

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР-РВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ *B-RAF V600E* У БОЛЬНЫХ ВОЛОСАТОКЛЕТОЧНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Якутик И.А., Аль-Ради Л.С., Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Судариков А.Б.

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Резюме. Описан метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для определения мутации *B-RAF V600E*, обладающий достаточно высокой чувствительностью и специфичностью для применения в клинической практике. Подтверждена высокая частота встречаемости и специфичность мутации *B-RAF V600E* при классической форме волосатоклеточного лейкоза (к-ВКЛ) среди прочих В-лимфопролиферативных заболеваний (В-ЛПЗ) (хронический лимфоцитарный лейкоз и лимфома маргинальной зоны селезенки). Показано наличие немногочисленных случаев к-ВКЛ, не несущих мутацию *B-RAF V600E*. Впервые изучена встречаемость *B-RAF V600E* на российской выборке пациентов с В-ЛПЗ. Результаты подтверждают высокую значимость данной мутации в качестве диагностического критерия к-ВКЛ. Выявление мутации является показанием к применению *B-RAF*-ингибиторов для лечения данного заболевания. Определенная чувствительность метода (не менее 1% лейкозных клеток) позволяет использовать его для выявления минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: *B-RAF V600E*; волосатоклеточный лейкоз; аллель-специфическая ПЦР-РВ.

DETECTION OF *B-RAF V600E* MUTATION IN PATIENTS WITH HAIRY CELL LEUKEMIA BY ALLELE-SPECIFIC RT-PCR

Yakutik I.A., Al-Radi L.S., Biderman B.V., Nikitin E.A., Sudarikov A.B.

Hematology Research Center, 125167, Moscow, Russia

S u m m a r y. Allele-specific real time PCR (RT-PCR) was used for detection of *B-RAF V600E* mutation. High incidence and specificity of *B-RAF V600E* in classical hairy cell leukemia (c-HCL) in comparison with other B-lymphoproliferative diseases (B-LPD) - chronic lymphoid leukemia, the splenic marginal zone lymphoma - was confirmed. The c-HCL cases without *B-RAF V600E* mutation were rare. The incidence of *B-RAF V600E* was for the first time studied in a sample of Russian patients with B-LPD. The results confirmed high significance of this mutation as a diagnostic test for c-HCL. The detection of this mutation should be considered as an indication for therapy with *B-RAF* inhibitors. The sensitivity of the method (at least 1% leukemic cells) allows its use for the detection of the minimum residual disease.

Key words: *B-RAF V600E*; hairy cell leukemia; allele-specific RT-PCR.

Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) – редкое В-лимфопролиферативное заболевание (В-ЛПЗ), выделенное в самостоятельную нозологическую единицу и обладающее специфическими морфологическими и иммунофенотипическими (sIg^+ , $CD19^+$, $CD20^{high}$, $CD5^-$, $CD10^-$, $CD22^+$, $CD11c^+$, $FMC7^+$, $CD25^+$, $CD103^+$, $CD123^+$) характеристиками, а также высокой чувствительностью к терапии пуриновыми аналогами. Характерными иммуногистохимическими признаками является экспрессия Annexin A1 и TRAP [1, 2].

После первого сообщения об обнаружении мутации *B-RAF V600E* при ВКЛ [3] были опубликованы исследования, большинство из которых подтверждает наличие данной мутации при классической форме ВКЛ и ее отсутствие при вариантном ВКЛ и других В-ЛПЗ [4–7]. Поскольку известно, что данная мутация приводит к конститутивной активации MAPK-каскада [8, 9], становится целесообразным применение таргетной терапии при классической форме ВКЛ (к-ВКЛ) [10–12].

Цель данной работы заключалась в исследовании наличия мутации *B-RAF V600E* на достаточно большой выборке больных к-ВКЛ (включающей различные подтипы) и другими В-ЛПЗ, а также разработке простого и чувствительного метода аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для определения данной мутации в образцах периферической крови, аспиратах костного мозга и биоптатах селезенки.

Материалы и методы

В работе использованы архивные образцы ДНК, применявшиеся для стандартных клинических исследований. В общей сложности был исследован 161 образец, полученный от 67 больных к-ВКЛ, а также 63 больных другими лимфопролиферативными заболеваниями, такими как лимфома маргинальной зоны селезенки ($n = 14$) и хронический лимфоцитарный лейкоз – ХЛЛ ($n = 49$). Диагностика основывалась на стандартных общепринятых диагностических критериях [1], включающих исследование морфологии и иммунофенотипа костного мозга. Во всех случаях была выявлена клональная реаранжировка генов тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Наличие мутации *B-RAF V600E* определяли с помощью аллель-специфической ПЦР-РВ [13] с некоторыми модификациями. ПЦР-амплификацию и анализ результатов проводили с помощью прибора StepOnePlus™ Real-Time PCR System ("Applied Biosystems", США) и соответствующего программного обеспечения. ПЦР с каждым из

Для корреспонденции:

Якутик Игорь Александрович, аспирант лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России.

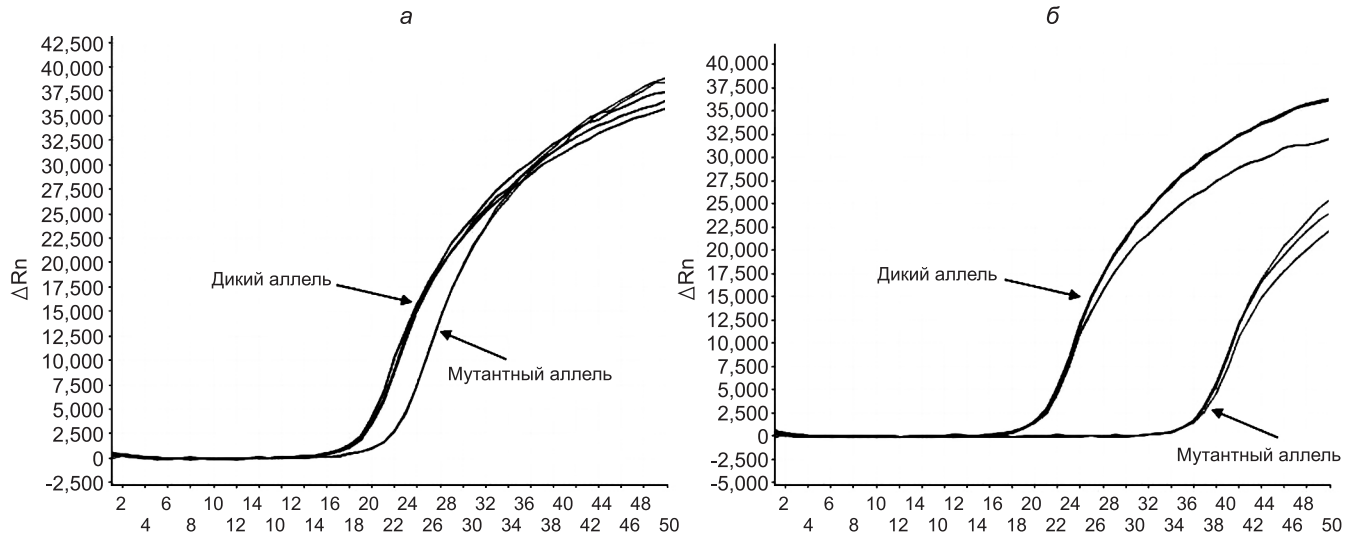
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д.4а.

Телефон: +7(495) 612-65-11.

E-mail: igorya90@list.ru

Corresponding author:

Yakutik Igor, post graduate student (igorya90@list.ru).



Кривые амплификации.

а – образец, содержащий мутацию *B-RAF V600E*; б – образец, содержащий только аллель дикого типа.
По оси ординат – относительная флюорисценция.

аллель-специфических праймеров проводили в отдельной лунке 96-луночной оптической плашки в объеме 25 мкл, содержащем 2,5 мкл × 10 ПЦР-буфера, 2,5 мкл раствора дНТФ (2,5 ммоль/л), 4 мкл раствора $MgCl_2$ (25 ммоль/л), по 10 пмоль каждого из праймеров, 5 пмоль пробы, 50 нг геномной ДНК, 2Е SynTaq ДНК-полимеразы ("Синтол", Россия) и 9 мкл H_2O . Программа амплификации включала следующие стадии: начальная денатурация при температуре 92°C в течение 2 мин, затем 50 циклов, включающих денатурацию при температуре 92°C 30 с, отжиг при температуре 56°C 20 с и элонгацию при температуре 72°C 30 с.

ПЦР и прямое секвенирование по Сенгеру 15-го экзона гена *B-RAF* осуществляли с использованием двух пар праймеров (e15F и e15R, BRAF-E15F и BRAF-E15R), которые описаны ранее [3]. ПЦР-амплификацию проводили с помощью прибора C1000 Touch™ PCR thermal cycler ("BioRad", США). ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 2,5 мкл × 10 ПЦР-буфера, 2,5 мкл раствора дНТФ (2,5 ммоль/л), 2,5 мкл раствора $MgCl_2$ (25 ммоль/л), по 5 пмоль каждого из праймеров, 50 нг геномной ДНК, 1Е SynTaq ДНК-полимеразы ("Синтол", Россия) и 13 мкл H_2O . Программа амплификации включала следующие стадии: начальную денатурацию при температуре 92°C в течение 2 мин, затем 40 циклов, включающих денатурацию при температуре 92°C 30 с, отжиг при температуре 56°C 20 с и элонгацию при температуре 72°C 30 с, а также стадию заключительной элонгации при температуре 72°C в течение 10 мин. Секвенирование и анализ результата осуществляли с помощью капиллярного секвенатора 3130 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США) и соответствующего программного обеспечения.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного пакета Microsoft Excel. Различия между исследуемыми показателями считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Были исследованы 76 образцов геномной ДНК, выделенной из образцов периферической крови, аспиратов костного мозга и биоптатов селезенки 67 больных

к-ВКЛ. В выборке – 5 больных с нетипичным иммунофенотипом (CD25⁻), а также 3 больных с двумя заболеваниями (к-ВКЛ и ХЛЛ). Мы использовали метод аллель-специфической ПЦР-РВ для определения наличия мутации *B-RAF V600E* (см. рисунок). Мутация *B-RAF V600E* была обнаружена в образцах у 62 (96,9%) из 64 больных к-ВКЛ ($p < 0,05$), в которых количество опухолевых клеток превышало 1%. У 2 (3,1%) больных мутация не выявлена. У 4 больных мутация не обнаружена в образцах с низким содержанием опухолевых клеток, но определялась в дополнительных образцах из других тканей, где их содержание было выше. У 3 больных к-ВКЛ/ХЛЛ мутация была выявлена только в тех образцах, в которых по данным иммунофенотипирования присутствовали клетки клона к-ВКЛ. Таким образом, мы подтвердили полученные ранее данные [3–6] о высокой частоте встречаемости мутации *B-RAF V600E* у больных к-ВКЛ. Выявление мутации *V600E* при нетипичных случаях к-ВКЛ (CD25⁻), а также у больных с двумя заболеваниями доказывает целесообразность использования данного критерия в дифференциальной диагностике к-ВКЛ.

С целью выяснения предела чувствительности использованного метода мы провели реакцию в серии разведений образца периферической крови больного с содержанием 52% лейкозных клеток. Мутация *B-RAF V600E* обнаруживалась до степени разведения 1:64 (табл. 1). Более точное значение предела чувствительности использованного метода может быть установлено с использованием клеточных линий, несущих гомозиготную мутацию *B-RAF V600E*. В настоящий момент данный метод обеспечивает чувствительность в пределах 1–5% опухолевых клеток, что позволяет применять его при исследовании образцов периферической крови и костного мозга от больных к-ВКЛ, в которых содержание лейкозных клеток зачастую оказывается сниженным вследствие лейкопении или фиброза костного мозга.

Для определения специфичности использованного метода аллель-специфической ПЦР-РВ в отноше-

Таблица 1

Анализ предельного разведения для определения предела чувствительности аллель-специфической ПЦР-РВ

Разведение	Доля лейкозных клеток, %	Разница пороговых циклов, ΔCt
1:1	50,0	1,67
1:2	25,0	2,48
1:4	12,5	3,44
1:8	6,3	4,55
1:16	3,1	5,21
1:32	1,6	6,56
1:64	0,8	7,29

нии к-ВКЛ наличие мутации *B-RAF V600E* изучали в 63 дополнительных случаях других В-ЛПЗ, при этом ни в одном из случаев мутации *V600E* не обнаружено (табл. 2).

С целью подтверждения специфичности использованной ПЦР-системы в отношении мутации *V600E* мы выполняли прямое секвенирование 15-го экзона гена *B-RAF* у 22 больных к-ВКЛ и у 25 больных другими В-ЛПЗ. При секвенировании в 22 случаях к-ВКЛ мутации *B-RAF V600E* наблюдались лишь в 11 образцах, в которых содержание опухолевых клеток превышало 20%, что соответствует пределу чувствительности прямого секвенирования по Сэнгеру [3]. Ни в одном из 25 случаев других В-ЛПЗ при секвенировании не выявлено мутаций в 15-м экзоне гена *B-RAF*.

Высокая частота встречаемости и специфичность мутации *B-RAF V600E* при к-ВКЛ среди прочих В-ЛПЗ были подтверждены на нашей выборке больных к-ВКЛ с помощью метода аллель-специфической ПЦР-РВ. Мутация выявлена у 96,9% больных к-ВКЛ. В то же время данный полиморфизм не выявлен у 3,1% больных с высоким содержанием лейкозных клеток в образцах, что согласуется с более ранними сообщениями [14, 15]. Данная мутация не встречалась ни в одном из 63 случаев других В-ЛПЗ, что подтверждает мнение [3–6] о специфичности данного полиморфизма для к-ВКЛ.

Предельный метод аллель-специфической ПЦР-РВ обладает значительно большей чувствительностью и специфичностью в отношении мутации *B-RAF V600E* по сравнению с прямым секвенированием по Сэнгеру при значительно меньших финансовых, временных и трудовых затратах. Данный метод позволяет выявлять мутацию *V600E* в случаях к-ВКЛ с малым содержанием опухолевых клеток, обладая пределом чувствительности 1–5%.

Ранее опубликованные данные [3–6] и полученные нами результаты указывают на то, что мутация *B-RAF V600E* обладает специфичностью по отношению к к-ВКЛ среди прочих В-ЛПЗ. Более ранние исследования [8, 9] показали, что данная мутация приводит к активации каскада *RAS-RAF-MEK-ERK* посредством фосфорилирования киназ, являющихся субстратами мутантной *B-RAF*-киназы. Ингибирование *B-RAF*-киназы подавляет данную активацию, указывая на значительную роль *B-RAF*-ингибиторов

Таблица 2

Частота встречаемости мутации *B-RAF V600E* у больных с к-ВКЛ и другими В-ЛПЗ

Диагноз	Частота мутации <i>B-RAF V600E</i>
Волосатоклеточный лейкоз (классическая форма)	У 62 из 64 больных
Хронический лимфоцитарный лейкоз	0 из 49 больных
Лимфома маргинальной зоны селезенки	0 из 14 больных

в лечении резистентных или рецидивных случаев к-ВКЛ [10–12].

Таким образом, методом серийных разведений определена чувствительность метода детекции мутации *B-RAF V600E* с помощью аллель-специфической ПЦР-РВ. Метод обладает значительно большей чувствительностью в сравнении с прямым секвенированием по Сэнгеру, позволяет выявлять опухолевый клон в образцах, содержащих не менее 1% лейкозных клеток, и может быть использован для количественного определения остаточной болезни.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

- Foucar K., Falini B., Catovsky D., Stein H. Hairy cell leukaemia. In: Swerdlow S., Campo E., Harris N.L., Jaffe E., Pileri S., Stein H., et al., eds. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 2008: 188–90.
- Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K., Houlihan A., Meeus P., Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk. Lymph.* 1994; 14 (Suppl. 1): 57–61.
- Tiacci E., Trifonov V., Schiavoni G., Homes A., Kern W., Martelli M.P., et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(24): 2305–15. doi: 10.1056/NEJMoa1014209.
- Arcaini L., Zibellini S., Boveri E., Riboni R., Rattotti S., Varettoni M., et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood.* 2012; 119(1): 188–91. doi: 10.1182/blood-2011-08-368209.
- Blombery P.A., Wong S.Q., Hewitt C.A., Dobrovic A., Maxwell E.L., Juneja S., et al. Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica.* 2012; 97(5): 780–3. doi: 10.3324/haematol.2011.054874.
- Boyd E.M., Bench A.J., van't Veer M.B., Wright P., Bloxham D.M., Follows C.A., Scott M.A. High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies. *Br. J. Haematol.* 2011; 155(5): 609–12. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08868.x.
- Schnittger S., Bacher U., Haferlach T., Wendland N., Ulke M., Dicker F., et al. Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Blood.* 2012; 119(13): 3151–4.
- Warden D.W., Ondrejka S., Lin J., Durkin L., Bodo J., Hsi E.D. Phospho-ERK^{Thr202/Tyr204} is overexpressed in hairy cell leukemia and is a useful diagnostic marker in bone marrow trephine sections. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 37(2): 305–8.
- Kamiguti A.S., Harris R.J., Slupsky J.R., Baker P.K., Cawley J.C., Zuzel M. Regulation of hairy-cell survival through constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene.* 2003; 22(15): 2272–84.
- Dietrich S., Glimm H., Andrusis M., von Kalle C., Ho A.D., Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(21): 2038–40. doi: 10.1056/NEJM1202124.
- Peyrade F., Re D., Ginet C., Gastaud L., Allegra M., Ballotti R., et al. Low-dose vemurafenib induced complete remission in case of hairy-cell leukemia with a V600E mutation. *Haematologica.* 2013; 98 (2): e20–2.

12. Урнова Е.С., Аль-Ради Л.С., Кузьмина Л.А., Карякина А.А., Ковригина А.М., Двирнык В.Н. и др. Успешное применение вемурафениба у больного с резистентной формой волосатоклеточного лейкоза. *Тер. арх.* 2013; 7: 76–8. [Urnova E.S., Al'-Radi L.S., Kuz'mina L.A., Kariakina A.A., Kovrigina A.M., Dvirnyk V.N., et al. Successful use of vemurafenib in a patient with resistant hairy cell leukemia. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; 85(7): 76–8]. (in Russian)
13. Morandi L., de Biase D., Visani M., Cesari V., De Maglio G., Pizzolitto S., et al. Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PLoS One*. 2012; 7(4): e36084.
14. Xi L., Arons E., Navarro W., Calvo K.R., Stetler-Stevenson M., Raffeld M., et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2012; 119(14): 3330–2.
15. Langabeer S.E., O'Brien D., McElligott A.M., Lavin M., Browne P.V. BRAF V600E-negative hairy cell leukaemia. *Case Rep. Hematol*. 2013; 2013: 513049. doi: 10.1155/2013/513049.

Поступила 30.12.13
Received 30.12.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.155.194.7:575.17.015.3]-07

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ АНТИГЕНОВ СИСТЕМЫ HLA ПРИ ПРИОБРЕТЕННОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ

Чумак А.А.¹, Астрелина Т.А.¹, Лебедева Л.Л.¹, Азова М.М.², Пухликова Т.В.¹, Ставцев Д.С.¹, Дышлевая З.М.³, Архипова А.Н.³

¹ГБУЗ Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия; ²ФГБУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва; ³ФГБУ Российская детская клиническая больница Минздрава России, Москва

Резюме. Известно, что при возникновении приобретенной апластической анемии (ПАА) важную роль играет наличие конкретных групп аллелей генов HLA. Цель исследования – изучение особенностей HLA-антигенов при ПАА у детей славянской популяции в зависимости от клинической формы, степени тяжести и ответа на иммуносупрессивную терапию (ИСТ). В исследование были включены 147 детей с ПАА, контрольная группа – 1700 образцов пуповинной крови новорожденных условно здоровых детей. Проводили HLA-генотипирование. Показано, что общими маркерами предрасположенности к развитию идиопатической апластической анемии для мальчиков старше 14 лет и девочек младше 14 лет являются DRB1*15 и B*51; характерным маркером – для девочек младше 14 лет – DQB1*06, для мальчиков младше 14 лет – B*08, B*40, DRB1*03. Общим маркером предрасположенности к ПАА сверхтяжелой формы у мальчиков и тяжелой формы ПАА, в том числе чувствительной к применению комбинированной ИСТ, у детей является HLA-DRB1*15; характерными маркерами предрасположенности к развитию сверхтяжелой формы ПАА у мальчиков – B*08, B*14 и DRB1*03. Полученные результаты позволяют по-новому рассматривать уже имеющиеся модели патогенеза ПАА.

Ключевые слова: антигены системы HLA; приобретенная апластическая анемия; маркеры предрасположенности и протекции к развитию заболевания.

GENETIC POLYMORPHISM OF HLA ANTIGENS IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA

Chumak A.A.¹, Astrelina T.A.¹, Lebedeva L.L.¹, Azova M.M.², Pukhlikova T.V.¹, Stavtsev D.S.¹, Dyshlevaya Z.M.³, Arkhipova A.N.³

¹Stem Cell Bank, 115541, Moscow, Russia; ²Russian University of Peoples' Friendship, 117198, Moscow, Russia; ³Russian Pediatric Clinical Hospital, 117513, Moscow, Russia

S u m m a r y. Certain groups of HLA gene alleles play an important role in emergence of acquired aplastic anemia (AAA). We studied HLA antigens in Slavic children with AAA of different clinical forms, severity, and response to immunosuppressive therapy (IST). The study was carried out in 147 children with AAA. The reference group was formed from 1700 specimens of umbilical blood from healthy newborns. HLA genotyping showed that DRB1*15 and B*51 were common markers of liability to idiopathic aplastic anemia for boys from the age of 14 years and girls aged under 14 years; characteristic markers were DQB1*06 for girls aged under 14 years and B*08, B*40, DRB1*03 for boys aged under 14 years. A common marker of liability to extremely severe AAA in boys and to severe AAA, including the disease sensitive to combined IST, was HLA-DRB1*15; characteristic markers of liability to extremely severe AAA in boys were B*08, B*14, and DRB1*03. These results suggested a novel view on the available models of AAA pathogenesis.

Key words: HLA antigens; acquired aplastic anemia; markers of predisposition to and protection from disease.

Приобретенная апластическая анемия (ПАА) относится к группе тяжелых патологий кроветворной системы, сопровождающихся угнетением костно-мозгового кроветворения. Заболеваемость ПАА составляет 2–3 случая на 1 млн населения в год в европейских странах и 3–5 случаев на 1 млн населения в год в странах Азии [1, 2]. Первые результаты исследований распределения антигенов HLA-системы у больных ПАА появились 40 лет назад

[3, 4]. В 1983 г. было обнаружено [5], что в разных этнических группах развитие данного заболевания связано с разными антигенами HLA-системы. К настоящему времени накоплено значительное количество данных о том, что при возникновении ПАА важную роль играет наличие конкретных групп аллелей генов HLA. Показано, что HLA-DRB1*15 является маркером предрасположенности к развитию ПАА и ассоциируется с благоприятным ответом на