



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.9.4.005>



Зеркаленкова Е.А.✉, Борковская А.Н.

Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Создание калибровочных стандартов для мониторинга минимальной остаточной болезни методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией при ОМЛ с t(10;11)(p12.31;q14.2)/PICALM::MLLT10

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Зеркаленкова Е.А.; сбор и обработка данных – все авторы; анализ и интерпретация данных – все авторы; предоставление материалов исследования – все авторы; подготовка рукописи – Зеркаленкова Е.А.; редактирование – Зеркаленкова Е.А.; окончательное одобрение рукописи – все авторы.

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-25-00367.

Подана: 04.10.2023

Принята: 22.11.2023

Контакты: eazerkalenkova@gmail.com

Резюме

Хромосомная транслокация t(10;11)(p12.31;q14.2) с образованием химерного гена PICALM::MLLT10 является редкой рекуррентной перестройкой при некоторых типах острых лейкозов, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Она ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и в настоящее время включена в риск-стратификацию ОМЛ у детей, получающих терапию по протоколу ОМЛ-MRD-2018, в качестве маркера высокого риска. Экспрессия PICALM::MLLT10 может использоваться в качестве мишени для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Однако в силу редкости и гетерогенности данной перестройки для нее отсутствуют коммерчески доступные калибровочные стандарты.

Целью данной работы явилось создание калибровочных стандартов для оценки экспрессии химерного гена PICALM::MLLT10 методом клонирования в плазмидный вектор. Были заклонированы 4 фрагмента PICALM::MLLT10 с различными локализациями точек разрыва в гене MLLT10 (интроны 4, 6, 9 и 10) и локализацией точки разрыва в гене PICALM в интроне 19. Для каждого калибровочного стандарта было показано наличие корректной вставки методом секвенирования по Сэнгеру и отсутствие мутаций в сайтах посадки праймеров и проб для количественной ПЦР. Чувствительность примененных в настоящей работе систем детекции составила 10 копий в реакции в ПЦР с плазмидными стандартами и 1/10 000 в 10-кратных лимитирующих разведениях. Значение углового коэффициента для калибровочных стандартов составило $3,4 \pm 0,05$, свободного коэффициента – $34,7 \pm 1,24$, значение R^2 превышало 0,95 во всех случаях, коэффициент вариации для образцов с минимальным содержанием молекул-мишеней составил $1,12 \pm 0,43\%$, что соответствует международным рекомендациям для систем детекции и количественных стандартов, применяемых в мониторинге МОБ методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Ключевые слова: ОМЛ, химерный ген PICALM::MLLT10, количественная ОТ-ПЦР, калибровочные стандарты, мониторинг МОБ

Zerkalenkova E., Borkovskaya A.

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Development of Calibration Standards for Minimal Residual Disease Monitoring by Quantitative Reverse Transcription-PCR in AML with t(10;11)(p12.31;q14.2)/PICALM::MLLT10

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design – Zerkalenkova E.; data collection and processing – all authors; data analysis and interpretation – all authors; submission of study materials – all authors; manuscript preparation – Zerkalenkova E.; editing – Zerkalenkova E.; final approval of the manuscript – all authors.

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-00367.

Submitted: 04.11.2023

Accepted: 22.11.2023

Contacts: eazerkalenkova@gmail.com

Abstract

The chromosomal translocation t(10;11)(p12.31;q14.2) leading to PICALM::MLLT10 fusion gene formation is a rare recurrent rearrangement in some types of acute leukemia, including acute myeloid leukemia (AML). It is associated with a poor prognosis and is currently included in the risk stratification of AML in children receiving therapy according to the AML-MRD-2018 protocol as a high-risk marker. PICALM::MLLT10 expression can be used as a target for minimal residual disease (MRD) monitoring by quantitative reverse transcription-PCR. However, due to the rarity and heterogeneity of this rearrangement, there are no commercially available calibration standards for it. The goal of this work was to create calibration standards for assessing the expression of the chimeric gene PICALM::MLLT10 by cloning into a plasmid vector. Four fragments of PICALM::MLLT10 were cloned with different localizations of breakpoints in the MLLT10 gene (introns 4, 6, 9 and 10) and localization of the breakpoint in the PICALM gene in intron 19. For each calibration standard, the presence of a correct insert was demonstrated by Sanger sequencing and the absence of mutations in the primer binding sites and probes for quantitative PCR. The sensitivity of the detection systems used in this work was 10 copies in a PCR reaction with plasmid standards and 1/10000 in 10-fold limiting dilutions. The slope coefficient for calibration standards was 3.4 ± 0.05 , y-intercept was 34.7 ± 1.24 , the R^2 value exceeded 0.95 in all cases, the coefficient of variation for samples with a minimum content of target molecules was $1.12 \pm 0.43\%$, which corresponds to international recommendations for systems detection and quantitative standards used in real-time RT-PCR monitoring of MRD.

Keywords: AML, fusion genes, PICALM::MLLT10, quantitative RT-PCR, calibration standards, MRD monitoring



■ ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – это злокачественное заболевание кроветворной системы, характеризующееся опухолевой трансформацией клеток-предшественниц миелоидной линии гемопоэза. Эта трансформация ассоциирована с гетерогенными генетическими изменениями, затрагивающими различные области генома, и вызывает неконтролируемую пролиферацию и нарушение дифференцировки гемопоэтических клеток. Для ОМЛ детского возраста характерна частая встречаемость крупных хромосомных перестроек – прежде всего транслокаций, а также инверсий, делеций и других aberrаций, приводящих к формированию химерных генов, – до 70–75% в зависимости от возрастной группы [1]. Рекуррентные хромосомные aberrации напрямую влияют на патогенез ОМЛ и, таким образом, тесно связаны с биологическими и клиническими особенностями заболевания. Хотя классификация ОМЛ изначально была основана на морфологическом и цитохимическом исследовании бластных клеток, наличие специфических генетических aberrаций все больше заменяет традиционные цитоморфологические критерии – 5-е издание Классификации гематолимфоидных опухолей Всемирной организации здравоохранения признает девять подтипов ОМЛ, определяемых рекуррентными хромосомными аномалиями [2], а Международная консенсусная классификация (ICC) миелоидных злокачественных новообразований признает 11 подтипов [3].

Молекулярно-генетические характеристики опухоли лежат в основе современных риск-адаптированных подходов к терапии ОМЛ, позволяя прогнозировать ожидаемую продолжительность ремиссии и определять показания к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [4]. Кроме того, терапия ОМЛ подразумевает продолжительное мониторинговое наблюдение для оценки эффективности и необходимости интенсификации проводимой терапии. Важным параметром, определяющим эффективность терапии и прогноз заболевания, является уровень минимальной остаточной болезни (МОБ) [5]. Уровень МОБ показал свою значимость в качестве прогностического фактора в крупных международных исследованиях (St Jude [6], NOPHO [7], PETHEMA [8], AML-BFM [9] и других) и используется в терапии ОМЛ детского возраста в Российской Федерации (протокол ОМЛ-MRD-2018). Определение уровня МОБ после завершения курса индукции ремиссии позволяет рестратифицировать пациентов по группам риска и выбрать оптимальную тактику дальнейшей терапии.

В настоящее время существует два основных метода высокочувствительной детекции МОБ – многоцветная проточная цитометрия и количественная ПЦР. Многоцветная проточная цитометрия является наиболее универсальным и широко применяемым методом детекции МОБ [10, 11]. Однако в силу значительного разнообразия и сложности иммунофенотипов опухолевых клеток при ОМЛ [12] необходимо определение МОБ независимым молекулярным методом – количественной ПЦР [13]. Химерные гены, образующиеся в результате рекуррентных хромосомных aberrаций, представляют собой хорошую мишень для детекции МОБ методами на основе ПЦР при ОМЛ у детей, поскольку широко распространены и стабильны в клональной эволюции опухоли. Системы праймеров и проб для детекции наиболее часто встречающихся ОМЛ-ассоциированных перестроек разработаны давно и применяются в течение длительного времени – $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$ и $inv(16)(p13.1q22)/CBFB::MYH11$ [14–16], $PML::RAR\alpha$ [17]. Однако большинство рекуррентных хромосомных

транслокаций при ОМЛ встречаются редко. Так, в крупнейшем на сегодняшний день исследовании генетического профиля ОМЛ (исключая промиелоцитарный вариант) у детей и подростков Bolouri и соавт. [1] из всех образцов с детектированными химерными генами на долю 31 редкой перестройки пришлось всего 22,4% случаев (99 из 442), тогда как доля CBF-ОМЛ составила 44,3% (196 из 442), а доля KMT2A-позитивных образцов составила 33,3% (147 из 442). Как следствие, ПЦР-мониторинг МОБ для таких образцов в исследованиях зачастую опускается и стандартные системы количественной ПЦР не разработаны.

Отдельной проблемой ПЦР-детекции является выраженная молекулярно-генетическая гетерогенность абсолютного большинства ОМЛ-ассоциированных перестроек, при которой в силу различной локализации точек разрыва в генах-партнерах каждый индивидуальный химерный ген может быть представлен множеством вариантов – от нескольких штук до нескольких десятков [18–20]. Практичным способом обойти данную трудность является использование количественной либо качественной мультиплексной ПЦР, которая надежно зарекомендовала себя в инициальной молекулярной диагностике острых лейкозов [21, 22]. Однако этот метод не всегда подходит для мониторинга МОБ – ранее нами для перестроек гена KMT2A при ОМЛ было показано, что мультиплексирование праймеров и проб может снижать чувствительность количественной ПЦР и методом выбора является моноплексная ПЦР [23].

С проблемой гетерогенности вариантов химерных генов при ОМЛ тесно связана проблема количественной оценки экспрессии редких химерных транскриптов. Количественная оценка экспрессии мРНК предполагает определение, во-первых, экспрессии контрольного гена для оценки качества РНК и нормализации [24] и, во-вторых, калибровочного стандарта, который представляет собой серию образцов с содержанием известного числа копий определяемого гена [25]. В то время как для детекции наиболее часто встречающихся ОМЛ-ассоциированных перестроек (RUNX1::RUNX1T1, CBFB::MYH11, PML::RARA) такие стандарты коммерчески доступны, для редких перестроек они отсутствуют. Таким образом, получение калибровочных стандартов для количественной оценки экспрессии редких химерных генов является актуальной задачей при мониторинге МОБ в ходе терапии ОМЛ у детей.

В рамках настоящей работы нами были получены калибровочные стандарты для оценки экспрессии различных вариантов химерного гена PICALM::MLLT10 при редкой рекуррентной транслокации t(10;11)(p12.31;q14.2) при ОМЛ. Данная транслокация выделена в качестве отдельного молекулярного маркера в классификации миелоидных неоплазий ICC [3] и включена в перечень маркеров высокого риска в протоколе ОМЛ-MRD-2018 «Проспективное нерандомизированное многоцентровое клиническое исследование эффективности дифференцированной интенсивной химиотерапии и трансплантации гемопоэтических клеток у пациентов до 18 лет с острым миелоидным лейкозом, на основании значений минимальной детектируемой болезни» (идентификатор CT.gov: NCT03846362).

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные образцы: в исследовании был использован материал от 4 первичных пациентов с ОМЛ с перестройкой t(10;11)(p12.31;q14.2) с известной последовательностью химерного транскрипта PICALM::MLLT10, подтвержденной ранее методом секвенирования по Сэнгеру (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).



Во всех образцах точка разрыва гена PICALM локализовалась в интроне 19 (референсный транскрипт MANE ENST00000393346.8), а точки разрыва в гене MLLT10 были различными и локализовались в интронах 4, 6, 9 и 10 (референсный транскрипт MANE ENST00000307729.12).

Молекулярное клонирование: РНК из материала пациентов выделяли с использованием набора InnuPrep DNA/RNA Kit (Analytik Jena AG, Йена, ФРГ). Далее проводили обратную транскрипцию с помощью ревертазы Mint (ЗАО «Евроген», Москва, РФ) и нарабатывали фрагменты химерного гена PICALM::MLLT10, содержащие регион слияния, с помощью полимеразы OneTaq (NEB, Ипсуич, Массачусетс, США). Клонирование проводили в вектор pGEM-T Easy (Promega, Мадисон, Висконсин, США) методом вставки по тупым концам с помощью лигазы T4. Химическую трансформацию компетентных клеток E. coli XL1-Blue (ЗАО «Евроген», Москва, РФ) проводили неочищенной лигазной смесью. Отбор позитивных колоний проводили методом ПЦР с колоний с последующей детекцией методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Для каждого варианта химерного транскрипта отбирали не менее 10 колоний, препаративно наращивали не менее трех позитивных колоний.

Контроль плазмидных стандартов, построение калибровочных кривых: выделение плазмидной ДНК осуществляли набором LumiPure (ООО «Люмипроб РУС», Москва, РФ). Полученные из позитивных колоний плазмиды проверяли на предмет

Таблица 1
Нуклеотидная последовательность праймеров и проб, использованных при создании калибровочных стандартов для мониторинга минимальной остаточной болезни методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией при ОМЛ с t(10;11)(p12.31;q14.2)/PICALM::MLLT10
Table 1
Nucleotide sequence of primers and probes used to create calibration standards for monitoring minimal residual disease by quantitative reverse transcription-PCR in AML with t(10;11)(p12.31;q14.2)/PICALM::MLLT10

Ген	Название	Последовательность (5'-3')	Ссылка
Отбор колоний			
–	M13 fwd	CAGGAAACAGCTATGAC	[27]
–	M13 rev	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	[27]
Клонирование			
PICALM	CALMex18	ACTACACCAACAGGCATGATAGG	Настоящая работа
MLLT10	AF10-ex6	ACCACTGGCTGCTTTGCTTTCTCT	[28]
MLLT10	AF10-ex9	GTGAGAGGAAGAATCACTTAAACTTTG	Настоящая работа
MLLT10	AF10-ex11	TTTGTTGCTGATGACTGTTGGG	Настоящая работа
qRT-PCR			
PICALM	CALM-1929F	GATGACTTGGATTCATCTTTAGCCA	[29]
PICALM	CALM-2156F	TCCTCCACAAATGGGAAGTGTT	[29]
PICALM	pPICALM-1	FAM-TTGTGGGCAATCTTGGCATCGGAAATGGAA-BHQ1	Настоящая работа
PICALM	pPICALM-2	FAM-TAATGACGCAACCAACCTTAATACAGCCAG-BHQ1	Настоящая работа
MLLT10	AF10-4	TAAAGCTCCATCCTTATGGGGACAAAG	Настоящая работа
MLLT10	AF10-6	ACCACTGGCTGCTTTGCTTTCTCT	[28]
MLLT10	AF10-9	ACCAATGCAGGTGATGTTCTGGCT	[28]
MLLT10	AF10-10	AGGTGTGTGCAGAGACTTCTCGG	Настоящая работа

наличия корректных точек разрыва PICALM::MLLT10 и отсутствия точечных мутаций в сайтах отжига праймеров и проб для количественной ОТ-ПЦР методом секвенирования по Сэнгеру (Thermo Fisher). Для последующего приготовления серийных разведений отбирали по одному вектору со вставкой каждого типа. Серийные разведения корректных плазмид готовили исходя из молекулярной массы вектора со вставкой и концентрации плазмидной ДНК, определенной спектрофотометрически и флуориметрически (Qubit, Thermo Fisher), из расчета от 10⁶ до 10¹ копии в 5 мл и проводили с ними количественную ПЦР с соответствующей парой праймеров и Taqman-пробой в двух технических повторностях для каждой точки. ПЦР-реакцию проводили с помощью 2х мастермикса на основе полимеразы OneTaq (NEB), совместимой с Taqman-пробами, в конечном объеме 25 мкл; конечная концентрация каждого праймера составляла 400 нМ, пробы – 200 нМ; матрицу вносили в объеме 5 мкл. ПЦР проводили по следующей программе: 95 °C 15 мин., 45 циклов: 95 °C 15 с. – 60 °C 60 с. Для калибровочных кривых определяли значения углового (slope) и свободного (y-intercept) коэффициентов, а также коэффициента детерминации (R²) и коэффициента вариации (CV) для проб с самым маленьким содержанием молекул-мишеней согласно рекомендациям группы «Европа против рака» [26]. Параллельно для каждой ПЦР-системы проверяли чувствительность методом серийных разведений РНК позитивного образца в смеси РНК здоровых доноров в 10, 1000 и 10 000 раз [25]. Последовательность всех праймеров и проб, использованных в работе, приведена в табл. 1.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы нами были получены плазмиды, содержащие фрагменты PICALM::MLLT10 вблизи точки слияния для 4 основных вариантов химерного транскрипта: экзон 19 – экзон 4, экзон 19 – экзон 6, экзон 19 – экзон 9 и экзон 19 – экзон 10. Схема фрагмента химерного транскрипта PICALM::MLLT10 с точкой слияния экзон 19 – экзон 10, заклонированного в вектор pGEM-T Easy, приведена на рис. 1.

Для каждой из полученных плазмид со вставкой корректность вставки была подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру. Были отбракованы плазмиды, содержащие фрагмент продуктов альтернативного сплайсинга PICALM::MLLT10 со слиянием экзон 17 – экзон 9 (n=1) и экзон 17 – экзон 6 (n=1), а также с точечной заменой в сайте посадки обратного праймера в фрагменте PICALM::MLLT10 со слиянием экзон 19 – экзон 10 (n=1). Последовательность фрагментов PICALM::MLLT10 вблизи точки слияния для 4 основных вариантов химерного транскрипта (экзон 19 – экзон 4, экзон 19 – экзон 6, экзон 19 – экзон 9 и экзон 19 – экзон 10) для отобранных клонов приведена на рис. 2.

Для отобранных корректных плазмид приготовили серийные разведения из расчета 10⁶, 10⁵, 10³, 10², 10¹ копий в 5 мл, что аналогично стандартам, использованным в международном проекте «Европа против рака» [25], а также коммерчески доступным стандартам (например, Ipsogen, Qiagen, Хильден, ФРГ). С ними провели количественную ПЦР с соответствующими праймерами и пробой в двух технических повторностях для каждой точки. Для полученных калибровочных кривых определяли значения углового (slope) и свободного (y-intercept) коэффициентов, а также коэффициента детерминации (R²) и коэффициента вариации (CV) для проб с 10 копиями

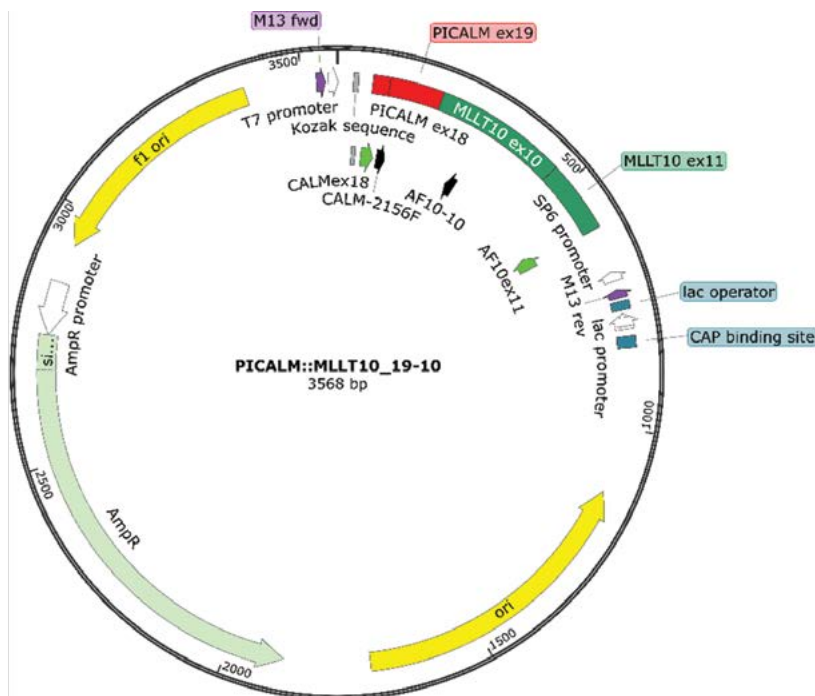


Рис. 1. Схема плазмиды на основе вектора pGEM-T Easy (Promega), содержащей фрагмент химерного транскрипта PICALM::MLLT10 с соединением экзон 19 – экзон 10. Ген PICALM показан красным, MLLT10 – синим; праймеры, используемые для клонирования, показаны зеленым цветом, праймеры для количественной ОТ-ПЦР показаны черным, праймеры M13 обозначены фиолетовым. Ori – ориджин репликации, AmpR – ген устойчивости к ампициллину. Нумерация экзонов соответствует референсным транскриптам MANE ENST00000393346.8 и MANE ENST00000307729.12 для PICALM и MLLT10 соответственно

Fig. 1. Breakpoint fragment of PICALM::MLLT10 fusion transcript with exon 19-exon 10 junction TA-cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). PICALM is shown in red, MLLT10 in blue; primers used for cloning are shown in green, qRT-PCR primers are shown in black, M13 primers are indicated in purple. Ori – origin of replication, AmpR – ampicillin resistance gene. Exon numbering corresponds to the reference transcripts MANE ENST00000393346.8 and MANE ENST00000307729.12 for PICALM and MLLT10, respectively

молекул-мишеней. Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени серийных разведений плазмид, несущих фрагменты различных вариантов химерного транскрипта PICALM::MLLT10, и полученные на их основе калибровочные кривые с их аналитическими характеристиками приведены на рис. 3. Параллельно для индивидуальных комбинаций праймеров и Taqman-пробы, используемых для детекции каждого варианта химерного транскрипта PICALM::MLLT10, также определяли чувствительность методом 10-кратных лимитирующих разведений РНК, выделенной из костного мозга в дебюте заболевания. Аналитические характеристики калибровочных кривых и параметры чувствительности индивидуальных систем праймеров/проб для количественной ОТ-ПЦР приведены в табл. 2.

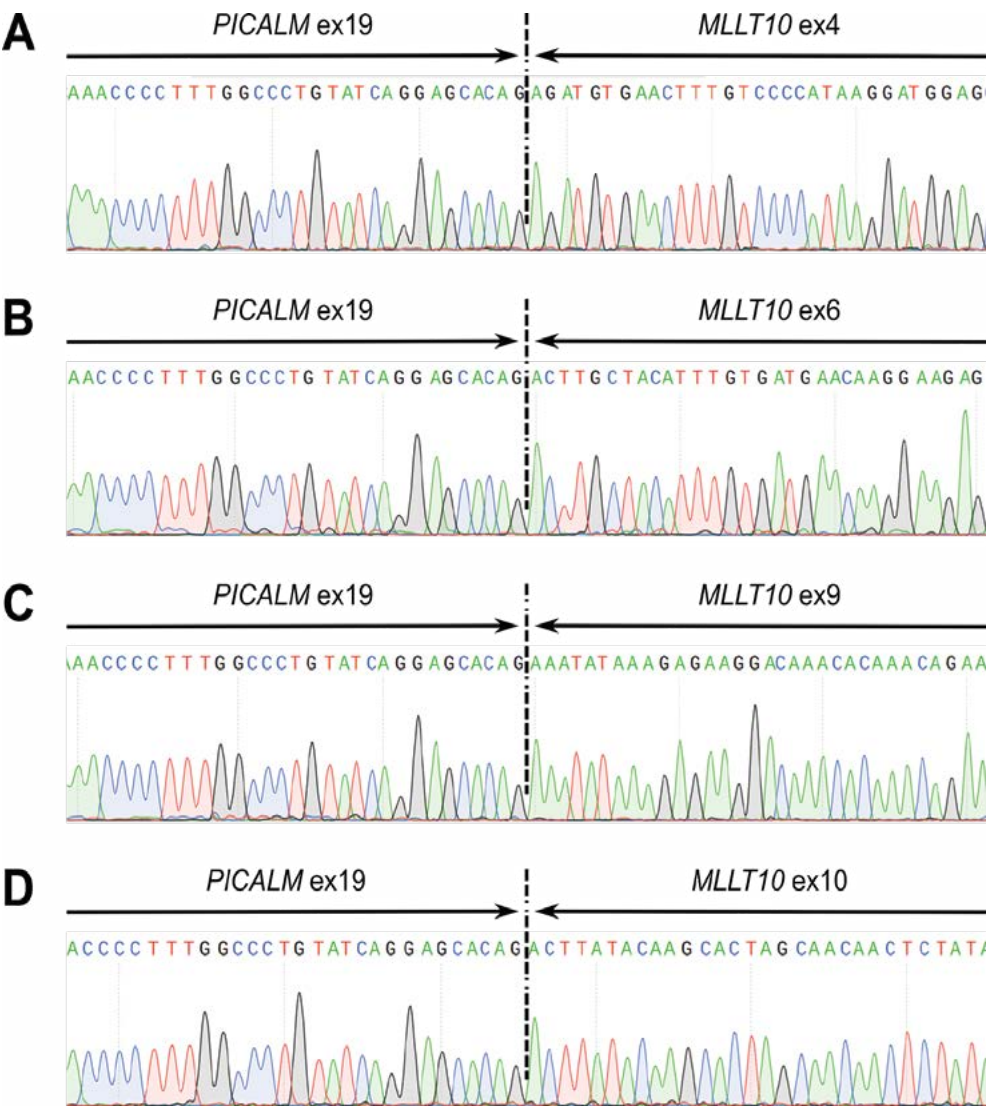


Рис. 2. Последовательность фрагментов PICALM::MLLT10 вблизи точки слияния, определенная методом секвенирования по Сэнгеру, для плазмид на основе вектора pGEM-T Easy (Promega) для клонов, отобранных для приготовления серийных разведений: (A) экзон 19 – экзон 4, (B) экзон 19 – экзон 6, (C) экзон 19 – экзон 9, (D) экзон 19 – экзон 10. Нумерация экзонов соответствует референсным транскриптам MANE ENST00000393346.8 и MANE ENST00000307729.12 для PICALM и MLLT10 соответственно
Fig. 2. Sequence of PICALM::MLLT10 fragments near the fusion point, determined by Sanger sequencing, for plasmids based on the pGEM-T Easy vector (Promega) for clones selected for the preparation of serial dilutions: (A) exon 19 – exon 4, (B) exon 19 – exon 6, (C) exon 19 – exon 9, (D) exon 19 – exon 10. Exon numbering corresponds to the reference transcripts MANE ENST00000393346.8 and MANE ENST00000307729.12 for PICALM and MLLT10, respectively

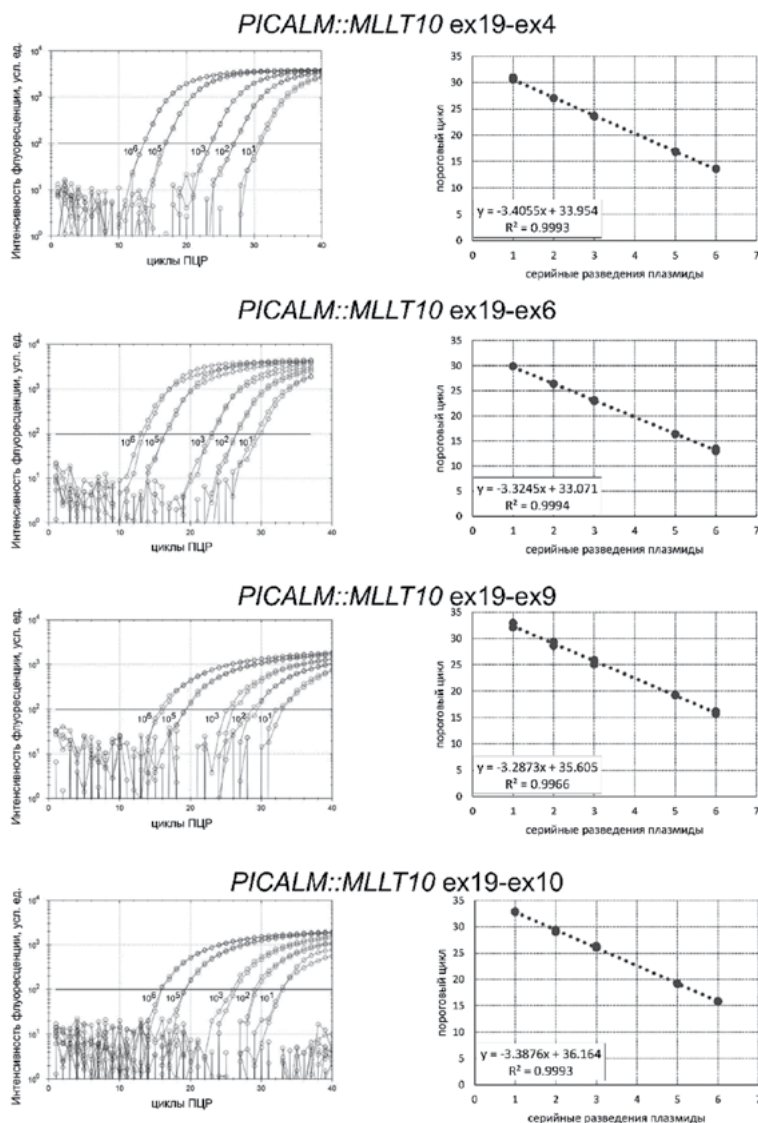


Рис. 3. Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени серийных разведений плазмид, несущих фрагменты различных вариантов химерного транскрипта PICALM::MLLT10 (слева) и полученные на их основе калибровочные кривые с их аналитическими характеристиками (справа). Серийные разведения содержат 10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 копий матрицы в реакции. Уравнение калибровочной кривой приведено в виде $y = k \times x + b$, где y – номер порогового цикла, k – угловой коэффициент, x – десятичный логарифм числа копий матрицы в реакции, b – свободный коэффициент, R^2 – коэффициент детерминации. Значение пороговой линии принято равным 100

Fig. 3. Results of real-time RT-PCR of serial dilutions of plasmids carrying fragments of various PICALM::MLLT10 variants (left) and calibration curves obtained on their basis with their analytical characteristics (right). Serial dilutions contain 10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copies of template per reaction. The calibration curve equation is given in the form of $y = k \times x + b$, where y is the number of the threshold cycle, k is the slope, x is the decimal logarithm of the template copies number in the reaction, b is the y-intercept, R^2 is the determination coefficient. The baseline threshold is 100

Таблица 2
Аналитические характеристики калибровочных кривых и параметры чувствительности индивидуальных систем праймеров/проб для количественной ОТ-ПЦР для детекции экспрессии химерного транскрипта PICALM::MLLT10 с вовлечением экзона 19 гена PICALM и экзонов 4, 6, 9 и 10 гена MLLT10
Table 2
Analytical characteristics of calibration curves and sensitivity parameters of individual primer/probe systems for quantitative RT-PCR for detecting the expression of the chimeric transcript PICALM::MLLT10 involving PICALM exon 19 of the gene and MLLT10 exons 4, 6, 9 and 10

PICALM::MLLT10	ex19-ex4	ex19-ex6	ex19-ex9	ex19-ex10	Среднее, разброс	[25]
Calibrators (10⁶, 10⁵, 10³, 10², 10¹ matrix copies in a reaction)						
Угловой коэффициент (slope)	3,4055	3,3245	3,2873	3,3876	3,4±0,05	3,3±0,3
Свободный коэффициент (y-intercept)	33,954	33,071	35,605	36,164	34,7±1,24	39,8±1
Коэффициент вариации R ²	0,9993	0,9994	0,9966	0,9993	0,9986	>0,95
Коэффициент вариации (CV, 10 копий в реакции)	0,72%	1,12%	1,29%	0,17%	1,12±0,43	<4%
RNA serial dilutions (1/10, 1/1000, 1/10 000)						
Угловой коэффициент (slope)	3,596	3,5446	3,6496	3,7907	3,6±0,09	3,45±0,3
R ²	0,9969	0,9978	0,9983	0,991	0,996	>0,95
Коэффициент вариации (CV, 1/10 000 разведение)	0,26%	0,70%	0,19%	0,93%	0,7±0,31	<6%

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Хромосомная транслокация t(10;11)(p12.31;q14.2) была впервые описана как рекуррентная при Т-ОЛЛ в 1991 году и впоследствии была обнаружена при других гематологических новообразованиях [30, 31]. Детальный молекулярно-генетический анализ этой перестройки с описанием вовлеченных генов [32] был проведен позже на клеточной линии U937, полученной от пациента с гистиоцитарной лимфомой [33]. Оказалось, что результатом транслокации является образование химерного гена PICALM::MLLT10. В экспрессируемом с него белке N-концевая часть принадлежит фрагменту белка CALM/PICALM, который является повсеместно экспрессирующимся компонентом системы клатрин-опосредованного эндоцитоза [34]. Дефекты белка CALM приводят к нарушению формирования эндоцитарных везикул, опосредованного трансферрином захвата железа и, как следствие, к нарушению эритропоэза [35–37]. С-концевая часть химерного белка принадлежит фрагменту MLLT10, который содержит PHD-домен и служит кофактором гистоновой метилтрансферазы DOT1L [38, 39], способствуя эффективной элонгации транскрипции РНК-полимеразой II за счет привлечения DOT1L.

Патогенетическим механизмом действия химерного белка PICALM-MLLT10 считается эктопическая активация генов HOXA-кластера, MEIS1 и BMI1 [40]. Повышенная экспрессия HOXA9 увеличивает количество миелоидных предшественников и блокирует дифференцировку В-лимфоцитов в клеточных и мышиных моделях [41]. Повышенная экспрессия HOXA10 в костном мозге мышей нарушает миелоидную и В-лимфоидную дифференцировку и приводит к развитию ОМЛ [42, 43].



Транслокация t(10;11)(p12.31;q14.2)/PICALM::MLLT10 встречается достаточно редко – на сентябрь 2023 в базе данных хромосомных транслокаций и химерных генов Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer [44] описано 23 случая PICALM::MLLT10-позитивных ОМЛ. Тем не менее, она включена в классификации миелоидных неоплазий ICC [3] как значимый для биологии и патогенеза ОМЛ молекулярный маркер. Данные выживаемости PICALM::MLLT10-позитивных лейкозов свидетельствуют о неблагоприятном прогностическом значении этого маркера. t(10;11)(p12.31;q14.2)/PICALM::MLLT10 ассоциирована с высокой частотой поражения центральной нервной системы [45] и характеризуется высоким риском рецидива заболевания, в том числе после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [46]. Хотя есть отдельные сообщения об успехе стандартных терапевтических режимов [26], данные более крупных когортных исследований подтверждают неблагоприятное прогностическое значение PICALM::MLLT10 при ОМЛ [47, 48]. В соответствии с перечисленными биологическими и клиническими особенностями t(10;11)(p12.31;q14.2) включена в протокол ОМЛ-MRD-2018 в качестве маркера высокого риска.

В настоящей работе нами были созданы и оценены калибровочные стандарты для количественной оценки экспрессии различных вариантов химерного гена PICALM::MLLT10 со слиянием экзон 19 – экзон 4, экзон 19 – экзон 6, экзон 19 – экзон 9 и экзон 19 – экзон 10. Чувствительность примененных в настоящей работе систем детекции составила 10 копий в реакции в ПЦР с плазмидными стандартами и 1/10 000 в 10-кратных лимитирующих разведениях (табл. 2). Значение углового коэффициента для калибровочных стандартов составило $3,4 \pm 0,05$, свободного коэффициента – $34,7 \pm 1,24$, значение R^2 превышало 0,95 во всех случаях, коэффициент вариации для образцов с минимальным содержанием молекул-мишеней (10^1 копий в реакции) составил $1,12 \pm 0,43\%$, что укладывается в диапазон значений, рекомендованных группой «Европа против рака» [25]. Существенные отличия наблюдались в значении свободного коэффициента ($34,7 \pm 1,24$ против $39,8 \pm 1$), что, однако, связано с технической причиной – для уменьшения базового шума нами был использован протокол ОТ-ПЦР в режиме реального времени, предполагающий отсутствие детекции в течение 5 первых циклов ПЦР. Таким образом, характеристики полученных калибровочных стандартов позволяют использовать их для адекватной количественной оценки экспрессии химерного транскрипта PICALM::MLLT10 на терапии.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень МОБ является важным параметром, включенным в современные протоколы лечения ОМЛ для оценки ответа на проводимую терапию. Одним из высокочувствительных методов детекции МОБ является количественная ОТ-ПЦР на химерные транскрипты – продукты рекуррентных хромосомных транслокаций, которые являются заведомо соматическими, исключительно опухолевыми и стабильными в клональной эволюции опухоли молекулярными маркерами. При этом высокая генетическая гетерогенность ОМЛ затрудняет разработку и валидацию стандартных систем праймеров и проб, а также калибровочных стандартов для количественной ОТ-ПЦР, так как большинство рекуррентных транслокаций встречается в очень небольшом проценте случаев. ТА-клонирование фрагментов химерных транскриптов из клеток пациентов в дебюте заболевания с последующим получением

калибровочной кривой из плазмидных стандартов и оценкой их аналитических характеристик является альтернативой коммерческим калибровочным стандартам в случае редких хромосомных перестроек.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bolouri H, Farrar J.E., Triche T., Jr. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med.* 2018;24(1):103–112. doi: 10.1038/nm.4439
2. Khoury J.D., Solary E., Aba O. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia.* 2022;36(7):1703–1719. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1
3. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R.P. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood.* 2022;140(11):1200–1228. doi: 10.1182/blood.2022015850
4. Dohner H., Wei A.H., Appelbaum F.R. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022;140(12):1345–1377. doi: 10.1182/blood.2022016867
5. Karol S.E., Coustan-Smith E., Cao X. Prognostic factors in children with acute myeloid leukaemia and excellent response to remission induction therapy. *Br J Haematol.* 2015;168(1):94–101. doi: 10.1111/bjh.13107
6. Rubnitz J.E., Inaba H., Dahl G. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(6):543–52. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70090-5
7. Tierens A., Bjorklund E., Siitonen S. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study. *Br J Haematol.* 2016;174(4):600–9. doi: 10.1111/bjh.14093
8. Vidrales M.B., Perez-Lopez E., Pegenaute C. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res.* 2016;40:1–9. doi: 10.1016/j.leukres.2015.10.002
9. Group M.-A.-B.S., Langebrake C., Creutzig U. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(22):3686–92. doi: 10.1200/JCO.2005.05.4312
10. San Miguel J.F., Martinez A., Macedo A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 1997;90(6):2465–70.
11. Terwijn M., van Putten W.L., Kelder A. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3889–97. doi: 10.1200/JCO.2012.45.9628
12. Konoplev S., Wang X., Tang G. Comprehensive immunophenotypic study of acute myeloid leukemia with KMT2A (MLL) rearrangement in adults: A single-institution experience. *Cytometry B Clin Cytom.* 2022;102(2):123–133. doi: 10.1002/cyto.b.22051
13. Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(29):3625–32. doi: 10.1200/JCO.2011.41.5323
14. Benetton M., Merli P., Walter C. Molecular Measurable Residual Disease Assessment before Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients: A Retrospective Study by the I-BFM Study Group. *Biomedicines.* 2022;10(7). doi: 10.3390/biomedicines10071530
15. Jourdan E., Boissel N., Chevret S. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2213–23. doi: 10.1182/blood-2012-10-462879
16. Krauter J., Gorlich K., Ottmann O. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol.* 2003;21(23):4413–22. doi: 10.1200/JCO.2003.03.166
17. Chendamalai E., Balasubramanian P., George B. Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. *Blood.* 2012;119(15):3413–9. doi: 10.1182/blood-2011-11-393264
18. De Braekeleer E., Douet-Guilbert N., Morel F. ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leuk Res.* 2012;36(8):945–61. doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.010
19. De Braekeleer E., Ferec C., De Braekeleer M. RUNX1 translocations in malignant hemopathies. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1031–7.
20. Meyer C., Larghero P., Almeida Lopes B. The KMT2A recombinome of acute leukemias in 2023. *Leukemia.* 2023;37(5):988–1005. doi: 10.1038/s41375-023-01877-1
21. Lomov N., Zerkalenskova E., Lebedeva S. Cytogenetic and molecular genetic methods for chromosomal translocations detection with reference to the KMT2A/MLL gene. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2021;58(3):180–206. doi: 10.1080/10408363.2020.1844135
22. Pallisaard N., Hokland P., Riishoj D.C. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood.* 1998;92(2):574–88.
23. Lebedeva S., Borkovskaya A., Dadahanova E. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with KMT2A gene rearrangements: comparison of real-time multiplex and monoplex RT-PCR methods. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe.* 2023;9(1):35–45. doi: 10.34883/PI.2023.9.1.002
24. Beillard E., Pallisaard N., van der Velden V.H. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2474–86. doi: 10.1038/sj.leu.2403136
25. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2318–57. doi: 10.1038/sj.leu.2403135
26. Krzisch D., Zduniak A., Veresezan E.L. Successful treatment of T/myeloid mixed-phenotype acute leukemia with the translocation (10;11)(p13;q14) PICALM/AF10 with 3 + 7 myeloid standard treatment: A case report. *Clin Case Rep.* 2021;9(3):1507–1513. doi: 10.1002/ccr3.3815
27. Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 1983;101:20–78. doi: 10.1016/0076-6879(83)01005-8
28. Burmeister T., Meyer C., Groger D. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res.* 2015;39(2):242–7. doi: 10.1016/j.leukres.2014.11.017
29. Ben Abdelali R., Asnafi V., Petit A. The prognosis of CALM-AF10-positive adult T-cell acute lymphoblastic leukemias depends on the stage of maturation arrest. *Haematologica.* 2013;98(11):1711–7. doi: 10.3324/haematol.2013.086082



30. Kobayashi H., Hosoda F., Maseki N. Hematologic malignancies with the t(10;11) (p13;q21) have the same molecular event and a variety of morphologic or immunologic phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20(3):253–9. doi: 10.1002/(sic)1098-2264(199711)20:3<253::aid-gcc5>3.0.co;2-1
31. Secco C., Wiernik P.H., Bennett J.M. Acute leukemia with t(10;11)(p11-p15;q13-q23). *Cancer Genet Cytogenet*. 1996;86(1):31–4. doi: 10.1016/0165-4608(95)00165-4
32. Dreyling M.H., Martinez-Climent J.A., Zheng M. The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4804–9. doi: 10.1073/pnas.93.10.4804
33. Sundstrom C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976;17(5):565–77. doi: 10.1002/ijc.2910170504
34. Tebar F., Bohlander S.K., Sorkin A. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell*. 1999;10(8):2687–702. doi: 10.1091/mbc.10.8.2687
35. Ishikawa Y., Maeda M., Pasham M. Role of the clathrin adaptor PICALM in normal hematopoiesis and polycythemia vera pathophysiology. *Haematologica*. 2015;100(4):439–51. doi: 10.3324/haematol.2014.119537
36. Scotland P.B., Heath J.L., Conway A.E. The PICALM protein plays a key role in iron homeostasis and cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(8):e44252. doi: 10.1371/journal.pone.0044252
37. Suzuki M., Tanaka H., Tanimura A. The clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice. *PLoS One*. 2012;7(2):e31854. doi: 10.1371/journal.pone.0031854
38. Chen S., Yang Z., Wilkinson A.W. The PZP Domain of AF10 Senses Unmodified H3K27 to Regulate DOT1L-Mediated Methylation of H3K79. *Mol Cell*. 2015;60(2):319–27. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.019
39. Deshpande A.J., Deshpande A., Sinha A.U. AF10 regulates progressive H3K79 methylation and HOX gene expression in diverse AML subtypes. *Cancer Cell*. 2014;26(6):896–908. doi: 10.1016/j.ccell.2014.10.009
40. Dik W.A., Brahim W., Braun C. CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. *Leukemia*. 2005;19(11):1948–57. doi: 10.1038/sj.leu.2403891
41. Thorsteinsdottir U., Mamo A., Kroon E. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*. 2002;99(1):121–9. doi: 10.1182/blood.v99.1.121
42. Bjornsson J.M., Andersson E., Lundstrom P. Proliferation of primitive myeloid progenitors can be reversibly induced by HOXA10. *Blood*. 2001;98(12):3301–8. doi: 10.1182/blood.v98.12.3301
43. Thorsteinsdottir U., Sauvageau G., Hough M.R. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*. 1997;17(1):495–505. doi: 10.1128/MCB.17.1.495
44. Mitelman F., Johansson B., Mertens F.E. *Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer*. 2023.
45. Kelly L.M., Gilliland D.G. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179–98. doi: 10.1146/annurev.genom.3.032802.115046
46. Lin P., Jones D., Dorfman D.M. Precursor B-cell lymphoblastic lymphoma: a predominantly extranodal tumor with low propensity for leukemic involvement. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(11):1480–90. doi: 10.1097/00000478-200011000-00003
47. Borel C., Dastugue N., Cances-Lauwers V. PICALM-MLLT10 acute myeloid leukemia: a French cohort of 18 patients. *Leuk Res*. 2012;36(11):1365–9. doi: 10.1016/j.leukres.2012.07.008
48. Mark C., Meshinchi S., Joyce B. Treatment outcomes of childhood PICALM::MLLT10 acute leukaemias. *Br J Haematol*. 2023. doi: 10.1111/bjh.19067