

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

Г. Д. Телегєєв, 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  $\mu$ -*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  $A_1$  (5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGG-A-3') (рис. 2). Реакційна суміш загальним об'ємом 40 мкл містила 2 мкг РНК, 10 пМ праймера  $A_1$ , 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'-GATGTTGGCACTGCCCTCCAGTTC-3') — 30 циклів: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 1,5 хв. На другому

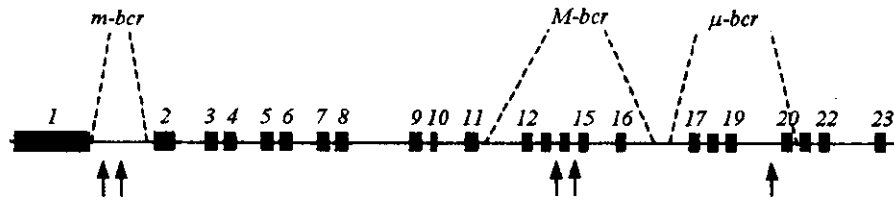


Рис. 1. Можливі місця розривів у гені *bcr* при різних *bcr/abl* перебудовах (за [7]). Цифри — номери екзонів

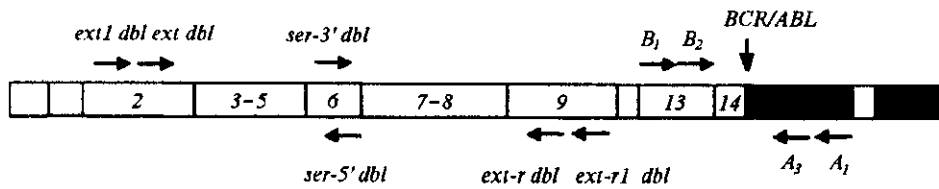


Рис. 2. Схематичне зображення мРНК *bcr/abl*. Стрілками показано праймери, які використані для одержання кДНК, ампліфікації та секвенування досліджуваної ділянки. Пронумеровано ділянки, які відповідають ексонам гену *bcr*

етапі брали 1 мкл реакційної суміші і здійснювали ампліфікацію з використанням праймерів *ext dbl* (5'-AAGCTTGCCCTGGAGTCCACTAAAG-3') та *ext-r dbl* (5'-GAATTCTGCCTCCAGTTCATCCAC-3') за аналогічних умов (рис. 2). Отриманий продукт обробляли фрагментом Кленова («МВІ Fermentas», Литва) у присутності 0,2 мМ dNTP протягом 15 хв при 37 °С. Після переосадження етанолом зразок обробляли полінуклеотидкіназою фага Т4 («МВІ 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 Т4 ДНК-лігази («МВІ Fermentas»). Для трансформації використовували компетентні клітини XLI-Blue MRF' Кап («Stratagene», США). Трансформацію проводили, як у роботі [14]. Плазмідні з рекомбінантних клонів виділяли за [15]. Реакцію секвенування здійснювали за допомогою набору «<sup>32</sup>P-Sequencing KIT» («Amersham», Велика Британія) за умов, що рекомендовані виробником, з використанням стандартних прямого та зворотного M13 праймерів *ser-3' dbl* (5'-CCAGAAGCAACAAGATGCC-3'), а також праймерів *ser-5' dbl* (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 *ext1dbl/ext-r1dbl* та *extdbl/ext-rdbl* (рис. 2). Отриманий продукт було клоновано 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 екзону 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. Telegeev, M. V. Dybkov, A. N. Dubrovskaya, S. S. Maliuta

Deletion of the fifth exon of *bcr/abl* gene by acute lymphoblastic leukemia with Ph<sup>+</sup> chromosome

#### Summary

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

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

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

6. 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. *Castello R., Sainty 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