

УДК.: 575.08: 616.15-076.5

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Мирзоева Л.А

Национальный Университет Узбекистана им. М.Улугбека

Аннотация: Данный обзор посвящен преимуществам, ограничениям, клиническому применению и будущим перспективам трех молекулярных методов (анализ на основе массивов, MLPA и NGS), используемых в настоящее время для генетического тестирования и/или трансляционных исследований МДС. Для выбора наиболее подходящей терапии используется несколько классификаций и прогностических систем. Классификации миелодиспластических синдромов в основном основаны на устоявшихся морфологических критериях. Общепринятая пересмотренная классификация ВОЗ (2008) учитывает также цитогенетические характеристики: количество периферических цитопений, процент бластов в периферической крови и костном мозге, доля кольцевых сидеробластов, наличие палочек Ауэра, обнаружение цитогенетической аномалии - изолированной *del(5q)*.

Ключевые слова: миелодиспластические синдромы, острый миелоидный лейкоз, соматические мутации, прогностические маркеры

ВВЕДЕНИЕ

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенный спектр предзлокачественных заболеваний стволовых кроветворных клеток, характеризующихся гиперклеточным костным мозгом, в котором наблюдается дефектное созревание всех линий клеток крови. Клинически MDS ассоциируются с неэффективным гемопоэзом, цитопенией периферической крови и повышенным риском прогрессирования в острый миелоидный лейкоз (AML) примерно у трети пациентов. МДС чаще всего диагностируются у пожилых людей и имеют крайне вариабельное клиническое течение и прогноз [1]. У многих пациентов МДС протекают бессимптомно и проявляются в виде отклонений в обычном анализе клеток крови. Симптомы развиваются по мере того, как производство нормальных клеток крови все больше и больше нарушается. Они обычно неспецифичны и зависят от типа клеток (например, обычно это анемия). Около 10 % случаев МДС являются вторичными, чаще всего вследствие лучевой терапии или химиотерапии (особенно с использованием алкилирующих агентов) по поводу первичного рака. Вторичные МДС имеют худший прогноз, чем случаи *de novo*. Молекулярные изменения с

возможным прогностическим значением при МДС, выявленные с помощью массивов и/или NGS-анализов (например, с-CBL, ASXL1 и TET-2, см. также ниже), пока не включены в прогностические модели. Обнаружение связи между наличием del5q и ответом на леналидомид привело к целенаправленному лечению этих пациентов и открытию RPS14 как критического гена в области del(5)(q31.5)55 [1,2]. Генетическая эволюция МДС - это динамический процесс, характеризующийся множественными циклами приобретения генетических аномалий и последующей клональной селекции. Частота клональных хромосомных aberrаций необычайно высока: они встречаются в 30 % случаев МДС de novo и до 50 % случаев МДС, связанных с терапией [6]. Кариотип клеток костного мозга остается одним из важнейших прогностических маркеров МДС. Числовые aberrации (моносомия 5 или 7, трисомия 8, потеря Y-хромосомы) и структурные аномалии или изменения числа копий (делеции или амплификации) хромосом 5, 7, 8 и 20 являются одними из наиболее распространенных цитогенетических нарушений, наблюдаемых при МДС [7]. Развитие технологий стало основной движущей силой последних открытий в области генетики МДС, поскольку от «сканирования генома с низким разрешением» с использованием традиционной цитогенетики и повторного секвенирования генов-кандидатов перешли к технологиям на основе массивов и NGS10. Инструменты геномного анализа позволили обнаружить субмикроскопические структурные вариации генома, так называемые вариации числа копий ДНК (CNV). Двенадцать процентов генома человека можно отнести к структурным вариантам, содержащим делеции, дупликации, инверсии или большие тандемные повторы. Выявление CNV, чаще всего делеций, амплификаций/дупликаций и регионов с нейтральной потерей гетерозиготности с помощью платформ на основе массивов данных, привело к идентификации генов, которые часто мутируют при миелоидных злокачественных опухолях [1,3,5]. Для диагностических целей с клиническими последствиями CNV должны включать как минимум критический участок ДНК синдрома и, если известно, причинные гены. Наибольшую сложность в интерпретации представляет дискриминация между CNV, которые могут быть причиной заболевания, и CNV, которые представляют собой лишь доброкачественный полиморфизм ДНК. Клиническая интерпретация данных проста и понятна, когда наборы зондов оценивают только известные aberrации (MLPA-анализ), в отличие от скрининга всего генома методом aCGH, который может выявить хромосомные аномалии, которые не были описаны ранее, и их клиническая интерпретация неясна. В настоящее время для выявления изменений числа копий используется несколько различных подходов, включая стандартный хромосомный анализ, флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH), методы на основе массивов и MLPA.

В недавнем исследовании, основанном на секвенировании следующего поколения, было проведено полногеномное секвенирование 29 образцов МДС и выявлены новые соматические мутации, затрагивающие гены, кодирующие несколько компонентов механизма сплайсинга РНК (U2AF35, ZRSR2, SRSF2 и SF3B1). Дальнейшие исследования с использованием технологии NGS расширили значение аномалий сплайсинга мРНК при МДС, продемонстрировав мутации в SF3B1 у 20 % из 354 пациентов, но с более высокой степенью специфичности для подтипа МДС с кольцевыми сидеробластами. Целевые исследования с глубоким секвенированием проводятся путем ампликонного повторного секвенирования мутационных участков установленных маркеров заболевания, например, изменений RAS-пути при миелопролиферативных заболеваниях, изменений SEBPA при АМЛ или мутаций TP53 при МДС низкого риска. Тестирование панели генов становится передовым методом получения максимально возможного количества информации для определения молекулярного профиля отдельного пациента с МДС. Только платформы NGS могут предоставить такую информацию сегодня и в ближайшем будущем. Портфель генов, подлежащих исследованию и потенциальному рутинному тестированию при МДС, может быть следующим: TET2, KRAS, CBL, ETV6, EZH2, ASXL1, TP53, U2AF1, UTX, WT1, SF3B1, SRSF2, RUNX1, FLT3, MLL-PTD и NRAS. В настоящее время мутации RUNX1, характерные для конкретного пациента, предложено считать клинически полезными биомаркерами прогрессирования заболевания от МДС до вторичного АМЛ.

Эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК и модификации гистонов, приводят к клональным изменениям в экспрессии генов и могут опосредовать дисфункцию путей при неопластической трансформации. Хотя этиопатогенез МДС считается крайне гетерогенным, подтипы заболевания можно в значительной степени объяснить нарушениями эпигенетики стволовых клеток. У пациентов с ранней стадией МДС можно обнаружить гиперметилирование ДНК целого ряда генов, что влияет на важнейшие клеточные функции: CDKN2A (клеточный цикл), DAPK1, RIL, CDH1 и CDH13 (адгезия и подвижность). Метилирование CpG-динуклеотидов опосредовано ДНК-метилтрансферазами, включая DNMT1, DNMT3A и DNMT3B. Гетерозиготные мутации DNMT3A были выявлены у 8 % пациентов с МДС. Эти пациенты имеют более низкую общую выживаемость и более быстрое прогрессирование в АМЛ по сравнению с пациентами без таких мутаций.

Сравнительная геномная гибридизация на основе массивов (aCGH). Изначально сравнительная геномная гибридизация (CGH) была методом определения прироста и потери числа копий между двумя образцами ДНК путем полной гибридизации этих двух дифференциально меченых ДНК с метафазными хромосомами²³. В последнее время на смену метафазным

хромосомам пришли форматы на основе микрочипов (array-CGH) с использованием вставленных геномных клонов или олигонуклеотидов²⁴. aCGH позволяет выявлять вариации числа копий в масштабах всего генома с высоким разрешением и в настоящее время рекомендуется в качестве генетического теста первой линии при MDS вместо стандартного кариотипирования. Коммерчески доступные платформы массивов имеют примерно в 50 раз более высокое разрешение, чем цитогенетический анализ, и выявляют хромосомные аномалии в 15-20 % образцов по сравнению с 4 % при классическом кариотипировании в той же популяции пациентов. Основным преимуществом aCGH перед FISH является возможность одновременного выявления изменений копий ДНК в контрольных образцах, меченных различными флуоресцентными красителями и когибридизированных с чипом, содержащим массивы геномных клонов или олигонуклеотидных зондов²⁷. После примерно 24-часовой гибридизации и промывки массивы сканируются с помощью флуоресцентного сканера. Соотношение флуоресценции гибридизационных сигналов исследуемого и контрольного образцов определяется в различных позициях вдоль генома и дает информацию об относительном числе копий ДНК в исследуемом геноме по сравнению с нормальным диплоидным геномом²⁹. Основное преимущество aCGH в генетическом тестировании MDS заключается в том, что для успешного анализа не требуются пролиферирующие клетки. Однако доля злокачественных клеток в образце должна достигать предела обнаружения около 25-35 % (ссылка 30). Как правило, сбалансированные перестройки, мозаицизм низкого уровня и полиплоидия не выявляются с помощью aCGH (ссылка 31). Стандартное разрешение варьирует в пределах 1-5 Мб и может быть увеличено примерно до 40 кб. Часть процедуры aCGH является полуавтоматизированной, а результаты анализируются с помощью биостатистического алгоритма. Было разработано несколько различных подходов на основе массивов, направленных, в частности, на улучшение разрешения aCGH. В настоящее время существуют коммерчески доступные платформы на основе массивов ДНК (бактериальных искусственных хромосом - BAC, олигонуклеотидов, однонуклеотидных полиморфизмов - SNP), синонимичными названиями которых являются хромосомный микрочип или молекулярное кариотипирование. Геномное разрешение различных платформ aCGH определяется расстоянием между зондами ДНК и их длиной (например, BACs 75-200 кб; клоны с меньшими вставками, космиды 30-40 кб; фосмиды 40-50 кб и олигонуклеотиды 25-85 пм).

Таблица 1.

Методы с использованием технологии массивов в сравнении с классическими методиками

Метод	Разрешение	Чувствительность	Скрининг новых	Сбалансированные
Стандартное	низкий	10%	Да	Да
FISH	низкий	>50-80%	Нет	Нет
aCGH, SNP	высокий	2-30%	Да	Нет

В онкогематологии микрочипы могут быть использованы для уточнения диагноза, выявления новых подтипов заболевания, прогнозирования ответа на лечение и определения генов и путей, связанных с патогенезом, что позволяет определить мишени для рациональной терапии³⁷. Словак и др.³² с помощью геномного микрочипа на основе BAC выявили новые CNV у 47 % (14/30) пациентов. Криптические делеции RUNX1 размером 344 кб были обнаружены у трех пациентов в момент трансформации АМЛ. Другие обнаруженные CNV включали 3q26.2/EVI1, 5q22/APC, 5q32/TCERG1, 12p13.1/ EMP1, 12q21.3/KITLG и 17q11.2/NF1.

Олигонуклеотидные массивы на основе SNP (массивы SNP) используются для выявления изменений числа копий генома и аллельного дисбаланса при различных гематологических злокачественных новообразованиях³⁸⁻³⁹. Высокое разрешение, геномный охват и минимальные требования к количеству ДНК являются преимуществом для использования в клинических условиях⁴⁰. Диагностические лаборатории начали внедрять SNP-массивы, чтобы исключить необходимость проведения нескольких FISH-тестов, обеспечить высокое разрешение анализа технологически сложных образцов и генерировать информацию о CNV одновременно с генотипированием⁴¹. MDS представляет собой убедительную модель для исследования с помощью SNP-массивов с целью выявления новых клональных молекулярных изменений, имеющих значение для патогенеза, оценки их влияния на прогрессирование заболевания и ответ на лечение⁴⁰.

Материалы и методы исследование. Мультиплексная амплификация с использованием лиганд-зависимых зондов (MLPA). Анализ MLPA - это недавно разработанная методика целенаправленного выявления CNV во многих генах человека одновременно. Развитие этого анализа для множества генетических локусов обеспечило новый подход к рутинной диагностике CNV.

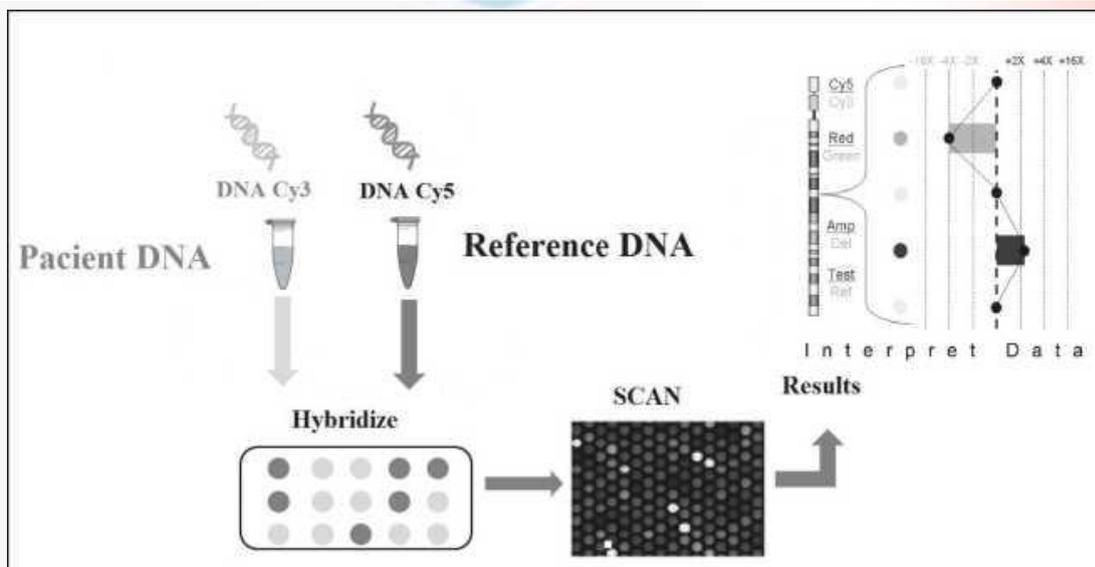


Рисунок 1. Схематичный обзор aCGH.

Тестовая и контрольная ДНК мечены зеленым и красным флуорохромами. Изображения флуоресцентных сигналов захватываются и анализируются.

К настоящему времени коммерчески доступны более 300 наборов зондов, специфичных для очень широкого спектра генетических заболеваний. MLPA - это мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на технологии, которая позволяет количественно определить до 50 различных геномных мишеней одновременно в одном эксперименте путем амплификации специфических гибридизирующих зондов⁴². Поскольку последовательность, распознаваемая зондом MLPA, имеет длину всего 50-70 нуклеотидов, этот анализ очень полезен для выявления делеций или амплификации отдельных экзонов¹⁴. Одно из главных преимуществ MLPA - высокая специфичность, поскольку этот метод способен различать последовательности, отличающиеся по длине всего на один нуклеотид. Еще одним преимуществом является небольшое количество исходной ДНК (минимум 20-50 нг), необходимое для успешного проведения реакции MLPA¹⁴. Анализ имеет ряд ограничений с aCGH: сбалансированные перестройки, полиплоидия и низкая доля проверенных CNV не выявляются MLPA. Предел обнаружения составляет приблизительно 20% доли тестируемого клеточного клона в образце. В случае ДНК низкого качества анализ данных может быть затруднен, и результаты должны быть подтверждены альтернативным методом, предпочтительно aCGH (ссылка 41). До 40-50 небольших специфических зондов направляются на интересующие области ДНК и на референтные области, не связанные с заболеванием, обеспечивая разрешение большее, чем aCGH на основе FISH или ВАС. Каждый зонд состоит из двух олигонуклеотидов (5- и 3'-концевые зонды), которые гибридизуются с соседними участками целевой последовательности. Короткий олигонуклеотид содержит целевую специфическую последовательность и универсальный праймер ПЦР X. Длинный

зонд состоит из целевой специфической последовательности, универсального праймера ПЦР Υ и последовательности-заполнителя переменной длины между ними (19-370 нуклеотидов) для создания различий в размерах, необходимых для электрофоретического разрешения^{14,45}. Реакция MLPA состоит из пяти этапов (рис. 2) и требует термоциклера и автоматического генетического анализатора для анализа фрагментов методом капиллярного электрофореза. Важнейшим этапом обнаружения дупликации/амплификации является анализ данных и интерпретация результатов. Наиболее широко используется программное обеспечение Coffalyser, программа на основе Excel, способная выполнять шаги нормализации данных и необходимые исправления^{46,47}. Интерпретация результатов основана на математическом сравнении относительных количеств целевой ДНК, амплифицированной из тестируемого (пациентского) образца, с таковыми из нормального (контрольного) образца⁴³. В целом сигналы интерпретируются как aberrантные при пороговых значениях ниже 0,7 (делеция) и выше 1,3 (дупликация/амплификация). Была проанализирована полезность анализа MLPA при тестировании острых лейкозов и миелодиспластических синдромов, что подтвердило превосходную точность и специфичность MLPA по сравнению с FISH (ссылка 39). Наборы SALSA MLPA MDS (P144 и P145, MRC Holland) используются для выявления хромосомных аномалий, обычно связанных с МДС. Смесь зондов содержит зонды для хромосом 7, 8, 11, 12 (ETV6), 17 (TP53), 20 и 21 (RUNX1). Новые приложения MLPA включают, например, определение статуса метилирования и профилирование экспрессии⁴⁸. RT-MLPA (обратная транскриптаза-MLPA) может использоваться для профилирования мРНК и является альтернативным методом ПЦР в реальном времени или экспрессионному микрочипу. Метод позволяет одновременно обнаруживать и относительно количественно определять экспрессию 40 генов в одной реакции ПЦР, изучать профили экспрессии заранее определенного набора генов в небольших популяциях клеток, таких как те, которые присутствуют в состояниях минимальной остаточной болезни (MRD). В MLPA, специфичном к метилированию (MS-MLPA), обнаружение CNV сочетается с профилированием метилирования, и анализ широко используется для одновременного обнаружения aberrантных паттернов метилирования CpG-островков и CNV целевых генов⁵⁰. MS-MLPA считается эквивалентной альтернативой другим анализам метилирования (бисульфитное секвенирование, пиросеквенирование и метилирование-специфическая ПЦР). Самое последнее приложение объединяет MLPA с гибридизацией на основе массива и использует до 200 различных зондов. Array-MLPA значительно увеличивает потенциал для высокого мультиплексирования и представляет собой ценный инструмент в рутинной диагностике.

Секвенирование нового поколения (NGS). Подходы NGS (или массивного параллельного секвенирования) предоставляют точный и всеобъемлющий инструмент для обнаружения соматических мутаций в гетерогенных образцах опухолей. В основных исследованиях, изучающих гематологические злокачественные новообразования, NGS обеспечил беспристрастный подход к обнаружению мутаций, иницирующих рак. Соматические мутации могут влиять на клинический фенотип МДС, но не включены в текущие системы оценки. Основные коммерчески доступные платформы NGS (Roche 454 GS Junior, Illumina HiSeq/ MiSeq, Life Technologies Ion Proton/ PGM) существенно различаются с точки зрения подготовки шаблонов, химии секвенирования, визуализации и анализа данных. Хотя каждый инструмент основан на принципиально разной химии секвенирования, режимы параллельной амплификации и обнаружения схожи, например, за счет использования универсальных кодируемых адаптеров для облегчения захвата и последующей амплификации фрагментов из смешанных образцов⁵². В настоящее время большинство основных типов рака уже охарактеризованы с помощью исследований по секвенированию всего генома (WGS) и всего экзома (WES). Для обеспечения беспристрастной биологической интерпретации варианты, полученные при анализе данных секвенирования, должны быть базами данных для исключения вариантов зародышевой линии и выявления истинных соматических изменений. Используя 116 образцов от 25 пациентов (18 с ОМЛ и 7 с МДС), Кольманн и др. продемонстрировали, что основанный на ампликонах NGS является высокочувствительным методом для точного обнаружения и количественной оценки различных аберраций *RUNX1* с последующим индивидуализированным мониторингом прогрессирования заболевания и эффективности лечения⁵³. Годли и др. предсказывают, что будущее диагностическое тестирование гематологических злокачественных новообразований будет состоять из различных анализов ПЦР, анализа микрочипов и NGS. Совместно эти тесты способны профилировать экспрессию генов и потенциально определять причинную клеточную линию, а также идентифицировать общие хромосомные перестройки и мутации генов⁵⁵. Молекулярный скрининг с помощью NGS и его сочетание с другими подходами необходимо проспективно протестировать на больших когортах пациентов с МДС, чтобы определить клиническую полезность в диагностике заболевания, прогнозировании (включая измерения MRD) и руководстве целевой терапией. Однако необходимо учитывать ограничения NGS; в настоящее время метод требует больших временных и финансовых затрат, охватывает сложный биоинформатический анализ и сталкивается с проблемой сложной интерпретации данных.

Вывод. В заключение приводится краткое резюме для клиницистов с точки зрения рутинной диагностики. Более высокое разрешение, воспроизводимость и пропускная способность, а также точное картирование aberrаций являются наиболее значительными преимуществами как aCGH, так и MLPA. Оба метода подходят для крупномасштабного тестирования хромосомных анеуплоидий и CNV в рутинной лабораторной диагностике. aCGH / MLPA также все чаще используются в качестве методов выбора для диагностики пациентов с МДС с необъяснимыми генетическими aberrациями. Выбор анализов в основном зависит от 1) клинической или исследовательской полезности, 2) спектра оцениваемых aberrаций (целевые или геномные, малые или большие), 3) желаемого уровня пропускной способности, 4) лабораторных ресурсов (доступность оборудования aCGH, экономическая и временная эффективность). С точки зрения лабораторного аналитика, клиницисты, естественно, предпочитают последовательные лабораторные анализы, приводящие к в значительной степени однозначным результатам, полезным для последующего принятия решений, связанных с пациентом. MLPA и микрочипы предлагают хорошо зарекомендовавшую себя и эффективную по времени аналитическую платформу с довольно простой интерпретацией данных. Мощное сочетание MLPA с технологией матриц должно сделать их полезным тестом при скрининге множественных соматических aberrаций и в конечном итоге привести к успешным первым попыткам индивидуальной терапии для пациентов с МДС. Хотя в настоящее время методы NGS (и в меньшей степени также эпигенетические анализы) появляются только как новые инструменты в условиях трансляционных исследований, их роль в персонализированной медицине гематологических злокачественных новообразований еще впереди.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ;

1. Manero G. Prognosis of myelodysplastic syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010;2010:330-7.
2. Barzi A, Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. Cleve Clin J Med 2010;77:37-44.
3. Vardiman J. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. Leuk Res 2012;36:1453-8.
4. Xicoy B, Jimenez MJ, Garcia O, Bargay J, Martinez-Robles V, Brunet S, Arilla MJ, Perez de Oteyza J, Andreu R, Casano FJ, Cervero CJ, Bailen A, Diez M, Gonzalez B, Vicente AI, Pedro C, Bernal T, Luno E, Cedena MT, Palomera L, Simiele A, Calvo JM, Marco V, Gomez E, Gomez M, Gallardo D, Munoz J, de Paz R, Grau J, Ribera JM, Benlloch LE, Sanz G. Results of treatment with azacitidine in patients aged \geq 75 years included in the Spanish Registry of Myelodysplastic Syndromes.

Leuk Lymphoma 2013; Sep 16. [Epub ahead of print]

5. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, Powell B, Greenberg P, Thomas D, Stone R, Reeder C, Wride K, Patin J, Schmidt M, Zeldis J, Knight R. Lenalidomide in the myelodys- plastic syndrome with chromosome 5q deletion. N Engl J Med 2006;355:1456-65.

6. Look AT. Molecular Pathogenesis of MDS. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005:156-60.