

Мутації *bcr/abl* гібридного гена як фактор пухлинної прогресії при хронічній мієлоїдній лейкемії

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

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

bcr/abl гібридний ген є невід'ємною характеристикою хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) і значної кількості випадків гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ). Саме експресія цього гена обумовлює початок чи один з етапів розвитку цих захворювань. На молекулярному рівні ХМЛ відрізняє від ГЛЛ наявність додаткових 3—10 екзонів (відповідно *Dbl*, *PH* домену) *bcr* частини гібридного гена/білка. Секвенуванням продуктів полімеразної ланцюгової реакції цієї області аналізували появу в ній мутацій під час бластної кризи, а виходячи з функції згаданого домену вивчали розподіл актину в цей період. Встановлено наявність мутації в положенні 2109 *bcr/abl* мРНК (транзиція Т на С), що призводить до заміни *Phe547* на *Leu547*. Флюоресцентна мікроскопія клітин еритробластної кризи ХМЛ за допомогою FITC-фаллоїдину свідчить про парамембранну локалізацію актину.

Вступ. Хромосомні транслокації детектуються в значній кількості неоплазій людини. В більшості випадків саме вони зумовлюють один чи декілька етапів пухлинного розвитку. Першим цитогенетичним маркером пухлинного росту стала виявлена 1960 року вкорочена 22-га хромосома, яка була названа за місцем роботи дослідників — філадельфійською.

Група лейкозів, яка характеризується наявністю філадельфійської хромосоми, включає кілька нозологічних форм. Це, по-перше, хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), при якій більше ніж у 95 % випадків детектується ця хромосома [1]. По-друге — це гостра лімфоїдна лейкемія (ГЛЛ), в разі якої філадельфійська хромосома виявляється в 30 % дорослих та 2—10 % хворих дітей [2]. Крім того, її знаходять приблизно в 2 % випадків гострої мієлоїдної лейкемії та при деяких лімфомах та мієломах [3—5]. Утворення даної хромосоми зумовлене реципрокною транслокацією між 9-ю та 22-ю хромосомами t(9;22)(q34;q11). На молекуляр-

ному рівні це супроводжується утворенням злитого гена *bcr/abl* (5'-ділянка гена *bcr* 22-ї хромосоми з'єднується з 3'-ділянкою гена *abl* 9-ї хромосоми). Розриви гена *abl* є можливими в трьох місцях на ділянці приблизно 300 тис. п. н. на його 5'-кінці: в інтроні до 1b екзона, в інтроні між 1b і 1a екзонами чи в інтроні між 1a та 11-м екзонами [3—6]. Розриви гена *bcr* переважно відбуваються в області *M-bcr* (major breakpoint cluster region) і менш часто — в районах *m-bcr* (minor *bcr*) та *μ-bcr* [7] (рис. 1). Таким чином, гібридні гени *bcr/abl* містять 11-й та всі інші екзони в напрямку до кінця гена *abl* (COOH-кінець білка ABL) і різні за довжиною (в залежності від точки розриву) кінцеві фрагменти гена *bcr* (NH₂-кінець білка BCR). Внаслідок транскрипції і наступної трансляції таких злитих генів синтезуються білки p190, p210, p230 (рис. 2) [8]. Аналіз впливу різних екзонів на перебіг захворювання дає можливість висловити припущення щодо визначальної ролі розміру білка BCR/ABL у цьому процесі. Так, білок p190 детектується переважно у хворих на ГЛЛ, p230 — при відносно доброякісній хронічній нейтрофільній мієлоїдній лейкемії [7], а p210 виявляється як при ГЛЛ, так і при ХМЛ. На нашу думку, перехід від

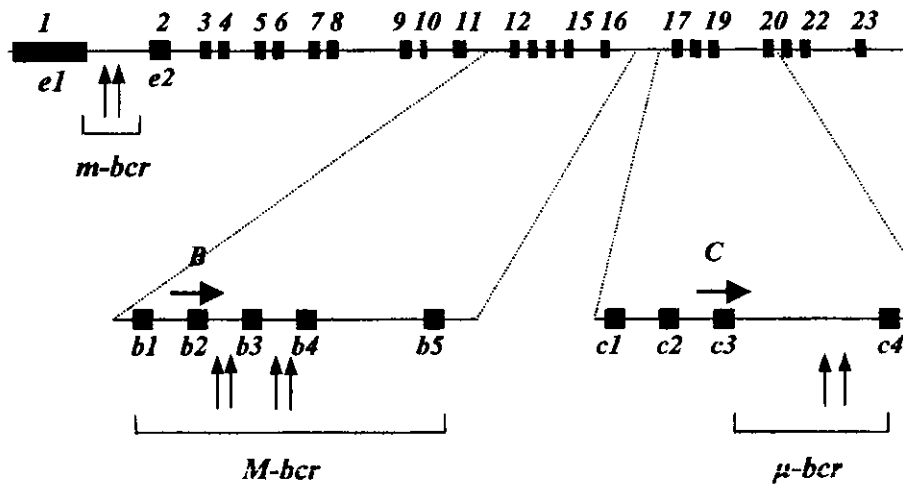


Рис. 1. Будова *bcr* гена за [7]. Цифрами позначено номери екзонів, стрілками — місця розривів при різних *bcr/abl* перебудовах

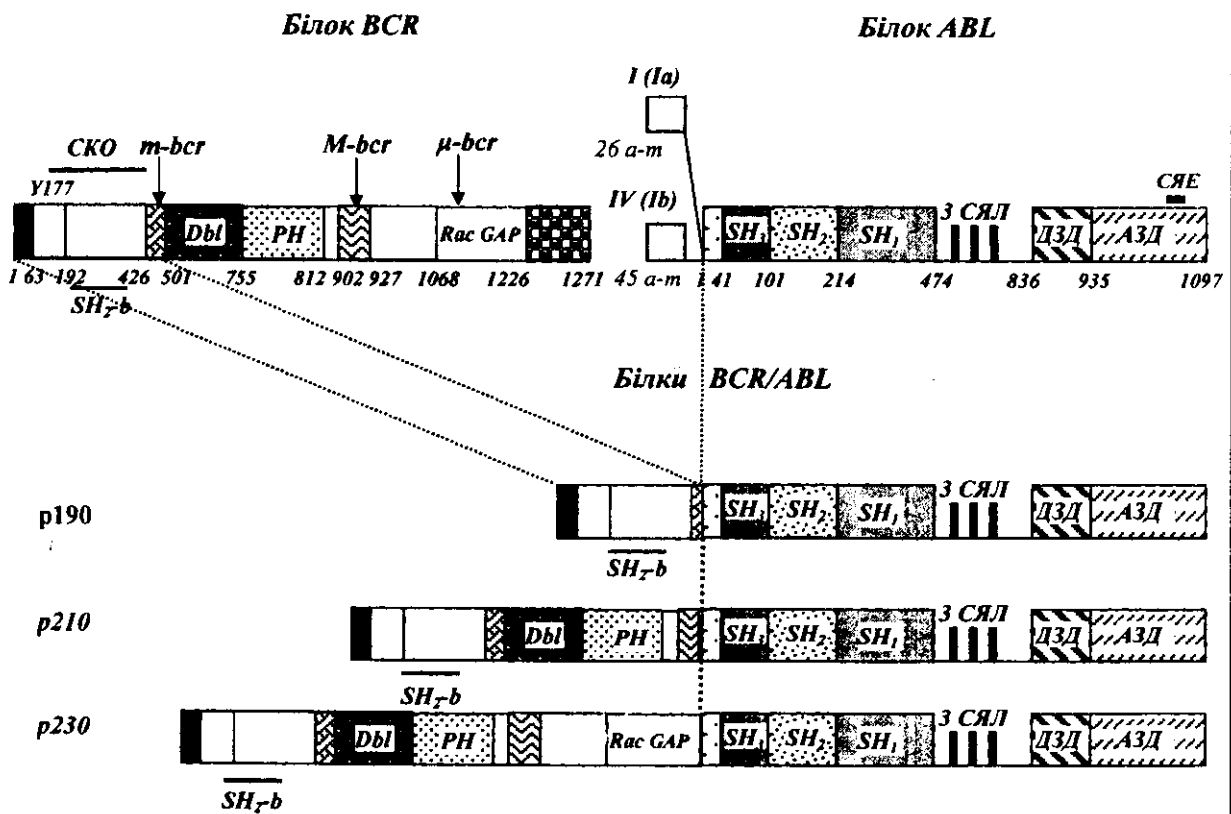


Рис. 2. Структурно-функціональна організація білків BCR, ABL та гібридних білків BCR/ABL p190, p210 та p230. Білок BCR (1271 амінокислотний залишок, а. з.): 1—63 — домен олігомеризації, який посилює зв'язування з актином; Y177 — точка зв'язування з доменом Grb2-SH₂; CKO — серинтреонін кінназа область; SH₂-b (192—413) — SH₂-зв'язуючий домен; Dbl — ділянка гомології з протоонкогеном Dbl; PH — ділянка гомології з плекстрином; Rac GAP домен (1068—1226) — домен, що активує GTPазу для p21 rac. Білок ABL (1097 а. з. + альтернативні домени Ia (26 а. з.) або Ib (45 а. з.)): SH₃ (42—101) і SH₂ (101—214) (*src* homology) — некаталітичні домени; 3 СЯЛ — сигнал ядерної локалізації, що визначає імпорт білка в клітину; ДЗД (836—935) — ДНК-зв'язуючий домен; АЗД (935—1097) — актинзв'язуючий домен; СЯЕ (1057—1067) — область, що визначає експорт білка з ядра. Стрілками позначено місця розривів при різних BCR/ABL перебудовах (p190, p210 та p230). Пунктиром показано транслокацію з утворенням p190 BCR/ABL

хронічної форми ХМЛ до гострої (бластної кризи) визначається змінами саме в ділянці гена, що відрізняє p210 від p190 (екзони 3—10 — *Dbl* домен *bcr* гена). Випадки захворювання на ГЛЛ, що характеризуються наявністю p210, можуть бути зумовлені тим, що ця ділянка з самого початку вже несе зміни, нівелюючи, таким чином, вплив цієї області. Виходячи з того, що *Dbl* домен являє собою ГОФ (гуанідин обмінюючий фактор) для Rho сімейства GTPаз і обумовлює вплив на розподіл актину, в даній роботі, окрім аналізу первинної структури *Dbl* ділянки *bcr* гена, вивчали й зміни в характері розподілу актину в клітині.

Матеріали і методи. В дослідях використано зразки крові хворих, які проходили лікування у гематологічних клініках Києва, а також клітини лінії K562 (еритробластна криза ХМЛ), люб'язно надані М. Завелевичем (Інститут експериментальної онкології НАН України). Клітини культивували на середовищі RPMI 1640 з 10 % ембріональної сироватки, 200 од/мл пеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину при температурі 37 °С. РНК отримували за [9]. кДНК синтезували за допомогою специфічного праймера A_1 (5'-TGATTATAGCCTAAGAC-CCGGA-3') (рис. 3). Реакційна суміш містила 1—5 мкг РНК, 10 рМ праймера A_1 , 20 од. зворотної транскриптази М-MLV («Gibco BRL», Велика Британія), 10—20 од. РНазину, 1 мМ dNTP, буфер для зворотної транскриптази. Загальний об'єм суміші складав 40 мкл. Синтез проводили при температурі 37 °С протягом 1 год. Аліквоти реакційної суміші (5—10 мкл) використовували для проведення ампліфікації. Ph'-хромосому виявляли за методом [10]. Ампліфікацію *dbl* ділянки здійснювали в два етапи в об'ємі 30 мкл. Перший етап проводили з використанням праймерів *ext1 dbl* (5'-GGCTGC-CCTACATTTGATGACTCGC-3') та *ext-r1 dbl* (5'-GATGTTGGGCACTGCCTCCAGTTC-3'); 30 циклів (94 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 1,5 хв). Для другого етапу брали 1 мкл суміші і проводили ампліфікацію (з використанням праймерів *ext dbl* (5'-AAGCTTGCCCTGGAGTCCACTAAAG-3') та *ext-r dbl* (5'-GAATTCTGCCTCCAGTTCATCCAC-3'); 30 циклів (94 °С — 18 с, 55 °С — 18 с, 72 °С —

1 хв). Отриманий продукт обробляли фрагментом Кленова («МВІ Fermentas», Литва) у присутності 0,2 мМ dNTP протягом 15 хв при температурі 37 °С. Після переосадження етанолом зразок обробляли полінуклеотидкіназою фага Т4 («МВІ Fermentas») у присутності 1 мМ АТР (30 хв при 37 °С). Далі здійснювали фенол-хлороформне очищення за [11]. Отриманий фрагмент клонували по тупих кінцях у вектор *pUC19*, розщеплений ферментом *HincII* за допомогою Т4 ДНК-лігази («МВІ Fermentas»). Суміш загальним об'ємом 10 мкл містила 500 нг фрагмента, 20 нг вектора, буфер з АТР та 1 од. Т4 ДНК-лігази («МВІ Fermentas»). Реакцію проводили протягом 2 год при 22 °С. Для трансформації використовували компетентні клітини XL1-Blue MRFB Kan («Stratagene», США). Реакцію трансформації проводили за [12]. Плазмиди з рекомбінантних клонів виділяли за [13]. Реакцію секвенування здійснювали за допомогою набору «¹⁷Sequencing KIT» («Amersham», Велика Британія) за умов, рекомендованих виробником, з використанням стандартних прямого та зворотного M13 праймерів, а також праймерів *ser-3' dbl* (5'-CCAGAAGCAAC-AAAGATGCC-3') та *ser-5' dbl* (5'-GCATCTTTG-TTGCTTCTGGC-3') (рис. 3).

Флюоресцентну мікроскопію проводили, як у [14] з деякими модифікаціями. Після відмивання фосфатним буфером PBS (рН 7,4) клітини фіксували 3,7 %-м параформальдегідом, відмивали PBS, пермеабілізували 0,1 %-м тритоном X-100, повторно відмивали PBS та експонували протягом 40 хв у розчині (0,05 мг/мл FITC-phalloidin в PBS з 1 %-м ДМСО). Після відмивання PBS зразки аналізували на флюоресцентному мікроскопі ЛОМО.

Результати і обговорення. У зв'язку з тим, що *dbl* ділянка є не тільки в *bcr/abl* гені, а також і в інтактному *bcr* гені 22-ї хромосоми, на першому етапі кДНК отримували з використанням праймера A_1 до *abl* гена (рис. 3) і таким чином одержували лише гібридні *bcr/abl* ДНК. Одну частину кДНК використовували для підтвердження діагнозу ХМЛ та ГЛЛ [10], іншу — для ампліфікації *dbl* ділянки (рис. 3). Продукт ампліфікації було клоновано у вектор *pUC19* та просеквеновано. Праймери, які

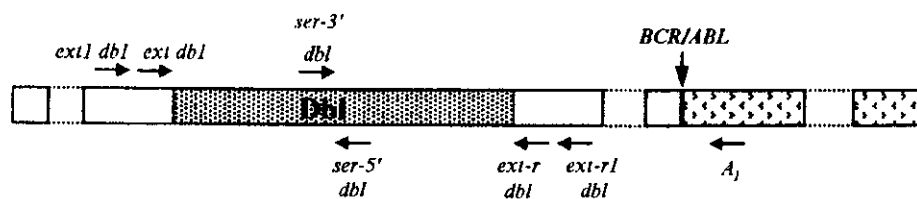


Рис. 3. Схема розміщення праймерів, які використані для ампліфікації та секвенування *Dbl* ділянки *bcr/abl*

використано для секвенування, наведено вище. При секвенуванні *dbl* ділянки (область 1923—2810 гібридної *bcr/abl* мРНК) було виявлено точкову мутацію в положенні 2109. У даному положенні відбувається заміна Т на С, що в свою чергу призводить до заміни кодону, внаслідок чого в молекулі білка Phe547 замінюється на Leu547. Згідно з даними [15] щодо амінокислотних послідовностей кількох ГОФ, ця область є однією з найконсервативніших. Така консервативність дозволяє припустити важливість згаданої зони для функціонування цих білків. Як уже відзначалося, *Dbl* домен білка BCR обумовлює ГОФ активність відносно Rho сімейства СТР-зв'язуючих білків. Ця активність визначає формування актинових стресових волокон та фокальної адгезії [16]. Втрата такої активності може призвести до більшої активності інших білків з ГОФ активністю (Rac чи CDC42), що викликає перерозподіл актину в клітині.

Можливо, що свій внесок у цей процес робить білок Vav, який є мішенню для дії білка BCR/ABL в гемопоетичній клітині [17]. Оскільки Vav є переважно GEF для Rac GTP-ази, він конкурує з Rho і обумовлює перерозподіл актинових мономерів з парамембранною локалізацією і утворенням мембранних виростів (ламеллоподій) та шорхуватості (ruffling) [18], а також впливає на проходження сигналу [19].

Виходячи з цього ми вивчали розподіл актину в Ph' клітинах лінії K562, яка являє собою еритробластну кризу хворого на ХМЛ. Флюоресцентна мікроскопія цих клітин з використанням FITC міченого фаллоїдину свідчить про парамембранну

локалізацію актину (рис. 4), яка може змінювати характер впливу BCR/ABL на діяльність клітин. Останнє обумовлене тим, що приблизно 70 % гібридного білка BCR/ABL поєднано з цитоскелетом [20] за рахунок COOH ділянки гена *abl* [14, 21].

Така локалізація актину може свідчити також про зниження активності Rho білка, що формує стресові волокна, та домінування Rac чи CDC42 білків з утворенням ламеллоподій та філоподій [22, 23]. Подібна зміна призводить як до значної зміни характеру рецепторних взаємодій, так і зміни пулу білків, що взаємодіють з BCR/ABL. Розробці проблеми будуть присвячені подальші дослідження.

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

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

Мутации *bcr/abl* гибридного гена как фактор опухолевой прогрессии при хронической миелоидной лейкемии

Резюме

Bcr/abl гибридный ген является неотъемлемой характеристикой хронической миелоидной лейкемии (ХМЛ) и значительного числа случаев острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Именно экспрессия этого гена обуславливает начало или один из этапов развития этих заболеваний. На молекулярном уровне ХМЛ отличается от ОЛЛ наличием дополнительных 3—10 экзонов (соответственно *Dbl*, *PH* домены) *bcr* части гибридного гена/белка. Секвенируя продукты полимеразной цепной реакции этой области анализировали появление в ней мутаций во время развития бластного криза, а также исходя из функции названного домена изучали характер распределения

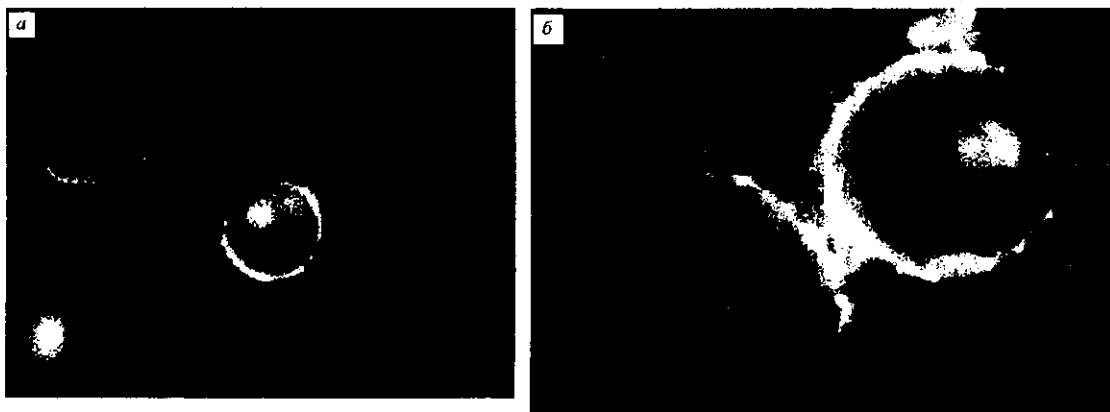


Рис. 4. Флюоресцентна мікроскопія клітин лінії K562 при X200 (а) та X900 (б).

актина в этот период. Показана мутация в положении 2109 *bcr/abl* мРНК (транзиция Т на С), приводящая к замене Phe547 на Leu547. Флюоресцентная микроскопия клеток эритробластного криза ХМЛ с помощью FITC-фаллоидина свидетельствует о парамембранной локализации актина.

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

Mutation in *bcr/abl* hybrid gene as a possible factor of tumor progression during CML

Summary

The *bcr/abl* hybrid gene is a hallmark of CML and of many cases of acute leukemias (ALL). The expression of this gene is the condition of the beginning or one of the stages of these diseases. In contrast to ALL, the *bcr/abl* fusion gene in CML has additional 3–10 exons (*Dbl* and *PH* domains). We analyzed this region seeking a cause of the blast crisis. The sequencing of RT/PCR product has revealed the point mutation at nucleotide 2109 of *bcr/abl* mRNA (the transition mutation from T to C) causing the amino acid change from Phe547 to Leu547. Using FITC-phalloidin we have shown the paramembrane actin location.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science*.—1960.—132.—P. 1497—1499.
2. 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
3. Melo J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype // *Blood*.—1996.—88, N 7.—P. 2375—2384.
4. Martiat P., Mecucci C., Nizet Y., Stul M., Philippe M., Cassiman J. J., Michaux J. L., Van den Berghe H., Sokal G. et al P190 BCR/ABL transcript in a case of Philadelphia-positive multiple myeloma // *Leukemia*.—1990.—4, N 11.—P. 751—754.
5. Mitani K., Sato Y., Tojo A., Ishikawa F., Kobayashi Y., Miura Y., Miyazono K., Urabe A., Takaku F. Philadelphia chromosome positive B-cell type malignant lymphoma expressing an aberrant 190 kDa *bcr-abl* protein // *Br. J. Haematol.*—1990.—76, N 2.—P. 221—225.
6. Телегесв Г. Д., Дибков М. В., Божко М. В., Третьяк Н. М., Малиута С. С. Молекулярно-біологічна діагностика неопластичних захворювань крові // *Цитологія і генетика*.—1998.—32, № 1.—С. 71—78.
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. Ahmed S., Lee J., Wen L. P., Zhao Z., Ho J., Best A., Kozma R., Lim L. Breakpoint cluster region gene product-related domain of *n-chimaerin*. Discrimination between Rac-binding and GTPase-activating residues by mutational analysis // *J. Biol. Chem.*—1994.—269, N 26.—P. 17642—17648.
9. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.*—1987.—162.—P. 156—159.
10. Телегесв Г. Д., Дибков 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.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование.—Москва: Мир, 1984.—480 с.
12. Mandel M., Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection // *J. Mol. Biol.*—1970.—53.—P. 154.
13. Birnboim H. C., Doly A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7.—P. 1513.
14. McWhirter J. R., Wang J. Y. Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of *c-abl* by *bcr* sequences in *bcr/abl* fusion proteins // *Mol. Cell Biol.*—1991.—11, N 3.—P. 1553—1565.
15. Miki T., Smith C. L., Long J. E., Eva A., Fleming T. P. Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins // *Nature*.—1993.—362, N 6419.—P. 462—465.
16. Ridley A. J., Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors // *Cell*.—1992.—70, N 3.—P. 389—399.
17. Matsuguchi T., Inhorn R. C., Carlesso N., Xu G., Druker B., Griffin J. D. Tyrosine phosphorylation of p95Vav in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by *p210BCR/ABL* // *EMBO J.*—1995.—14, N 2.—P. 257—265.
18. Ridley A. J., Paterson H. F., Johnston C. L., Diekmann D., Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling // *Cell*.—1992.—70, N 3.—P. 401—410.
19. Crespo P., Bustelo X. R., Aaronson D. S., Coso O. A., Lopez-Barahona M., Barbacid M., Gutkind J. S. Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav // *Oncogene*.—1996.—13, N 3.—P. 455—460.
20. McWhirter J. R., Wang J. Y. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias // *EMBO J.*—1993.—12, N 4.—P. 1533—1546.
21. Van Etten R. A., Jackson P. K., Baltimore D. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity // *J. Cell Biol.*—1994.—124, N 3.—P. 325—340.
22. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton // *Science*.—1998.—279, N 5350.—P. 509—514.
23. Van Aelst L., D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks // *Genes Dev.*—1997.—11, N 18.—P. 2295—2322.

Надійшла до редакції 17.06.99
УДК 616-006:577.2.575