

Транслокация t(1;11)(p32;q23) с образованием химерного гена *MLL-EP515* при острых лейкозах: обзор литературы и описание 6 новых случаев. Подходы к мониторингованию минимальной остаточной болезни

Г.А. Цаур^{1,2}, А.М. Попов^{1,2}, О.М. Плеханова¹, А.М. Кустанович³, О.В. Алейникова³, Т.Л. Гиндина⁴, А.С. Демина^{1,2}, А.Е. Друй^{1,2,5}, С.Ю. Ковалев⁶, К.Л. Кондратчик⁷, А.В. Мисюрин⁸, Н.В. Мякова⁸, Т.О. Ригер^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,5}, О.И. Сокова⁹, О.В. Стренева^{1,2}, М.В. Сучкова¹⁰, Ю.П. Финашутина⁸, Е.В. Флейшман⁹, Е.В. Шориков^{1,2}, Р.И. Юцкевич³, С. Meyer¹¹, R. Marschalek¹¹, Л.Г. Фечина^{1,2}

¹ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Екатеринбург;

²ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург;

³ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь;

⁴Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

⁵ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия», Екатеринбург;

⁶ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург;

⁷Морозовская детская городская клиническая больница, Москва;

⁸ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Минздрава России, Москва;

⁹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва;

¹⁰ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва;

¹¹Diagnostic Center of Acute Leukemia, Institute of Pharmaceutical Biology/ZAFES, Goethe-University of Frankfurt, Франкфурт-на-Майне, Германия

Контакты: Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru

На основании собственных исследований (6 пациентов) и данных литературы (27 случаев) представлена клиничко-лабораторная характеристика острых лейкозов с транслокацией t(1;11)(p32;q23)/*MLL-EP515*. Установлено, что наиболее часто транслокация t(1;11)(p32;q23) обнаруживается у детей первого года жизни (медиана возраста составляет 8 мес). При остром лимфобластном лейкозе лица мужского пола болеют реже (соотношение 1:3), при остром миелоидном лейкозе соотношение полов 1:1. Хромосомные аномалии, дополнительные к t(1;11)(p32;q23), выявлены в 38 % случаев. Наиболее часто зоной разрывов в ДНК гена *EP515* является интрон 1. Описано 4 типа химерных транскриптов *MLL-EP515*. Создана и успешно применена комбинация праймеров, флуоресцентных зондов и плазмиды для мониторингования химерного транскрипта *MLL-EP515* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Подобраны условия и проведен мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) по индивидуальным точкам разрыва в геномной ДНК у пациентов с наличием химерного гена *MLL-EP515*. Сравнение данных определения МОБ в геномной ДНК и кДНК показало высокую качественную сопоставимость результатов (92 %).

Ключевые слова: острый лейкоз, дети первого года жизни, перестройки гена *MLL*, транслокация t(1;11)(p32;q23), химерный ген *MLL-EP515*, минимальная остаточная болезнь

Translocation t(1;11)(p32;q23) with *MLL-EP515* fusion gene formation in acute leukemias: a review and 6 new case reports. Approaches to minimal residual disease monitoring

G.A. Tsauro^{1,2}, A.M. Popov^{1,2}, O.M. Plekhanova¹, A.M. Kustanovich³, O.V. Aleynikova³, T.L. Gindina⁴, A.S. Demina^{1,2}, A.Ye. Druy^{1,2,5}, S.Yu. Kovalev⁶, K.L. Kondratchik⁷, A.V. Misyurin⁸, N.V. Myakova⁸, T.O. Riger^{1,2}, L.I. Savelyev^{1,2,5}, O.I. Sokova⁹, O.V. Strenева^{1,2}, M.V. Suchkova¹⁰, Yu.P. Finashutina⁸, Ye.V. Fleyshman⁹, Ye.V. Shorikov^{1,2}, R.I. Yutskevich³, C. Meyer¹¹, R. Marschalek¹¹, L.G. Fechina^{1,2}

¹Regional Children's Clinical Hospital №1, Yekaterinburg;

²Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg;

³Belarusian Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus;

⁴Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Hematology and Transplantation, St.-Petersburg I.P. Pavlov State Medical University, Ministry of Health of Russia;

⁵Ural State Medical Academy, Yekaterinburg;

⁶The first President of Russia Boris Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg;

⁷Morozov Children Municipal Clinical Hospital, Moscow;

⁸Dmitriy Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, Moscow;

⁹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

¹⁰Hematology Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow;

¹¹Diagnostic Center of Acute Leukemia, Institute of Pharmaceutical Biology/ZAFES, Goethe-University of Frankfurt, Frankfurt on the Main, Germany

We performed clinical and laboratory characterization of patients with rare translocation $t(1;11)(p32;q23)$ leading to *MLL-EP515* fusion gene formation. Study cohort consisted of 33 primary acute leukemia (AL) cases including 6 newly diagnosed and 27 patients previously described in literature. Among study group patients $t(1;11)(p32;q23)$ was found most frequently in infant AL cases (median age 8 months). In acute lymphoblastic leukemia (ALL) male/female ratio was 1:3, in acute myeloid leukemia (AML) it was 1:1. Additional cytogenetic aberrations in 38 % of patients were revealed. The most frequent breakpoint position in *EP515* gene was intron 1. Four different types of *MLL-EP515* fusion gene transcripts were detected. Primers-probe-plasmid combination for *MLL-EP515* fusion gene transcript monitoring by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) was developed and successfully applied. In 3 patients RQ-PCR was done on genomic DNA for absolute quantification of *MLL-EP515* fusion gene. High qualitative concordance rate (92 %) was noted between minimal residual disease data obtained in cDNA and genomic DNA for *MLL-EP515* fusion detection.

Key words: acute leukemia, infants, *MLL* rearrangements, translocation $t(1;11)(p32;q23)$, *MLL-EP515* fusion gene, minimal residual disease

Введение

Перестройки $11q23/MLL$ встречаются примерно в 10 % всех случаев острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и в 3 % случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [1, 2]. На сегодняшний день на молекулярном уровне охарактеризовано 64 различных перестройки хромосомного района $11q23$ с участием гена *MLL*, встречающихся при острых лейкозах (ОЛ) и при миелодиспластическом синдроме [3]. Наиболее частыми партнерами *MLL* являются гены *AFF1* (*AF4*), *MLLT3* (*AF9*), *MLLT1* (*ENL*), *MLLT10* (*AF10*), *MLLT4* (*AF6*), *ELL*, на долю которых суммарно приходится около 85 % всех случаев *MLL*-позитивных ОЛ, как у детей, так и у взрослых. Среди оставшихся 15 % случаев наиболее часто обнаруживается транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ с образованием химерного гена *MLL-EP515*, частота выявления которой составляет примерно 3 % от общего числа перестроек гена *MLL* [3, 4]. Данная транслокация встречается у детей и у взрослых как при *de novo*, так и при вторичных ОЛ [4–22]. Также описаны 2 случая миелодиспластического синдрома с наличием aberrаций хромосомного района $1p32$ у лиц, переживших атомную бомбардировку в Японии: в одном случае была выявлена делеция $del(1)(p22p32)$, во втором транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ [23].

Ген *EP515* (*AF1P*, *AF-1P*, *MLLT5*), располагающийся в хромосомном регионе $1p32$, кодирует один из рецепторов эпидермального фактора роста, отвечающий за эндоцитоз данного белка. Ген имеет протяженность 165 т. н., состоит из 25 экзонов и кодирует белок, состоящий из 896 аминокислот с молекулярным весом 98 656 Да [24]. Транскрипция гена осуществляется в теломерном направлении. Описано 10 транскриптных вариантов, образующихся вследствие альтернативного сплайсинга, однако только 4 из них кодируют белок [25].

У человека наиболее высокая экспрессия гена *EP515* выявлена в Т- и В-лимфоцитах, моноцитах и лимфоцитах [26]. Белок *EP515*, как участник сигнального пути рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), регулирует рост и пролиферацию клеток. Структура белка *EP515* приведена на рис. 1.

Химерный ген *MLL-EP515* впервые описан O. Bernard et al. [13]. В основе образования данного химерного гена лежит реципрокная транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ (рис. 2).

Известно, что существует 2 альтернативных механизма активации онкогенного потенциала белка *MLL* [29, 30]. Первый, более универсальный механизм, связан с воздействием на мотив белка-партнера *MLL* различных внешних факторов, что ведет к последующему неконтролируемому синтезу белка. Данный механизм реализуется в том случае, если белок-партнер локализуется в ядре клетки. Второй механизм, предложенный для *MLL-EP515* и ряда других химерных белков с участием *MLL*, локализующихся в цитоплазме, – двуспиральная олигомеризация функциональных доменов белка *EP515*, приводящая к лейкозогенной трансформации белка *MLL*, что, в свою очередь, ведет к увеличенной способности клеток к самообновлению. Было показано, что при ОЛ действие химерного белка опосредуется через гены семейства *HOX* [31–34], однако по отношению к ОЛЛ данная точка зрения разделяется не всеми авторами [35].

В доступной нам литературе встретилось описание всего 25 случаев *de novo* ОЛ, а также 2 рецидивов ОЛ с наличием $t(1;11)(p32;q23)$ [4–22]. Структура химерного гена *MLL-EP515* была описана всего в 2 случаях, а структура химерного транскрипта – в 5. **Целью данной работы** была клинично-лабораторная характеристика пациентов с транслокацией $t(1;11)(p32;q23)/$



Рис. 1. Структура *EP515*. В структуре данного белка выделяют: 1. Три N-концевых *EP515*-гомологических домена (*EH1*, *EH2*, *EH3*), которые необходимы для присоединения к цитоплазматической мембране путем взаимодействия с белками и прямого связывания с фосфолипидами; 2. Биспиральный домен (*CCD*), ответственный за гомо- и гетеродимеризацию; 3. Аспаратат-пролин-фенилаланиновые повторы (*DPF*), которые могут связываться с α -субъединицей адапторного белка *AP-2*; С-концевой фрагмент представлен 4 убиквитин-связывающими мотивами (*UIM*), которые необходимы для убиквитинилирования *EGFR* [27, 28]

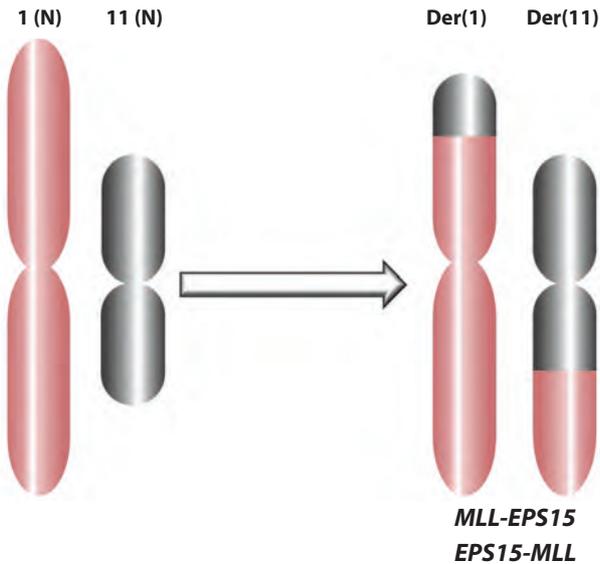


Рис. 2. Основной механизм образования химерного гена у пациентов с наличием *MLL-EPS15* – реципрокная транслокация

MLL-EPS15, а также разработка методики мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с этой транслокацией методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В отличие от других, более часто встречающихся перестроек гена *MLL*, для которых описаны различные комбинации праймеров и зондов [36, 37], нам не встретилось методики мониторинга МОБ у пациентов с наличием химерного гена *MLL-EPS15* или его транскрипта.

Материалы и методы

За период с февраля 2000 по апрель 2012 г. было обследовано 186 детей в возрасте от 1 до 365 дней с ОЛ, включая 120 пациентов с ОЛЛ, 58 – с ОМЛ, 3 – с острым недифференцированным лейкозом, по 2 – с острым бифенотипическим и острым билинейным лейкозами, еще в 1 случае тип ОЛ не был определен. Транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ и/или химерный ген *MLL-EPS15* были выявлены нами в 6 случаях. Пациенты, у которых была обнаружена транслокация $t(1;11)(p32;q23)$, получали терапию по протоколам *MLL-Baby* [38] или *ALL IC-BFM 2002* в детских онкогематологических клиниках Российской Федерации и Республики Беларусь. Информированное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур было получено во всех случаях.

Для цитогенетического исследования использовали клетки костного мозга, взятые до начала терапии. Применялась техника краткосрочного культивирования клеток в течение 24 ч. Методом окраски хромосомных препаратов был GTG-вариант. В большинстве случаев анализировали не менее 20 метафазных пластинок. Кариотипирование проводили в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека, принятой на момент выполнения стандартного цитогенетического исследования [39–41]. В ходе данной

работы все кариотипы были повторно оценены с учетом рекомендаций ISCN 2009 [41]. Дополнительными хромосомными aberrациями считали все клональные аномалии, сочетавшиеся с $t(1;11)(p32;q23)$ [42]. Кариотип считали комплексным, если каждая клетка лейкозного клона у пациентов с ОМЛ содержала не менее 3 хромосомных изменений, включая перестройки района 11q23 [43, 44].

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили с использованием гибридизационной системы ThermoBrite (StatSpin, США) на микроскопе DM 4000 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия) при помощи программного обеспечения CW4000 FISH (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия). Применяли локус-специфичный зонд LSI *MLL* Dual Color Rearrangement Probe 11q23 (Abbott Molecular, США), а также цельнохромосомные зонды для полного окрашивания 1-й и 11-й хромосом, меченные FITC и TexasRed соответственно (Metasystems, Германия).

Длинную инвертированную ПЦР (long-distance inverse PCR-LDI-PCR) выполняли по описанной ранее методике [45]. В качестве исходного материала использовали геномную ДНК в количестве 1 мкг, выделенную из лейкоцитов и бластных клеток костного мозга, взятого в момент установления диагноза. ДНК обрабатывали экзонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Bgl*II, а затем лигировали. Полученный продукт использовали для проведения нескольких инвертированных ПЦР-реакций. Ампликоны секвенировали с целью определения индивидуальной для каждого пациента точки разрыва в *MLL* и гене-партнере.

Выделение РНК и обратную транскрипцию проводили по ранее описанной методике [46]. Качество полученной РНК оценивали методом капиллярного электрофореза на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, США). В дальнейший анализ брали образцы с показателем целостности РНК более 4,2, который, как было доказано ранее, является достаточным для эффективного проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [47].

Обратно-транскриптазную ПЦР (ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора NemaVision (DNA-technology A/S, Дания) и TaqF ДНК-полимеразы (ЦНИИ эпидемиологии, Россия) в 2 этапа, согласно инструкции производителя. На первом этапе ставили 8 мультиплексных ПЦР-реакций. При получении положительного результата в одной из пробирок на втором этапе проводили несколько моноплексных реакций. Результат расценивали как позитивный, если на обоих этапах ПЦР обнаруживалось наличие специфического ПЦР-продукта, совпадающего по размеру с ожидаемым. Результат расценивали как отрицательный, если в ходе первого этапа ПЦР не было выявлено продуктов амплификации и во всех пробирках присутствовала полоса внутреннего контроля размером 911 п. н. Детекцию проводили методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле. Дополнительно

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с ОЛ и наличием $(1;11)(p32;q23)/MLL-EP315$ (начало)

№ пациента	Пол	Возраст	Лейкоциты ($\times 10^9/л$)	Картиотип	Вид ОЛ	FISH	Химерный ген	Химерный транскрипт	Исход терапии	Источник
1	ж	НД**	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ВП-ОЛЛ	—	—	—	НД	D. Williams et al., 1984 [5]
2	ж	8 мес	425	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[6]	ВИ-ОЛЛ	—	—	—	Пациент жив в ППР со сроком наблюдения 19 мес	Y. Kaneko et al., 1986 [6]
3	м	4 мес	104	46,XY,t(1;11)(p32;q23)[17]/46,XY[20]	ВИ-ОЛЛ	—	—	—	Смерть в ремиссии от инфекции через 9 мес от начала терапии	M. Gregoire et al., 1987 [7]
4	ж	< 1 года	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	НД	—	—	—	НД	A. Selypes et al., 1987 [8]
5	ж	2 мес	260	46,XX,del(1)(p32),del(11)(q13q23),der(4)t(1;11;4)(1pter>▶p32::11q23>>11q13::4p16→4qter)[29]/44,XX,-14,-21[1]	ОМЛ	—	—	—	НД	A. Hagemeyer et al., 1987 [9]
6	ж	1 год	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ВИ-ОЛЛ	—	—	—	НД	S. Raimondi et al., 1989 [10]
7	ж	3,3 года	153	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[5]/46,XX[18]	ВИ-ОЛЛ	—	—	—	Смерть от рецидива через 5 мес от начала терапии	C. Shippey et al., 1989 [11]
8	ж	35 лет	НД	46,XX,t(X;5)(q26;p15),t(1;11)(p32;q23),i(9)(q10),del(17)(p11)/46,XX,i(9)(q10),add(12)(p13),del(17)(p11)	ОЛЛ	—	—	—	НД	T. Abshire et al., 1992 [12]
9	м	НД	НД	50,XY,t(1;11)(p32;q23),+7,+21,+2mat**	ОЛЛ	—	—	—	НД	O. Bernard et al., 1994 [13]
10	м	4 года	465	46,XY,t(1;11)(p32;q23)[11]/46,XY[11]	ОМЛ M0	—	—	MLL экзон 9 – EP315 экзон 2	НД	
11	ж	43 года	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23),+der(1)t(1;12)(p12;q12),-12[5]/46,XX[4]	ОМЛ M5a	—	—	MLL экзон 9 – EP315 экзон 2	НД	
12	ж	1 год	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ОЛЛ	—	—	—	Событие* через 20 мес от начала терапии, смерть через 24 мес	
13	ж	5 мес	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ВИ-ОЛЛ	—	—	—	Пациент жив в ППР после проведения ТГСК. Срок наблюдения 54 мес	C. Harrison et al., 1998 [4]
14	ж	8 мес	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ВИ-ОЛЛ	—	—	—	Событие через 21 мес от начала терапии, смерть через 32 мес	

№ па-циента	Пол	Воз-раст	Лейкоциты ($\times 10^9/l$)	Картиопн	Вид ОЛ	FISH	Химерный ген	Химерный транскрипт	Исход терапии	Источник
15	ж	2 мес	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ОМЛ М0	—	—	—	Событие через 4 мес от начала терапии, смерть через 6 мес	
16	ж	67 лет	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)/47, idem, +8	ОМЛ М5	MLL R	—	—	Пациент жив в ППР. Срок наблюдения 5 мес	C. Harrison et al., 1998 [4]
17	ж	1 год	НД	46,XX,t(1;11)(p32;q23)	ОМЛ М4	—	—	—	Пациент жив в ППР. Срок наблюдения 37 мес	
18	м	3 мес	НД	46,XY,t(1;11)(p32;q23)[16]/46,XY[4]**	ОБфЛ	НД	НД	НД	Смерть от лейкоза через 9,7 мес от начала терапии	C. Felix et al., 1998 [14]
19	м	59 лет	НД	46,XY,t(1;11)(p32;q23)[8]/47, idem, +18[2]	ОЛЛ	MLL R	—	—	НД	A. von Bergh et al., 2000 [15]
20	ж	6 мес	89	46,XX,der(1)t(1;11)(p32;q23),inv(1)(p13q21),der(11)t(1;11)(p32;q23)	ОЛЛ	НД	—	—	Время наблюдения до события 31 мес	
21	м	9 мес	189	46,XY,t(1;4)(q21;p15),-8,del(9)(p11),der(11)t(1;11)(p32;q23),+13,del(15)(q22)	ОМЛ М5	НД	—	—	Пациент находится в ППР со сроком наблюдения 140 мес	J. Chessells et al., 2002 [16]
22	м	6 мес	187	46,XY,der(1)t(1;11)(p32;q23),der(10)t(1;11;10)(p32;q23q14;p11),del(10)(q22q25),r(11)(p11q14)	ОМЛ М5	НД	—	—	Время наблюдения до события 6 мес	
23	ж	2 года	87	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[17]/46,XX[3]	ОМЛ М5	MLL R	—	—	НД	K. Park et al., 2001 [17] и H. Kim et al., 2002 [18]
24	м	62 года	37	45,XY,t(1;11)(p32;q23),-7[9]/46,XY[4]	ОМЛ М4	MLL R	—	—	Рецидив через 16 мес от начала терапии. Смерть от рецидива через 1 нед	N. Douet-Guilbert et al., 2005 [19]
25	м	76 лет	2	55,XY,t(1;11)(p32;q23),+der(1)t(1;11)x2,add(3)(p11)+6,+8x3,+21[1]	ОМЛ М5	MLL R	—	MLL экзон 9 – EP515 экзон 2	Смерть от рецидива через 13 мес от начала терапии	M. Sagawa et al., 2006 [20]
26	ж	2 мес#	102	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[13]/46,XX[7]	В1-ОЛЛ	MLL R	MLL экзон 10 – EP515 интрон 9	MLL экзон 9 – EP515 экзон 10	Смерть от веноокклюзионной болезни на день +8 после ТГСК	
27	ж	2 мес#	156	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[8]/47, idem, +X[4]/46,XX[8]	В1-ОЛЛ	MLL R	MLL экзон 10 – EP515 интрон 9	MLL экзон 9 – EP515 экзон 10	ЦНС-рецидив на сроке 18 мес после ТГСК. Пациент жив	R. Kotecha et al., 2012 [21, 22]
28	ж	5 мес	430	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[11]	В1-ОЛЛ	—	—	—	Пациент жив в ППР со сроком наблюдения 39 мес	
29	м	7 мес	НД	47,XY,t(1;11)(p32;q23),+8[11]	НД	—	—	—	Отсутствие ответа на терапию, смерть через 2 мес от начала лечения	Настоящая работа

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с ОЛ и наличием t(1;11)(p32;q23)/MLL-EP515 (окончание)

№ пациента	Пол	Возраст	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	Картиотип	Вид ОЛ	FISH	Химерный ген	Химерный транскрипт	Исход терапии	Источник
30	ж	9 мес	91	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[11]	В1-ОЛП	MLL R	MLL интрон 10 – EP515 интрон 1	MLL экзон 10 – EP515 экзон 2	Пациент жив в ППР со сроком наблюдения 64 мес	Настоящая работа
31	м	1 день	212	46,XY,t(1;11)(p32;q23)[13]/46,XY[11]	В1-ОЛП	MLL R	MLL интрон 11 – EP515 интрон 1	MLL экзон 11 – EP515 экзон 2	Рецидив на сроке 18 мес, смерть от рецидива через 28 мес от начала терапии	
32	ж	3 мес	49	—	В1-ОЛП	MLL R	MLL интрон 11 – EP515 интрон 1	MLL экзон 11 – EP515 экзон 2	Рецидив на сроке 7 мес, смерть от рецидива через 9 мес от начала терапии	
33	ж	4 мес	300	46,XX,t(1;11)(p32;q23)[11]	В1-ОЛП	MLL R	MLL интрон 10 – 1p32	MLL экзон 10 – EP515 экзон 2	Пациент жив в ППР со сроком наблюдения 20 мес	

Примечание. FISH – результаты флуоресцентной гибридизации *in situ* с локус-специфичным зондом; «НД» – нет данных; «—» – исследование не проведено;

* – вид неблагоприятного события не был указан авторами; # – моносомные близнецы; ОбФЛ – острый бифенотипический лейкоз; ТПСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; ППР – полная продолжающаяся ремиссия; ** – образцы № 9 и 18 взяты от пациентов при рецидиве ОЛ, инициально у пациента № 18 определялся нормальный картиотип, у пациента № 9 – случайная транслокация 46,XY,t(1;12)(p32;q24).

всех пациентов с выявленным химерным геном *MLL-EP515* тестировали в гнездовой ОТ-ПЦР с праймерами, предложенными N. Palisgaard et al. [36].

Полученные в ходе гнездовой ОТ-ПЦР ампликоны очищали при помощи «Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System» (Promega, Германия). Секвенирующую реакцию ставили с применением праймеров, использовавшихся во втором раунде гнездовой ОТ-ПЦР, и набора BigDye Terminator 3.1. (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили в 2 направлениях на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Для конструирования калибратора, используемого для количественной оценки величины химерного транскрипта *MLL-EP515* в ходе ПЦР-РВ, была использована РНК пациента № 30 (табл. 1). После проведения гнездовой ОТ-ПЦР по описанной ранее методике [36] визуализацию ампликонов проводили методом электрофореза в 6 % полиакриламидном геле. Выделение ДНК-фрагмента из геля выполняли путем элюирования ТЕ-буфером с последующим осаждением 70 % этиловым спиртом по общепринятой методике. Перед процедурой лигирования проводили наращивание «тупых» концов с использованием Taq ДНК-полимеразы (ООО «Генотехнология») в присутствии дезоксиаденозинтрифосфата. Полученный ампликон лигировали в плазмидный вектор «pGEM-T Easy» (Promega, Германия) с последующей его трансформацией в бактериальную культуру *E. coli*. Из отобранных положительных клонов *E. coli* выделяли плазмидную ДНК методом щелочного лизиса. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически. Для использования в качестве калибратора для ПЦР-РВ сделали 5 разведений (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 копий/5 мкл), аналогичных использованным в международном проекте «Европа против рака» [48].

ПЦР-РВ для количественной оценки химерного транскрипта выполняли в соответствии с ранее описанными протоколами [48, 49]. В качестве калибраторов применяли плазмиды, несущие фрагменты химерного транскрипта *MLL-EP515* и контрольного гена *ABL1* (Ipsogen, Франция). Нуклеотидная последовательность использовавшихся праймеров и зондов для определения транскрипта *MLL-EP515* приведена в табл. 2. Для количественной оценки величины МОБ на основании данных, полученных путем ПЦР-РВ, использовалась методика расчета, рекомендованная консорциумом «Европа против рака» [49].

ПЦР-РВ для определения количества химерного гена *MLL-EP515* в геномной ДНК проводили по ранее описанному протоколу [50] с рядом модификаций. ПЦР выполняли в мультиплексном формате: реакционная смесь включала 2 пациент-специфичных праймера и зонд, меченный карбоксифлуоресцеином (FAM), комплементарных зоне слияния генов *MLL* и *EP515*, а также 2 праймера и зонд, меченный карбокси-X-род-амином (ROX), для амплификации контрольного гена

N-ацетилглюкозамин киназы (*NAGK*), располагающегося на коротком плече хромосомы 2 в регионе 2p12. Ген *NAGK* использовался для исключения случайной ошибки. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов приведены в табл. 2. В ПЦР-смесь вносили 600 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили с использованием TaqF-полимеразы (ЦНИИ эпидемиологии, Россия) по следующей программе: 95 °С 15 мин, 45 циклов: 95 °С 15 с – 60 °С 60 с. Для создания калибровочной кривой проводили амплификацию 10-кратных разведений ДНК пациента в смеси ДНК, полученной от 5 пациентов без онкогематологических заболеваний, взятых в общем количестве 600 нг в соотношениях от 1:10 до 1:100 000. Все образцы тестировали в 2 повторах.

Интерпретация результатов ПЦР-РВ проводилась исходя из рекомендаций Европейской рабочей группы

по изучению МОБ при ОЛЛ *ESG-MRD-ALL* [51] с дополнениями Т. Burmeister et al. [50]. Величина МОБ была рассчитана как среднее значение числа копий 2 повторов каждого образца при следующих условиях.

1. Отсутствие амплификации в отрицательном контроле (смесь ДНК, использованная для создания разведений) или превышение значения порогового цикла в образце пациента более чем на 3,0 от величины порогового цикла отрицательного контроля.

2. Разброс значений порогового цикла контрольного гена *NAGK* в 2 повторах 1 образца не превышает 1,5.

3. Коэффициент корреляции (R^2) выше 0,95.

4. Угол наклона калибровочной кривой укладывается в диапазон от –2,5 до –4,5. В каждом образце рассчитывался количественный диапазон согласно рекомендациям *ESG-MRD-ALL* [51].

Таблица 2. Использованные праймеры и зонды

	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Ген	Экзон	Локализация
Химерный транскрипт <i>MLL-EPS15</i> (кДНК)				
Прямой праймер	AGGAGAATGCAGGCACTTTGA	<i>MLL</i>	10	4135-4155
Обратный праймер	AAGCCAACACCCTTCCAGTA	<i>EPS15</i>	3	201-182
Зонд	ROX-CATCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATA-BHQ2	<i>MLL</i>	10	4157-4185
Контрольный ген <i>ABL</i> (кДНК)				
Прямой праймер	AGTCCGGGTCTTAGGCTAT	<i>ABL</i>	2	263-282
Обратный праймер	TAGTTGCTTGGGACCCAGCC	<i>ABL</i>	3	357-328
Зонд	FAM-CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-BHQ1	<i>ABL</i>	3	323-296
Химерный ген <i>MLL-EPS15</i> у пациента № 30 (ДНК)				
Прямой праймер	GCAGCAGTTATTTTGGACTCATTGA	<i>MLL</i>		
Обратный праймер	GATCTTTGTGACAGAGCAAGTCTTTA	<i>EPS15</i>		
Зонд	FAM-TGATTACGCTTACAGTTACATGAACCCACACAT-BHQ1	<i>EPS15</i>		
Химерный ген <i>MLL-EPS15</i> у пациента № 31 (ДНК)				
Прямой праймер	TCCCTGTTTAAACCAGCTAAAGAAATGT	<i>MLL</i>		
Обратный праймер	TCAAGTGTAATTTAAACAACACCATTTC	<i>EPS15</i>		
Зонд	FAM-TGCTACTCTAATAGCAGATTCTTCCTAAAATCT-BHQ1	<i>MLL</i>		
Химерный ген <i>MLL-EPS15</i> у пациента № 32 (ДНК)				
Прямой праймер	AGTGGGCATGTAGAGGTAAG	<i>MLL</i>		
Обратный праймер	GCAGGAGGATTGGTTGAG	<i>EPS15</i>		
Зонд	FAM-TGCACTCTAGCCTGGGCAACAGAGTGAGA-BHQ1	<i>EPS15</i>		
Контрольный ген <i>NAGK</i> (ДНК)				
Прямой праймер	TGGGCAGACATCGTAGCA	<i>NAGK</i>		
Обратный праймер	CACCTTCACTCCACCTCAAC	<i>NAGK</i>		
Зонд	ROX-TGTTGCCCGAGATTGACCCGGT-BHQ-2	<i>NAGK</i>		

Примечание. Нуклеотидная последовательность и нумерация экзонов гена *MLL* дана I. Nilson et al. [52], *EPS15* – согласно NM_001981.2, *ABL* – согласно NM_005157.

Результаты терапии оценивались по кривым общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ), построенным по методу Каплана–Майера [52]. Для сравнения кривых выживаемости использовался непараметрический log-rank критерий. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Данные о 27 пациентах, представленных в литературе, а также 6 вновь описываемых нами случаев, приведены в табл. 1. Возраст на момент установления диагноза был известен у 31 пациента. Среди них было 19 (62 %) детей первого года жизни, 6 (19 %) детей в возрасте от 1 года до 4 лет и 6 (19 %) взрослых в возрасте от 35 до 76 лет. При этом медиана возраста во всей исследуемой группе составила 8 мес (диапазон 1 день – 76 лет). У лиц женского пола транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ выявлялась в 2 раза чаще по сравнению с мужчинами: 22 и 11 человек соответственно. В первую очередь это было связано с преобладанием лиц женского пола среди пациентов с ОЛЛ, где соотношение женщин и мужчин составило 3:1 (15 и 5 человек соответственно). Это же соотношение сохранялось и у детей первого года жизни с ОЛЛ (10 девочек и 3 мальчика). Для пациентов с ОМЛ вне зависимости от возраста соотношение лиц женского и мужского пола было близко к 1:1.

У 20 (63 %) пациентов диагностирован ОЛЛ, у 11 (34 %) – ОМЛ, в 1 (3 %) случае – острый бифенотипический лейкоз. У 1 пациента (№ 4 в табл. 1) вариант ОЛ не был указан авторами. У детей первого года жизни ОЛЛ встречался еще чаще. Из 18 пациентов с известным типом ОЛ у 13 (72 %) был ОЛЛ, у 4 (22 %) – ОМЛ и у 1 (6 %) – острый бифенотипический лейкоз.

Иммунофенотип бластных клеток был известен в 15 случаях ОЛЛ, в том числе полностью в 13 и частично в 2 (№ 1 и 9 в табл. 1). У всех описанных пациентов выявлен В-линейный иммунофенотип бластных клеток, в том числе 14 случаев ОЛЛ из В-линейных предшественников, в 1 случае (№ 3) нельзя исключить зрелый В-ОЛЛ. В1-ОЛЛ выявлен у 10 (77 %) из 13 пациентов первого года жизни с ОЛЛ. FAB-вариант описан у 10 пациентов с ОМЛ. В эту группу вошли 2 пациента с ОМЛ с минимальной дифференцировкой (M0 морфологический вариант по FAB-классификации), 2 – с острым миелонобластным лейкозом (M4) и 6 – с острым монобластным лейкозом (M5). У детей первого года жизни с ОМЛ в 2 случаях выявлен ОМЛ M5, в 1 – ОМЛ M0.

Данные об инициальном уровне лейкоцитов приведены для 18 пациентов. У них превалировал инициальный гиперлейкоцитоз: уровень лейкоцитов выше $100 \times 10^9/л$ на момент установления диагноза выявлен в 12 (67 %) случаях. Медиана количества лейкоцитов составила $156 \times 10^9/л$ (диапазон 2–465). Дети первого года жизни имели большую опухолевую массу: из

13 человек только трое имели уровень лейкоцитов менее $100 \times 10^9/л$, а медиана количества лейкоцитов в этой возрастной группе составила $187 \times 10^9/л$ (диапазон $49–425 \times 10^9/л$).

Цитогенетическое исследование показало, что транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ как единственная аномалия выявлена в 20 (59 %) из 32 случаев. У 1 пациента (случай № 5) найдена комплексная транслокация с вовлечением хромосомных районов $1p32$, $11q23$ и $4p16$. Дополнительные хромосомные аномалии (ДХА) в опухолевых клетках пациентов с наличием $t(1;11)(p32;q23)$ и информативным цитогенетическим исследованием выявлены у 12 (38 %) из 32 пациентов. В 3 случаях (№ 8, 20, 22 в табл. 1) обнаружены только количественные ДХА, в 6 (№ 16, 19, 24, 25, 27, 29) – только структурные; в 3 случаях – сочетание количественных и структурных (№ 9, 11, 24). Наиболее частой количественной ДХА являлась трисомия 8 (3 случая). Комплексный кариотип обнаружен у 4 (36 %) из 11 пациентов с ОМЛ (№ 11, 21, 22, 25) (рис. 3).

Молекулярно-генетические исследования выполнены 15 пациентам, в том числе исследование методом FISH с локус-специфичным зондом проведено у 11 больных, и во всех случаях была выявлена перестройка гена *MLL*. В 3 случаях (№ 30, 32, 33) нами проведен дополнительный анализ методом FISH с использованием цельнохромосомных зондов для хромосом 1 и 11, который также подтвердил присутствие $t(1;11)$ (рис. 4).

У пациентов № 14 и 18 перестройки *MLL* подтверждены методом гибридизации по Саузерну. Структура химерного транскрипта определена у 9 пациентов, химерного гена – у 6. Выявлено по 2 случая локализации точек разрыва в экзоне 10 (№ 26 и 27), интроне 10 (№ 30 и 33) и интроне 11 (№ 31 и 32)



Рис. 3. Типы ДХА у пациентов с $t(1;11)(p32;q23)$. Цифры соответствуют числу пациентов; * – разделение по количеству ДХА на более 3 (комплексный кариотип) и менее 3 проведено только для пациентов с ОМЛ

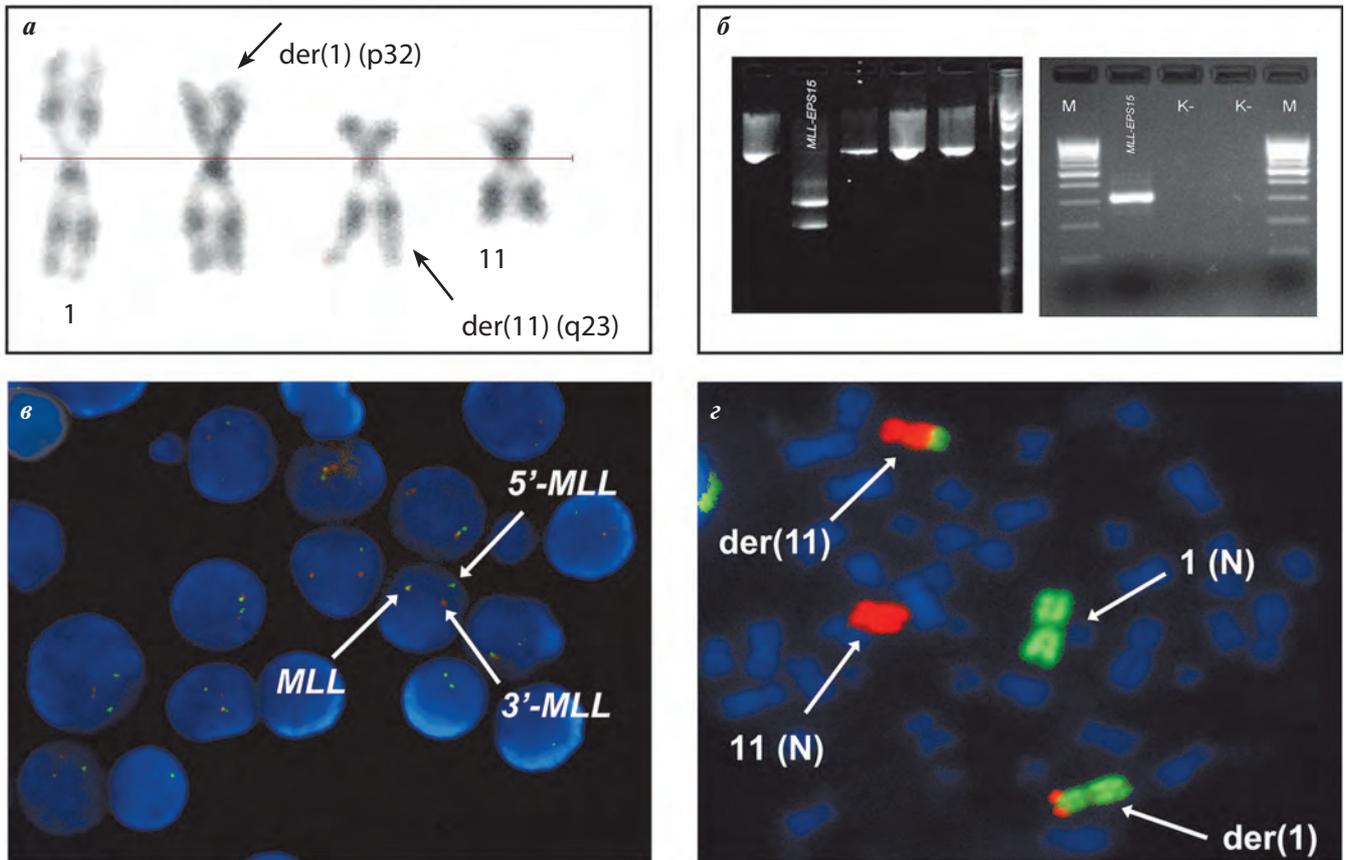


Рис. 4. Результаты цитогенетического и молекулярно-генетических методов исследования: а – частичная кариограмма пациента с наличием *t(1;11)(p32;q23)*; б – результаты скрининговой (слева) и подтверждающей (справа) ОТ-ПЦР с использованием набора HemaVision (DNA-technology A/S, Дания) у пациента с наличием химерного транскрипта *MLL-EP515*. К- – негативный контроль. Также на каждой электрофореграмме присутствует ДНК-маркер размерности ПЦР-продуктов; в – результат исследования методом FISH в интерфазных ядрах, характерный для перестройки гена *MLL*; г – данные FISH с применением целнхромосомных зондов к 1-й и 11-й хромосомам, показывающие наличие *t(1;11)*

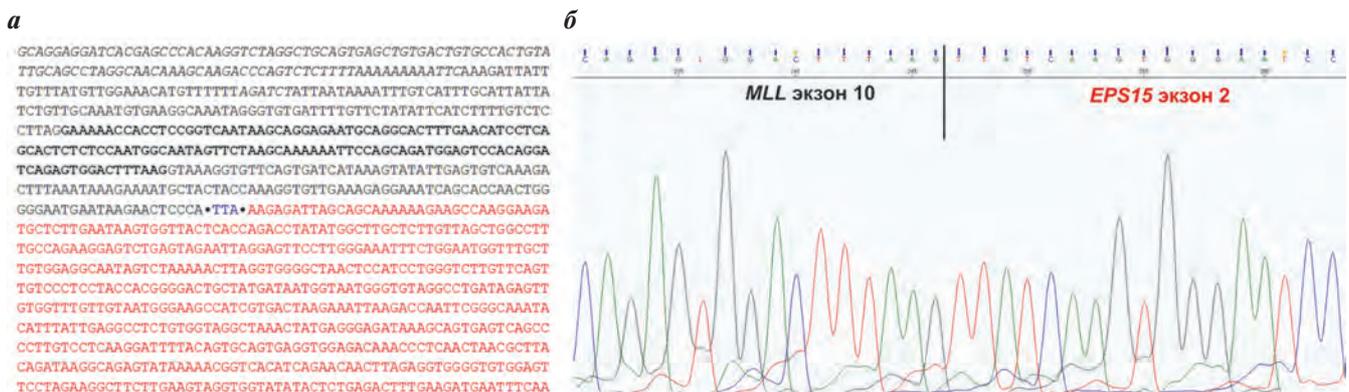


Рис. 5. а – нуклеотидная последовательность зоны слияния гена *MLL* (выделен черным цветом) и хромосомного района *1p32* (выделен красным цветом), полученные при проведении LDI-PCR у пациента № 33. Жирным шрифтом отмечен экзон 10 гена *MLL*. Синим цветом выделена тринуклеотидная вставка; б – результат секвенирования химерного транскрипта у этого же пациента выявил слияние экзона 10 гена *MLL* с эксоном 2 гена *EP515*

в ДНК гена *MLL*. В гене *EP515* в 3 случаях точка разрыва находилась в пределах интрона 1 (№ 30–32), в 1 случае в регионе *1p32* на расстоянии 1580 нуклеотидов от экзона 1 гена *EP515* (№ 33) (рис. 5а). Интересно отметить, что в этом случае точка слияния в химерном транскрипте располагалась во 2-м экзоне гена *EP515* (рис. 5б).

Еще в 2 случаях у монозиготных близнецов точка разрыва в гене *EP515* локализовалась в относительно нетипичном месте – интроне 9 (№ 26 и 27). Выявлены следующие типы химерных транскриптов *MLL-EP515*: *e9e2* – 3 случая, и по 2 случая *e9e10*, *e10e2*, *e11e2* (рис. 6).

Для проведения количественного мониторинга МОБ нами была создана комбинация флуоресцентных

зондов, праймеров и плазмиды, несущей фрагмент химерного транскрипта *MLL-EPIS15*. На основании 10-кратных разведений плазмиды (рис. 7а) была получена калибровочная кривая (рис. 7б и табл. 3). Специфичность комбинации зондов и праймеров была проверена исследованием 15 пациентов с ОЛ и нормальным кариотипом и 15 пациентов с ОЛ и другими химерными транскриптами с участием *MLL*, в том числе 6 – с *MLL-AF4*, 5 – с *MLL-MLLT1*, 2 – с *MLL-MLLT4*, 1 – с *MLL-MLLT3*, 1 – с *MLL-MLLT10*. Ни в одном случае неспецифической амплификации не выявлено. При разведении РНК, выделенной из исходного образца костного мозга пациента № 30, смесью РНК 10 пациентов без онкогематологических заболеваний была определена чувствительность системы, созданной для выявления *MLL-EPIS15* методом ПЦР-РВ. Она составила 1×10^{-5} (рис. 7в).

Мониторинг МОБ путем качественного и количественного определения химерного транскрипта *MLL-EPIS15* проводили пациентам № 29–33. Во время проведения первого курса консолидации ремиссии пациенты № 30, 31, 32 (рис. 8а) достигли МОБ-негативности, однако 2 из них позднее рецидивировали (№ 31 и 32) (рис. 8б). Пациент № 33 достиг МОБ-негативности во время проведения 3-го курса консолидации ремиссии и находится в полной продолжающейся ремиссии (ППР) со сроком наблюдения 20 мес (рис. 8в). У пациента № 29 мониторинг МОБ стал проводиться через 5,5 мес от начала терапии. Для исключения случайных ошибок одновременно с ПЦР в этом случае проводилось исследование методом FISH. Химерный транскрипт *MLL-EPIS15* методом ПЦР и перестройки гена *MLL* методом FISH ни разу не определялись.

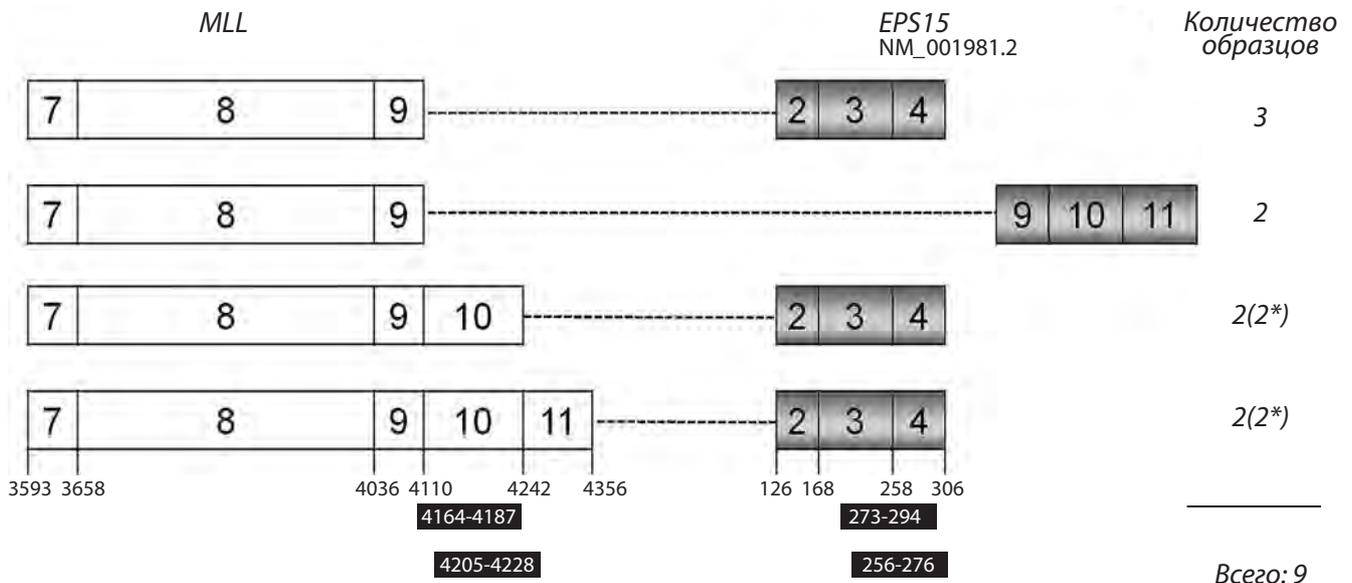


Рис. 6. Типы химерных транскриптов *MLL-EPIS15*. Белые прямоугольники – экзоны гена *MLL*, серые – экзоны гена *EPIS15*. Нумерация экзонов гена *MLL* дана по работе I. Nilson et al. [53], нумерация экзонов *EPIS15* – согласно референсной последовательности NM_001981.2. Праймеры для проведения гнездовой ОТ-ПЦР схематически представлены в виде черных прямоугольников. Цифры внутри черных прямоугольников соответствуют местам начала и конца праймера по отношению к нормальной мРНК соответствующего транскрипта. Цифры под схематическим изображением экзонов соответствуют началу экзона. * – цифры в скобках соответствуют числу пациентов, впервые описанных в данной работе

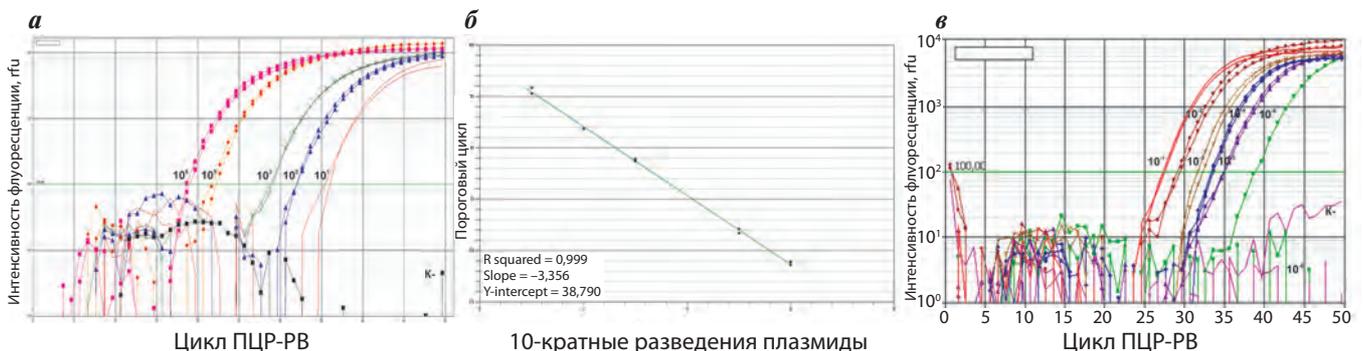


Рис. 7. Получение и оценка калибровочной кривой для последующего проведения количественного анализа химерного транскрипта *MLL-EPIS15* в кДНК пациентов: а – 10-кратные разведения плазмиды, несущей фрагмент транскрипта *MLL-EPIS15*; б – калибровочная кривая, полученная на основании 10-кратных разведений плазмиды, с аналитическими характеристиками; в – чувствительность созданной комбинации праймеров и зонда методом 10-кратных лимитирующих разведений составила 1×10^{-5} . Одно из разведений 1×10^{-6} лежит за пределом линейности, во втором – амплификация отсутствует

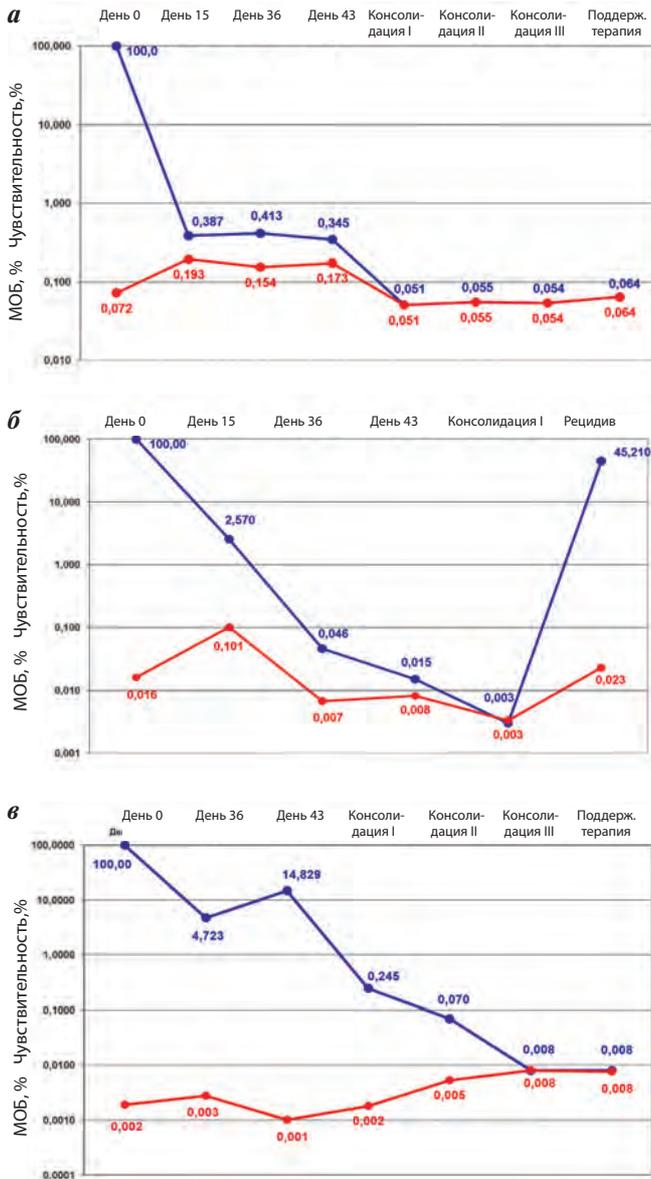


Рис. 8. Результаты мониторинга МОБ в кДНК пациентов № 30 (а), № 32 (б), № 33 (в). На всех графиках синим цветом показана величина МОБ, красным – чувствительность (нижний предел детекции), рассчитанные согласно рекомендациям консорциума «Европа против рака» [49]. В тех точках, где кривые чувствительности и МОБ сходятся, пациент становился МОБ-негативным

Для пациентов № 30, 31 и 33 проведено также определение МОБ путем количественной оценки химерного гена в геномной ДНК. Параметры калибровочных кривых, полученные при использовании индивидуально подобранных комбинаций зондов и праймеров, приведены в табл. 3. Все значения укладываются в диапазоны, рекомендованные рабочей группой *ESG-MRD-ALL* [51] с дополнениями T. Burmeister et al. [50] (рис. 9). Пример определения абсолютного количества *MLL-EPS15* в геномной ДНК у пациента № 31 приведен на рис. 10.

Сравнение результатов качественного определения МОБ в кДНК и геномной ДНК у пациентов с наличием *MLL-EPS15* проведено в 23 образцах. В 21 (92%) из них были получены идентичные результаты. В 2 случаях МОБ была выявлена только в кДНК, но не в геномной ДНК, что, скорее всего, связано с более высокой чувствительностью методики по определению химерного транскрипта. Несмотря на различные величины МОБ, получаемые при использовании различных подходов для мониторинга *MLL-EPS15*, нами была выявлена сходная кинетика МОБ при определении в геномной ДНК и кДНК (рис. 11).

Прогностическое значение транслокации $t(1;11)(p32;q23)$ в настоящее время трудно оценить, поскольку

Таблица 3. Аналитические характеристики полученных калибровочных кривых

	Коэффициент корреляции (R ²)	Угол наклона кривой (Slope)	Точка пересечения с осью ординат (Y-intercept)
ПЦР-РВ химерного транскрипта			
	0,999	-3,356	38,790
ПЦР-РВ химерного гена в ДНК			
Пациент № 30	0,990	-3,323	25,602
Пациент № 31	0,992	-2,987	21,987
Пациент № 32	0,996	-3,244	21,491

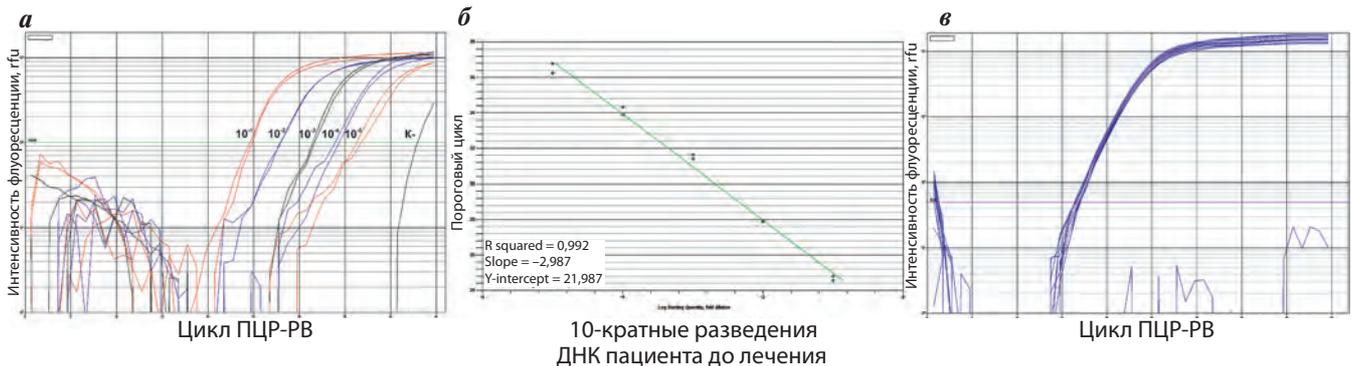


Рис. 9. Получение и оценка калибровочной кривой для последующего проведения количественного анализа химерного гена *MLL-EPS15* в геномной ДНК пациента № 31: а – 10-кратные разведения ДНК пациента, взятой до лечения в смеси ДНК от 5-го пациента без онкогематологических заболеваний; б – калибровочная кривая, полученная на основании 10-кратных разведений с аналитическими характеристиками; в – амплификация контрольного гена *NAGK* во всех образцах, использовавшихся для получения калибровочной кривой



Рис. 10. Определение МОБ в геномной ДНК. Динамика количества химерного гена *MLL-EPS15* в геномной ДНК у пациента № 31. Красной горизонтальной линией обозначен предел чувствительности, рассчитанный исходя из рекомендаций ESG-MRD-ALL [51]. Два образца, значения которых лежат ниже уровня чувствительности, являются негативными

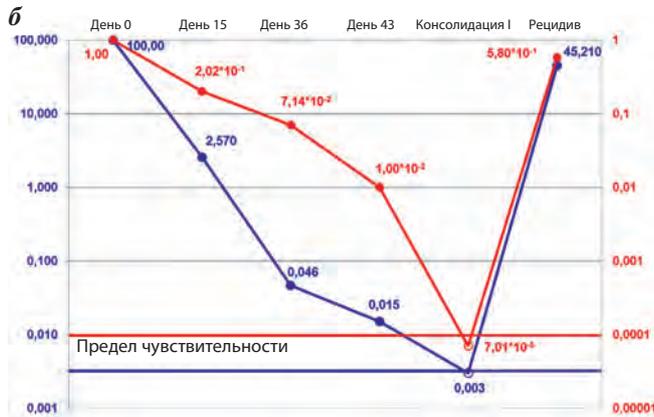


Рис. 11. Сравнение результатов определения МОБ в кДНК и геномной ДНК: а – сходимость в 23 образцах пациентов составила 92 %; б – кинетика МОБ, определенной в кДНК (синий цвет) и ДНК (красный цвет) у пациента № 32. Синей и красной горизонтальными линиями указаны пределы чувствительности в кДНК и ДНК соответственно

ку эта аномалия является весьма редкой. Из доступной литературы мы выбрали данные о выживаемости пациентов, начиная с середины 1980-х годов. За это время терапевтические подходы претерпели значительные изменения, и, соответственно, улучшилась эффективность лечения как ОЛЛ, так и ОМЛ. В анализ ОВ было включено 12 пациентов с ОЛЛ и 6 больных с ОМЛ. Внутри этой группы ОВ составила $0,37 \pm 0,12$ с медианой наблюдения 38 мес (диапазон 5–140 мес), а БСВ – $0,33 \pm 0,11$. ОВ и БСВ в исследуемой группе

не зависели от типа ОЛ и возраста пациентов (рис. 12а и 12б). Однако при более детальном разделении на группы было показано, что ОВ и БСВ в группе мальчиков с ОЛЛ младше 1 года были достоверно ниже, чем у девочек с ОЛЛ этой же возрастной группы (0 и $0,64 \pm 0,21$, $p = 0,033$; 0 и $0,46 \pm 0,18$, $p = 0,049$ соответственно) (рис. 12в и 12г).

Обсуждение

Транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ – относительно редкая генетическая перестройка, возможно, именно с этим связано небольшое количество работ, посвященных этой хромосомной аномалии. Так, на крупнейшем онлайн-ресурсе – Базе данных хромосомных aberrаций и химерных генов F. Mitelman приводятся данные всего о 32 пациентах с транслокацией $t(1;11)(p32;q23)$ [54]. Такие же цифры представлены в обзорной статье J.-L. Huret [55]. К сожалению, в этих источниках не разделены сведения о пациентах с первичными ($n = 20$) и вторичными ОЛ ($n = 12$), что затрудняет детальную оценку случаев ОЛ *de novo*. Участники Европейской рабочей группы по изучению перестроек 11q23 собрали информацию о 7 пациентах с транслокацией $t(1;11)(p32;q23)$, включая 1 пациента со вторичным ОМЛ [4]. Мы в своей работе не касались случаев вторичных ОЛ из-за совершенно особой биологии опухолевого процесса у данной категории пациентов.

Мы подтвердили ранее опубликованные данные о более высокой частоте $t(1;11)(p32;q23)$ у лиц женского пола [4, 55]. Также необходимо отметить, что для пациентов с наличием $t(1;11)(p32;q23)$ характерны общие черты всех *MLL*-позитивных ОЛ: преимущественное выявление у детей первого года жизни, доминирование CD10-негативного иммунофенотипа при ОЛЛ и М5 морфологического варианта при ОМЛ, частый инициальный гиперлейкоцитоз [56–58].

Согласно ранее опубликованным данным транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ наблюдается примерно с одинаковой частотой как при ОЛЛ, так и при ОМЛ [3, 4, 55]. Интересно, что нами ранее не выявлено ни одного случая ОМЛ с данной хромосомной аномалией. Отчасти это можно объяснить тем, что мы ограничили свой выбор изучением только детей первого года жизни, хотя и в этой возрастной группе встречается ОМЛ с $t(1;11)$. Возможно, что отсутствие случаев с относительно редкой транслокацией $t(1;11)$ объясняется малочисленностью (58 человек) нашей группы больных с ОМЛ, среди которой перестройки 11q23/*MLL* выявлены в половине случаев [59]. В то же время частота обнаружения $t(1;11)(p32;q23)$ среди всех перестроек 11q23/*MLL* у детей первого года жизни с ОЛЛ по нашим наблюдениям достигает 6 % [60], что значительно выше, чем по литературным данным. Возможно, этот вопрос требует отдельного исследования на большем числе пациентов.

Прогностическое значение $t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15$ трудно оценить, как в силу небольшого числа на-

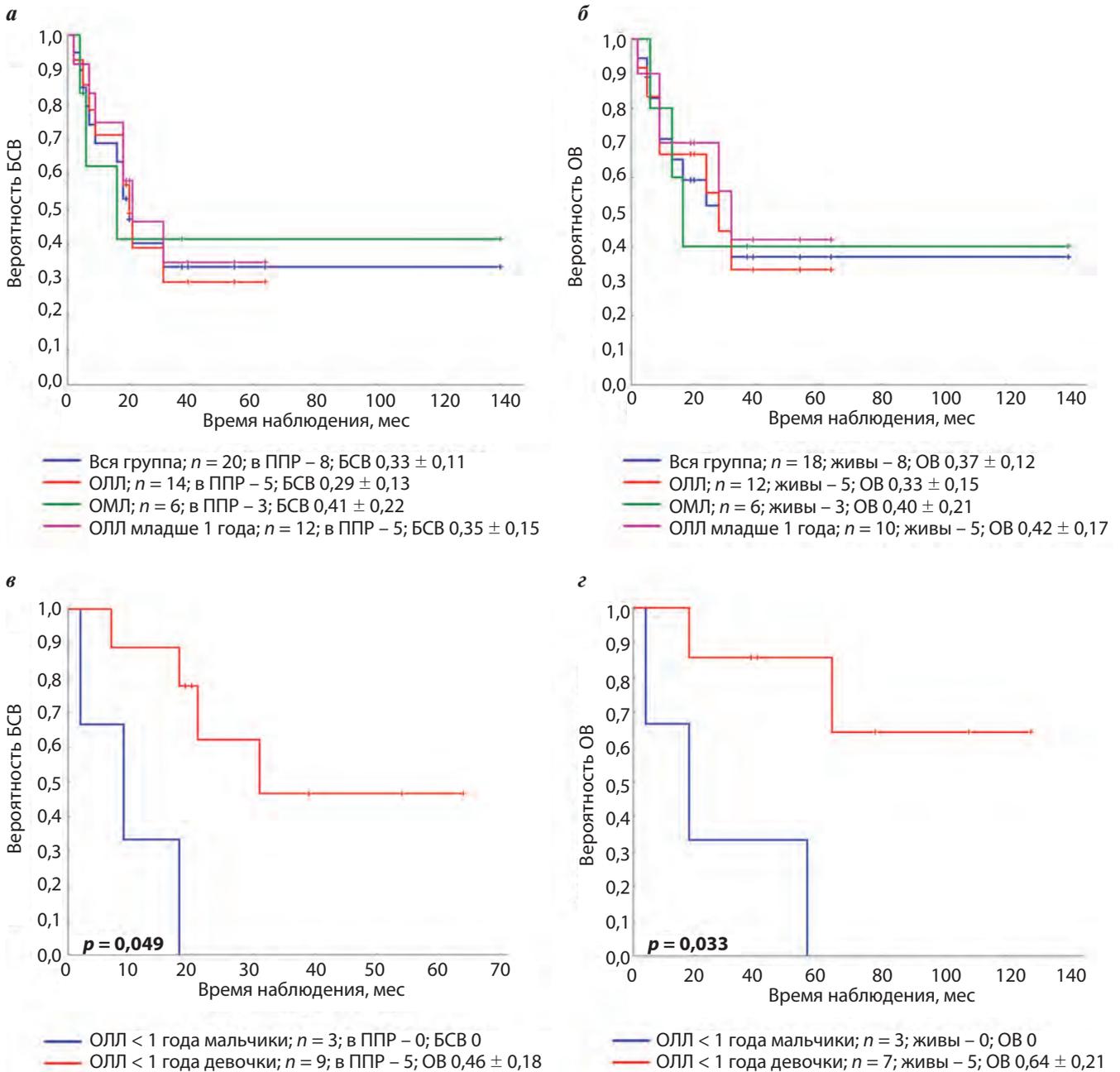


Рис. 12. Оценка прогностического значения $t(1;11)(p32;q23) / MLL-EP515$: а – показатели БСВ в общей группе пациентов, а также пациентов с ОЛЛ, ОМЛ и ОЛЛ в возрасте младше 1 года; б – показатели ОВ в вышеупомянутых группах; в и г – БСВ и ОВ соответственно у пациентов первого года жизни с ОЛЛ в зависимости от пола. ППР – полная продолжающаяся ремиссия

блюдений, так и гетерогенности терапевтических подходов, использовавшихся у данной группы пациентов. Мы, так же как и J.-L. Huret [55], при ОЛЛ выявили достоверно более низкие показатели БСВ и ОВ у пациентов мужского пола в возрасте младше 1 года по сравнению с девочками данной возрастной группы, но следует принимать во внимание, что в исследуемой группе было всего 12 пациентов (9 девочек и 3 мальчика). Более того, из-за отсутствия данных о том, живы ли 2 из 9 девочек, они были исключены из расчета вероятности ОВ.

Целенаправленное исследование структуры химерного гена *MLL-EP515* было выполнено лишь однажды:

C. Meyer et al. приводят собственные данные о 13 пациентах, включая 12 случаев ОЛ у детей [3]. Однако в этой работе отсутствуют клинико-лабораторные характеристики пациентов с *MLL-EP515* при ОЛ. Точка разрыва в гене *EP515* у обследованных нами пациентов локализовалась либо в интроне 1, на долю которого приходится около 30 % всех случаев формирования химерного гена *MLL-EP515* [3], либо в некодирующей последовательности ДНК в хромосомном районе 1p32 в непосредственной близости от 5'-конца гена *MLL*. В гене *MLL* точки разрыва у обследованных нами пациентов располагаются в 10-м

и 11-м интронах, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными [3, 50, 61].

Несмотря на относительно небольшую частоту встречаемости транслокации $t(1;11)(p32;q23)$, важно проводить ее молекулярный мониторинг, который, как было показано ранее, позволяет прогнозировать исходы терапии [62]. Технически определение МОБ может быть проведено как методом FISH, так и ПЦР. Первый метод более универсален, но обладает низкой чувствительностью: в среднем он способен выявлять 1 бластную клетку среди 500–1000 нормальных. Довольно часто для оценки МОБ используется количественное определение индивидуальных клональных перестроек генов Т-клеточных рецепторов (*TCR*) и тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IgH*) методом количественной ПЦР-РВ со специфичными для каждого пациента праймерами и зондом. Однако ранее было показано, что по сравнению со старшими детьми у детей первого года этот метод имеет ограниченное применение вследствие того, что в данной группе пациентов перестройки *IgH/TCR* встречаются реже и часто являются олигоклональными [63, 64]. Применение проточной цитометрии, еще одного метода, широко используемого для мониторинга МОБ у детей и взрослых, также может быть затруднено в данной возрастной группе вследствие совершенно особого иммунофенотипа опухолевых клеток [65–67] и нестабильной экспрессии антигенов под действием химиопрепаратов [68, 69]. Альтернативой может служить мониторинг МОБ путем определения химерного гена в геномной ДНК методом ПЦР-РВ. Для этого необходимо предварительно определить индивидуальную для каждого пациента точку слияния гена *MLL* и гена-партнера и, исходя из сиквенса зоны слияния 2 генов, подобрать комбинацию праймеров и зонда [51, 70]. Проведенное сопоставление показало хорошее совпадение результатов с данными МОБ, получаемыми при использовании *IgH/TCR* [70]. Наконец, в качестве мишени для оценки МОБ можно использовать химерный транскрипт в мРНК/кДНК, определяемый методом ПЦР-РВ [48, 71]. Нами в качестве основного метода для мониторинга МОБ была

выбрана ПЦР с определением химерного гена *MLL-EPS15* в геномной ДНК и химерного транскрипта в РНК/кДНК. Наш выбор связан с тем, что и химерные гены, и химерные транскрипты представляют собой стабильные мишени для определения МОБ [37, 48, 72], патогенетически связанные с развитием ОЛ, так как они выявляются только в опухолевых клетках.

Подобранные условия ПЦР позволили нам успешно провести мониторинг МОБ во всех доступных образцах пациентов, что дало возможность оценить ответ опухоли на химиотерапию. На основании данных, получаемых при мониторинге МОБ, уже сегодня проводится стратификация пациентов с ОЛЛ, получающих терапию по большинству современных протоколов.

Заключение

Транслокация $t(1;11)(p32;q23)$ при ОЛ наиболее часто выявляется у детей первого года жизни. Медиана возраста составляет 8 мес. Соотношение девочек и мальчиков 2:1. В 38 % случаев у пациентов с транслокацией $t(1;11)(p32;q23)$ обнаружены ДХА. Наиболее часто зоной разрывов в гене *EPS15* является интрон 1, в гене *MLL* – интроны 10 и 11. Описано 4 типа химерных транскриптов *MLL-EPS15*. Создана и успешно применена комбинация праймеров, флуоресцентных зондов и плазмиды для мониторинга химерного транскрипта *MLL-EPS15* методом ПЦР-РВ. Подобраны условия и проведен мониторинг МОБ по индивидуальным точкам разрыва в геномной ДНК у пациентов с наличием химерного гена *MLL-EPS15*. Сравнение результатов определения МОБ в геномной ДНК и кДНК показало высокую качественную сопоставимость (92 %).

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность врачам-гематологам, детским онкологам из Областной детской клинической больницы № 1 (Екатеринбург), Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Минск), Российской детской клинической больницы (Москва), Морозовской детской городской клинической больницы (Москва), предоставившим данные о пациентах, описанных в этой статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Armstrong S., Look A. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:6306–15.
2. Schoch C., Schnittger S., Klaus M. et al. AML with 11q23/*MLL* abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003;102:2395–402.
3. Meyer C., Kowarz E., Hofmann J. et al. New insights to the *MLL* recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23:1490–9.
4. Harrison C., Cuneo A., Clark R. et al. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. *Leukemia* 1998;12:811–22.
5. Williams D., Look A., Melvin S. et al. New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 1984;36:101–9.
6. Kaneko Y., Maseki N., Takasaki N. et al. Clinical and hematologic characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations. *Blood* 1986;67:484–91.
7. Gregoire M., Peeters M., Bene M. et al. Karyotype, immunophenotype, and clinical outcome: correlations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematol Blood Transfus* 1987;30:504–8.
8. Selyes A., László A. A new translocation $t(1;4;11)$ in congenital acute nonlymphocytic

- leukemia (acute myeloblastic leukemia). *Hum Genet* 1987;76:106–8.
9. Hagemeyer A., van Dongen J., Slater R. et al. Characterization of the blast cells in acute leukemia with translocation (4;11): report of eight additional cases and of one case with a variant translocation. *Leukemia* 1987;1:24–31.
10. Raimondi S., Peiper S., Kitchingman G. et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia with chromosomal breakpoints at 11q23. *Blood* 1989;73:1627–34.
11. Shippey C., Lawlor E., Secker-Walker L. Isochromosome 9q in acute lymphoblastic leukemia: a new non-random finding. *Leukemia* 1989;3:195–9.
12. Abshire T., Buchanan G., Jackson J. et al. Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and relapse: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1992;6:357–62.
13. Bernard O., Mauchauffe M., Mecucci C. et al. A novel gene, AF-1p, fused to HRX in t(1;11)(p32;q23), is not related to AF-4, AF-9 nor ENL. *Oncogene* 1994;9:1039–45.
14. Felix C., Hosler M., Slater D. et al. *MLL* genomic breakpoint distribution within the breakpoint cluster region in *de novo* leukemia in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20:299–308.
15. Bergh von A., Emanuel B., Zelderren-Bhola van S. et al. A DNA probe combination for improved detection of *MLL/11q23* breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias. *Genes Chromosomes and Cancer* 2000;28:14–22.
16. Chessells J., Harrison C., Kempinski H. et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia* 2002;16:776–84.
17. Park K., Lee D., Lee H. et al. Granulocytic Sarcoma in *MLL*-Positive Infant Acute Myelogenous Leukemia: Fluorescence in Situ Hybridization Study of Childhood Acute Myelogenous Leukemia for Detecting *MLL* Rearrangement. *Am J Pathol* 2001;159(6):2011–6.
18. Kim H., Cho H., Kim E. et al. A study on 289 consecutive Korean patients with acute leukaemias revealed fluorescence in situ hybridization detects the *MLL* translocation without cytogenetic evidence both initially and during follow-up. *Br J Haematol* 2002;119(4):930–9.
19. Douet-Guilbert N., Morel F., Le Bris M. et al. Rearrangement of the *MLL* gene in acute myeloblastic leukemia: report of two rare translocations. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;157:169–74.
20. Sagawa M., Shimizu T., Shimizu T. et al. Establishment of a new human acute monocytic leukemia cell line TZ-1 with t(1;11)(p32;q23) and fusion gene *MLL-EPS15*. *Leukemia* 2006;20:1566–71.
21. Kotecha R., Ford J., Beesley A. et al. Molecular characterization of identical, novel *MLL-EPS15* translocation and individual genomic copy number alterations in monozygotic infant twins with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97:1447–50.
22. Kotecha R., Murch A., Kees U., Cole C. Pre-natal, clonal origin of t(1;11)(p32;q23) acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. *Leuk Res* 2012;36:46–50.
23. Nakamura H., Hata T., Tagawa M. et al. Chromosome 1 abnormalities at band 1p32 in two atomic bomb survivors with myelodysplastic syndrome. *Rinsho Ketsueki* 2000;41:152–8.
24. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPS15>.
25. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000085832;r=1:51819935-51985000.
26. Su A., Wiltshire T., Batalov S. et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6062–7.
27. Salcini A., Chen H., Iannolo G. et al. Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:805–9.
28. Parachoniak C., Park M. Distinct recruitment of Eps15 via its coiled-coil domain is required for efficient down-regulation of the MET receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2009;284(13):8382–94.
29. Hess J. *MLL*: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends in Molecular Medicine* 2004;10(10):500–7.
30. Slany R. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematol* 2009;94:984–93.
31. Armstrong S., Staunton J., Silverman L. et al. *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30:41–7.
32. Ferrando A., Armstrong S., Neuberg D. et al. Gene expression signatures in *MLL*-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of *HOX* dysregulation. *Blood* 2003;102:262–8.
33. Yeoh E., Ross M., Shurtleff S. et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133–43.
34. Ayton P., Cleary M. Transformation of myeloid progenitors by *MLL* oncoproteins is dependent on *Hoxa7* and *Hoxa9*. *Genes and Development* 2003;17:2298–307.
35. Trentin L., Giordan M., Dingermann Th. et al. Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. *Euro J Haematol* 2009;83:406–19.
36. Pallisgaard N., Hokland P., Riishoj D. et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92:574–88.
37. Dongen van J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901–18.
38. Fehina L., Shorikov E., Tsaour G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A; abstr. 2828.
39. ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995). Ed. Mitelman F. Basel: S. Karger, 1995.
40. ISCN 2005: An International System For Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Eds.: Shaffer L., Tommerup N. Basel: S. Karger, 2005.
41. ISCN 2009: An International System For Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Eds.: Schaffer L., Slovak M., Campbell L. Basel: S. Karger, 2009.
42. Coenen E., Raimondi S., Harbott J. et al. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 *de novo* pediatric 11q23/*MLL*-rearranged AML patients: results of an international study. *Blood* 2011;117:7102–11.
43. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Eds.: Swerdlow S., Campo E., Harris N. et al. Lyon, France: IARC, 2008.
44. Betts D., Ammann R., Hirt A. et al. The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). *Eur J Haematol* 2007;78(6):468–76.
45. Meyer C., Schneider B., Reichel M. et al. Diagnostic tool for the identification of *MLL* rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(2):449–54.
46. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематол* 2010;2:46–54.
47. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестн Урал мед акад науки* 2011;4:107–11.
48. Gabert J., Beillard E., Velden van der V. et al. 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;17:2318–57.
49. Beillard E., Pallisgaard N., Velden van der V. et al. 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;17:2474–86.
50. Burmeister T., Marschalek R., Schneider B. et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 2006;20:451–7.
51. Velden van der V., Cazzaniga G., Schrauder A. et al. Analysis of minimal residual disease by *Ig/TCR* gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604–11.
52. Kaplan E., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–81.
53. Nilson I., Loechner K., Siegler G. et al. Exon/intron structure of *ALL1 (MLL)* gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukemias. *Br J Haematol* 1996;94(4):966–72.
54. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer (2012). Mitelman F., Johansson B. Mertens F. (eds.). <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
55. Huret J.-L. t(1;11)(p32;q23). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* (September 2010). <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0111p32q23ID1046.html>.
56. Chowdhury T., Brady H. Insights from clinical studies into the role of the *MLL* gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:192–9.
57. Forestier E., Schmiegelow K. The incidence peaks of the childhood acute leukemias reflect specific cytogenetic aberrations. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28:486–95.
58. Zweidler-McKay P., Hilden J. The ABCs of Infant Leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2008;38(3):78–94.
59. Цаур Г.А., Флейшман Е.В., Гиндина Т.Л. и др. Характеристика перестроек 11q23/*MLL* при остром миелоидном лейкозе у детей первого года жизни. *Клин онкогематол* 2012;5(4):365–71.
60. Цаур Г.А., Попов А.М., Алейникова О.В. и др. Характеристика перестроек 11q23 (*MLL*) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематол* 2011;3:57–64.
61. Meyer C., Schneider B., Jakob S. et al. The *MLL* recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2006;20:777–84.
62. Цаур Г.А., Попов А.М., Наседкина Т.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни, определенной путем выявления химерных транскриптов у детей первого года жизни, больных острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколу MLL-BABY. *Гематол и трансфузиол* 2012;57(4):12–22.
63. Jansen M., Corral L., Velden van der V. et al. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of *MLL* gene rearrangement. *Leukemia* 2007;21:633–41.
64. Peham M., Panzer S., Fasching K. et al. Low frequency of clonotypic Ig and T-cell receptor gene rearrangements in t(4;11) infant acute lymphoblastic leukaemia and its implication for the detection of minimal residual disease. *Br J Haematol* 2002;117:315–21.
65. De Zen L., Bicciato S., te Kronnie G., Basso G. Computational analysis of flow-cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification. *Leukemia* 2003;17:1557–65.
66. Schwartz S., Rieder H., Schlaeger B. et al. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangement and a CD10(-)/CD24(-)/CD65(+)/CD15(+) B-cell phenotype. *Leukemia* 2003;17:1589–95.
67. Attarbaschi A., Mann G., König M. et al. Mixed lineage leukemia-rearranged childhood pro-B and CD10-negative pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin Cancer Res* 2006;12:2988–94.
68. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Особенности мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах методом проточной цитометрии у детей первого года жизни. *Дет онкол* 2008;2:32–5.
69. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Возможности применения NG2 для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом, ассоциированным с реарранжировками гена *MLL*. *Гематол и трансфузиол* 2009;6:19–22.
70. Velden van der V., Corral L., Valsecchi M. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Infant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23:1073–9.
71. Jansen M., Velden van der V., Dongen van J. Efficient and easy detection of *MLL-AF4*, *MLL-AF9* and *MLL-ENL* fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and LightCycler. *Leukemia* 2005;19(11):2016–18.
72. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2007;21:622–6.