

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

2013г.

Регистрационный № 237-1213

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБЕРРАЦИЙ ГЕНА IKZF1 ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

к.б.н.Мелешко А.Н., Прохореня И.В.

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
27.12.2013
Регистрационный № 237-1213

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБЕРРАЦИЙ ГЕНА IKZF1 ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Н. Мелешко, И.В. Прохореня

Минск 2013

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТП — дезоксинуклеотидилтрифосфаты, смесь

КМ — костный мозг

МОБ — минимальная остаточная болезнь

ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз

НХЛ — неходжкинская лимфома

ПК — периферическая кровь

п. о. — пар оснований

ПЦР — полимеразная цепная реакция

Ik1–10 — Ikaros, продукт гена IKZF1, изоформы 1–10

RQ-PCR — real-time quantitative PCR (ПЦР «в реальном времени»)

PAGE — polyacrylamide gel electrophoresis

PBS — phosphate buffered saline

SDS — sodium dodecyl sulfate (лаурилсульфат натрия)

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения нарушений гена опухолевого супрессора IKZF1 (Ikaros), ассоциированных с неблагоприятным прогнозом ОЛЛ.

Область применения: молекулярная биология, гематология, онкология.

Настоящая инструкция по применению предназначена для врачей лабораторной диагностики, занимающихся диагностикой лейкозов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

Центрифуга для пробирок 15–50 мл.

Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин.

Термомиксер.

Вакуумный аспиратор.

Вортекс.

Морозильник -20°C.

Морозильник -80°C.

Спектрофотометр.

ПЦР-боксы.

Термоциклер.

Аппарат для ПЦР в реальном времени (термоциклер с оптическим блоком).

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Документирующая система.

Дозаторы.

Расходные материалы

Вакутайнеры (пробирки для забора крови), КЭДТА, 10–15 мл.

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем — от 0,1 до 1000 мкл).

ПЦР-пробирки (0,2 мл).

96-луночные плашки с прозрачной пленкой.

Оптические ПЦР-пробирки 0,2 мл.

Пробирки типа эппендорф (0,5; 1,5; 2,0 мл).

Центрифужные пробирки 15 и 50 мл.

Реагенты

ЭДТА.

Ингибиторы РНКаз (RNAlater).

Гистопак (Histopaque) или Лимфопреп.

Фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4.

NaCl.

Трис-HCl.

ЭДТА.

SDS (лаурилсульфат натрия).

Протеиназа-К.

Хлороформ.

Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).
Изопропанол.
Ацетат аммония.
В-меркаптоэтанол.
Три-реагент.
Этанол.
Олиго-dT (dT18) олигонуклеотиды.
Смесь трифосфатдезоксинуклеотидов (дНТФ).
Обратная транскриптаза.
Тaq-полимераза.
Олигонуклеотиды (праймеры).
Флуоресцентномеченные олигонуклеотиды (TaqMan-пробы).
Агароза.
Вода деионизованная.
Маркер молекулярного веса.
Трис-боратный буфер, рН = 7,5.
Этидиум бромид.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

S91 Лимфоидный лейкоз [лимфолейкоз]
S91.0 Острый лимфобластный лейкоз
S91.1 Хронический лимфоцитарный лейкоз
S91.2 Подострый лимфоцитарный лейкоз
S91.3 Пролимфоцитарный лейкоз
S91.5 Т-клеточный лейкоз взрослых
S91.7 Другой уточненный лимфоидный лейкоз
S91.9 Лимфоидный лейкоз неуточненный

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Для указанных нозологий отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Суть метода состоит в выявлении с помощью ПЦР делеций или нарушений сплайсинга в гене IKZF1 (Ikaros), ассоциированных с неблагоприятным прогнозом при лейкозах. Ген IKZF1 является гематопоэтическим транскрипционным фактором, ключевым для лимфоидной дифференцировки, и опухолевым супрессором. Характерными для лейкозов аберрациями этого гена являются внутривенные делеции, а также нарушения сплайсинга, ведущие к экспрессии коротких, доминантно-негативных изоформ. Соответственно метод диагностики этих нарушений включает три независимых анализа, каждый из которых расширяет и подтверждает результаты других:

1. Анализ двух наиболее распространенных делеций внутри гена IKZF1 с помощью классической ПЦР и электрофореза в агарозном геле.

2. Количественный ПЦР-анализ в «реальном времени» (RQ-PCR) для определения делеций гена IKZF1 с использованием геномной ДНК из лейкозных клеток.

3. Количественный ПЦР-анализ в «реальном времени» (RQ-PCR) для определения уровня экспрессии длинных (функциональных) и коротких (доминантно-негативных) изоформ Ikaros.

Первые два анализа выполняются на геномной ДНК, полученной из лейкозных клеток КМ и могут применяться для диагностического скрининга в составе комплекса молекулярно-генетической диагностики первичных лейкозов и рецидивов. Первый метод не требует RQ-PCR и включает только традиционную ПЦР и электрофорез в агарозном геле. Второй метод количественный, основан на RQ-PCR и позволяет выявлять те же две делеции локуса IKZF1. Это более быстрый анализ, выполнимый в течение одного рабочего дня.

Третий анализ проводится на кДНК, синтезированной на основе РНК лейкозных клеток пациентов. Этот метод предоставляет дополнительную информацию по уровню и профилю экспрессии различных изоформ Ikaros. Диагностическим признаком служит сверхэкспрессия коротких изоформ Ik6, 9, 10. Как правило, их сверхэкспрессия является результатом внутригенной делеции. Подробная информация по интерпретации результатов анализа приводится в соответствующем разделе инструкции.

Биопсия опухолевого материала

Материалом для выполнения метода является костный мозг пациентов при презентации заболевания или рецидиве лейкоза, при содержании бластных клеток не менее 50%. В вакутайнер с ЭДТА в качестве коагулянта забирают 2–5 мл костно-мозговой пункции. В случае костномозговой пункции в разных местах материал биопсии допускается смешивать на уровне выделения клеток или ДНК/РНК. Бластные клетки выделяются вместе с фракцией моноклеаров путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077 г/мл. Клетки один раз в фосфатно-солевом буфере (PBS), подсчитываются в камере Горяева, и разделяются по 10 млн и используются для выделения ДНК/РНК.

Выделение ДНК, РНК и синтез кДНК

Для выделения геномной ДНК клетки лизируют в буфере для лизиса (DB-буфер) (100 м MNaCl, 10 mMtris-HCl, 25 mM EDTA, 0,5 SDS, 0,1 мкг/мкл протеиназа-K, pH = 8,0) при 45°C в течение 2–5 ч. Выделение ДНК проводится общепринятым способом фенол-хлороформной экстракции и с последующей преципитацией изопропанолом. При необходимости дополнительная очистка ДНК от примеси белка выполняется из DB-буфера за счет его преципитации равным объемом 8M раствором ацетата аммония с последующим осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом. ДНК отмывается 70% этанолом, высушивается и растворяется в 50–200 мкл TE-буфера.

Выделение суммарной РНК проводится с использованием TRIreagent или любого набора. Очищенная РНК растворяется в стерильной воде, измеряется концентрация и чистота РНК на спектрофотометре и немедленно замораживается

на -80°C . Из РНК синтезируется кДНК обратной транскрипцией с использованием рандом-праймеров или Oligo-dT и обратной транскриптазы. Для синтеза используется объем РНК, содержащий 1 мкг РНК. После отжига с праймерами/олиго-dT в течение 5 мин при 70°C аликвота РНК вносится в смесь для обратной транскрипции с 10 ед./мкл обратной транскриптазы и инкубируется при 37°C в течение 1 ч.

Выявление внутригенных делеций в локусе IKZF1 методом традиционной ПЦР

При ОЛЛ возможны различные генетические поломки в локусе IKZF1 (Ikaros), но наиболее широко распространенными являются внутригенные делеции, включающие 3–6-й кодирующий экзон (4–7-й экзон мРНК) и 1–6-й кодирующий экзон (2–7-й экзон мРНК) (рисунок 1).

Поскольку точки разрыва могут происходить со смещением на сотни нуклеотидов, праймеры для ПЦР-амплификации были подобраны на достаточно большом расстоянии от наиболее частых точек хромосомных разрывов. Таким образом, амплифицированный фрагмент при делеции составляет от 1500 до 1600 п.н. Праймеры показаны в таблице 1. В качестве матрицы для ПЦР используется геномная ДНК из мононуклеарной фракции клеток костного мозга при презентации лейкоза.



Нумерация экзонов включает первый, нетранслируемый экзон

Рисунок 1. — Два наиболее типичных варианта делеций в локусе IKZF1 при ОЛЛ

Таблица 1. — Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР анализа делеций ΔEx3–6 и ΔEx1–6. Обратный (R) для обеих делеций общий

Для делеции ΔEx3–6	
ΔEx3–6_F	CCACAGGGCAAGTCATCCACATTTTG
ΔEx3–6_R	CAGACCATAGAGTCCCTCCTAGGGGAAAAA
Для делеции ΔEx1–6	
ΔEx1–6_F	TTCCTCCTCTAATCTTTGGACTTG
ΔEx1–6_R	CAGACCATAGAGTCCCTCCTAGGGGAAAAA

ПЦР выполняется в объеме 30 мкл, содержащем 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТП, 12,5 пмоль каждого из двух праймеров и 1U Taq-полимеразы. Протокол реакции включает 35 циклов: 95°C — 30 с, 62°C — 30 с, 72°C — 1 мин, в завершении — однократный прогрев 72°C — 5 мин.

ПЦР-продукты разделяются в 1,5%-м агарозном геле, окрашиваются этидиум бромидом и фотографируются с помощью документирующей системы. В качестве положительного контроля используется позитивный образец ДНК пациента. При оценке продуктов ПЦР-анализа в агарозном геле положительным результатом является наличие полосы ДНК размером 1500–1600 п.н., соответствующей положительному контролю (рисунок 2).

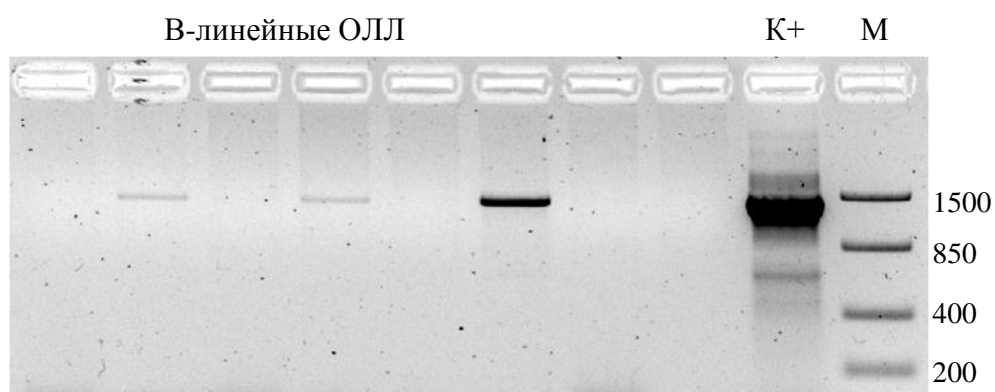


Рисунок 2. — ПЦР-анализ делеции ΔEx3–6 гена IKZF1

Возможно обнаружение тонкой полосы положительного продукта (рисунок 2). Такой результат является положительным, но означает наличие делеции в гене IKZF1 в минорных субпопуляциях лейкозного клона (следует учитывать процент бластных клеток в образце биопсии). Для количественного определения процента клеток, содержащих делецию, полученный ПЦР-продукт при необходимости можно секвенировать с использованием тех же праймеров для точной локализации точки разрыва ДНК.

Выявление внутригенных делеций в локусе IKZF1 методом RQ-PCR

Метод RQ-PCR позволяет выявлять те же два варианта делеций, а также оценивать количество клеток с делецией относительно общего количества клеток по значению начала роста амплификационной кривой (Ct). Поскольку в данном методе амплифицируется небольшой фрагмент ДНК, а место разрыва ДНК при делеции варьирует в некотором диапазоне, предлагается несколько вариантов праймеров с флуоресцентно-мечеными TaqMan-пробами (таблица 2). В качестве матрицы для ПЦР используется геномная ДНК из мононуклеарной фракции клеток костного мозга при презентации лейкоза.

Таблица 2. — Нуклеотидные последовательности праймеров для RQ-PCR анализа делеций ΔEx3–6 и ΔEx1–6. Прямой праймер обозначен как F, обратный R, проба ТМ.

Для делеции ΔEx1–6 (1 пара праймеров)	
F- IKZF1-A	CCTTTGAAGCTTACAAGAAGAGAAA
R- IKZF1-C	CCTTGAAGAAGAAACAGTTACACTAGACT
ТМ- IKZF1-A	FAM-TTGCTCAAAAAGGGCACATGTAC-BHQ
Для делеции ΔEx3–6 (2 пара праймеров)	
F- IKZF1-B	TCTTAGAAGTCTGGAGTCTGTGAAGGT
R- IKZF1-B	AGGAATAAAATGCAAATCACCTTGA
ТМ- IKZF1-C	FAM-AATTGACGGCATCCAGGGATCTCAGA-BHQ
Для делеции ΔEx3–6 (3 пара праймеров)	
F- IKZF1-C	CCCAGCCCATAGGGTATAAATAAT
R- IKZF1-C	CCTTGAAGAAGAAACAGTTACACTAGACT
ТМ- IKZF1-C	FAM-AATTGACGGCATCCAGGGATCTCAGA-BHQ
Контрольный ген альбумина	
Albumin1	TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT
Albumin2	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT
Albumin-ТМ	FAM-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-BHQ

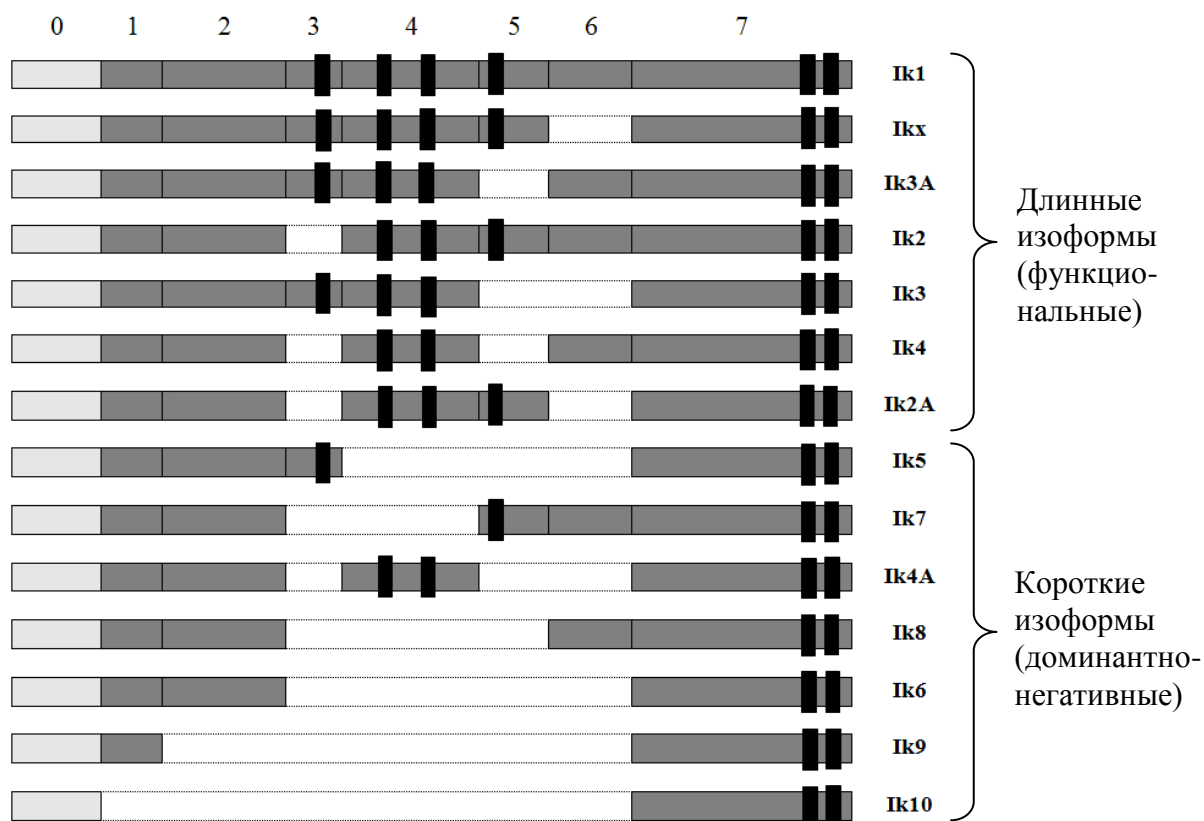
Все ТМ-пробы помечены флуоресцентными метками FAM (5') и BHQ (3'). Реакция выполняется в объеме 20 мкл с готовым 2X супермиксом. В реакцию вносится 500 нг геномной ДНК, по 10 пмоль каждого праймера и 3 пмоля ТМ-пробы. Как правило, раскапывается по 15 мкл смеси ПЦР и в нужные лунки (пробирки) вносится 5 мкл образца ДНК концентрацией примерно 100 нг/мкл. Условия ПЦР выполняются согласно инструкции набора супермикса и прибора для RQ-PCR. Амплификация проводится 60 циклов, каждый включает 95°C — 15 с, 62°C — 1 мин. Фиксация уровня флуоресценции выполняется на стадии элонгации (62°C). Реакция выполняется в триплетах для каждой пары праймеров независимо, включая контрольный ген альбумина. В качестве отрицального (неспецифического) контроля используется ДНК из ПК здорового донора. При правильном выполнении методики пары праймеров 1–3 с ДНК донора не дает амплификации вообще или случайное повышение кривой после 50 цикла. Контрольная пара праймеров должна давать амплификацию на 19–24 цикле для любого образца ДНК человека.

Количественная оценка содержания клеток с делецией IKZF1 рассчитывается методом ΔCt. Для этого устанавливается разница (ΔCt) в значении среднего по триплету Ct контрольного гена (ABL) и среднего по триплету Ct измеряемой мишени (IKZF1 делеции), а относительное содержание клеток с делецией по отношению ко всем ядродержащим в образце определяется как 2^{ΔCt}. Уровень от 1 до 10⁻⁴ свидетельствует, что в образце КМ низкое содержание бластов, или делеция имеет место в субклоне лейкозных клеток. В этом случае

целесообразно мониторировать эту мишень на этапах лечения для предотвращения рецидива.

Экспрессия коротких, доминантно-негативных изоформ гена IKZF1 RQ-PCR анализ экспрессии изоформ Ikaros

Белок Ikaros, продукт гена IKZF1, включает два отдельных домена со структурами «цинковых пальцев»: 4 ДНК-связывающих цинковых пальца N-конца и 2 цинковых пальца для белок-белковых взаимодействий около C-конца. Ген IKZF1 включает 7 экзонов и транскрибируется в виде по меньшей мере 14 различных изоформ по средствам альтернативного сплайсинга с использованием альтернативных экзонов (рисунок 2).



Длинные изоформы, Ik1, Ikx, Ik2 и Ik3, которые содержат по меньшей мере 3 цинковых пальца в ДНК-связывающем домене, сохраняют высокоаффинное ДНК-связывание и локализуются в ядре.

Мотивы «цинковые пальцы» обозначены черными полосами

Рисунок 3. — Схематическое представление транскриптов гена IKZF1

Изоформы Ik4-Ik10, которые имеют менее 3 цинковых пальцев, теряют свою ДНК-связывающую активность и локализуются в цитоплазме. Такие изоформы сохраняют способность образовывать гетеродимеры с полными изоформами, что приводит к потере их транскрипционной активности, поэтому они получили название доминантно-негативных изоформ (DN-Ik). Клинические

испытания показали, что диагностическое значение при лейкозах имеет сверхэкспрессия коротких изоформ Iк6, 9, 10.

В настоящей инструкции приводятся праймеры и пробы для RQ-PCR анализа экспрессии 9 длинных и коротких изоформ Iкаros для полной характеристики профиля экспрессии этого гена. Для каждой изоформы подобрана своя пара праймеров и проба, так же, как и для контрольного гена тирозинкиназы Абельсона (ABL) (не путать с контрольным геном для ДНК-анализа — альбумином (ALB)!). Комбинации праймеров и их нуклеотидные последовательности приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. — Комбинации праймеров, зондов и красителей, используемых для RQ-PCR анализа экспрессии изоформ Iкаros

Транскрипт	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд (TM-probe)	Флуоресцентная метка
ABL	abl1	abl2	abl_TM	FAM
Iкаros 1,x	Iк-Ex3-3'F	Iк-Ex5-5'R	Iк-Ex4_TM	JOE
Iкаros 1,x,3, 3A*	Iк-Ex3-3'F	Iк-Ex4-3'R	Iк-Ex4_TM	JOE
Iкаros 2, 2A	Iк-Ex2-3'F	Iк-Ex5-5'R	Iк-Ex4_TM	JOE
Iкаros 4	Ex2/4_Iк4_F	Ex6/4_Iк4_R	Iк-Ex4_TM	JOE
Iкаros 6	Iк6_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Iкаros 5	Iк5_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Iкаros 8	Iк8_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Iкаros 9	Iк-Ex1/7_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX
Iкаros 10	Iк-Ex0/7_F	Ex7-5'R	Ex7-5'TM	ROX

Примечание — значение экспрессии изоформы Iкаros 3/3A вычисляется как разница между величиной, полученной с указанной парой праймеров, и показателем экспрессии Iк1.

Рекомендуется использовать три разных красителя (FAM, JOE, ROX) для контрольного гена, длинных и коротких изоформ Iкаros, что позволит избежать влияния неспецифической амплификации. Для этого требуется калибровка прибора на три длины волны. В случае одноканального прибора возможно использование одного красителя FAM для всех трех зондов.

Таблица 4. — Комбинации праймеров, зондов и красителей, используемых для RQ-PCR анализа экспрессии изоформ Iкаros

Лигонуклеотид	Последовательность
ABL-1	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT
ABL-TM	FAM-CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-BHQ
ABL-2	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
Iк-Ex3-3'F	GGTTCACAAAAGAAGCCACAC
Iк-Ex5-5'R	TAGCTTCGGCCACAATATCC
Iк-Ex4-3'R	GGAGTGCGTCCTCAGGTG
Iк-Ex2-3'F	AGAGTGACAGAGTCGTGGGAGA
Iк-Ex4-5'F	ATTCACCCAGAAGGGCAAC
Iк-Ex4_TM	JOE-AGCCCTTCAAATGCCACCTCTGCAAC-BHQ
Iк-Ex2/4_Iк4_F	AGAGTGACAGAGTCGTGGGAGA

Ik-Ex6/4_Ik4_R	TTTCTTCTTTAATGACGGAGTGC
Ex7-5'R	AGCTGGCGCTGCTGTCGT
Ex7-5'TM	ROX-CAAGGGCCTGTCCGACACGCC-BHQ
Ik5_F	CACAAAAGAAGCCACACTGGG
Ik6_F	AAGAGTGACAGAGTCGTGGGGA
Ik8_F	AGAGTGACAGAGTCGTGTCATTAAG
Ik-Ex1/7_F	AAGACATGTCCCAAGTTTCAGGGG
Ik-Ex0/7_F	GCGCGACGCACAAATCCACGG

В качестве материала для анализа используется кДНК, полученная из РНК лейкозных клеток. Для каждой мишени один образец кДНК амплифицируется в дуплетах. Рассчитывается среднее арифметическое порогового уровня амплификации (Ct) между дуплетами — mean Ct, после чего устанавливается разница между mean Ct для контрольного гена ABL и измеряемой мишени — ΔCt . Относительный уровень экспрессии каждой мишени определяется как $2^{\Delta Ct}$. Полученная величина указывает уровень экспрессии мишени (изоформы Ikaros) относительно контрольного гена ABL, принятого за 1.

Профиль экспрессии изоформ Ikaros в нормальных клетках

Ген IKZF1 экспрессируется в нормальных лимфоидных клетках костного мозга и других тканей, однако соотношение уровня экспрессии разных изоформ резко отличается в норме и при некоторых лейкозах. Нормальным лимфоцитам свойственна относительно высокая (на уровне контрольного гена ABL или выше) экспрессия длинных изоформ (Ik1, Ikx, Ik2, Ik3) и на порядок более низкая экспрессия коротких изоформ (Ik4–9). Самая короткая изоформа, Ik10, в норме не экспрессируется. Нормальный диапазон экспрессии изоформ Ikaros в контрольных образцах здоровых доноров костного мозга и периферической крови представлен в таблицах 5,6, а также на рисунке 3.

Таблица 5. — Уровни экспрессии изоформ Ikaros в нормальном костном мозге

	Ik1	Ik3	Ik2	Ik4	Ik5	Ik8	Ik6	Ik9	Ik10
25 th % перцентиль	0,39	0,49	0,79	0,06	0,014	0,02	0,0058	0,007	0
75 th % перцентиль	0,93	1,61	3,27	0,15	0,048	0,034	0,04	0,025	0,002
Медиана	0,47	1,01	1,75	0,1	0,027	0,024	0,0076	0,014	$<10^{-6}$

Таблица 6. — Уровни экспрессии изоформ Ikaros в периферической крови

	Ik1	Ik3	Ik2	Ik4	Ik5	Ik8	Ik6	Ik9	Ik10
25 th % перцентиль	0,6	2,00	0,65	0,06	0,002	0,01	0,031	0,013	0
75 th % перцентиль	2,06	3,84	2,52	0,22	0,009	0,03	0,12	0,06	0
Медиана	1,25	2,35	1,52	0,14	0,005	0,025	0,07	0,024	0

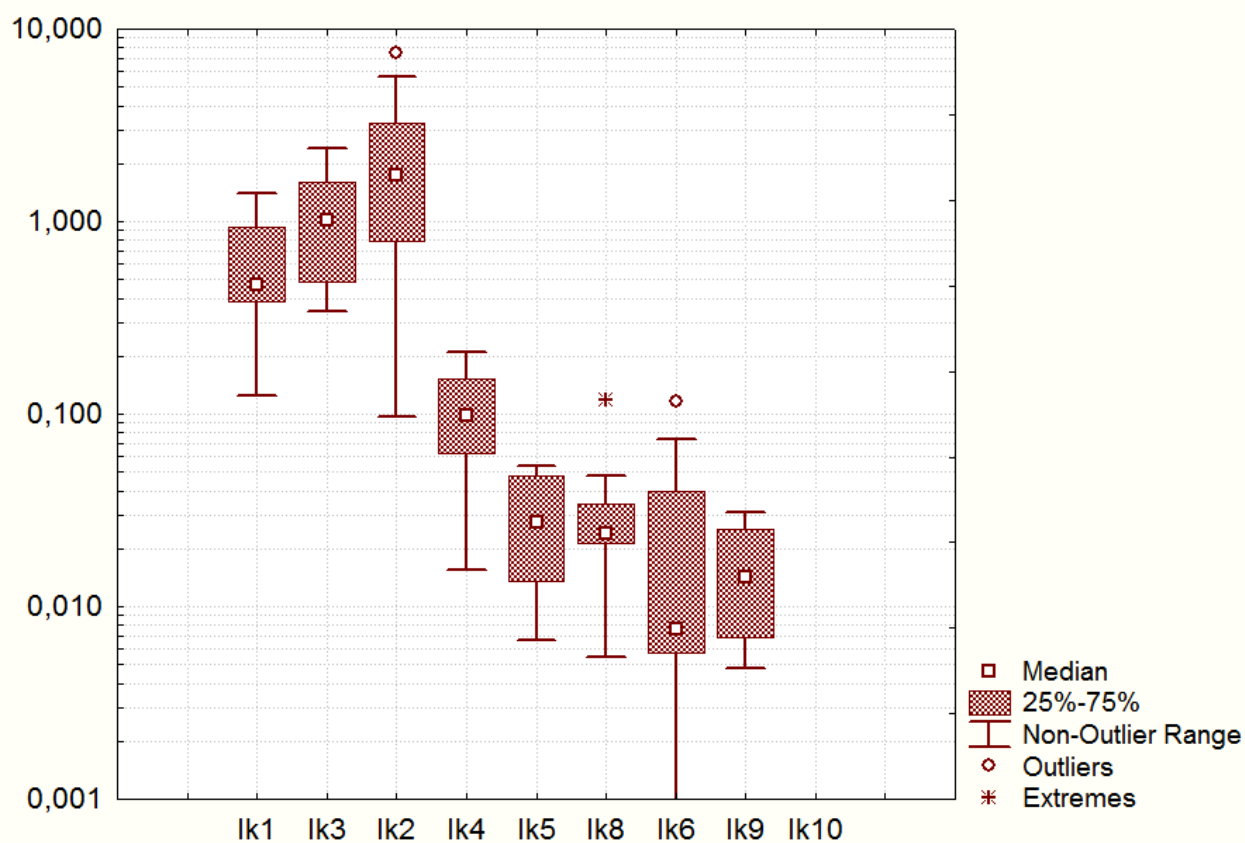
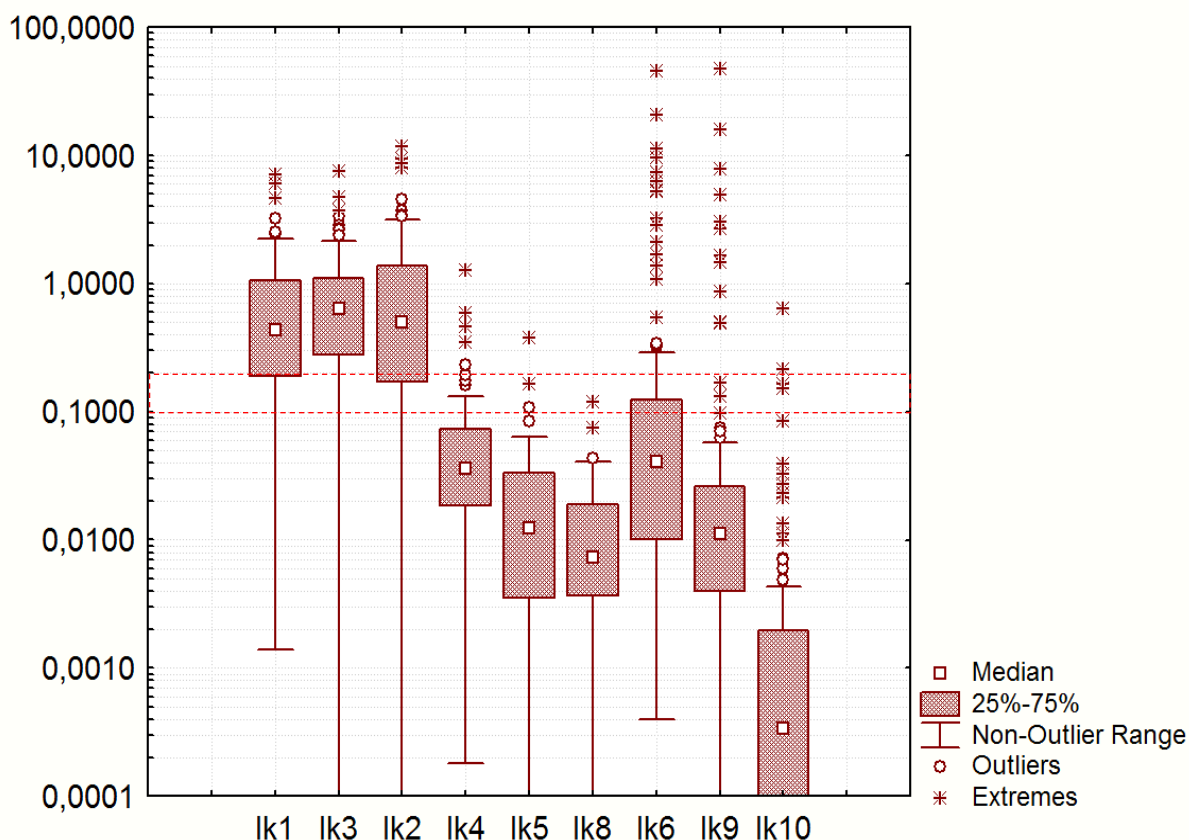


Рисунок 4. — Профиль экспрессии изоформ Ikaros в клетках здорового костного мозга

Аберрантная экспрессия изоформ Ikaros у больных ОЛЛ

Нарушение сплайсинга в опухолевых лейкозных клетках приводит к аберрантной экспрессии некоторых изоформ Ikaros. Нарушения могут носить качественный и количественный характер. Количественные изменения экспрессии на сегодняшний день плохо изучены, их клиническое значение неизвестно. Качественные изменения представляют собой резкое увеличение (сверхэкспрессия) или снижение (отсутствие) экспрессии какой-либо изоформы. Наиболее характерным качественным нарушением экспрессии Ikaros является сверхэкспрессия коротких изоформ Ik6, Ik9 и Ik10 (рисунок 4).



Пороговые уровни для сверхэкспрессии Ik6 — **0,2** и для Ik9 и Ik10 — **0,1**, обозначены пунктирными линиями

Рисунок 5 — Профиль экспрессии изоформ Ikaros в костном мозге больных ОЛЛ

В качестве порогового критерия, отделяющего нормальный уровень экспрессии Ik6 от aberrантного, было определено значение 0,2, для изоформы Ik9 — 0,1 от контрольного гена ABL. Величина экспрессии Ik6 и Ik9 выше либо равная 0,2 или 0,1 соответственно оценивается как наличие сверхэкспрессии, ниже — как нормальный уровень.

Самая короткая изоформа Ik10 практически не экспрессируется в нормальных лимфоцитах. Поэтому лейкоз оценивается как Ik10-позитивный в случае воспроизводимой амплификации ранее 40 цикла с ΔCt в репликах (дуплете или триплете) ≤ 2 и значением большим, чем 0,1 контрольного гена ABL.

Интерпретация результатов анализа

Первые два метода — классическая и количественная ПЦР «в реальном времени» равнозначны для диагностики двух наиболее распространенных делеций в гене IKZF1. Для верификации результатов рекомендуется использовать оба метода параллельно для всех образцов или в случае сомнительных результатов одного из методов.

Классическая ПЦР требует лучшего качества высокомолекулярной ДНК. В случае выделения ДНК из фиксированного материала, например, гематологических мазков или парафиновых блоков ткани амплификация большого фрагмента ДНК может быть затруднена.

Возможны положительный результат классической ПЦР и отрицательный — RQ-PCR. Две пары праймеров RQ-PCR для делеции ΔEx3–6 расширяют возможности метода, однако есть вероятность ложноотрицательных результатов. В случае положительного результата классической ПЦР и отрицательного RQ-PCR приоритет имеет первый метод. Подобные ограничения связаны с тем, что точки разрыва могут выходить за пределы небольшого фрагмента, амплифицируемого праймерами для RQ-PCR. Секвенирование фрагмента, полученного классической ПЦР, позволяет идентифицировать точку разрыва и определить подходящее расположение праймеров.

Третий метод, RQ-PCR анализ транскрипционных изоформ гена IKZF1 (Ikaros) на уровне РНК (кДНК), позволяет оценить функциональное состояние гена IKZF1. Как правило, сверхэкспрессия коротких, доминантно-негативных (Ik-DN) изоформ Ik6, Ik9, Ik10 является следствием различных делеций внутри гена. Изоформы Ik6 и Ik9 обычно сопряжены с делецией ΔEx3–6, Ik10 — проявление делеции ΔEx1–6. В некоторых случаях, однако, сверхэкспрессия коротких изоформ проявляется в отсутствии соответствующих делеций. В таких ситуациях, результаты следует интерпретировать по принципу дополненности: аберрантный статус гена в случае хотя бы одного события, делеции или Ik-DN экспрессии. Анализ экспрессии изоформ существенно расширяет диагностические возможности, поскольку большое разнообразие редких делеций, не выявляемых непосредственно ПЦР, проявляются в указанных нарушениях сплайсинга.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема: Отсутствует амплификация положительного контроля делеции ΔEx3–6 или ΔEx1–6.

Причина: 1. Недостаточное качество ДНК. 2. Фрагментация ДНК.

Решение: 1. Использовать контрольную ПЦР-амплификацию с любой парой праймеров к гену «домашнего хозяйства» (альбумин, актин и др.), предпочтительно с большой длиной фрагмента. Оптимизировать ПЦР по контрольному гену. Проверить ДНК образцов на спектрофотометре, убедиться, что ДНК чистая. 2. Использовать второй метод, RQ-PCR анализ делеций IKZF1.

Проблема: При RQ-PCR анализе экспрессии изоформ Ikaros амплификация контрольного гена ABL проходит нормально, а изоформ Ikaros — неудовлетворительно.

Причина: Неправильное приготовление реакционной смеси или разведение праймеров.

Решение: Повторить анализ с включением проверенного образца кДНК от другого пациента или клеточной линии с той же самой реакционной смесью. Приготовить повторно супермикс. Если контрольная амплификация проходит успешно, результат низкой или отрицательной экспрессии следует интерпретировать как отрицательный результат анализа.