

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ КОРОТКИХ ИЗОФОРМ ГЕНА IKZF1 (IKAROS)

Аннотация. Внутригенные делеции в гене IKZF1 – одна из наиболее значимых генетических aberrаций при прогнозировании рецидивов В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ). Диагностика делеций IKZF1, особенно редких типов, осложняется разнообразием точек разрыва ДНК, необходимостью подбора ПЦР-праймеров для каждой из них, реже – пациент-специфических праймеров для подтверждения делеции и точек разрыва методом секвенирования по Сенгеру. В связи с этим определение коротких транскриптов (изоформ), которые всегда формируются в результате делеции функционального участка гена IKZF1, является альтернативным методом оценки статуса данного гена в рутинной лабораторной практике. Статья посвящена разработке быстрого, выполняемого в течение одного рабочего дня, метода мультиплексной ПЦР в реальном времени, позволяющего выявлять экспрессию 3 прогностически значимых транскриптов в одной реакции, и оценке его эффективности. Диагностическая чувствительность метода составила 90,14%, а специфичность – 89,47%.

Ключевые слова: IKZF1, Ikaros, острый лимфобластный лейкоз, мультиплексная ПЦР.

Для цитирования: Богатенкова Д., Вшивкова О., Мелешко А. Оценка эффективности метода мультиплексной ПЦР в реальном времени при определении коротких изоформ гена IKZF1 (Ikaros) // Наука и инновации. 2023. №1. С. 79–84. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-1-79-84>

Дарья Богатенкова,

младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии; yanchenko.darya255@gmail.com

Ольга Вшивкова,

старший научный сотрудник лаборатории клинических исследований РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии; yshyukova@gmail.com

Александр Мелешко,

ведущий научный сотрудник РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, кандидат биологических наук; meleshko@tut.by

Аберрации (внутригенные делеции) гена транскрипционного фактора IKZF1 (Ikaros) встречаются в среднем у 15% детей при первично диагностированном В-клеточном остром лимфобластном лейкозе, чаще всего – у пациентов с транслокацией BCR-ABL1 (>60%) и до 85% случаев – у пациентов с BCR-ABL1-подобным ОЛЛ. Большинство исследований демонстрирует, что пациенты с делецией IKZF1 имеют значительно худший прогноз при В-ОЛЛ, ее наличие – надежный прогностический маркер развития рецидива этого заболевания [1, 2]. Наши собственные исследования подтверждают это: у пациентов, про-

ходивших лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии, частота aberrаций составила 10,4% при первичном В-ОЛЛ и 27,7% – при рецидивах заболевания ($p=0,0005$). Сравнительный анализ показал, что пациенты стандартного риска с aberrациями IKZF1 имеют значительно более высокую 5-летнюю кумулятивную частоту рецидивов ($66,7\pm 22,7\%$ против $11,6\pm 2,9\%$ в группе с нормальным генным статусом, $p<0,001$) [4–7].

Ген IKZF1 экспрессируется в нормальных лимфоидных клетках костного мозга и клетках других тканей, он является ключевым

транскрипционным фактором, регулирующим ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и дендритных [3].

Белок Ikaros, продукт экспрессии гена IKZF1, включает два отдельных домена 4 ДНК-связывающих «цинковых пальца» на N-конце и 2 – для белок-белковых взаимодействий вблизи C-конца. Ген IKZF1 состоит из 7 экзонов и транскрибируется как минимум в 14 различных транскриптов (изоформ) путем альтернативного сплайсинга с использованием альтернативных экзонов. Нормальные лимфоциты характеризуются относительно высокой экспрессией длинных изоформ (Ik1, Ikx, Ik2, Ik3) и на порядок меньшей экспрессией коротких изоформ (Ik4–9). Самая короткая из них (Ik10) является нетранскрибируемой и в норме не экспрессируется.

Длинные изоформы Ik1, Ikx, Ik2 и Ik3, которые содержат, по крайней мере, 3 «цинковых пальца» в ДНК-связывающем домене, сохраняют высокую аффинность связывания с ДНК и локализуются в ядре.

Изоформы Ik4–Ik10, имеющие менее 2 «цинковых пальцев», теряют свою ДНК-связывающую активность и сосредотачиваются в цитоплазме. Такие изоформы сохраняют способность образовывать гетеродимеры с полными изоформами, что приводит к потере ими транскрипционной активности и подавлению димеризации функциональных изоформ, в связи с чем короткие изоформы называют доминантно негативными. Несмотря на все многообразие транскриптов IKZF1, наши исследования показали, что гиперэкспрессия только 3 коротких изоформ – Ik6, 9, 10 (Ik-DN) – имеет прогностическое значение при В-ОЛЛ [4]. Представленный в данной статье метод оценки основан на мультиплексной ПЦР, позволяющей выявлять их экспрессию в одной реакции, что значительно экономит реактивы, биоматериал пациента и сокращает время диагностики.

Цель настоящего исследования – оценить эффективность метода мультиплексной ПЦР в реальном времени при определении коротких изоформ гена IKZF1 (Ikaros).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал и пробоподготовка.

Для проведения исследования использованы образцы костного мозга (КМ) 65 пациентов с первичным В-ОЛЛ, 18 образцов КМ и 4 образца периферической крови здоровых доноров.

Для контроля и установления границ нормальной экспрессии изоформ был исследован материал 6 здоровых доноров КМ, полученный в лаборатории цитофереза РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, а также клеточная линия эритробластного лейкоза K562 и трансгенная клеточная линия K562_Ik6, характеризующаяся высоким уровнем экспрессии короткой изоформы Ikaros 6.

Выделение суммарной РНК из клеточных суспензий, мононуклеаров КМ и периферической крови проводили с помощью TRIreagent (США) [8]. Очищенную РНК растворяли в деионизированной воде, измеряли концентрацию и чистоту РНК на спектрофотометре и немедленно замораживали при -80°C ; кДНК синтезировали из РНК обратной транскрипцией с применением рандом-праймеров или Oligo-dT и обратной транскриптазы. Для синтеза использовали 1 мкг РНК. После отжига с праймерами/олиго-dT в течение 5 мин. при 70°C , аликвоту РНК вносили в смесь для обратной транскрипции с 10 единиц/мкл обратной транскриптазы и инкубировали при 37°C в течение одного часа.

Метод сравнения – моноплексная RQ-PCR.

Диагностика aberrаций IKZF1 в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии проводится с 2013 г. согласно разработанному нами методу, описанному в утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению [9]. Он подразумевает постановку 9 отдельных реакций для детекции как длинных, так и коротких изоформ IKZF1. С учетом накопленных за прошедшие годы данных прогностически значимыми в отношении развития рецидивов В-ОЛЛ являются только 3 короткие изоформы [4, 5]. Для оптимизации диагностики нами предложено объединить 3 реакции в одну, поскольку гиперэкспрессия любого из указанных 3 маркеров (Ik6, 9 или 10) является прогностически значимой, а оценка уровня экспрессии других изоформ не несет практической пользы.

Подбор праймеров и зондов для коротких изоформ гена Ikaros.

Короткие изоформы амплифицировались при участии консенсусного «обратного» праймера (Ik-Ex7–5'R) и зонда к 7 экзону IKZF1 (Ik-Ex7–5'TM), и специфических «прямых» праймеров (Ik6_alt2-F, Ik_Ex1/7_F, Ik_Ex0/7_F для амплификации транскриптов Ik6, 9 и 10 соответственно).

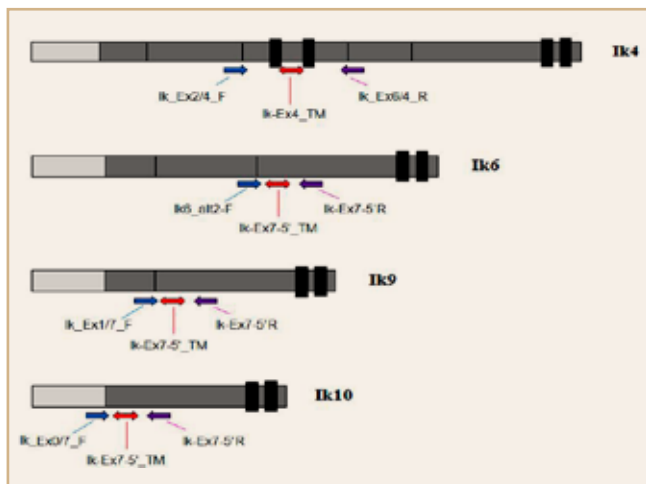


Рис. 1. Схематическое расположение олигонуклеотидов и TaqMan-проб для амплификации коротких изоформ Ik6, 9 и 10

Схема расположения праймеров и зондов показана на рис. 1.

Для каждой изоформы подобрана своя пара праймеров и проб, так же, как и для контрольного гена GUS. В табл. 1 приведена комбинация олигонуклеотидов и TaqMan-проб для анализа экспрессии коротких изоформ Ikaros и гена внутреннего контроля GUS в мультиплексной реакции.

Анализ экспрессии.

Анализ экспрессии 3 коротких изоформ IKZF1 – Ik6, 9 и 10 (Ik-DN) проводили методом мультиплексной ПЦР в реальном времени (RQ-PCR) в объеме 10 мкл с готовым супермиксом. В реакцию вносили по 10 пмоль каждого праймера и 3 пмоля ТМ-пробы. Раскапывали по 15 или 7,5 мкл мастермикса и 5 или 2,5 мкл образца кДНК для достижения общего объема реакции 20 или 10 мкл соответственно. Условия ПЦР-реакции соблюдали согласно инструкции набора супермикса и прибора для RQ-PCR. Проводили 40 циклов амплификации: 95 °C – 15 мин., 95 °C – 15 сек., 60 °C – 15 сек., 72 °C – 30 сек. Реакции выполняли в дублях, в каче-

Транскрипт	Прямой праймер	Обратный праймер	TaqMan-проба	Флуоресцентная метка
GUS	GUS_F	GUS_R	GUS_TM	FAM
Ikaros 6	Ik6_alt2-F			
Ikaros 9	Ik-Ex1/7_F	Ex7-5'R	Ex7-5'_TM	ROX
Ikaros 10	Ik-Ex0/7_F			

Таблица 1. Комбинации олигонуклеотидов и TaqMan-проб для анализа экспрессии коротких изоформ Ikaros в мультиплексной реакции

стве отрицательного (неспецифического) контроля использовали деионизированную воду.

Для полуколичественного выражения уровня экспрессии применяли метод расчета ΔC_t , который подразумевает соответствие результатов ПЦР математической модели, когда на каждом цикле ПЦР количество мишени удваивается. В этом случае продукта ПЦР составляет 2^N , где N – номер цикла. При этом измеряется не исходное количество мишени в копиях, а разница в ее экспрессии по сравнению с контрольным геном. Разница в значении C_t контрольного гена (GUS) и C_t измеряемой мишени (Ik-DN) есть ΔC_t , а относительная разница в уровне экспрессии определялась как $2^{\Delta C_t}$ (единица измерения – отн. ед.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение порогового уровня экспрессии коротких изоформ.

Поскольку анализ RQ-PCR является количественным, требуется порог, чтобы отличить гиперэкспрессию Ik-DN от нормы. Медиана уровня Ik-DN в лейкозных клетках пациентов составила 0,018, максимальное значение – 8,3, минимальное – 0,0001 отн. ед. Экспрессия в мононуклеарах периферической крови и костного мозга здоровых доноров – 0,0286, 0,075 и 0,000014 отн. ед. соответственно. Таким образом, разделение по медиане, часто используемое для количественной оценки экспрессии генов, в данном

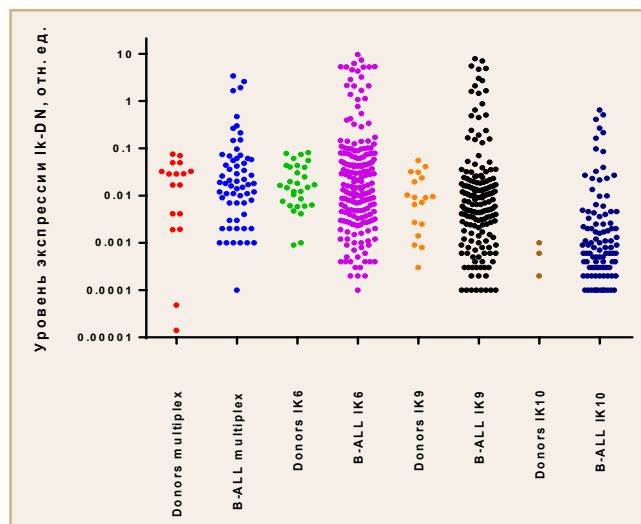
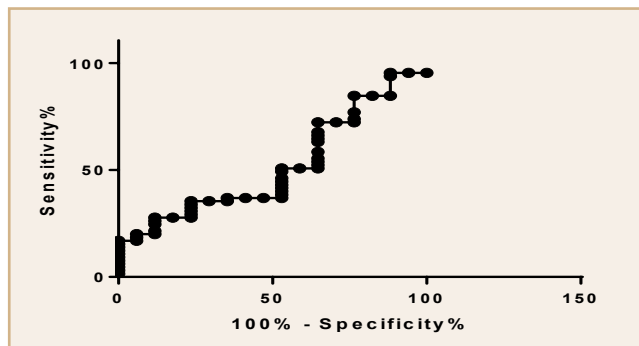
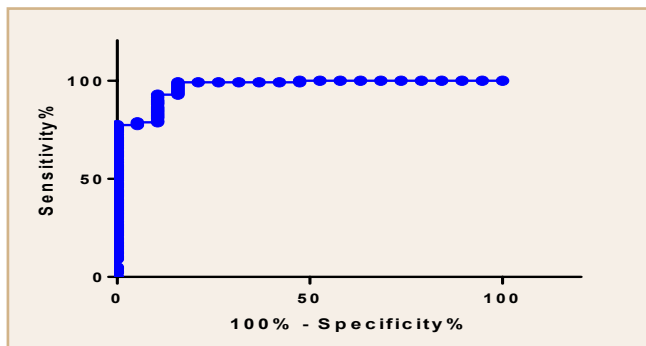


Рис. 2. Точечная диаграмма распределения уровня экспрессии Ik-DN у пациентов с В-клеточным ОЛЛ и здоровых доноров (donors). Анализ коротких изоформ был проведен как мультиплексным методом, так и для каждой изоформы в отдельности



А: Моноплексная ПЦР (порог 0,2 отн. ед.)

Б: Мультиплексная ПЦР (порог 0,7 отн. ед.)

Рис. 3. ROC-кривые взаимосвязи между чувствительностью и специфичностью теста при принятии порогового значения экспрессии Iκ-DN, оцененной моноплексной за 0,2 отн. ед. (А) и мультиплексной ПЦР – за 0,7 отн. ед. (Б)

случае не применимо, так как порог будет слишком низким. Реалистичный порог гиперэкспрессии Iκ-DN должен быть выше максимально возможного уровня экспрессии в КМ здоровых доноров.

Для определения порогового значения были построены точечные диаграммы распределения экспрессии Iκ-DN (рис. 2).

Исходя из распределения случаев в логарифмической шкале, в качестве порогового уровня было принято значение 0,7 отн. ед. (красная линия на диаграмме), тогда как для моноплексного метода оно было 0,2.

Для оценки чувствительности и специфичности этого порога пациенты с В-клеточным ОЛЛ были разделены на две группы: с делециями IKZF1, наличие которых было подтверждено геномными методами (ПЦР и анализ фрагментов) и без них. Параллельно для всех участников был проведен анализ уровня экспрессии коротких изоформ.

Также осуществлена оценка групп с применением ROC-анализа (рис. 3), который демонстрирует, что при принятии порогового значения экспрессии Iκ-DN, оцененной методом мультиплексной ПЦР, за 0,7 отн. ед. чувствительность теста составит 90,14% (95%CI 84,01–94,50%), а специфичность – 89,47% (95%CI 66,86–98,70%). Площадь под ROC-кривой – 0,9711 (95%CI 0,9389–1,003), $p < 0,0001$.

Точность и сходимость результатов.

Оценка теста была проведена на основе 4 повторных измерений в дублирующих пробах с использованием биологического материала 6 пациентов с ОЛЛ одним лабораторным на одном приборе (CFX96 BioRad, США).

Как видно из табл. 2, минимальное значение абсолютной погрешности (ΔX , разницы между наблюдаемым и ожидаемым значением

Критерии точности (GUS)	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3	Пациент 4	Пациент 5	Пациент 6
Минимум Ct	25,99	23,66	21,94	24,61	22,28	21,17
Максимум Ct	29,20	26,29	23,20	26,11	23,83	23,41
Абсолютная погрешность (ΔX), максимальное значение, %	0,93	0,77	0,41	0,41	0,37	0,56
Стандартное отклонение, (σ)	1,11	0,92	0,48	0,49	0,44	0,67
Среднее значение	27,41	24,85	22,58	25,05	22,99	22,18
Коэффициент вариации (CV), %	4,06	3,71	2,15	1,94	1,92	3,00

Таблица 2. Точность метода для гена внутреннего контроля GUS

Критерии точности (Iκ-DN)	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3	Пациент 4	Пациент 5	Пациент 6
Минимум Ct	25,30	27,29	26,86	28,53	26,96	27,27
Максимум Ct	27,78	30,52	29,59	31,24	28,64	29,95
Абсолютная погрешность (ΔX), максимальное значение, %	0,65	0,93	0,73	0,80	0,50	0,69
Стандартное отклонение, (σ)	0,78	1,12	0,88	0,95	0,60	0,83
Среднее значение	26,34	28,44	28,04	29,68	27,98	28,40
Коэффициент вариации (CV), %	2,94	3,93	3,13	3,22	2,14	2,91

Таблица 3. Точность метода в отношении детекции мишени

теста) для гена внутреннего контроля GUS варьировало от 0,37 до 0,93%. При этом коэффициент вариации был на уровне от 1,92 до 4,06%.

Однако характеристикой воспроизводимости и сходимости результатов серии измерений является их межгрупповая или внутри-

	Критическое значение В	p, Bartlett test	Результат
Пациент 1	7,74	0,052	Воспроизводимо (пограничное значение)
Пациент 2	1,452	0,694	Воспроизводимо
Пациент 3	3,789	0,285	Воспроизводимо
Пациент 4	0,656	0,884	Воспроизводимо
Пациент 5	0,674	0,879	Воспроизводимо
Пациент 6	0,269	0,966	Воспроизводимо

Таблица 4. Однородность дисперсий значений $2\Delta Ct$, характеризующих воспроизводимость/сходимость теста, согласно критерию Бартлетта

групповая дисперсия. Ее однородность оценивали с помощью критерия Бартлетта (данные характеризовались нормальным распределением), согласно которому значение $p \geq 0,05$ является весомым доказательством того, что серия измерений характеризуется высокой воспроизводимостью/сходимостью (табл. 4).

Согласно данным таблицы 4, результаты теста для пациентов с нормальным уровнем экспрессии коротких изоформ Ikaros характеризовались высокой сходимостью, однако у образца с гиперэкспрессией Ikaros-DN (пациент №1) отмечался большой разброс значений (рис. 4) и пограничный результат теста Бартлетта.

Невысокая сходимость результатов у пациента с гиперэкспрессией Ikaros-DN объясняется стохастической природой амплификации мишени при проведении RQ-PCR: чем больше копий мишени, тем быстрее происходит накопление продукта реакции, и даже небольшие колебания объема или качества кДНК, ингибиторов ПЦР и других факторов могут оказывать влияние на воспроиз-

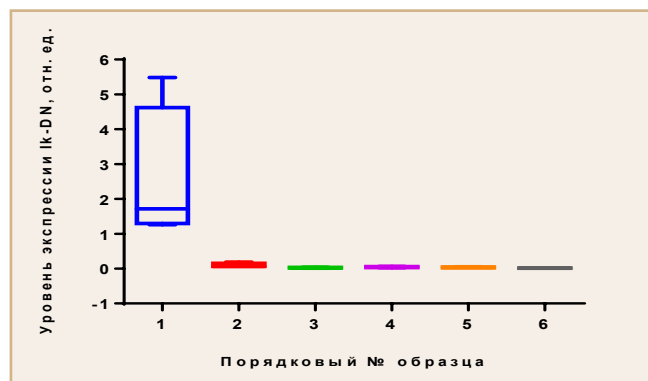


Рис. 4. Оценка сходимости/воспроизводимости результатов теста на основе 3 повторных измерений в дублирующих пробках

водимость теста. Однако его результаты у данного пациента во всех проведенных измерениях свидетельствовали о повышенной экспрессии Ikaros-DN и характеризовались высокой точностью.

Влияние объема реакции на результат теста.

Как известно, амплификация нуклеиновой кислоты в ПЦР представляет собой стохастический процесс, во многом зависящий от различных факторов, в том числе от конечного объема реакции. В большинстве случаев он, согласно рекомендациям производителей ПЦР-смесей, должен составлять 20–25 мкл. В данном методе мы уменьшили его вдвое с целью экономии биологического материала пациента и реагентов.

На рис. 5 приведены результаты оценки влияния объема реакции на результаты измерения мишени в реакциях с полным (20 мкл) и с конечным объемом 10 мкл для 6 пациентов.

Значимых различий в показателях относительного уровня экспрессии Ikaros-DN не выявлено ($p=0,197$, Mann Whitney test). Коэффициент вариации наблюдался в диапазоне от 0,05 до 6,5%. Визуально можно отметить незначительные (статистически не значимые) колебания у мишени у пациентов с нормальным статусом гена IKZF1, где уровень экспрессии Ikaros-DN был очень низким, в сторону уменьшения значения при увеличении объема реакции 20 мкл, тогда как у пациента с повышенным уровнем экспрессии он оставался неизменным при любом объеме реакции.

Предел обнаружения (LoD).

Предел обнаружения мишени Ikaros-DN может быть ограничен небольшим количеством лейкозных клеток (бластов) в образце костного мозга. Для определения их минимума мы провели серийное разведение трансгенной культуры

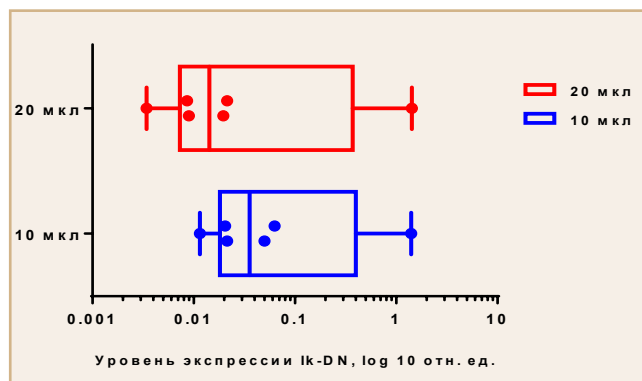


Рис. 5. Влияние объема реакции на результаты измерения мишени Ikaros-DN у 6 пациентов с ОЛЛ (вертикальная красная линия – порог нормы экспрессии Ikaros-DN)

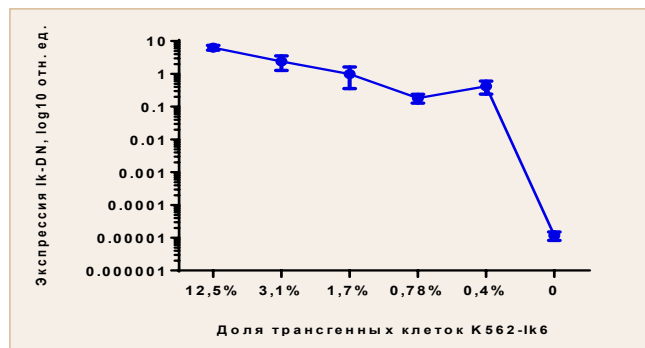


Рис. 6. Оценка предела обнаружения Ik-DN на серии разведений трансгенной клеточной культуры K562_Ik6 в культуре K562

клеточной линии K562_IK6, экспрессирующей на высоком уровне короткие изоформы Ik6 и Ik9, в нормальной клеточной линии K562 в следующем соотношении: 1/8 (12,5%), 1/32 (3,1%), 1/64 (1,7%), 1/128 (0,78%) и 1/256 (0,4%). Разведение «0» представляло собой суспензию клеток K562 без присутствия трансгенного белка Ikaros и служило контролем, характеризующим нормальную экспрессию коротких изоформ (рис. 6).

При использовании модельных клеточных линий минимальное количество клеток минорной популяции для успешной детекции мишени выше порогового уровня нормы составило 0,4%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Безусловно, использование одного молекулярно-генетического маркера не позволит с высокой долей вероятности прогнозировать развитие рецидива лейкоза. Тем не менее определение делеций IKZF1, согласно современным стандартам диагностики, необходимо во всех случаях первичного В-ОЛЛ. Анализ экспрессии изоформ на основе предлагаемого метода существенно расширяет диагностические возможности, поскольку большое разнообразие редких делеций, не выявляемых рутинной ПЦР, проявляются в указанных нарушениях сплайсинга.

На основании ROC-анализа диагностическая чувствительность метода мультиплексной ПЦР в реальном времени при определении коротких изоформ гена IKZF1 (Ikaros) составила 90,14% (95%CI 84,01–94,50%), а специфичность – 89,47% (95%CI 66,86–98,70%). Площадь под ROC-кривой 0,9711 (95%CI 0,9389–1,003), $p < 0,0001$.

Метод экономически эффективный, быстрый и обладает высокой диагностической чувствительностью и специфичностью, воспроизводим

и выполним в любой молекулярно-биологической лаборатории, оснащенной амплификатором с флуоресцентным детектором. Допустимо проведение реакции в объеме 10 мкл при отсутствии большего количества биологического материала. ■

■ **Summary.** Intragenic deletions of IKZF1 gene are one of the most significant genetic aberrations in predicting of relapse of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). Investigation of IKZF1 deletions, especially rare types, is complicated by the diversity of DNA breakpoints, the need to select PCR primers for each of the known breakpoints, less commonly, patient-specific primers to confirm the deletion and breakpoints by Sanger sequencing. In this regard, determination of short transcripts (isoforms), which are always formed as a result of deletion of the functional region of the IKZF1 gene, is an alternative method for assessing the status of the IKZF1 gene in routine laboratory practice. This article is devoted to the development of a real-time multiplex PCR method, which allows to detect the expression of three prognostical transcripts in one reaction, and to evaluate its effectiveness. This is the fastest method and can be completed within one day. The diagnostic sensitivity of the method was 90.14% (95% CI 84.01–94.50%), and the specificity was 89.47% (95% CI 66.86–98.70%).

■ **Keywords:** IKZF1, Ikaros, acute lymphoblastic leukemia, multiplex real-time PCR.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2023-1-79-84>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Vairy S., Tran T.H. (2020). IKZF1 alterations in acute lymphoblastic leukemia: the good, the bad and the ugly. *Blood Reviews* // <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100677>.
- Mullighan C.G., Downing J.R. (2009) Global genomic characterization of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* Vol. 46, N.1. PP. 3–15.
- Роль транскрипционного фактора Ikaros в нормальном гемопоэзе и лейкозогенезе: биологические и клинические аспекты / О.С. Вшивкова, А.Н. Мелешко // *Успехи молекулярной онкологии.* 2015. №1. Т. 2. С. 13–16.
- Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms coupled with clonal IKZF1 deletions and chimeric oncogenes in acute lymphoblastic leukemia / V. Vshyukova, A. Valochnik, A. Meleshko // *Blood Cells Mol Dis.* 2018. Vol. 71. P. 29–38.
- Прогностическое значение aberrаций гена IKZF1 у пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом / Вшивкова О.С., Мелешко А.Н. // *Достижения белорусской науки, вып. XXIII.* – Минск, 2019.
- Внутригенные делеции в локусе IKZF1 при остром лимфобластном лейкозе у детей / А.Н. Мелешко, О.С. Вшивкова // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* 2014. №4 (12). С. 57–65.
- Достижения в терапии острого лимфобластного лейкоза у молодых взрослых Республики Беларусь / Н.В. Мигаль, О.И. Быданов, А.С. Лелей, Е.А. Столярова, Л.В. Мовчан, Е.В. Волочник, О.С. Вшивкова, В.В. Дмитриев, И.В. Тарасевич, Н.Ф. Казакевич, Л.В. Артюшкевич, М.В. Белевцев, О.В. Алейникова // *Гематология и трансфузиология. Восточная Европа.* 2017. №3. Т. 3. С. 352–364.
- Инструкция производителя по использованию TRI Reagent® // <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>.
- Методы определения aberrаций гена IKZF1 для диагностики острого лимфобластного лейкоза / Мелешко А.Н., Прохореня И.В. – Минск, 2013.

Статья поступила в редакцию 12.04.2022 г.