

УДК 616-006.446.8

ДЕТЕКЦИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНОВ KRAS И NRAS ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© А. В. Виноградов*, А. В. Резайкин, А. Г. Сергеев

Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Россия, 620028 г. Екатеринбург, ул. Ретина, 3.

Тел.: +7 (343) 268 36 48.

Email: vinogradov-av@russia.ru

Цель исследования – разработать технологию детекции и определить частоту точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. Установлено, что функционально значимые мутации генов KRAS и NRAS обнаруживались, соответственно, в 7.1% и 12.9% проб при морфологических вариантах ОМЛ M0, M2, M4 и M7. Наряду с мутациями генов семейства RAS, в 77.8% образцов определялись точечные мутации генов NPM1, KIT, специфические, неслучайные и комплексные хромосомные aberrации. Во всех наблюдениях наличие мутаций генов KRAS и NRAS ассоциировалось с низкой эффективностью программной полихимиотерапии и неблагоприятным прогнозом ОМЛ.

Ключевые слова: точечная мутация, острый миелоидный лейкоз, гены KRAS, NRAS, прямое автоматическое секвенирование.

Актуальность

Гены семейства RAS (KRAS – район 12p12.1, NRAS – 1p13.2) представляют собой протоонкогены, кодирующие белковые продукты, обладающие ГТФ-азной активностью и участвующие в Ras-Raf-MEK-ERK сигнальном пути внутриклеточной сигнализации. Передача сигнала по Ras-Raf-MEK-ERK-пути приводит к выживанию, пролиферации и увеличению подвижности гемопоэтических клеток в ответ на внеклеточные сигналы, поступающие через рецепторные тирозинкиназы либо рецепторы цитоплазматической мембраны, ассоциированные с G-белками. Мутации генов KRAS и NRAS являются одним из наиболее распространенных вторичных генетических событий при острых миелоидных лейкозах, обуславливающих неблагоприятный прогноз, в т.ч. у больных с транслокацией t(8;21) и инверсией inv(16) [1, 2]. Однако, определение мутаций в генах KRAS и NRAS не нашло широкого применения в клинической онкогематологии из-за отсутствия доступных коммерческих диагностических наборов и алгоритма детекции.

Цель работы – разработать технологию детекции и определить частоту точечных мутаций в генах KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования.

Материалы и методы исследований

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 66 больных ОМЛ в возрасте от 18 до 82 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2008 по 2014 г. Среди них с морфологическим вариантом ОМЛ M0 по FAB-классификации наблюдалось трое пациентов, M1 – 3, M2 – 25, M3 – 7, M4 – 16, M4э – 2, M5 – 3, M6 – 4, M7 – 1, бластная плазматоидная дендритоклеточная опухоль – 1.

В исследуемой группе всем пациентам выполнено цитогенетическое (G-banding) и/или мо-

лекулярно-генетическое (полимеразная цепная реакция, ПЦР) исследование. Методом прямого автоматического секвенирования в 62 пробах исследованы на наличие молекулярных поврежденных экзоны 1–4 гена NRAS, в 14 – экзоны 1–4 гена KRAS. Кроме этого, в 61 образце методом прямого автоматического секвенирования исследованы на наличие мутаций экзоны 12–15 и 19–21 гена FLT3, в 57 – экзоны 9–12 гена NPM1, в 54 – экзоны 4–11 гена TP53, в 56 – экзоны 6–9 гена WT1 и экзоны 7–12, 16–19 гена KIT в соответствии с ранее описанной методикой [3].

Выделение тотальной РНК из лейкозных клеток проводили методом сорбции на силикагелевом носителе либо методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной (силикой) в миницентрифужной колонке с помощью комплекта реагентов "QIAamp RNA Blood Mini Kit" (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции с целью получения кДНК на мРНК проводили с использованием ревертазы M-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов ("РЕВЕРТА-Л", ФГБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Целевые участки исследуемых генов клонировали методом ПЦР в виде одного фрагмента с помощью праймеров, разработанных на основе депонированных в GenBank (NCBI) нуклеотидных последовательностей (NM_002524 и NM_033360 для гена KRAS, NM_004985 – для NRAS, соответственно) и описанных ранее [3, 4]. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Секвенирование кДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 по прямой и обратной последовательностям, согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводи-

ли с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0 [5].

Результаты исследований и их обсуждение

Точечные мутации гена NRAS выявлены в 8 пробах (12.9%), и были представлены во всех случаях несинонимичными нуклеотидными заменами, из них в 7 наблюдениях – по второй позиции кодирующего триплета, в одном – по первой. Морфологические варианты ОМЛ, при которых определялись мутации, соответствовали M0 (2 пробы), M2 (5 пациентов) и M7 (1 случай). При этом у 6 пациентов мутации гена NRAS определялись как вторичные при наличии выявляемых цитогенетически или методом ПЦР специфических (транслокации t(8;21), t(3;3)), неслучайных (делеция del(5q), транслокация t(3;12)) или комплексных аномалий кариотипа. В двух случаях (морфологические варианты M2 и M7) мутации гена NRAS (соответственно, A188T и A182C) определялись при диплоидном кариотипе и отсутствии химерных генов, определяемых методом ПЦР. Кроме того, в одном образце (ОМЛ M2 с транслокацией t(8;21) и транзицией G38A в гене NRAS) методом прямого автоматического секвенирования определялась делеция в гене KIT, тогда как во всех остальных NRAS-положительных пробах функционально значимые мутации генов TP53, FLT3, KIT, NPM1 и WT1 не выявлялись.

Во всех наблюдениях NRAS-положительные пациенты имели неблагоприятный прогноз ОМЛ. Течение заболевания характеризовалось у них развитием первичной резистентности при проведении программной полихимиотерапии (5 наблюдений), ранней летальности (2 пациента) и рецидивов (1 случай). Так, при ОМЛ M2-базо, резистентном к программной полихимиотерапии, трансверсия A182C в гене NRAS определялась четырехкратно в пробах костного мозга и периферической крови пациента как в дебюте заболевания, так и на протяжении 10 месяцев программного лечения. Кариотип лейкозных клеток при этом изменился с 47, XY,+13[11] в дебюте на 47, XY,+13[11]/ 47, XY,+mar(16?)[3]/ 46, XY,del(5)(p1.3-1.5)[3] /46, XY[3] после проведения двух курсов интенсивной полихимиотерапии. Еще в двух случаях (в дебюте ОМЛ M2 с транслокацией t(3;3) и ОМЛ M7 с диплоидией, резистентных к программной химиотерапии) мутации G38A и A182C в гене NRAS определялись параллельно в содержащих лейкоэмические клетки образцах периферической крови и костного мозга. В одном наблюдении, при ОМЛ M2 с диплоидией, мутация A188C не определялась в пробе периферической крови (бластемия 90% при гиперлейкоцитозе 37000/мкл) в дебюте заболевания, однако была выявлена в аспирате костного мозга при позднем рецидиве.

Точечные мутации гена KRAS определялись в одном случае (7.1%) при остром миеломонобластном лейкозе (ОМЛ M4), который развился в исходе хронического миеломоноцитарного лейкоза, и бы-

ли представлены двумя функционально значимыми несинонимичными трансверсиями G88C и A311C по первой и второй позициям кодирующих триплетов, соответственно. Параллельно в этом же образце периферической крови методом прямого автоматического секвенирования определялась тетра-нуклеотидная инсерция в экзоне 12 гена NPM1 (инсерция типа A), приводящая к появлению в белке Npm1 дополнительного сигнала ядерного экспорта и являющаяся, как правило, первичным молекулярно-генетическим событием при ОМЛ.

Таким образом, разработанная тест-система позволяет эффективно выявлять мутации генов KRAS и NRAS в образцах периферической крови и костного мозга больных ОМЛ с частотой, сопоставимой с данными международных исследований [2], и может применяться в качестве дополнительного метода исследования на этапе генодиагностики и стратификации прогноза при ОМЛ.

Выводы

1) Средние частоты точечных мутаций, определявшихся в экзонах 1–4 генов KRAS и NRAS методом прямого автоматического секвенирования, составляли при ОМЛ 7.1% и 12.9% соответственно.

2) Наряду с мутациями генов семейства RAS, в большинстве RAS-положительных проб (77.8%) определялись также специфические, неслучайные и комплексные хромосомные aberrации, а также точечные мутации генов KIT и NPM1, что может свидетельствовать о вторичном характере мутаций генов семейства RAS. Однако в двух NRAS-положительных образцах выявить какие-либо дополнительные мутации с использованием цитогенетического метода, ПЦР и прямого автоматического секвенирования не удалось.

3) Наличие мутаций в экзонах 1–4 генов KRAS и NRAS ассоциировалось с низкой эффективностью программной полихимиотерапии и неблагоприятным прогнозом ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia // NEJM. 2013. Vol. 368. N. 22. P. 2059–2074.
2. Ward A. F., Braun B. S., Shannon K. M. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies // Blood. Vol. 120. N.17. P. 3397–3406.
3. Виноградов А. В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах // Российский онкологический журнал. 2013. №4. С. 34–35.
4. Виноградов А. В. Детекция мутаций генов тирозинкиназных рецепторов и белков Ras при острых миелоидных лейкозах со специфическими хромосомными aberrациями // Материалы IX научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Завадские чтения», 22 марта 2014 г., Р-н/Д. С. 46–49.
5. Tamura K., Peterson D., Peterson N. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. No. 10. P. 2731–2739.

Поступила в редакцию 23.09.2014 г.

KRAS AND NRAS GENES POINT MUTATIONS DETECTION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS USING SEQUENCING TECHNIQUE

© A. V. Vinogradov*, A. V. Rezaikin, A. G. Sergeev

*Ural State Medical University
3 Repin St., 620028 Ekaterinburg, Russia.*

Phone: +7 (343) 268 36 48.

**Email: vinogradov-av@russia.ru*

The aim of the study is to elaborate the diagnostic kit for the sequence analysis of KRAS and NRAS genes in acute myeloid leukemia (AML) patients (pts). Bone marrow and peripheral blood samples were obtained from 66 AML pts aged 18 to 82, who were treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2008 – 2014. Distribution of the pts according to FAB-classification was as follows: AML M0 – 3, M1 – 3, M2 – 25, M3 – 7, M4 – 16, M4eo – 2, M5 – 3, M6 – 4, M7 – 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm – 1. Total RNA was extracted from leukemic cells and subjected to reverse transcription. NRAS gene exons 1–4 and KRAS gene exons 1–4 were amplified by PCR. Detection of mutations in NRAS and KRAS genes was performed by direct sequencing. Sequencing was realized using an automatic genetic analyzer ABI Prism 310. The average frequency of functionally significant mutations in KRAS and NRAS gene among the treated AML pts was 7.1% and 12.9%, respectively, and varied in different morphologic, cytogenetic subgroups and in the presence of other genetic abnormalities. Thus, they were detected only in 4 morphological subgroups: AML M0, M2, M4 and M7. In 77.8% there were samples in which RAS genes mutations were accompanied by molecular and chromosomal abnormalities such as specific translocations t(8;21)(q22;q22) and t(3;3)(q21;q26), non-random deletion del(5q) and translocation t(3;12)(q25;p13), NPM1 gene exon 12 insertions and KIT gene deletions and complex karyotype lesions. AML pts with NRAS and KRAS genes mutations characterized by poor response to standard chemotherapeutic regimens and unfavorable prognosis.

Keywords: *acute myeloid leukemia, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, KRAS, NRAS, mutation, sequencing.*

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia NEJM. 2013. Vol. 368. N. 22. Pp. 2059–2074.
2. Ward A. F., Braun B. S., Shannon K. M. Blood. Vol. 120. N.17. Pp. 3397–3406.
3. Vinogradov A. V. Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. 2013. No. 4. Pp. 34–35.
4. Vinogradov A. V. Materialy IX nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiem «Zavadskie chteniya», 22 marta 2014 g., R-n/D. Pp. 46–49.
5. Tamura K., Peterson D., Peterson N. Mol. Biol. Evol. 2011. Vol. 28. No. 10. Pp. 2731–2739.

Received 23.09.2014.