

New molecular markers of CML progression

V.A. Misyurin^{1,2}, A.V. Misyurin^{1,2}, L.A. Kesayeva^{1,2},
Yu.P. Finashutina^{1,2}, Ye.N. Misyurina², I.N. Soldatova^{1,2},
A.A. Krutov², N.A. Lyzhko^{1,2}, T.V. Akhlynnina^{1,2},
A.Ye. Lukina³, T.I. Kolosheynova³, N.V. Novitskaya¹,
Ye.G. Arshanskaya⁴, Ye.G. Ovsyannikova⁵,
R.A. Golubenko⁶, V.A. Lapin⁷, T.I. Pospelova⁸,
V.A. Tumakov⁹, and A.Yu. Baryshnikov¹

ABSTRACT

In the contrast to Ph⁻negative chronic myeloproliferative disorders (cMPD), chronic myelogenous leukemia (CML) is prone to rather early transformation into the later stage disease, known as the acceleration phase (AP) and blast crisis (BC). Myeloproliferative disorders are termed myeloproliferative neoplasms in the WHO classification, 2008. Molecular mechanisms underlying CML progression are unclear and still being studied. Recently, it was shown that progression of some malignancies was associated with activation and hyperexpression of some genes from the cancer-testis (CT) family. In this study, we evaluated the gene expression profile of CT genes (*GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* and *PRAME*) in the blood of patients with initially diagnosed cMPD, as well as in the blood and bone marrow of CML patients in CP, AP and BC. It was found that activation of these eight CT genes expression was strongly correlated with CML progression to AP and BP. These data suggest that at least some of CT genes can be involved in CML evolution towards the terminal phases. Expression of these genes can be used as an early molecular predictor of CML progression to AP and BC.

Keywords: cancer-testis genes, *PRAME*, gene expression, chronic myelogenous leukemia, chronic myeloproliferative diseases.

Accepted: April 6, 2014

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS

115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation

² GeneTechnology Medical Center LLC

117485, ul. Profsoyuznaya, d. 104, Moscow, Russian Federation

³ Hematology Research Center, RF Ministry of Health

125167, Novyy Zыkovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation

⁴ Moscow Hematological City Center, S.P. Botkin City Clinical Hospital, RF Ministry of Health

125101, 2 Botkinskiy pr., d. 5, bld. 19, Moscow, Russian Federation

⁵ Astrakhan State Medical Academy

414000, ul. Bakinskaya, d. 121, Astrakhan, Russian Federation

⁶ Oryol Regional Clinical Hospital

302028, Bulvar Pobedy, d. 10, Oryol, Russian Federation

⁷ Hematological Center, Yaroslavl City Clinical Hospital № 1

1500062, ul. Yakovlevskaya, d. 7, Yaroslavl, Russian Federation

⁸ Novosibirsk State Medical University

630091, Krasnyy prospekt, d. 52, Novosibirsk, Russian Federation

⁹ Ivanovo Regional Clinical Hospital № 1

153040, ul. Lyubimova, d. 1, Ivanovo, Russian Federation

V.A. Misyurin, Junior scientific worker, Laboratory of experimental chemotherapy

A.V. Misyurin, PhD, Head of laboratory of recombinant tumor antigens

L.A. Kesayeva, Scientific worker, Laboratory of recombinant tumor antigens

Новые маркеры прогрессирования хронического миелолейкоза

В.А. Мисюрин^{1,2}, А.В. Мисюрин^{1,2}, Л.А. Кесаева^{1,2}, Ю.П. Финашутина^{1,2},
Е.Н. Мисюрин², И.Н. Солдатова^{1,2}, А.А. Крутов², Н.А. Лыжко^{1,2},
Т.В. Ахлынина², А.Е. Лукина³, Т.И. Колошейнова³, Н.В. Новицкая¹,
Е.Г. Аршанская⁴, Е.Г. Овсянникова⁵, Р.А. Голубенко⁶, В.А. Лапин⁷,
Т.И. Поспелова⁸, В.А. Тумаков⁹, А.Ю. Барышников¹

РЕФЕРАТ

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) отличается от Ph-негативных хронических миелолиферативных заболеваний (хМПЗ) относительно более ранней трансформацией в поздние стадии, известные как фаза акселерации (ФА) и бластный криз (БК). В классификации ВОЗ 2008 г. хМПЗ обозначены как миелолиферативные опухоли. Молекулярные механизмы прогрессии ХМЛ в настоящее время только начинают проясняться. Недавно было показано, что прогрессия некоторых злокачественных опухолей сопровождается активацией так называемых раково-тестикулярных генов (РТГ). Данная работа посвящена исследованию профиля экспрессии РТГ: *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* — в крови первичных больных хМПЗ, а также в крови и костном мозге пациентов с ХМЛ в хронической фазе, ФА и БК. В результате проведенного исследования была обнаружена достоверная связь перехода ХМЛ в ФА и БК с активацией экспрессии данных генов.

Ключевые слова:

раково-тестикулярные гены, *PRAME*, экспрессия генов, хронический миелоидный лейкоз, хронические миелолиферативные заболевания.

Принято в печать: 6 апреля 2014 г.

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН
115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация

² Медицинский центр ООО «ГеноТехнология»

117485, Профсоюзная ул., д. 104, Москва, Российская Федерация

³ ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ

125167, Новый Зыковский пр., д. 4а, Москва, Российская Федерация

⁴ Московский гематологический городской центр при ГКБ им. С.П. Боткина МЗ РФ

125101, 2-й Боткинский пр., 5, к. 19, Москва, Российская Федерация

⁵ Астраханская государственная медицинская академия

414000, ул. Бакинская, д. 121, Астрахань, Российская Федерация

⁶ Орловская областная клиническая больница

302028, ул. Бульвар Победы, д. 10, Орел, Российская Федерация

⁷ Гематологический центр ЯОКБ № 1, Ярославль

150062, ул. Яковлевская, д. 7, Ярославль, Российская Федерация

⁸ Новосибирский государственный медицинский университет

630091, ул. Красный проспект, д. 52, Новосибирск, Российская Федерация

⁹ Ивановская ОКБ № 1

153040, ул. Любимова, д. 1, Иваново, Российская Федерация

Yu.P. Finashutina, Scientific worker, Laboratory of recombinant tumor antigens
 Ye.N. Misyurina, PhD, Hematologist
 I.N. Soldatova, Scientific worker, Laboratory of recombinant tumor antigens
 A.A. Krutov, PhD, Scientific worker, Laboratory of recombinant tumor antigens
 N.A. Lyzhko, Scientific worker, Laboratory of recombinant tumor antigens
 T.V. Akhlynina, Scientific worker, Laboratory of recombinant tumor antigens
 A.Ye. Lukina, Hematologist in the scientific and clinical department for chemotherapy of hematological diseases and the intensive care unit
 T.I. Kolosheynova, PhD, Hematologist in the scientific and clinical department for chemotherapy of hematological diseases (with a day patient facility)
 N.V. Novitskaya, Hematologist in hematological unit № 7
 Ye.G. Arshanskaya, Hematologist in hematological unit № 7
 Ye.G. Ovsyannikova, PhD, Assistant of subdepartment of internal medicine
 R.A. Golubenko, Head of hematological unit
 V.A. Lapin, Head of the Clinical Department
 T.I. Pospelova, DSci, Professor of subdepartment of therapeutics, hematology, and transfusiology, Head of subdepartment of therapeutics, hematology, and transfusiology
 V.A. Tumakov, Head of hematological unit
 A.Yu. Baryshnikov, DSci, Professor of subdepartment of clinical immunology and allergology, Director

Address correspondence to:

V.A. Misyurin
 115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation
 Tel.: +7 (985) 4363019, e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В 1951 г. Уильям Дамешек предложил рассматривать эссенциальную тромбоцитемию, эритремию, первичный идиопатический миелофиброз и хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) в качестве единой группы хронических миелопролиферативных заболеваний (хМПЗ). Обоснованием для такого объединения стала общность клинических и морфологических особенностей этих заболеваний [1]. В настоящее время эритремия (истинная полицитемия), эссенциальная тромбоцитемия и первичный идиопатический миелофиброз отнесены к Ph-негативным хМПЗ и рассматриваются отдельно от ХМЛ [2].

ХМЛ связан с транслокацией t(9;22), приводящей к слиянию генов *BCR* и *ABL*, в результате чего слитный ген кодирует химерную тирозинкиназу BCR-ABL [3]. Многие случаи развития хМПЗ связаны с мутацией в гене *JAK2*-киназы. Замены нуклеотидных оснований или микроделеции могут проходить в экзоне 12 гена *JAK2* [4]. Однако чаще всего происходит точечная мутация в псевдокиназном домене (проявляющаяся на уровне белка), известная как мутация *JAK2V617F* [5].

В норме киназа *JAK2* передает сигнал, активирующий промоторы генов, которые отвечают за запуск процессов пролиферации [2]. Функции ABL-киназы более широкие. Она участвует не только в процессах регуляции пролиферации и регуляции клеточного цикла, но и в ответах на стресс. Функции тирозинкиназ *JAK2* и ABL жестко регулируются. Для инактивации фактора ABL существуют ингибиторы *Pag/Msp33*, *Abi-1*, *Abi-2* и множество других [6]. Инактивацию пути передачи сигнала от киназы *JAK2* осуществляют белки семейства *PIAS* [5]. Системы инактивации не способны нивелировать последствия усиленный передачи внутриклеточного сигнала. Вследствие этого мутантные тирозинкиназы продолжают передавать сигнал своим партнерам и дальше, превращаясь из контролируемых посредников в автономные инициаторы внутриклеточной передачи сигнала [5, 6].

Присутствие киназ BCR-ABL и *JAK2V617F* способствует лейкозной трансформации (лейкемизации)

стволовых кроветворных клеток. В этом и заключается общность индукции лейкемогенеза при хМПЗ и ХМЛ [7].

Наблюдаются различия на уровне генов-мишеней мутантных тирозинкиназ. Считается, что путь передачи сигнала киназой *JAK2V617F* во многом соответствует пути нативной *JAK2*-киназы [5, 8]. Вследствие этого клинические проявления хМПЗ постоянны на протяжении долгого периода времени — до нескольких десятков лет [2]. В течение этого периода, однако, хМПЗ нередко трансформируется в миелодиспластический синдром, который может получить свое дальнейшее развитие в острый лейкоз, плохо поддающийся терапии [9]. В связи с этим актуальна проблема определения признаков трансформации на молекулярном уровне [10].

Киназа BCR-ABL передает сигнал не только по путям, подчиненным регуляции ABL-киназой, но вмешивается во множество других регуляторных каскадов. Нарушается работа многих клеточных систем, в т. ч. репарации ДНК и контроля клеточного цикла [11]. Происходит накопление дополнительных эпигенетических изменений и генетических дефектов, из-за чего наблюдается стадийная прогрессия ХМЛ [12, 13]. В патогенезе и клиническом течении ХМЛ выделяют хроническую фазу (ХФ), фазу акселерации (ФА) и бластный криз (БК) [2].

В последнее время накоплено много данных, свидетельствующих о перспективах иммунотерапии злокачественных опухолей [14]. Идея иммунотерапии состоит в разработке средств, токсичных для клеток, которые имеют определенный антиген [15, 16]. Теоретически в качестве мишени для иммунотерапии подходит любой антиген, специфичный только для данной опухолевой клетки и отсутствующий на поверхности здоровых клеток [17]. Иммунотерапия может быть единственным выходом для больных ХМЛ с развившейся резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы [18].

Этому критерию соответствуют раково-тестикулярные антигены, кодируемые раково-тестикулярными генами (РТГ). В группу включены гены, которые у здорового человека экспрессируются только в семенниках (мужские половые железы,

в которых происходит сперматогенез). В соматических клетках эти гены, как правило, неактивны. Однако генетическая нестабильность трансформированных клеток приводит к спонтанной экспрессии РТГ. Феномен активации РТГ при онкологических заболеваниях подтвержден рядом исследований [19]. Наше предположение заключается в том, что по мере прогрессирования ХМЛ (ХФ → ФА → БК) возможна спонтанная активация РТГ, причем наибольшее число активных генов характерно для более поздних стадий заболевания.

К настоящему времени опубликованы результаты нескольких исследований профиля экспрессии РТГ при ХМЛ [19]. Однако эти данные получены при использовании разных методов детекции, причем совсем нет работ, в которых с этой точки зрения были бы рассмотрены все фазы прогрессирования ХМЛ. Исследования специфики экспрессии РТГ при истинной полицитемии не проводились вовсе.

В настоящей работе методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени были определены паттерны экспрессии РТГ: *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*. Они кодируют белки, для которых характерна высокая иммуногенность, а их экспрессия была обнаружена при солидных опухолях и некоторых онкогематологических заболеваниях [19]. В частности, динамика экспрессии гена *PRAME* описана при множественной миеломе [20, 21]. Мы сравнили профили экспрессии РТГ у больных хМПЗ и ХМЛ в различных фазах с целью определить возможности и условия специфической иммунотерапии данных заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аналізу подвергнуты 69 образцов крови и 26 проб костного мозга у больных с диагнозом ХМЛ ($n = 95$), 39 образцов крови у первичных больных хМПЗ. Для создания группы контроля были взяты пробы крови у 13 здоровых доноров. Диагноз устанавливался в соответствии со стандартными критериями [2]. Все больные с диагнозом ХМЛ, ранее получавшие лечение, принимали иматиниб.

Определение мутантного аллеля гена *Jak2*

Выделение геномной ДНК для этого исследования проводилось с применением «DNA-экстракт» («ГеноТехнология», Россия). Для дискриминации нормального и мутантного аллеля гена *JAK2* использовался набор реактивов *JAK2V617F*-тест («ГеноТехнология», Россия) согласно инструкции, предложенной разработчиком.

Выделение мРНК и синтез кДНК

Тотальная РНК из образцов крови и костного мозга была выделена с помощью набора реактивов «RNA-экстракт-1» («ГеноТехнология», Россия). Этот же набор использовался для получения кДНК. Вся работа проводилась в полном соответствии с инструкцией, предложенной разработчиком.

Проведение реакции количественной ПЦР

Для определения уровня экспрессии генов *BCR-ABL*, *PRAME* и контрольного гена *ABL* использовались наборы реактивов «Онкоскрин-1-1Q», «Онкоскрин-9Q» и «Онкоскрин-14Q» («ГеноТехнология», Россия) соответственно.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Ген	5'-3'-последовательность праймеров и зондов
<i>GAGE1</i>	AGC TGC TCA GGA GGG AGA GGA T
	GGT GAC CCT GTT CCT GGC TA
	R6G-CAT CTG CAG GTC AAG GGC CGA AGC CTG AA-BHQ1
<i>NY-ESO-1</i>	TCT GAA GGA GTT CAC TGT GT
	AGA CAG GAG CTG ATG GAG AG
	R6G-AAC ATA CTG ACT ATC CGA CTG ACT GCT GCA-BHQ1
<i>MAGEA1</i>	GAA GGA ACC TGA CCC AGG CT
	AAT CCT GTC CTC TGG GTT GG
	R6G-TGT GAG GAG GCA AGG TTT TCA GGG GAC-BHQ1
<i>SCP1</i>	AAA AGG AAC AGA ACA AGA AC
	TGT GGT AAT GGC AGT TAA CT
	R6G-CCA AGC CAG AGA GAA AGA AGT ACA TGA TTT-BHQ1
<i>SEMG1</i>	TCC TCA TCT TGG AGA AGC AA
	TGG GAA AAT TCA CTT GGT AA
	R6G-ATG GGA CAA AAA GGT GGA TCA AAA GGC C-BHQ1
<i>SPANXA</i>	GAG GAG CGT CCC CTG TGA TT
	AGC AGG TTG CGG GTC TGA GT
	R6G-AGG CCA ACG AGA TGA TGC CGG AGA CCC CAA-BHQ1
<i>SSX1</i>	GTA TAT GAA GAG AAA CTA TAA GG
	TAT TAC ACA TGA AAG GTG GG
	R6G-ATG ACT AAA CTA GGT TTC AAA GTC ACC-BHQ1

Для измерения уровня экспрессии *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1* использовался двукратный буфер для ПЦР в реальном времени («ГеноТехнология», Россия). Системы праймеров и зондов для оценки уровня экспрессии этих генов были разработаны на основании данных по геномным последовательностям, предоставленным онлайн-ресурсом по адресу <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Данные о последовательностях праймеров и зондов представлены в табл. 1. Количественная оценка уровня экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1* проводилась относительно мРНК гена *ABL*. Для расчета использовали разведение плазмидных контролей, содержащих клонированные фрагменты кДНК изучаемых генов [20].

Анализ данных

Выделено четыре группы пациентов с ХМЛ:

- 1) ХФ ХМЛ — первичные, не получавшие лечение ($n = 16$);
- 2) ХФ ХМЛ, получавшие иматиниб ($n = 37$);
- 3) ФА ХМЛ, получавшие иматиниб ($n = 27$);
- 4) БК ХМЛ, получавшие иматиниб ($n = 15$).

Группы были образованы в соответствии с тем, что при ХМЛ популяция лейкозных клеток приобретает дополнительные изменения, которые клинически проявляются как прогрессирование заболевания (ХФ → ФА → БК).

Больные с хМПЗ рассмотрены в одной группе, т. к. они имели сходные клинические характеристики, а главное, у всех была обнаружена мутация в гене *JAK2V617F*.

Для таких параметров, как пол, возраст, длительность заболевания и терапии, а также уровень экспрессии гена, представлено значение медианы и межквартильных интервалов (табл. 2). Для доказательства сходства про-

Таблица 2. Профиль экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* при хронических миелопролиферативных заболеваниях ($n = 39$, исследование крови) и хроническом миелолейкозе ($n = 95$, исследование крови и костного мозга)

Характеристика участников исследования	Группа контроля						Кровь						Костный мозг					
	Число пациентов	Мужской пол, n (%)	Медиана (диапазон) возраста, лет	Медиана (диапазон) длительности заболевания, мес.	Медиана (диапазон) терапии иматинибом, мес.	Ракowo-тестикулярные гены	хМПЗ	ХФ ХМЛ, без лечения	ХФ ХМЛ	ФА ХМЛ	БК ХМЛ	ХФ ХМЛ, без лечения	ХФ ХМЛ	ФА ХМЛ	БК ХМЛ	ХФ ХМЛ	ФА ХМЛ	БК ХМЛ
13	7 (54)	25 (19-45)	—	—	—	39	11	27	21	10	5	10	6	5	10	6	5	
Мужской пол, n (%)	7 (54)	25 (19-45)	—	—	—	39	11 (64)	10 (37)	9 (43)	4 (40)	3 (60)	6 (60)	4 (67)	3 (60)	6 (60)	4 (67)	3 (60)	
Медиана (диапазон) возраста, лет	25 (19-45)	25 (19-45)	43 (36-65)	—	—	39	43 (36-65)	50 (23-66)	51 (27-78)	43 (29-59)	62 (33-77)	56 (23-81)	46 (32-50)	53 (36-65)	56 (23-81)	46 (32-50)	53 (36-65)	
Медиана (диапазон) длительности заболевания, мес.	—	—	—	—	—	39	—	66 (11-195)	57 (12-168)	61 (12-198)	—	58 (14-156)	63 (29-110)	69 (14-204)	58 (14-156)	63 (29-110)	69 (14-204)	
Медиана (диапазон) терапии иматинибом, мес.	—	—	—	—	—	39	—	61 (10-74)	53 (13-81)	58 (45-81)	—	55 (12-95)	44 (9-50)	59 (9-103)	55 (12-95)	44 (9-50)	59 (9-103)	
Ракowo-тестикулярные гены																		
<i>GAGE1</i>	—	—	—	—	—	39	—	—	4 (19)	4 (40)	—	—	—	1 (20)	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	—	4 (19)	4 (40)	—	—	—	1 (20)	—	—	—	
Медиана (диапазон) уровня экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	—	0,3 (0,1-1,8)	0,2 (0,1-1)	—	—	—	0,1	—	—	—	
<i>NY-ESO-1</i>	—	—	—	—	—	39	—	—	—	—	—	1 (10)	—	—	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	—	—	—	—	1 (10)	—	—	—	—	—	
Уровень экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	—	—	—	—	35,36	—	—	—	—	—	
<i>MAGEA1</i>	—	—	—	—	—	39	—	—	1 (5)	—	—	—	—	—	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	—	1 (5)	—	—	—	—	—	—	—	—	
Уровень экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	—	0,01	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>SCP1</i>	—	—	—	—	—	39	—	—	—	—	—	1 (10)	—	—	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	—	—	—	—	1 (10)	—	—	—	—	—	
Уровень экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	—	—	—	—	0,14	—	—	—	—	—	
<i>SEMG1</i>	—	—	—	—	—	39	—	—	5 (27)	4 (40)	—	—	2 (33)	—	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	—	5 (27)	4 (40)	—	—	2 (33)	—	—	—	—	
Медиана (диапазон) уровня экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	—	0,7 (0,3-1,3)	1,6 (0,8-6)	—	—	0,5 (0,15-0,9)	—	—	—	—	
<i>SPANXA1</i>	—	—	—	—	—	39	—	1 (4)	1 (5)	—	—	—	—	—	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	1 (4)	1 (5)	—	—	—	—	—	—	—	—	
Уровень экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	0,15	0,01	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>SSX1</i>	—	—	—	—	—	39	—	—	3 (14)	1 (10)	—	—	1 (17)	—	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	—	3 (14)	1 (10)	—	—	1 (17)	—	—	—	—	
Медиана (диапазон) уровня экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	—	0,24 (0,01-0,26)	0,26	—	—	0,03	—	—	—	—	
<i>PRAME</i>	—	—	—	—	—	39	—	2 (7)	6 (28)	6 (60)	—	3 (30)	5 (83)	4 (80)	—	—	—	
Наличие в группе, n (%)	—	—	—	—	—	39	—	2 (7)	6 (28)	6 (60)	—	3 (30)	5 (83)	4 (80)	—	—	—	
Медиана (диапазон) уровня экспрессии*	—	—	—	—	—	39	—	43 (38-48)	3 (-3-51)	67 (4-460)	—	27 (21-51)	0,13 (0,02-3,6)	36 (7-81)	—	—	—	
—	—	—	—	—	—	39	—	5,5	3 (-3-51)	67 (4-460)	—	27 (21-51)	0,13 (0,02-3,6)	36 (7-81)	—	—	—	

* Уровень экспрессии относительно гена *ABL*.

филей экспрессии РТГ в крови у больных в дебюте хМПЗ и ХМЛ, а также для сравнения их в различных фазах ХМЛ применялся критерий χ^2 . Сравнение групп больных ХМЛ по уровню экспрессии генов проводилось с использованием критерия Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках крови здоровых доноров не обнаружено экспрессии мРНК генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1*, *PRAME*, а также не выявлено следов транскрипта гена *BCR-ABL* и не было клеток, несущих аллель *JAK2V617F*.

У 4 первичных больных хМПЗ мы наблюдали спонтанную экспрессию только одного РТГ — *PRAME*.

Профили экспрессии РТГ в клетках крови у больных с впервые диагностированными хМПЗ и ХФ ХМЛ не отличаются ($p = 0,199$). Только у отдельных пациентов экспрессируется ген *PRAME*, причем на сопоставимом уровне относительно контрольного гена ($p = 0,001$). Активность других рассматриваемых РТГ не выявлена.

У 1 пациента в ХФ ХМЛ и получающего иматиниб при исследовании крови обнаружена экспрессия гена *SPANXA1*. Частота выявления активного гена *PRAME* у этих больных была приблизительно такой же, как и в группе без лечения иматинибом ($p = 0,346$).

В крови больных в ФА и БК ХМЛ экспрессируется больше генов, чем при ХФ ($p = 0,032$ и $p = 0,048$ соответственно). В частности, в ФА кроме экспрессии *SPANXA1* и *PRAME* наблюдалась высокая активность генов *GAGE1*, *MAGEA1*, *SEMG1* и *SSX1*. В фазе БК экспрессировались гены *GAGE1*, *SEMG1*, *SSX1* и *PRAME*.

При анализе результатов исследования крови пациентов, получавших лечение, отмечено увеличение уровня экспрессии *PRAME* в фазе БК относительно ХФ ($p = 0,001$) и ФА ($p = 0,048$).

В костном мозге больных, обследованных в дебюте ХМЛ, не обнаружено экспрессии каких-либо из изучаемых генов. Однако у больных, получающих лечение в ХФ ХМЛ, в костном мозге в единичных случаях экспрессируются гены *NY-ESO-1* и *SCPI*, в ФА — гены *SEMG1* и *SSX1* и в фазе БК — *GAGE1*.

Только ген *PRAME* экспрессировался в клетках костного мозга у больных, получавших лечение во всех фазах ХМЛ: ХФ, ФА и БК. Уровень экспрессии генов у больных в БК ХМЛ был выше, чем в ХФ ($p = 0,06$) и в ФА ($p = 0,026$).

ОБСУЖДЕНИЕ

PRAME оказался единственным РТГ, экспрессия которого наблюдалась в клетках крови первичных больных хМПЗ и ХФ ХМЛ. Вероятной причиной спонтанной инициации транскрипции гена *PRAME* может быть вмешательство белков, кодируемых генами *JAK2V617F* и *BCR-ABL*, в нормальные регуляторные пути. Моменту обращения больного за медицинской помощью предшествует период развития заболевания. Скрытый период заболевания может быть различным по длительности. За это время как при ХМЛ, так и при хМПЗ могут происходить события, стимулирующие экспрессию *PRAME*, что и было показано в нашем исследовании.

В отличие от первичных больных до лечения у пациентов в ХФ, ФА и БК ХМЛ, получающих лечение

иматинибом, профиль экспрессии РТГ клетками крови и костного мозга более сложный. Кроме повышения уровня экспрессии РТГ *PRAME* наблюдается спонтанная активация экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*.

Интересно, что в ХФ ХМЛ в костном мозге некоторых больных экспрессировались гены *NY-ESO-1* и *SCPI*, активные на ранних стадиях сперматогенеза. Ген *MAGEA1* экспрессируется в развивающихся герминогенных клетках до тех пор, пока они не завершат мейотическое деление. У 1 больного в ФА ХМЛ в крови экспрессировался ген *MAGEA1*. Гены *GAGE1* и *SEMG1*, транскрипты которых были обнаружены в ФА и БК, но не в ХФ ХМЛ, в норме экспрессируются на поздних стадиях сперматогенеза. Однако ген *SSX1*, экспрессирующийся в БК ХМЛ, активен только в сперматогониях и сперматоцитах, выполняя функцию репрессора транскрипции.

Чем длительнее срок заболевания, тем больше генетических изменений накапливается в популяции лейкозных клеток. В известной работе J.P. Radich и соавт. результаты сравнения активности нескольких тысяч генов в различных фазах ХМЛ свидетельствовали, что состояние общего профиля экспрессии генов соответствует не трем клиническим фазам заболевания, а только двум. Изменения в уровне экспрессии генов наступают в начале ФА ХМЛ и предшествуют увеличению количества бластных клеток [22]. Наши результаты демонстрируют экспрессию множества РТГ в ФА и БК ХМЛ при низкой частоте активации РТГ в ХФ, что укладывается в контекст феномена, открытого J.P. Radich и соавт. Активация промоторов РТГ может происходить одновременно с другими молекулярными событиями, предшествующими переходу заболевания из ХФ в ФА.

Формированию того или иного фенотипа всегда предшествует экспрессия тех или иных генов. Мы рекомендуем проводить молекулярный мониторинг ХМЛ не только по признаку экспрессии гена *BCR-ABL*, но и исследовать профиль экспрессии РТГ *PRAME* и других генов. Выявление мРНК генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* в клетках крови или костного мозга больных в ХФ ХМЛ может свидетельствовать о скорой трансформации заболевания в ФА и БК. Эти маркеры можно использовать и для контроля результатов проведенной аллогенной трансплантации костного мозга, актуальность которой сохраняется и сегодня [23].

Хотя функции белков, кодируемых РТГ, изучены недостаточно, имеются данные об их участии в регуляции процессов созревания сперматогональной клетки. Последствия экспрессии РТГ при злокачественных опухолях в точности предсказать невозможно, однако мы полагаем, что их активация дополнительно дестабилизирует клеточный геном и способствует эволюции ХМЛ.

Опубликовано множество обзорных работ, в которых обозначена возможность применения некоторых РТГ в качестве мишеней для таргетной терапии онкогематологических заболеваний [19]. Однако еще не было проведено ни одного исследования профиля экспрессии РТГ в различных фазах ХМЛ. Мы показали, что из 8 самых обсуждаемых РТГ свойства только 1 гена — *PRAME* — дают возможность создать специфическую вакцину, направленную против кодируемого им белка,

которая может использоваться у многих больных в ФА и БК ХМЛ. Белок, кодируемый РТГ *PRAME*, обладает свойствами «хорошего» опухолевого антигена: он с высокой частотой экспрессируется при онкологических заболеваниях и неактивен в нормальных соматических клетках [24, 25].

Что же касается остальных РТГ, то случаи их активации крайне редки, что не позволяет отдавать приоритет их исследованию в рамках разработки методов специфической иммунотерапии ХМЛ. Наиболее высоким уровнем экспрессии отличается ген *NY-ESO-1*, но его активность наблюдалась всего у 1 из 85 исследованных больных. Задача создания специального иммунотерапевтического (таргетного) препарата, направленного против эпитопов белка *NY-ESO-1*, приобретет актуальность только при возможности производства дешевых индивидуальных лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы обнаружили, что в крови примерно 10 % первичных больных хМПЗ и ХФ ХМЛ экспрессируется ген *PRAME*. По сравнению с ХФ в крови больных в ФА и БК ХМЛ наблюдаются единичные случаи экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*, что говорит скорее о двустадийном течении заболевания на уровне генома. Наши данные свидетельствуют о том, что по крайней мере некоторые РТГ могут быть вовлечены в процесс эволюции ХМЛ. Активация экспрессии изученных в данной работе генов может служить ранним молекулярным предвестником прогрессирования ХФ ХМЛ в ФА и БК.

Мониторинг экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* у больных с ХФ ХМЛ может быть полезным для раннего выявления признаков скорой трансформации заболевания в ФА и БК.

Уровень экспрессии гена *PRAME* в стадии БК ХМЛ выше, чем в ХФ и ФА. По результатам исследования костного мозга в более поздних фазах ХМЛ активность гена *PRAME* регистрируется у большей части больных. Уровень экспрессии гена *PRAME* наиболее высок при БК ХМЛ. Наши результаты позволяют говорить о том, что максимальными перспективами в качестве объекта для изучения методов специфической (таргетной) иммунотерапии ХМЛ среди рассмотренных РТГ обладает ген *PRAME*.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6(4): 372–5.
2. Tefferi A., Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(5): 573–82.
3. Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973; 243(5405): 290–3.
4. Scott L.M., Tong W., Levine R.L. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(5): 459–68.

5. Gabler K., Behrmann I., Haan C. JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. *JAKSTAT* 2013; 2(3): 250–5.
6. Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(10): 3343–56.
7. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелолипролиферативных заболеваний. *Клин. онкогематол.* 2009; 2(3): 201–9. [Misyurin A.V. Molecular pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Klin. onkogematol.* 2009; 2(3): 201–9. (In Russ.)].
8. Tutaeva V., Misurin A.V., Rozenberg J.M. et al. Application of *prv-1* mRNA expression level and *Jak2v617f* mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. *Hematology* 2007; 12(6): 473–9.
9. Heaney M.L., Soriano G. Acute myeloid leukemia following a myeloproliferative neoplasm: clinical characteristics, genetic features and effects of therapy. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2013; 8(2): 116–22.
10. Turkina A.G., Zabolina T.N., Kusnetzov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Adv. Exper. Med. Biol.* 1999; 457: 477–88.
11. Kremenetskaya O.S., Logacheva N.P., Baryshnikov A.Y. et al. Distinct effects of various p53 mutants on differentiation and viability of human K562 leukemia cells. *Oncol. Res.* 1997; 9: 155–66.
12. Turkina A.G., Baryshnikov A.Y., Sedyakhina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen. *Br. J. Haematol.* 1996; 92: 88–96.
13. Stavrovskaya A.A., Sedyakhina N.P., Stromskaya T. et al. Prognostic value of P-glycoprotein and correlation with CD34 antigen. *Br. J. Haematol.* 1998; 28(5–6): 469–82.
14. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма. *Практ. онкол.* 2003; 4(3): 127–30. [Baryshnikov A.Yu. Interaction between tumor and immune system. *Prakt. onkol.* 2003; 4(3): 127–30. (In Russ.)].
15. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака. *Бюл. СО РАМН* 2004; 2: 59–63. [Baryshnikov A.Yu. Principles and practice of cancer vaccine-prophylaxis. *Byul. SO RAMN* 2004; 2: 59–63. (In Russ.)].
16. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н. Современные проблемы биотерапии опухолей. *Вестн. Моск. онкол. общ.* 2008; 1: 6–10. [Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V., Mikhaylova I.N., Petenko N.N. Current issues of biotherapy for tumors. *Vestn. Mosk. onkol. obshch.* 2008; 1: 6–10. (In Russ.)].
17. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2008; 18(5): 303–13.
18. Turkina A.G., Logacheva N.P., Stromskaya T.P. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML). 3rd International Symposium on Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Amsterdam, 1998. Drug resistance in leukemia and lymphoma III Book Series: advances in experimental medicine and biology. Ed. by G.J.L. Kaspers, R. Pieters, A.J.P. Veerman. 1999: 457, 477–88.
19. Lim S.H., Zhang Y., Zhang J. Cancer-testis antigens: the current status on antigen regulation and potential clinical use. *Am. J. Blood Res.* 2012; 2(1): 29–35.
20. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В., Варламова Е.В., Савченко В.Г. Экспрессия опухолеассоциированных генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* у больных множественной миеломой. *Онкогематол.* 2009; 2: 52–7. [Gaponova T.V., Mendeleyeva L.P., Misyurin A.V., Varlamova Ye.V., Savchenko V.G. Expression of *PRAME*, *WT1* and *XIAP* tumor-associated genes in patients with multiple myeloma. *Onkogematol.* 2009; 2: 52–7. (In Russ.)].
21. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена *PRAME* при множественной миеломе. *Тер. арх.* 2004; 7: 77–81. [Abramenko I.V., Belous N.I., Kryachok I.A., et al. Expression of *PRAME* gene in multiple myeloma. *Ter. arkh.* 2004; 7: 77–81. (In Russ.)].
22. Radich J.P., Dai H., Mao M. et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006; 103(8): 2794–9.
23. Демидова И.А., Савченко В.Г., Ольшанская Ю.В. и др. Аллогенная трансплантация костного мозга после режимов кондиционирования пониженной интенсивности в терапии больных гемобластозами. *Тер. арх.* 2003; 75(7): 15–21. [Demidova I.A., Savchenko V.G., Olshanskaya Yu.V., et al. Allogeneic bone marrow transplantation after reduced-intensity conditioning regimens in management of patients with hematological malignancies. *Ter. arkh.* 2003; 75(7): 15–21. (In Russ.)].
24. Anguille S., Van Tendeloo V.F., Berneman Z.N. Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2012; 26(10): 2186–96.
25. Lichtenegger F.S., Schnorfeil F.M., Hiddemann W., Subklewe M. Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Immunotherapy* 2013; 5(1): 63–78.

- В.А. Мисюрин** — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной химиотерапии
- А.В. Мисюрин** — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией рекомбинантных опухолевых антигенов
- Л.А. Кесаева** — научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов
- Ю.П. Финашутина** — научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов
- Е.Н. Мисюрина** — кандидат медицинских наук, врач-гематолог
- И.Н. Солдатова** — научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов
- А.А. Крутов** — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов
- Н.А. Лыжко** — научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов
- Т.В. Ахлынина** — научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов
- А.Е. Лукина** — врач гематолог научно-клинического отделения химиотерапии гематологических заболеваний и интенсивной терапии
- Т.И. Колошейнова** — кандидат медицинских наук, врач-гематолог научно-клинического отделения химиотерапии с дневным стационаром
- Н.В. Новицкая** — врач-гематолог гематологического отделения №7
- Е.Г. Аршанская** — врач-гематолог гематологического отделения №7
- Е.Г. Овсянникова** — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры внутренних болезней факультета усовершенствования врачей в АГМИ
- Р.А. Голубенко** — руководитель гематологического отделения
- В.А. Лапин** — руководитель
- Т.И. Поспелова** — доктор медицинских наук, профессор кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ, заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ
- В.А. Тумаков** — заведующий гематологическим отделением
- А.Ю. Барышников** — доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии, директор
- Адрес для переписки: В.А. Мисюрин, 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация, тел.: +7 (985) 4363019, e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

