



Астрамович В.А.¹✉, Баровская Ю.А.^{1,2}, Капуза Д.Р.¹, Наумович М.Г.¹, Стёганцева М.В.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Метод выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 у пациентов детского возраста с острым миелоидным лейкозом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Астрамович В.А. – дизайн исследования, сбор материала, пробоподготовка, выполнение молекулярного исследования, написание текста; Баровская Ю.А. – лечащий врач положительного пациента, описание клинического случая; Капуза Д.Р. – выполнение и описание цитогенетического исследования; Наумович М.Г. – куратор нового протокола лечения острых миелоидных лейкозов ММ2020, включающего диагностику NUP98-NSD1, редактирование текста; Стёганцева М.В. – написание текста, дизайн исследования, редактирование.

Подана: 20.06.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: veronika.astramovich@gmail.com

Резюме

Введение. Химерный транскрипт NUP98-NSD1 характеризует подгруппу пациентов с острым миелоидным лейкозом с плохим прогнозом и общей выживаемостью ниже 10%, что служит основанием для разработки технологии выявления данного транскрипта, а также оценки клинической значимости его определения.

Цель. Разработать наиболее эффективный и подходящий метод диагностики NUP98-NSD1.

Материалы и методы. Методом полимеразной цепной реакции проведено ретроспективное исследование 31 пациента с острым миелоидным лейкозом на наличие химерного транскрипта NUP98-NSD1.

Результаты. Отработан эффективный метод ПЦР-диагностики химерного онкогена NUP98-NSD1 с чувствительностью 10^{-2} и специфичностью 100%. По результатам ретроспективного исследования обнаружен 1 пациент (3%) с искомой транслокацией (подтверждено секвенированием), у которого изначально был установлен нормальный кариотип. Дополнительный анализ методом FISH продемонстрировал наличие реаранжировки гена NUP98. Описан клинический случай, связанный с исследованием пациента.

Заключение. Описанный метод ПЦР-анализа позволяет проводить диагностику у пациентов с ОМЛ на наличие химерного транскрипта NUP98-NSD1. Целесообразно включать в аналитическое исследование пациентов с нормальным кариотипом и без известных рекуррентных транслокаций.

Ключевые слова: химерный транскрипт NUP98-NSD1, острый миелоидный лейкоз, полимеразная цепная реакция, пациенты детского возраста, клинический случай



Astramovich V.¹✉, Barouskaya Y.^{1,2}, Kapuza D.¹, Navumovich M.¹, Stegantseva M.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Method of the NUP98-NSD1 Detection in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Astramovich V. – research design, material collection, processing, text writing; Barouskaya Y. – treating physician of the positive patient, description of the clinical finding; Kapuza D. – performance and description of cytogenetic research; Navumovich M. – curator of the new protocol for the treatment of acute myeloid leukemia MM2020, including the diagnosis of NUP98-NSD1, text editing; Stegantseva M. – text writing, research design, editing.

Submitted: 20.06.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: veronika.astramovich@gmail.com

Abstract

Introduction. The NUP98-NSD1 chimeric transcript characterizes a subgroup of patients with poor prognosis acute myeloid leukemia (AML) and overall survival below 10%, which proves the great importance of identifying and studying this transcript.

Purpose. To develop the effective and appropriate method for NUP98-NSD1 detection.

Materials and methods. A retrospective study of 31 AML patients for NUP98-NSD1 were performed using polymerase chain reaction.

Results. Effective method for NUP98-NSD1 screening were developed. Test has 10⁻² sensitivity and 100% specificity. According to the results of a retrospective study, 1 patient (3%) with initially established normal karyotype was found with the desired translocation (confirmed by sequencing). Additional FISH analysis demonstrated the presence of the NUP98 gene rearrangement. The clinical case of the studied patient is described.

Conclusion. The described PCR method is an effective tool to diagnose patients with AML for NUP98-NSD1. It is advisable to test patients with a normal karyotype and without known recurrent translocations.

Keywords: NUP98-NSD1 chimeric transcript, acute myeloid leukemia, polymerase chain reaction, pediatric patients, clinical case

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенное заболевание, в основе которого лежат функционально различные генетические аберрации. Многие из ранее идентифицированных молекулярных событий имеют подтвержденную ассоциацию с прогнозом заболевания. Общая выживаемость при ОМЛ у пациентов детского возраста (среди детей до 15 лет) составляет примерно 70%, в то время как в группе высокого риска – 55% [1, с. 1]. К числу неблагоприятных аберраций, ведущих к формированию ОМЛ, относятся транслокации нуклеопорина 98 кДа (NUP98), расположенного на хромосоме 11p15 [2, с. 3645]. Идентифицировано более 20 различных хромосомных перестроек с участием данного гена [3, с. 684].

При различных гематологических злокачественных новообразованиях в транслокации с NUP98 могут участвовать как гомеобоксные (HOXA9, HOXC11, HOXD13), так и негемеобоксные гены (JAR1D1A, DDX10, TOP1 и NSD1) [4, с. 1054]. Среди всех партнеров для NUP98, идентифицированных к настоящему времени, транслокация NUP98-NSD1 t(5;11) является наиболее частой и присутствует у 4–7% детей с ОМЛ [1, с. 13]. В частности, данная перестройка встречается у 5% пациентов с ОМЛ в диапазоне от 2 до 17 лет [4, с. 1053]. NUP98 играет важную роль в ядерно-цитоплазматическом обмене макромолекул через ядерную мембрану.

NUP98-NSD1-положительные пациенты с ОМЛ слабо отвечают на проведение паллиативной химиотерапии [5, с. 1]. В материалах опубликованных ранее исследований сообщается, что наличие данного химерного транскрипта характеризует подгруппу ОМЛ с плохим прогнозом и общей выживаемостью ниже 10% [4, с. 1053]. В связи с этим выявление и изучение данной транслокации у детей с ОМЛ имеет большое значение для повышения эффективности их лечения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработать наиболее эффективный и подходящий метод диагностики NUP98-NSD1.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследовании был использован материал костного мозга 31 пациента с острым миелоидным лейкозом, диагностированного в РНПЦ ДГОИ в период с 2018 по 2021 год, с отсутствием других рекуррентных транслокаций.

Выделение РНК, синтез кДНК

Осадок клеток лизировали в 1 мл TRIzol (Invitrogen, США). РНК выделяли методом спиртовой преципитации. Качество РНК оценивали на спектрофотометре DS-11 FX+ (DeNovix, США). В синтез кДНК брали 1 мкг РНК. Реакционная смесь включала обратную транскриптазу SuperScript™ III (Invitrogen, США), 5X буфер синтеза первичной цепи, ингибитор рибонуклеаз, рандомные праймеры, дитиотреитол. Синтез проводили согласно протоколу: 25 °C – 5'; 50 °C – 60'; 70 °C – 15'; 4 °C – ∞.

Полимеразная цепная реакция

Для выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 использовали следующие праймеры: прямой – 5'-TCTTGGTACAGGAGCCTTG-3'; обратный – 5'-TCCAAAAGCCACTTGCTTGGC-3' [6, с. 1265]. В качестве положительного контроля использовалась кДНК пациента, у которого была обнаружена и подтверждена секвенированием данная транслокация (материал любезно предоставлен НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Россия). ПЦР-смесь, используемая для отрицательного контроля, вместо кДНК пациента содержала деионизированную воду. ПЦР-смесь включала: DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher scientific, США), праймеры (2 ммоль/л). Протокол ПЦР: 95 °C – 3' (1 цикл); 96 °C – 45", 58 °C – 45", 72 °C – 1' (40 циклов); 72 °C – 7' (1 цикл); 12 °C – ∞. Продукты ПЦР визуализировали в агарозном геле 1,5% (Calbiochem, США).



Секвенирование

ПЦР-продукт очищали от праймер-димеров и неизрасходованных компонентов реакции в 9%-ном полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза. Определение нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР проводили путем прямого секвенирования по Сэнгеру на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Реакцию секвенирования проводили в объеме 10 мкл: 1 мкл буфера для секвенирования BigDye terminator v3.1 Buffer, 1 мкл флуоресцентно меченных нуклеотидов BigDye (Applied Biosystems, США), 4 мкл прямого или обратного праймера с концентрацией 2,5 пмоль, 100 нг матрицы, вода до 10 мкл. Протокол реакции: 96 °C – 1 мин.; 25 циклов: 96 °C – 10 сек., 50 °C – 5 сек., 60 °C – 4 мин. Очищенный ПЦР-продукт разводили в 15 мкл формамида и денатурировали 5 минут при 95 °C. Для анализа сиквенсограмм использовали программы Sequencing Analysis 5.2, NCBI BLAST.

Цитогенетическое исследование

Кариотипирование лейкемических клеток выполнялось методом дифференциального G-окрашивания 24-часовой культуры клеток КМ (MarrowMAX Bone Marrow Medium). Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) проводили на интерфазных ядрах с использованием локус-специфического двухцветного ДНК-зонда для гена NUP98 (11p15.4) (Dual Color Break Apart Probe, Zytovision, Germany) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-биологический метод выявления транслокации NUP98-NSD1

Для амплификации химерного транскрипта NUP98-NSD1 была применена технология Hotstart, которая позволяет повысить чувствительность и специфичность ПЦР-реакции. Специфичность данного метода была проверена с помощью проведения ПЦР с кДНК, полученной из 5 образцов костного мозга здоровых доноров и 5 образцов периферической крови здоровых доноров, а также положительного контроля (материал любезно предоставлен НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Россия). В ходе визуализации ПЦР-продуктов с помощью электрофореза ни в одном образце, кроме положительного контроля, ничего не было выявлено. Чувствительность метода была установлена с помощью последовательных десятикратных разведений заведомо положительной кДНК пациента, у которого была обнаружена транслокация NUP98-NSD1 и подтверждена методом секвенирования в лаборатории НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (рис. 1).

По результатам исследования установлено, что чувствительность метода составляет 10^{-2} , что позволяет использовать его в качестве инициальной диагностики после постановки диагноза ОМЛ. Для верификации метода был проведен ретроспективный анализ пациентов, диагностированных в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (д. Боровляны, Беларусь).

Выявление транслокации NUP98-NSD1 у пациентов с ОМЛ

В период с 2018 по 2021 год в РНПЦ ДОГИ было диагностировано 73 пациента с первичным ОМЛ, из них у 35 не было обнаружено наиболее распространенных

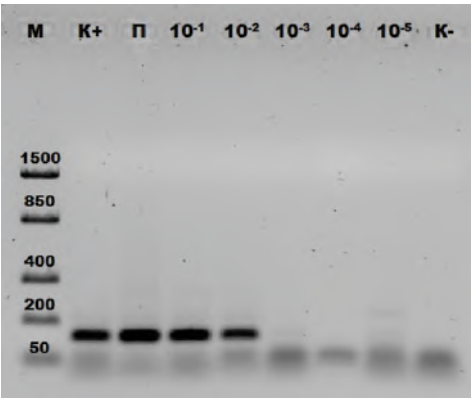


Рис. 1. Последовательные десятикратные разведения кДНК пациента с NUP98-NSD1

Примечания: М – маркер молекулярного веса; П – пациент с транслокацией NUP98-NSD1; 10⁻¹–10⁻⁵ – последовательные разведения; К+ – положительный контроль; К– – отрицательный контроль.

Fig. 1. Serial 10-fold dilutions of cDNA from patients with NUP98-NSD1

Notes: M – molecular weight marker; P – patient with NUP98-NSD1 translocation; 10⁻¹–10⁻⁵ – serial dilutions; K+ – positive control; K– – negative control.

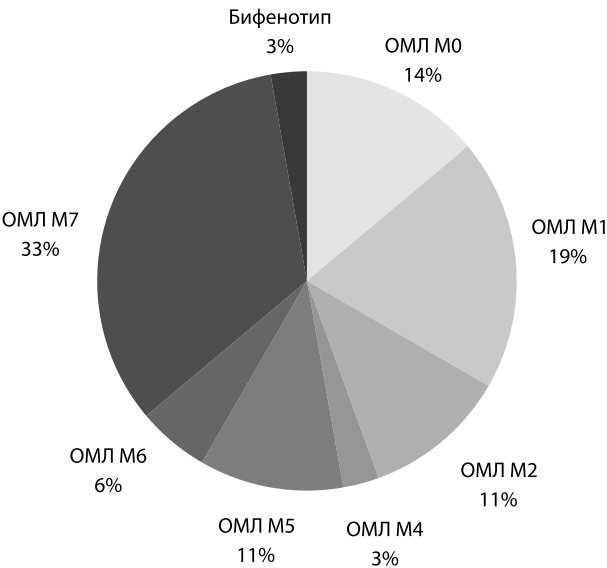


Рис. 2. Процентное соотношение морфологических типов ОМЛ по FAB-классификации, обнаруженных у исследуемых пациентов без установленного молекулярного диагноза
Fig. 2. Percentage of AML morphological types according to the FAB classification in the studied patients without established molecular diagnosis



молекулярно-генетических перестроек. В процентном соотношении в группе исследованных пациентов без установленного молекулярного диагноза были диагностированы следующие типы ОМЛ согласно FAB-классификации (Франко-американо-британская классификация): ОМЛ М0 – 14%, ОМЛ М1 – 19%, ОМЛ М2 – 11%, ОМЛ М4 – 3%, ОМЛ М5 – 11%, ОМЛ М6 – 6%, ОМЛ М7 – 33%, пациент с бифенотипом (В-ОЛЛ/ОМЛ) – 3% (рис. 2).

В рамках проводимого исследования был проанализирован 31 образец костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом. Среди них был выявлен один пациент, у которого обнаружено наличие химерного онкогена NUP98-NSD1 (3%) (П5 на рис. 3А). Наличие искомого транскрипта было подтверждено методом прямого секвенирования по Сэнгеру. На рис. 3В продемонстрирована точка слияния двух генов.

Разрыв произошел в 12-м экзоне гена NUP98 и 6-м экзоне гена NSD1. Ген NSD1 кодирует белок, который функционирует как гистонметилтрансфераза. Добавляя метильную группу к гистонам, гистоновые метилтрансферазы регулируют активность определенных генов и могут включать и выключать их по мере необходимости. Фермент NSD1 контролирует активность генов, участвующих в нормальном росте и развитии. Перестройка генетического материала, связанная с острым миелоидным лейкозом у детей, приводит к аномальному слиянию гена NSD1 на хромосоме 5 с геном NUP98 на хромосоме 11. Эта транслокация приобретает в течение жизни человека и присутствует только в раковых клетках. Исследования показывают, что слитый ген NUP98-NSD1 включает гены, которые способствуют росту незрелых клеток крови, и блокирует процессы, которые отключили бы эти гены [7, с. 1]. NUP98-NSD1 изменяет конформацию хроматина, связывая гистоновые хвосты и считывая активные метки, тем самым модифицируя нормальную регуляцию генов. Клетки костного мозга, трансдуцированные NUP98-NSD1, увеличивают экспрессию Noxa5, a7, a9, a10 и Meis1. Было показано, что NUP98-NSD1 связывает и активирует промоторы Noxa7 и Noxa9. Таким образом, NUP98-NSD1 ведет себя как мощный активатор транскрипции в локусе Noxa, объединяя 2 эпигенетических модификатора, которые подготавливают хроматин к активной транскрипции генов, наряду с доменом PHD, который нацеливается на промотор Noxa9. Одновременно с этим данная транслокация предотвращает эпигенетическое молчание и репрессию с помощью комплекса репрессора polycomb, который обычно подавляет локус Noxa во время гемопоэтической дифференцировки [8, с. 6251].

При инициальном цитогенетическом исследовании материала костного мозга данного пациента методом G-окрашивания был установлен нормальный кариотип 46, XY (рис. 4А).

Транслокация NUP98-NSD1 не была обнаружена, т. к. она относится к категории криптогенных. Такие мелкие скрытые аберрации выявляются только молекулярными методами, такими как ПЦР и секвенирования [9, с. 84]. По результатам ПЦР было проведено дополнительное ретроспективное FISH-исследование материала костного мозга данного пациента, по результатам которого установлена трисомия 8-й хромосомы, а также клетки с паттерном сигнала 1F(fusion)1R(red)1G(green), соответствующим реаранжировке гена NUP98 (рис. 4В).

Исследован клинический случай пациента, у которого была обнаружена данная транслокация. Характер течения заболевания пациента подтверждает неблагоприятный прогноз, наблюдаемый при наличии NUP98-NSD1.

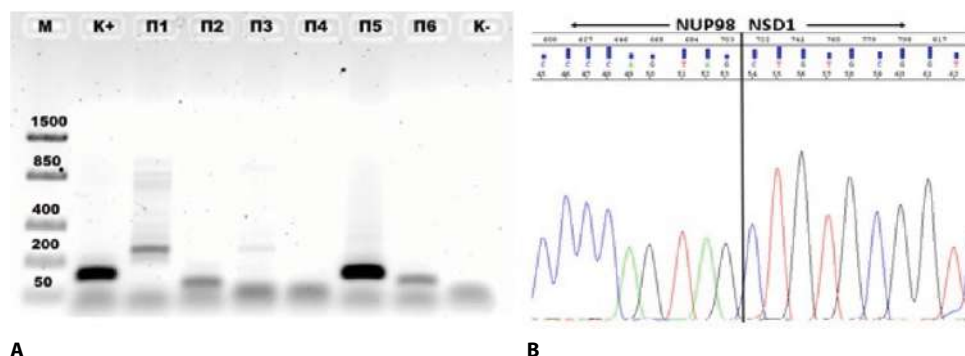


Рис. 3. А – результат электрофореза; В – результат секвенирования по Сэнгеру

Примечания: М – маркер молекулярного веса; П1–П6 – исследуемые пациенты; К+ – положительный контроль; К– – отрицательный контроль.

Fig. 3. A – the result of electrophoresis; B – Sanger sequencing result

Notes: M – molecular weight marker; P1–P6 – studied patients; K+ – positive control; K– – negative control.

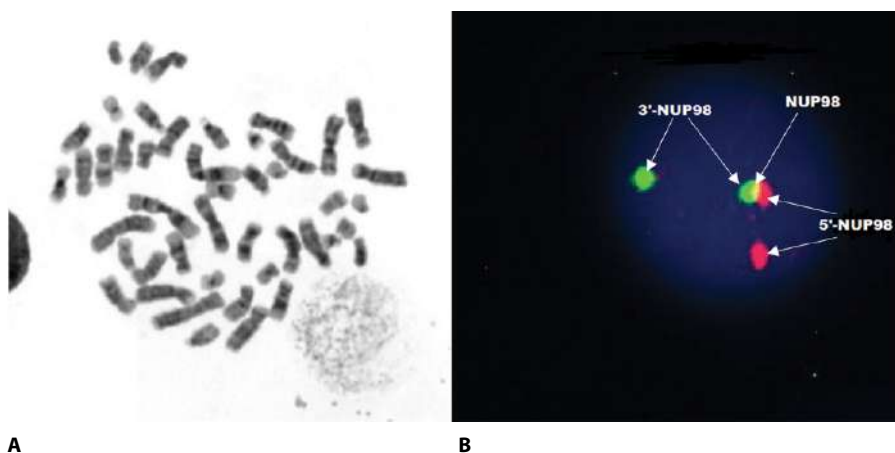


Рис. 4. А – метафазная пластинка пациента, окрашенная методом Г-бэндинг; В – результат исследования методом FISH в интерфазных ядрах, характерный для перестройки гена NUP98
Fig. 4. A – patient metaphase, colored by the G-banding method; B – the result of the FISH study in interphase nuclei, specific the rearrangement of the NUP98 gene

Клинический случай

Пациент, 14 лет, ребенок от третьей беременности, третьих родов. Привит по возрасту. Из перенесенных заболеваний отмечались острые респираторные инфекции, ветряная оспа. На диспансерном учете не состоял. В ноябре 2019 г. поступил в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии с жалобами на слабость, повышение температуры тела до фебрильных цифр. Из анамнеза известно, что за месяц



до госпитализации отмечались подъемы температуры до фебрильных значений, за две недели до госпитализации обнаружено увеличение подмышечного лимфоузла. Лечился амбулаторно, получал антибактериальную терапию. В общем анализе крови (ОАК): эритроциты – $3,2 \times 10^{12}/л$, гемоглобин – 90 г/л, тромбоциты – $600 \times 10^9/л$, лейкоциты – $22,3 \times 10^9/л$, бласты – 55%. В миелограмме: пунктат богат клеточными элементами, большое количество тромбоцитов разной степени зрелости, функционируют. Бласты составляют 70%. Исходя из морфологических и цитохимических признаков, данная картина соответствует М4 по FAB-классификации. Молекулярными методами стандартные химерные онкогены не были обнаружены. При цитогенетическом исследовании кариотип 46, XY. Пациент был стратифицирован в промежуточную группу риска и получал полихимиотерапию по протоколу ОМЛ-ММ-2014 (два курса индукции в режиме интенсивного «тайминга» ADE-HAM (цитарабин, даунорубин, вепезид); курс HAM (высокодозный цитарабин, митоксантрон) начинается на 14-й день от начала курса ADE; два курса консолидации: HD-ARA-C+IDA (высокодозный цитарабин, идарубин) и AME-H (высокодозный цитарабин, вепезид, митоксантрон)). Ремиссия констатирована после проведения двойной индукции. Далее пациенту планировалось проведение третьего консолидирующего блока с введением натуральных киллерных клеток от гаплоидентичного донора, однако из-за длительного цитопенического синдрома блок полихимиотерапии не проводился. В ноябре 2020 г. констатирован изолированный костномозговой рецидив. При цитогенетическом исследовании выявлен клон клеток с трисомией 8-й хромосомы. Начато противорецидивное лечение, пациент получил курс полихимиотерапии FLAG+IDA (флударабин, идарубин, высокодозный цитарабин, G-CSF). Через три недели от установления рецидива у пациента была диагностирована COVID-19-инфекция, тяжелое течение (двусторонняя пневмония с формированием фиброателектазов). С ноября 2020 г. по май 2021 г. пациент получал активное комплексное лечение против COVID-19 (кислородотерапия, глюкокортикостероиды, анти-COVID-19-свежезамороженная плазма курсами, ремдесивир). Длительно персистирующая COVID-19-инфекция привела к невозможности продолжения специального лечения. В костном мозге бласты составляли до 5%, однако восстановления ростков гемопоэза не было. У пациента сохранялась зависимость от гемотрансфузий. В апреле 2021 г. с целью поиска дополнительных мишеней для уточнения прогноза и оценки минимальной остаточной болезни было проведено таргетное секвенирование ДНК и обнаружена патогенная мутация в гене NRAS (герминогенная). NRAS не имеет показаний для таргетной терапии. Учитывая невозможность проведения специальных методов лечения (высокодозная полихимиотерапия и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток) ввиду активной COVID-19-инфекции и развившихся тяжелых инфекционно-токсических осложнений (синдром Иценко – Кушинга, медикаментозная гипергликемия, стероидная миопатия, умеренный тетрапарез с дистрофией мышц и формированием сгибательных контрактур в коленных суставах, диабетическая полинейропатия, атрофия зрительных нервов, токсическая энцефалопатия, остеопороз, снижение индекса Карновского до 40%), пациент переведен в паллиативную группу медицинской помощи. Пациенту была назначена терапия сдерживания. Смерть наступила от прогрессирования лейкоза в январе 2022 г.

При своевременной диагностике на наличие транскрипта NUP98-NSD1 лечение данного пациента проводилось бы по протоколу для высокого риска, который включает в себя проведение трансплантации костного мозга в первой ремиссии, что могло повысить шансы на выздоровление.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный метод выявления химерного транскрипта NUP98-NSD1 позволяет проводить диагностику пациентов с ОМЛ на наличие данного транскрипта. Представленный метод является быстрым в исполнении, экономичным, эффективным и обладает достаточной чувствительностью, необходимой для своевременной диагностики пациентов с ОМЛ, и позволяет сформировать адекватную тактику лечения, что повышает шансы пациентов на благоприятный исход заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Niktoreh N., Walter Ch., Zimmermann M. Mutated WT1, FLT3-ITD, and NUP98-NSD1 Fusion in Various Combinations Define a Poor Prognostic Group in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Oncology*. 2019;373(12):1–15. doi: 10.1155/2019/1609128
2. Hollink I.H.J.M., van den Heuvel-Eibrink M.M., Arentsen-Peters S.T.C.J.M. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 2011;118(13):3645–3656. doi: 10.1182/blood-2011-04-346643
3. Shiba N., Ichikawa H., Taki T. NUP98-NSD1 Gene Fusion and Its Related Gene Expression Signature Are Strongly Associated with a Poor Prognosis in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2013;52:683–693. doi: 10.1002/gcc.22064
4. Akiki S., Dyer S.A., Grimwade D. NUP98-NSD1 Fusion in Association with FLT3-ITD Mutation Identifies a Prognostically Relevant Subgroup of Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients Suitable for Monitoring by Real Time Quantitative PCR. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2013;52:1053–1064. doi: 10.1002/gcc.22100
5. Mohanty S., Jyotsana N., Sharma A. Targeted Inhibition of the NUP98-NSD1 Fusion Oncogene in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 2020;2766(12):1–17. doi: 10.3390/cancers12102766
6. Jaju R.J., Fidler C., Haas O.A. A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98(4):1264–1267. doi: 10.1182/blood.v98.4.1264
7. Berdasco M., Ropero S., Setien F. Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(51):21830–21835. doi: 10.1073/pnas.0906831106
8. Gough S.M., Slape Ch.I., Aplan P.D. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*. 2011;118(24):6247–6257. doi: 10.1182/blood-2011-07-328880
9. Domninskiy D.A. Molecular mechanisms of leukemogenesis. *Oncohematology*. 2011;3:82–93. doi: 10.17650/1818-8346-2012-7-1-46-54. (in Russian)