

Делеція п'ятого екзона гена *bcr/abl* при гострому лімфобластному лейкозі з філадельфійською хромосомою

Г. Д. Телегесєв, М. В. Дибков, Г. М. Дубровська, С. С. Малюта

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Секвенування 3–8 екзонів гібридного гена *bcr/abl* дозволило виявити делецію п'ятого екзона (108 нуклеотидів) у хворого на гострий лімфобластний лейкоз з розривом у ділянці *M-bcr*. Обговорюється роль подібних порушень у розвитку лейкозів з філадельфійською хромосомою.

Вступ. Філадельфійська хромосома (Ph') була першою виявленою хромосомною аномалією, пов'язаною з пухлинним захворюванням, а саме — хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) [1]. Пізніше вона була охарактеризована як продукт реципрокної транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ [2], внаслідок якої утворюються два гібридних гени — ген *bcr/abl* на 22-й Ph' хромосомі та ген *abl/bcr* на 9q⁺ хромосомі. Як показали численні експерименти, саме продукт гена *bcr/abl* обумовлює розвиток пухлинного фенотипу [3–5]. Філадельфійська хромосома виявляється при ХМЛ у більше ніж 95 % випадків, а також при гострому лімфобластному лейкозі (ГЛЛ) та в разі деяких лімфом та мієлом [4].

До групи хворих на гострі лейкози з Ph' входять, за різними даними, від 10 до 55 % дорослих і 2–10 % дітей від загальної кількості випадків цієї патології [4, 6].

Як відомо, розриви в гені *bcr* відбуваються переважно в трьох ділянках — *M-bcr*, *m-bcr* і *μ-bcr* (рис. 1) [4, 7]. Поруч з цим мають місце і розриви в інших ділянках цього гена — між *m-bcr* та *M-bcr* [4, 8, 9]. Утворення гібридного гена *bcr/abl* при цьому зумовлює перебіг мієлоїдного та лімфоїдного типів лейкозу.

Випадки розвитку ГЛЛ з перебудовою в *M-bcr* та *m-bcr*, незважаючи на різні функціональні білки

(p190 та p210), за клінічною картиною не відрізняються у дорослих, у той час як у дітей перебіг захворювання з різним місцем розриву має відмінності [4, 10]. Якщо перебудова в *m-bcr* обумовлює переважно гострий перебіг захворювання, то чим обумовлений подібний перебіг хвороби при точці розриву в *M-bcr*? Поруч з можливими факторами, які не стосуються гібридного гена (білка) *bcr/abl*, зміни в самому гені (білку), а саме — в ділянці, що відрізняє ген *m-bcr/abl* від гена *M-bcr/abl*, вірогідно, й обумовлюють різний перебіг захворювання.

Матеріали і методи. В роботі використано зразки крові хворих на ГЛЛ, що проходили лікування в гематологічних клініках Києва. РНК виділяли за [11]. кДНК синтезували за допомогою праймера A₁ (5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGG-A-3') (рис. 2). Реакційна суміш загальним об'ємом 40 мкл містила 2 мкг РНК, 10 пМ праймера A₁, 20 одиниць зворотної транскриптази M-MLV («Gibco»BRL, США), 10–20 од. РНазину, 1 мМ dNTP, буфер для зворотної транскриптази. Синтез проводили при температурі 37 °C протягом 1 год.

Аліквоту реакційної суміші (5 мкл) використовували для здійснення ампліфікації. Ph'-хромосому виявляли за [12]. Ампліфікацію *dbl* ділянки проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у два етапи. На першому етапі використовували праймери *ext1 dbl* (5'-GGCTGCCCTACAT-TGATGACTCGC-3') та *ext-r1 dbl* (5'-GATGTTG-GGCACTGCCCTCCAGTTC-3') — 30 циклів: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 1,5 хв. На другому

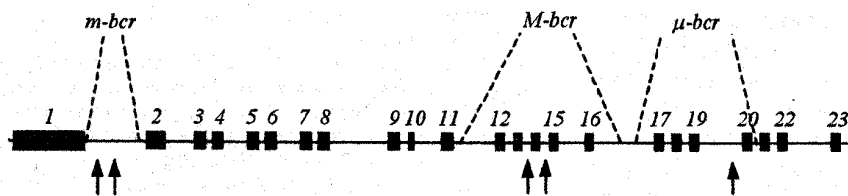


Рис. 1. Можливі місця розривів у гені *bcr* при різних *bcr/abl* перебудовах (за [7]). Цифри — номери екзонів

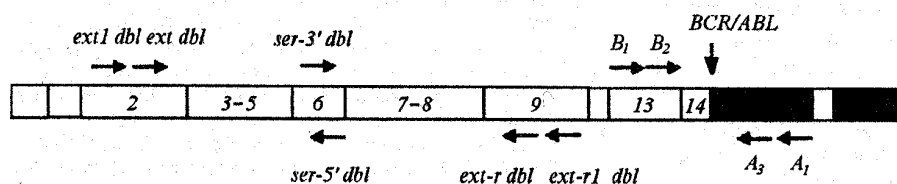


Рис. 2. Схематичне зображення мРНК *bcr/abl*. Стрілками показано праймери, які використані для одержання кДНК, ампліфікації та секвенування досліджуваної ділянки. Пронумеровано ділянки, які відповідають ексонам гену *bcr*

етапі брали 1 мкл реакційної суміші і здійснювали ампліфікацію з використанням праймерів *ext dbi* (5'-AAGCTTGCCTGGAGTCCACTAAAG-3') та *ext-r dbi* (5'-GAATTCTGCCTCCAGTTCATCCAC-3') за аналогічних умов (рис. 2). Отриманий продукт обробляли фрагментом Кленова («MBI Fermentas», Литва) у присутності 0,2 мМ dNTP протягом 15 хв при 37 °С. Після переосадження етанолом зразок обробляли полінуклеотидкіназою фага T4 («MBI Fermentas») у присутності 1 мМ АТР (30 хв при 37 °С. Далі проводили фенол-хлороформне очищення за [13]. Отриманий фрагмент клонували по тупих кінцях у вектор *pUC19*, розщеплений ферментом *HincII*, за допомогою T4 ДНК-лігази («MBI Fermentas»). Для трансформації використовували компетентні клітини XL1-Blue MRF' Кап («Stratagene», США). Трансформацію проводили, як у роботі [14]. Плазмідні з рекомбінантних клонів виділяли за [15]. Реакцію секвенування здійснювали за допомогою набору «³²P-Sequencing KIT» («Amersham», Велика Британія) за умов, що рекомендовані виробником, з використанням стандартних прямого та зворотного M13 праймерів *ser-3' dbi* (5'-CCAGAAGCAACAAGATGCC-3'), а також праймерів *ser-5' dbi* (5'-GCATCTTTGTTGCTTCTGGC-3') (рис. 2).

Результати і обговорення. Початковою метою роботи було виявлення Ph' хромосоми з розривом у ділянці *M-bcr* у хворих на ГЛЛ (тобто гібридні гени містять 2—12-й екзони гену *bcr*). Це було здійснено за допомогою ПЛР кДНК з використанням двох пар праймерів — B_1/A_1 та B_2/A_3 (рис. 2) [12]. Далі проводили ПЛР кДНК з використанням

пар праймерів *ext1dbi/ext-r1dbi* та *extdbi/ext-rdbi* (рис. 2). Отриманий продукт було клонувано в плазміді *pUC19*. При аналізі одержаних клонів виявлено клон, розмір клонованого фрагмента в якому відрізнявся від очікуваного. Даний клон було просеквенувано і виявлено делецію 108 нуклеотидів. При порівнянні з послідовністю гену *bcr* встановлено, що делетована ділянка відповідає п'ятому екзона цього гену. На молекулярному рівні показано, що розрив у гені *bcr* при ГЛЛ переважно відбувається у двох ділянках: *M-bcr* (major breakpoint cluster region) з утворенням перебудов екзон 13 *bcr*/екзон 2 *abl* чи екзон 14 *bcr*/екзон 2 *abl* (рис. 1) (приблизно у 30 % випадків) та *m-bcr* (minor-*bcr*) з формуванням екзон 1 *bcr*/екзон 2 *abl* перебудови (70 % випадків). У першому випадку утворюється білок p210 BCR/ABL, у другому — білок p190 BCR/ABL [16].

Водночас з експресією гену p210 *bcr/abl* при ХМЛ нерідко детектується також і продукт гену p190 *bcr/abl*. Ця експресія спостерігається більш ніж у 50—70 % пацієнтів, хворих на ХМЛ [17], більш ніж у 65 % хворих на ХМЛ на стадії акселерації і в усіх проаналізованих хворих на стадії бластного кризу [17, 18]. Показано також, що якщо при ХМЛ співвідношення p190 до p210 становить $2 \cdot 10^{-4}$, то при ГЛЛ з точкою розриву в *M-bcr* воно доходить до $2 \cdot 10^{-3}$ [19]. Складається враження, що зміна спектра різних функціонуючих молекул BCR/ABL обумовлює різний перебіг захворювання, особливо з огляду на вплив доменів білка p210, що відсутні в білку p190, на актиновий цитоскелет [20]. Тому цілком імовірно, що мутації

в цій ділянці гібридного p210 призводять до утворення клонів, функціонально подібних до p190. Ці зміни в ділянці *bcr* обумовлюються особливостями формування гібридного гена *bcr/abl* та впливом другого екзона гена *abl*, який є фактором, що посилює альтернативний сплайсинг у лейкозних клітинах [21]. Відомо, що абераційний сплайсинг призводить до різних клітинних порушень як непухлинної [22], так і пухлинної природи [23—27], зокрема, неопластичних захворювань крові [28—31]. З урахуванням цього описана нами делеція екзона в гібридному гені *bcr/abl* виглядає як варіант реалізації альтернативного сплайсингу, який може підсилювати дану патологію.

Робота була проведена за часткової підтримки гранту UB1-294 Уряду України та Фонду цивільних досліджень та розвитку (CRDF, США), а також Державного фонду фундаментальних досліджень (проект 5/4.64).

G. D. Teleguev, M. V. Dybkov, A. N. Dubrovskaya, S. S. Maliuta

Deletion of the fifth exon of *bcr/abl* gene by acute lymphoblastic leukaemia with Ph' chromosome

Summary

Sequencing of 3—8 exons of *bcr/abl* hybrid gene detected of 5th exon excision (108 nucleotide) in patient with acute lymphoblastic leukaemia with breakpoint in *M-bcr*. Possible role of such disturbance in development of Ph' leukaemia is discussed.

Г. Д. Телегеев, М. В. Дыбков, А. Н. Дубровская, С. С. Малиута

Делеция пятого экзона гена *bcr/abl* при остром лимфобластном лейкозе с филадельфийской хромосомой

Резюме

Секвенирование 3—8 экзонов гибридного гена *bcr/abl* позволило выявить делецию пятого экзона (108 нуклеотидов) у больного с острым лимфобластным лейкозом с точкой разрыва в *M-bcr*. Обсуждается возможная роль подобных нарушений в развитии лейкозов с филадельфийской хромосомой.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science*.—1960.—132.—P. 1497—1499.
2. Rowley J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // *Nature*.—1973.—243, N 5405.—P. 290—293.
3. Телегеев Г. Д., Дубровская А. Н., Дыбков М. В. Роль белка BCR/ABL в лейкозогенезе // *Эксперим. онкология*.—1999.—21, № 3—4.—С. 182—194.
4. Melo J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype // *Blood*.—1996.—88, N 7.—P. 2375—2384.
5. Gishizky M. L. Molecular mechanisms of Bcr-Abl-induced oncogenesis // *Cytokines Mol. Ther.*—1996.—2, N 4.—P. 251—261.
6. Maurer J., Janssen J. W., Thiel E., van Denderen J., Ludwig W. D., Aydemir U., Heinze B., Fonatsch C., Harbott J., Reiter A. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction // *Lancet*.—1991.—337, N 8749.—P. 1055—1058.
7. Pane F., Frigeri F., Sindona M., Luciano L., Ferrara F., Cimino R., Meloni G., Saglio G., Salvatore F., Rotoli B. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker // *Blood*.—1996.—88, N 7.—P. 2410—2414.
8. Hochhaus A., Reiter A., Skladny H., Melo J. V., Sick C., Berger U., Guo J. Q., Arlinghaus R. B., Hehlmann R., Goldman J. M., Cross N. C. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia // *Blood*.—1996.—88, N 6.—P. 2236—2240.
9. Negrini M., Tallarico A., Pazzi I., Castagnoli A., Cuneo A., Castoldi G. L. A new chromosomal breakpoint in Ph positive, bcr negative chronic myelogenous leukemia. Report of a case // *Cancer Genet. and Cytogenet.*—1992.—61, N 1.—P. 11—13.
10. Suryanarayan K., Hunger S. P., Kohler S., Carroll A. J., Crist W., Link M. P., Cleary M. L. Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias // *Blood*.—1991.—77, N 2.—P. 324—330.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.*—1987.—162.—P. 156—159.
12. Телегеев Г. Д., Дыбков М. В., Божко М. В., Третьяк Н. М., Малиута С. С. Використання молекулярно-біологічних методів для виявлення філадельфійської хромосоми у хворих на лейкози // *Биополимеры и клетка*.—1996.—12, № 6.—С. 63—68.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование.—М.: «Мир», 1984.—480 с.
14. Mandel M., Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection // *J. Mol. Biol.*—1970.—53.—P. 154.
15. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7, N 6.—P. 1513—1523.
16. Westbrook C. A., Hooberman A. L., Spino C., Dodge R. K., Larson R. A., Davey F., Wurster-Hill D. H., Sobol R. E., Schiffer C., Bloomfield C. D. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762) // *Blood*.—1992.—80, N 12.—P. 2983—2990.
17. Lichty B. D., Keating A., Callum J., Yee K., Croxford R., Corpus G., Nwachukwu B., Kim P., Guo J., Kamel-Reid S. Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia // *Brit. J. Haematol.*—1998.—103, N 3.—P. 711—715.
18. Saglio G., Pane F., Gottardi E., Frigeri F., Buonaiuto M. R., Guerrasio A., de Micheli D., Parziale A., Fornaci M. N., Martinelli G., Salvatore F. Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis // *Blood*.—1996.—87, N 3.—P. 1075—1080.
19. Van Rhee F., Hochhaus A., Lin F., Melo J. V., Goldman J. M., Cross N. C. p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias // *Blood*.—1996.—87, N 12.—P. 5213—5217.
20. McWhirter J. R., Wang J. Y. Effect of Bcr sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein // *Oncogene*.—1997.—15, N 14.—P. 1625—1634.

21. Lichty B. D., Kamel-Reid S. Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2 // *Biochem J.*—2000.—348, N 1.—P. 63—69.
22. Lin C. L., Bristol L. A., Jin L., Dykes-Hoberg M., Crawford T., Clawson L., Rothstein J. D. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis // *Neuron.*—1998.—20, N 3.—P. 589—602.
23. Carstens R. P., Eaton J. V., Krigman H. R., Walther P. J., Garcia-Blanco M. A. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) in human prostate cancer // *Oncogene.*—1997.—15, N 25.—P. 3059—3065.
24. Noordzij M. A., van Steenbrugge G. J., Verkaik N. S. The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy // *Clin. Cancer Res.*—1997.—3, N 5.—P. 805—815.
25. Saito H., Nakatsuru S., Inazawa J., Nishihira T., Park J. G., Nakamura Y. Frequent association of alternative splicing of NER, a nuclear hormone receptor gene in cancer tissues // *Oncogene.*—1997.—14, N 5.—P. 617—621.
26. Van Dijk M. A., Floore A. N., Kloppenborg K. I., van't Veer L. J. A functional assay in yeast for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma // *Cancer Res.*—1997.—57, N 16.—P. 3478—3485.
27. Kim J., Lee K., Pelletier J. The desmoplastic small round cell tumor t(11;22) translocation produces EWS/WT1 isoforms with differing oncogenic properties // *Oncogene.*—1998.—16, N 15.—P. 1973—1979.
28. Biondi A., Rambaldi A., Rossi V., Elia L., Caslini C., Basso G., Battista R., Barbui T., Mandelli F., Masera G. Detection of ALL-1/AF4 fusion transcript by reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring of acute leukemias with the t(4;11) translocation // *Blood.*—1993.—82, N 10.—P. 2943—2947.
29. Silliman C. C., McGavran L., Wei Q., Miller L. A., Li S., Hunger S. P. Alternative splicing in wild-type AF10 and CALM cDNAs and in AF10-CALM and CALM-AF10 fusion cDNAs produced by the t(10;11)(p13-14;q14-q21) suggests a potential role for truncated AF10 polypeptides // *Leukemia.*—1998.—12, N 9.—P. 1404—1410.
30. Van der Reijden B. A., van Ommen G. J., Hagemeijer A., Breuning M. H. Acute myelogenous leukemia: a disorder of gene splicing // *Leukemia.*—1996.—10, N 2.—P. 204—206.
31. Costello R., Sainy D., Lecine P., Cusenier A., Mozziconacci M. J., Arnoulet C., Maraninchi D., Gastaut J. A., Imbert J., Lafage-Pochitaloff M., Gabert J. Detection of CBFbeta/MYH11 fusion transcripts in acute myeloid leukemia: heterogeneity of cytological and molecular characteristics // *Leukemia.*—1997.—11, N 5.—P. 644—650.

УДК 616-006:577.2.575

Надійшла до редакції 17.04.2000

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

БІОПОЛІМЕРИ І КЛІТИНА



НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

ТОМ 17 №4 2001

ЛИПЕНЬ—СЕРПЕНЬ

ЗАСНОВАНИЙ У СІЧНІ 1985

ВИХОДИТЬ 6 РАЗІВ НА РІК

КИЇВ

З М І С Т

Огляди

ЛУКАШ Л. Л., МАНЬКО В. Г., ЛИЛО В. В. Роль O^6 -алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в репарації ушкоджень, індукованих алкілюючими сполуками 265

Структура і функції біополімерів

КОМАРНИЦЬКИЙ С. І., КОМАРНИЦЬКИЙ І. К. Філогенетичне дерево австралійських видів роду *Nicotiana* на основі ампліфікації випадково поліморфної ДНК 278

КОЗЛОВ Е. А., ЛЕВІТІНА Т. Л., БОБРОВСЬКА М. Т., ОВАНДЕР М. М., ГУДКОВА Л. В., ЛАТИШКО Н. В. Ревізія структури триптичних пептидів і бромціанових фрагментів каталази гриба *Penicillium vitale* 283

ЛИМАНСЬКИЙ О. П. Дослідження аміномодифікованої слюди як субстрату для атомно-силової мікроскопії нуклеїнових кислот 292

ТЕЛЕГЕСВ Г. Д., ДИБКОВ М. В., ДУБРОВСЬКА Г. М., МАЛЮТА С. С. Делеція п'ятого екзону гена *bcr/abl* при гострому лімфобластному лейкозі з філадельфійською хромосомою 298

Геном і його регуляція

КВАША С. М., ПРОТОПОПОВ А. І., ЗАБАРОВСЬКИЙ Е. Р., РИНДИЧ А. В., КАШУБА В. І. Ізолювання, аналіз експресії та хромосомне картування нового гена кінази людини *MLK4* 302

Віруси і клітина

ДІДЕНКО Л. Ф., МАКСИМЕНКО Л. А., ПАРХОМЕНКО Н. І., ДЯЧЕНКО Н. С., ВАРБАНЕЦЬ Л. Д., БРОВАРСЬКА О. С., ЗАРИЦЬКИЙ Н. М. Деякі властивості структурних компонентів фігорабдовірусу кучерявої карликової картоплі 308

БОЙКО А. Л., КИР'ЯЧЕНКО С. С., ЮДІНА О. Ю., САВЦОВА З. Д. Вплив вірусу тютюнової мозаїки та його РНК на культури клітин різного походження 314

Біомедицина

МАКУХ Г. В., КОЧЕВА С., ЗАСТАВНА Д. В., КОРНІЄНКОЮ. О., ГНАТЕЙКО О. З. Скринінг мутацій гена ТРБМ методом електрофорезу в денатуруючому градієнтному гелі в осіб високого ризику муковісцидозу із Західного регіону України 319

Біоорганічна хімія

ДУБЕЙ І. Я., ДУБЕЙ Л. В. Препаративний синтез та деякі властивості дезоксирибозилсечовини, продукта окислювальної деградації ДНК 325

ЛУКАШОВ С. С., КАЧКОВСЬКИЙ Г. О., ЯРМОЛЮК С. М., МАЦУКА Г. Х. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. 23. Комп'ютерне моделювання «напівінтеркаляційної» взаємодії монометинових ціанінових барвників з GСТА:TAGC-фрагментом ДНК 331

Короткі повідомлення

ВАГІН Ю. В. Роль гена *aleutian* в онтогенезі *Mustela vison*. 4. Вплив величин послідів і дат народження щенят на розщеплення у потомстві *ppAa* самиць і *ppaa* самців норок 337

Ювілеї

Ювілей Віталія Арнольдовича КОРДЮМА 341