



УДК 577.29

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМЕРНОГО ТРАНСКРИПТА *NUP98-NSD1* ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

© 2021 г. А. А. Бессонова\*, Л. Г. Гукасян\*, Л. В. Байдун\*\*, А. В. Чудинов\*, Т. В. Наседкина\*.\*

\*ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

\*\*Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 119117 Москва, Ленинский просп., 117

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 20.12.2020 г.

Принята к публикации 26.12.2020 г.

Разработан и оптимизирован метод анализа на основе обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции и аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе для определения химерного транскрипта *NUP98-NSD1* в образцах костного мозга при остром миелоидном лейкозе у детей.

*Ключевые слова:* острый миелоидный лейкоз, химерный ген *NUP98-NSD1*, биологический микрочип, диагностика

**DOI:** 10.31857/S0132342321060051

### ВВЕДЕНИЕ

Образование химерного гена *NUP98-NSD1* происходит в результате транслокации t(5;11) (q35.2;p15.4), которая встречается при остром миелоидном лейкозе у детей в 3.8% случаев [1]. Данная транслокация – криптогенная, пациенты с такой перестройкой, как правило, относятся к группе острого миелоидного лейкоза с нормальным кариотипом [2]. При экспрессии перестроенного гена образуется химерный транскрипт *NUP98-NSD1*, в котором 12-й экзон гена *NUP98* N-концом соединяется с 6-м экзоном C-конца гена *NSD1*. Образуется химерный белок, в котором одна часть аминокислотной последовательности относится к белку нуклеопорину 98 (NUP98), а другая часть – к белку 1 с доменом SET, связывающим ядерный рецептор (NSD1), который входит в семейство гистоновых метилтрансфераз [3]. Считается, что наличие химерного гена *NUP98-NSD1* – неблагоприятный фактор течения заболевания, еще более ухудшает прогноз присутствие реципрокной транслокации *NSD1-NUP98* [4].

Сложность обнаружения перестройки t(5;11) *NUP98-NSD1* заключается в том, что данная транслокация не может быть выявлена при стандартном цитогенетическом исследовании. Для определения *NUP98-NSD1* используют, как пра-

вило, молекулярные методы анализа, такие как FISH, обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), ПЦР в реальном времени [5]. Однако данная транслокация – не частое событие, и она, как правило, не входит в число мишеней в диагностических наборах для скрининга транслокаций при лейкозах. В то же время постановка дополнительных индивидуальных реакций ОТ-ПЦР на редкие транслокации, выявляемые у небольшого количества пациентов, требует затрат времени, реагентов и самого образца.

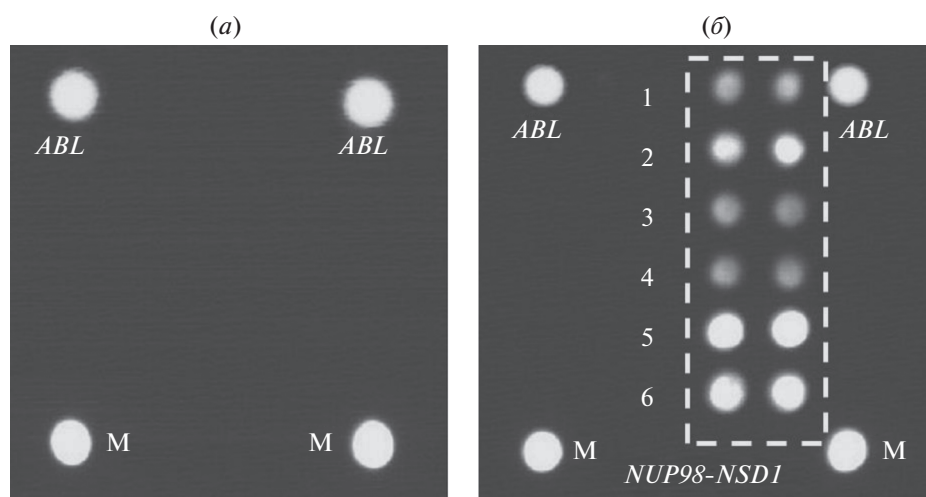
Параллельное выявление множества молекулярных мишеней с помощью гидрогелевых биологических микрочипов показало себя эффективным для анализа 22 наиболее известных клинически значимых хромосомных транслокаций при лейкозах у детей [6]. Поэтому данный подход был применен для определения транслокации *NUP98-NSD1* в настоящей работе. Разработанный метод выявления химерного гена *NUP98-NSD1* позволит расширить панель анализируемых хромосомных перестроек и повысить специфичность молекулярной диагностики острого миелоидного лейкоза у детей [7].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

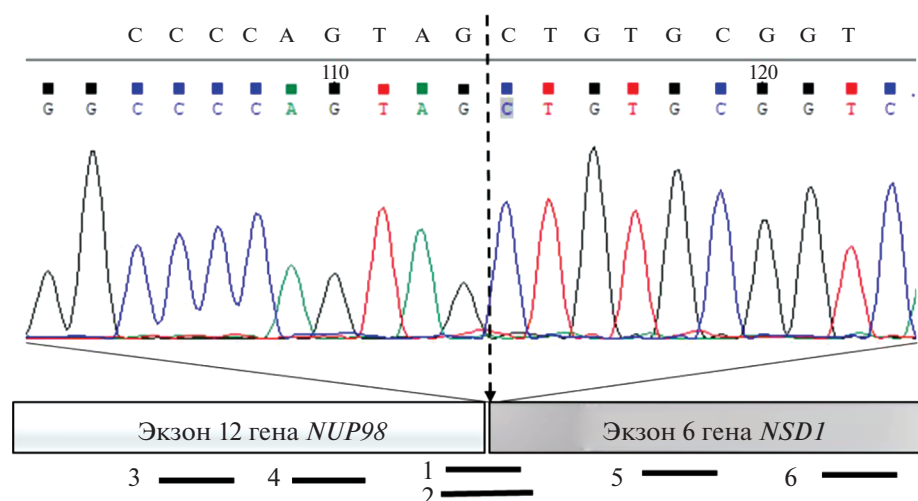
Для разработки метода использовали контрольные образцы РНК с ранее выявленным химерным транскриптом *NUP98-NSD1* (положительный контроль) и образец, не содержащий известных перестроек (отрицательный контроль).

Сокращения: NUP98 – нуклеопорин 98; NSD1 – белок 1 с доменом SET, связывающим ядерный рецептор.

\* Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-46; эл. почта: nased@biochip.ru).



**Рис. 1.** Картины гибридизации на биологическом микрочипе: (а) – образец без транслокации, наблюдаются флуоресцентные сигналы от ячеек, содержащих маркер (М) и зонды для контрольного гена *ABL*; (б) – образец, содержащий транслокацию *NUP98-NSD1*, 1, 2 – ячейки с зондом, комплементарным месту слияния двух генов (12-й экзон гена *NUP98* и 6-й экзон гена *NSD1*); 3, 4 и 5, 6 – ячейки с зондами, комплементарными последовательностям генов *NUP98* и *NSD1* соответственно; номера ячеек соответствуют номерам зондов в табл. 1.



**Рис. 2.** Результаты секвенирования химерного ПЦР-продукта *NUP98-NSD1*. Пунктирной линией обозначено место слияния 12-го экзона гена *NUP98* и 6-го экзона гена *NSD1*. Схематично представлено распределение зондов 1–6 по длине химерного ПЦР-продукта.

Методика анализа включала обратную транскрипцию с праймерами, специфичными для транслокаций, далее кДНК была использована в качестве матрицы в двухэтапной ПЦР. На втором этапе в ПЦР-смесь добавляли *Sy5-dUTP* и получали флуоресцентно-меченый ПЦР-продукт, который гибридизовали на биочипе с иммобилизованными зондами. Картины гибридизации для различных образцов представлены на рис. 1. Секвенирование ПЦР-продукта показало, что при образовании химерного транскрипта происходит слияние экзона 12 гена *NUP98* и экзона 6 гена *NSD1*

(рис. 2). Это соответствует картине гибридизации на биочипе. Последовательности зондов представлены в табл. 1. Наиболее яркое свечение наблюдается для зондов 2, 5 и 6, в дальнейшем эти зонды будут использованы для включения в расширенную панель для анализа транслокаций при лейкозах у детей.

Разработанный метод был использован для поиска химерного транскрипта *NUP98-NSD1* в образцах пациентов с острым миелоидным лейкозом (всего 36 образцов). Среди них для шести образцов были получены положительные флуо-

**Таблица 1.** Последовательности зондов, иммобилизованных на биочипе

№	Название	Последовательность (5'–3')	Длина, нт
1	NUP98j_1	CCCAGTAGCTGTGCGGTCA–NH <sub>2</sub>	19
2	NUP98j_2	CCCCAGTAGCTGTGCGGTCAAG–NH <sub>2</sub>	21
3	NUP98_1	CGACAGCCACTTTGGGCTTTGG–NH <sub>2</sub>	22
4	NUP98_2	GCCACTTTGGGCTTTGGAGCC–NH <sub>2</sub>	21
5	NSD1_1	TAGGAAGCCAAGCAAGTGGCT–NH <sub>2</sub>	21
6	NSD1_2	GAGAAGAAACGCCTTAGGAAGC–NH <sub>2</sub>	24
7	ABL1	TAATGGTACACCCTCCCTTC–NH <sub>2</sub>	20

ресцентные сигналы с *NUP98-NSD1*-зондами. Наличие химерного транскрипта также проверяли методом ОТ-ПЦР с последующим электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. Длина выявленного продукта в *NUP98-NSD1*-положительных образцах составила 550 нт, что соответствует расчетной длине химерного ПЦР-продукта, содержащего перестройку *NUP98-NSD1*.

Для определения аналитической чувствительности метода РНК с *NUP98-NSD1* смешивали в пропорциях 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000 с РНК, не содержащей данную перестройку, далее проводили анализ с использованием биочипа. Нижний предел обнаружения специфичных флуоресцентных сигналов для *NUP98-NSD1* соответствовал разведению исходной РНК в 1000 раз.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 36 образцов костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом. Возраст пациентов от 1 года до 18 лет. Фракцию лейкоцитов выделяли в результате гемолиза образцов костного мозга в 0,8%-ном растворе NH<sub>4</sub>Cl и центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин.

В ходе обратной транскрипции была синтезирована кДНК на матрице мРНК, выделенной из лейкоцитов костного мозга пациентов, с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Для получения кДНК химерного гена были подобраны праймеры, комплементарные участку экзона гена, расположенного на 3'-стороне химерного транскрипта. В качестве контроля выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР использовали ген домашнего хозяйства *ABL* (*ABL1*), который кодирует белок тирозин-протеинкиназу и экспрессируется во всех клетках. Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 25 мкл с использованием набора РЕВЕРТА-Л (АмплиСенс, Россия): 10 мкл RT-mix (АмплиСенс, Россия), 10 мкл РНК, 1 мкл ревертазы MMlv (АмплиСенс, Россия), 5 пмоль специфичного праймера и 20 пмоль праймера *ABL*. Для наработки одноце-

почечного меченого фрагмента ДНК для гибридизации на гидрогелевом микрочипе использовали метод “гнездовой” ПЦР в два этапа, как описано ранее [8]. ПЦР проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 95°C – 5 мин; далее 35 циклов: 95°C – 20 с, 62°C – 20 с, 72°C – 30 с; 72°C – 3 мин. В ходе первого этапа происходила наработка двухцепочечного продукта на основе кДНК, на втором этапе в реакционную смесь добавляли 1 мкл ПЦР-продукта первого этапа и проводили асимметричную ПЦР и флуоресцентное маркирование конечного ПЦР-продукта.

Последовательности праймеров для обратной транскрипции: *ABL1* ОТ 5'-GGACACACCATAG-ACAGT-3', *NSD1* ОТ 5'-CAAGAACTGGAGGC-3'.

Последовательности праймеров ПЦР этапа 1: *ABL1* Fex 5'-CAATGCCGCTGAGTATCTGCT-3', *NUP98* Fex 5'-GCTTGGTGACAGGAT-3' и *ABL1* Rex 5'-GCGTTCATCTCCCACTTGT-3', *NSD1* Rex 5'-GCTAGAAGGCTTTCCTCTTC-3'.

Последовательности праймеров ПЦР этапа 2: *ABL1* F 5'-AGCTTCTTGGTGCGTGAGAGT-3', *NUP98* F 5'-TGCTGGACAGGCATCT-3' и *ABL1* R 5'-GCCACCGTTGAATGATGATGA-3', *NSD1* R 5'-CTTACCTTGTGCACCTGCTC-3'.

Флуоресцентно-меченый продукт второго этапа ПЦР гибридизовали на биочипе. Биочипы изготавливали методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов акриламидного геля, как описано ранее [6, 8]. Последовательности зондов приведены в табл. 1. Гибридизационная смесь с общим объемом 35 мкл содержала 6× SSPE (Promega, США), 2 M раствор гуанидин-изотиоцианата и амплификат. Гибридизационную смесь полностью денатурировали при 95°C, быстро охлаждали на льду, наносили на биочип и инкубировали в течение 10–12 ч при 37°C. Затем биочип отмывали в растворе 1× SSPE в течение 10 мин при комнатной температуре и высушивали.

Флуоресцентные сигналы регистрировали с помощью анализатора биочипов (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия), анализ изображения проводи-

ли с помощью программы ImageWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием ПЦР-продукта первого этапа и праймера NUP98\_Fex или NSD1\_Rex в концентрации 5 пмоль.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод анализа с помощью биологического микрочипа специфично выявляет химерный транскрипт *NUP98-NSD1* в образцах костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом. Чувствительность метода такова, что позволяет обнаруживать одну лейкоэмическую клетку среди 1000 нормальных клеток, что позволяет проводить не только молекулярно-генетическую диагностику в острый период заболевания, но и мониторинг минимальной остаточной болезни в ходе лечения. Далее планируется включить разработанные наборы праймеров и зондов в состав диагностической тест-системы для определения клинически значимых транслокаций при лейкозах у детей.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00398).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От родителей пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Struski S., Lagarde S., Bories P., Puisieux C., Prade N., Cucchini W., Pages M.-P., Bidet A., Gervais C., Lafage-Pochitaloff M., Roche-Lestienne C., Barin C., Penther D., Nadal N., Radford-Weiss I., Collonge-Rame M.-A., Gaillard B., Mugneret F., Lefebvre C., Petit A., Leverger G., Broccardo C., Luquet I., Pasquet M., Delabesse E.* // *Leukemia*. 2017. V. 31. P. 565–572. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.267>
2. *Shiba N., Ichikawa H., Taki T., Park M.-J., Jo A., Mitani S., Kobayashi T., Shimada A., Sotomatsu M., Arakawa H., Adachi S., Tawa A., Horibe K., Tsuchida M., Hanada R., Tsukimoto I., Hayashi Y.* // *Genes Chromosomes Cancer*. 2013. V. 52. P. 683–693. <https://doi.org/10.1002/gcc.22064>
3. *Bennett R.L., Swaroop A., Troche C., Licht J.D.* // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2017. V. 7. P. a026708. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026708>
4. *Niktoreh N., Walter C., Zimmermann M., von Neuhoff C., von Neuhoff N., Rasche M., Waack K., Creutzig U., Hanenberg H., Reinhardt D.* // *J. Oncol*. 2019. V. 2019. P. 1609128. <https://doi.org/10.1155/2019/1609128>
5. *Nebral K., König M., Schmidt H.H., Lutz D., Sperr W.R., Kalwak K., Brugger S., Dworzak M.N., Haas O.A., Strehl S.* // *Haematologica*. 2005. V. 90. P. 746–752. <https://doi.org/10.3324/haematol.2005.90.7.746>
6. *Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Y., Zasedatelev A.S.* // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 4–18. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>
7. *Kivioja J.L., Thanasopoulou A., Kumar A., Kontro M., Yadav B., Majumder M.M., Javarappa K.K., Eldfors S., Schwaller J., Porkka K., Heckman C.A.* // *Leukemia*. 2019. V. 33. P. 1360–1372. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0327-2>
8. *Наседкина Т.В., Иконникова А.Ю., Цаур Г.А., Каратеева А.В., Аммура Ю.И., Авдоница М.А., Карачунский А.И., Заседателев А.С.* // *Мол. биология*. 2016. Т. 50. С. 968–977. <https://doi.org/10.7868/S0026898416060148>

## Detection of Chimeric Transcript *NUP98-NSD1* in Pediatric Acute Myeloid Leukemia

A. A. Bessonova\*, L. G. Ghukasyan\*, L. V. Baidun\*\*, A. V. Chudinov\*, and T. V. Nasedkina\*, #

#Phone: +7 (495) 135-98-46; e-mail: nased@biochip.ru

\*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

\*\*Russian Children's Clinical Hospital, Leninsky prosp. 117, Moscow, 119117 Russia

The method for identification of chimeric transcript *NUP98-NSD1* in acute myeloid leukemia in children has been developed and optimized based on combination of reverse transcription-polymerase chain reaction and allele-specific hybridization on biological microchip.

*Keywords: acute myeloid leukemia, chimeric gene NUP98-NSD1, biochip, diagnostics*