

DETEKCE EXPRESNÍCH PROFILŮ U PACIENTŮ S CML POMOCÍ ATLAS PLASTIC 8K MICROARRAYS

GENE EXPRESSION PROFILING IN CML PATIENTS USING ATLAS PLASTIC 8K MICROARRAYS

BRUCHOVÁ H., KRÁČMAROVÁ A., KLAMOVÁ H., BRDIČKA R.

ODDĚLENÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY, ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Východisko: Expresní microarrays představují vhodnou technologii i pro studium patologických procesů na genomické úrovni. Pro identifikace odlišně exprimovaných genů u pacientů s CML jsme použili plastické microarrays, které kombinují hlavní přednosti nylonových membrán a skleněných microarrays.

Pacienti a Metody. Leukocyty byly izolovány z periferní krve 6 pacientů s chronickou myeloidní leukémií v době stanovení diagnózy. U všech pacientů byl detekován BCR/ABL fúzní gen. Pro detekci expresních profilů byly použity Atlas Human Plastic 8K Microarrays (Clontech) s 8 327 genovými sondami. mRNA byla izolována z 45 µg celkové RNA pomocí magnetických částic.

Výsledky. Většina genů u pacientů vykazovala stejnou expresi jako kontrolní vzorek. U některých genů bylo možné detekovat podobné změny v expresi u všech (či většiny) pacientů např. zvýšená exprese: lactotransferrin, proteoglycan 2, elastase 2, MMP 9, defensin alpha 1,3,4, peptidoglycan recognition protein, cathepsin G, myeloperoxidase, proteinase 3; snížená exprese: CD68 antigen, cathepsin B, H factor, integrin-alpha X, interleukin 8, preB cell colony enhancing factor. **Závěr.** Naše studie odhalila variabilitu v expresi mnoha genů, ale i přesto jsme identifikovali skupinu genů s podobnými změnami v aktivitě. Tyto geny by mohly být asociovány s rozvojem onemocnění a budou podrobněji studovány.

Klíčová slova: genová exprese, CML, plastické microarrays

Summary

Background: Expression microarrays provide a powerful technology for studying disease processes on a genomic scale. We used plastic microarrays for identification of differentially expressed genes in chronic myeloid leukemia patients. Plastic arrays combine the best properties of glass and nylon arrays. **Patients and Methods:** Leukocytes were isolated from peripheral blood of 6 CML patients at diagnosis. All patients were BCR/ABL fusion gene positive. For gene expression profiling we used Atlas Human Plastic 8K Microarrays (Clontech) with 8 327 gene probes. mRNA was isolated from 45 µg of total RNA using magnetic bead method. **Results:** Majority of the patient genes showed the same transcription activity as in the control sample. In a few genes it was possible to observe similar significant changes of gene expression in all (most) patients e.g. up-regulation: lactotransferrin, proteoglycan 2, elastase 2, MMP9, defensin alpha 1,3,4, peptidoglycan recognition protein, cathepsin G, myeloperoxidase, proteinase 3; down-regulation: CD68 antigen, cathepsin B, H factor, integrin-alpha X, interleukin 8, preB cell colony enhancing factor. **Conclusions:** Although the study revealed variability of gene expression in many genes, we identified a number of genes with the similar expression regulation. The genes may be associated with the disease process and will be analysed in detail.

Key words: gene expression, CML, plastic microarrays

Úvod

Čipové technologie představují velmi přínosnou metodiku pro studium komplexního pozadí různých onemocnění. Právě sledování transkripční aktivity genů v době rozvoje onemocnění či v průběhu léčby pomocí těchto metod může vést k odhalení kandidátních genů, které se podílejí na vzniku onemocnění a zároveň mohou představovat další potenciální diagnostické či terapeutické cíle. U leukemií byly cDNA microarrays již využity pro charakterizaci jejich molekulárního (genetického) pozadí (1,2), jejich klasifikaci (3,4,5,6,7,8), identifikaci molekulárních změn při progresi onemocnění (9) či pro studium působení léků používaných pro chemoterapii (10,11).

Také cílem této studie byla charakterizace expresních profilů u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v době stanovení diagnózy pomocí microarrays a identifikace genů s odlišnou expresí. Doposud jsme pro expresní analýzy v naší laboratoři využívali nylonové membrány, které však umožňují

detekovat relativně malý počet genů (600 až 1200), ale nevyžadují speciální vybavení laboratoře. Pro sledování exprese většího počtu genů jsme začali používat plastické microarrays. Firma Clontech vyvinula plastickou microarray Atlas Plastic 8K Microarray s 8327 sondami, u které se pokusila zkombinovat hlavní přednosti nylonových membrán a skleněných microarrays (12). Tyto plastické microarrays lze stejně jako nylonové membrány opakovaně použít minimálně 3krát (dle našich praktických zkušeností to je i maximální počet recyklací), což je činí finančně dostupné. Zároveň použitý materiál má přednosti „sklíček“ tzn. uniformní neporézní povrch, který umožňuje efektivní nanášení sond po stránce kvantitativní i kvalitativní. Neporézní povrch samozřejmě minimalizuje pozadí a zjednodušuje metodiku z hlediska prehybridizace a odmývání. Navíc pevné materiály jsou pohodlné na manipulaci a je zde i možnost automatizace.

Materiál a metody

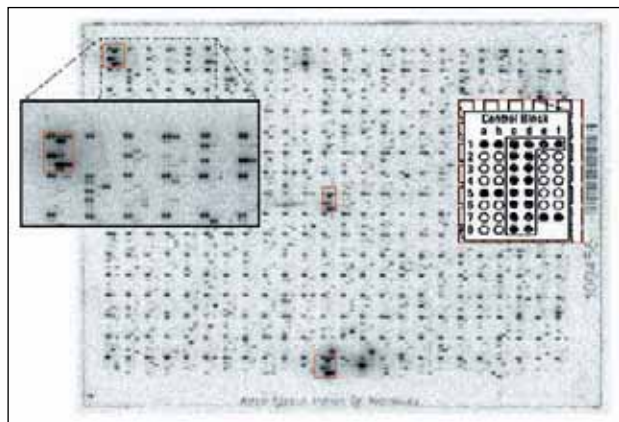
V rámci studie bylo vyšetřeno 6 pacientů s CML ve věku od 39 do 76 let (medián 49) (Tab. 1). Diagnóza byla stanovena podle standardních kritérií. Vzorky periferní krve byly odebrány v době stanovení diagnózy s informovaným souhlasem pacientů na základě schválení etickou komisí. Do souboru byli zařazeni pacienti v chronické fázi s relativně vysokým počtem leukocytů, přičemž u pacientů č. 3, 4 onemocnění již přešlo v akcelerovanou fázi. U všech pacientů byl detekován BCR/ABL fúzní gen.

Tabulka 1: Charakteristika testovaných pacientů

pacient č.	pohlaví	věk	diagnóza	BCR/ABL	leukocyty (109/l)
1	Ž	49	CML	b3 a2	350,7
2	Ž	49	CML	b3 a2	236,5
3	Ž	60	CML (akce. fáze)	b3 a2	189,0
4	Ž	76	CML (akce. fáze)	b3 a2	380,0
5	M	39	CML	b2 a2	590,0
6	Ž	49	CML	b2 a2	354,6

Celková RNA z leukocytů periferní krve byla izolována pomocí kyselého guanidinium thiokyanat/fenol:chloroformové metody (13) a následně byla inkubována s DNase I (0.2U/μg, Sigma) 30min při 37°C. Ze 45mg total-RNA byla izolována mRNA kitem Atlas Pure Total RNA Labeling System (Clontech), který je založený na magnetické separaci (12). Pro detekci expresních profilů byly využity Atlas Plastic Human 8K Microarrays (Clontech) s 8 327 genovými sondami o délce 80b (Obr. 1).

Obrázek 1.: Atlas Plastic Human 8K Microarray (Clontech) s 8 327 genovými sondami, které jsou v duplikátech uspořádány do 384 bloků. cDNA fragmenty o délce 80b jsou na plastickém nosiči imobilizovány UV zářením. Červeně jsou ohraničeny kontrolní bloky obsahující pozitivní a negativní kontroly (12). Na obrázku je expresní profil pacienta č. 1.



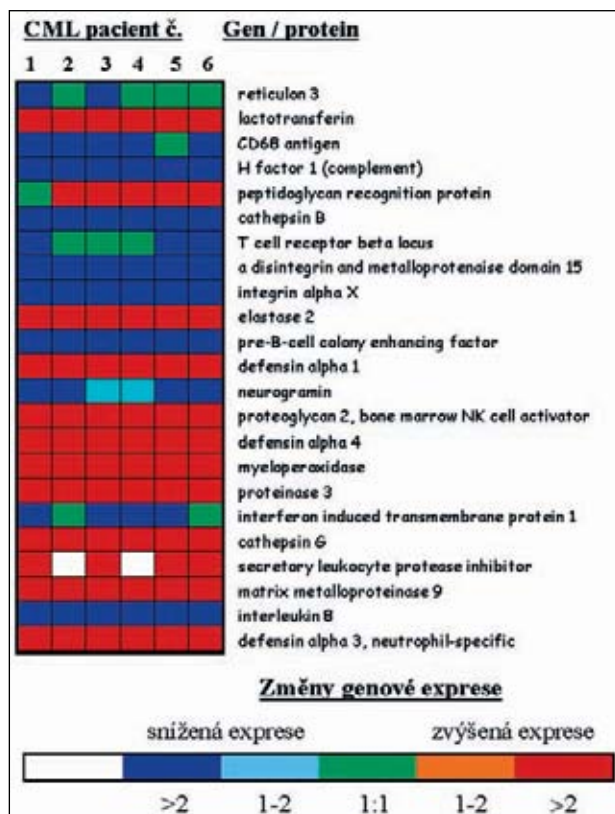
Pro přepis mRNA na cDNA neboli reverzní transkripci (RT) byl použit Atlas cDNA Expression Arrays kit (Clontech) dle instrukcí v manuálu (12), přičemž reakční směs obsahovala jako primery náhodné hexanukleotidy, MMLV reverzní transkriptasu a pro radioaktivní značení cDNA bylo použito $\alpha^{32}\text{P}$ [dATP] (50mCi/vzorek, Amersham Pharmacia Biotech). RT probíhala 30min při 42°C. Pro oddělení označené cDNA od neinkorporovaných nukleotidů byla použita silikagelová kolonová chromatografie (Atlas NucleoSpin Extraction Kit, Clontech). Vzorky byly hybridizovány přes noc při 60°C za stálého míchání (6 ot/min). Při posthybridizačním odmytí byly microarrays 2-krát opláchnuty (20s) roztokem 0.1x SSC, 0.1% SDS pokojové teploty a následně inkubovány v 50ml stejného roztoku 10min při 60°C. Po ukončení inkubace byly microarrays opláchnuty destilovanou vodou a důkladně usušeny. Radioaktivita byla detekována pomocí přístroje Phosphorimager FLA-2000 (Fuji) (doba expozice-24hod). Komparativní analýzy expresních profilů byly provedeny pomocí programu AtlasImage 2.7 (Clontech). Expresní profily u CML pacientů byly porovnány se standardním profilem

(profil směsného vzorku zdravých osob). Do výsledkové tabulky byly zahrnuty geny (na základě standardně nastavených podmínek v softwaru), jejichž exprese se lišila nejméně dvojnásobně a rozdíl v intenzitách představoval nejméně dvojnásobek průměrné hodnoty pozadí. Názvy genů/proteinů v tabulkách a v textu byly zachovány dle Clontech databáze.

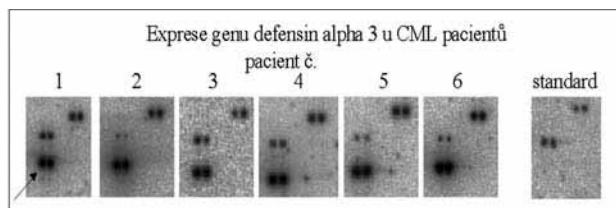
Změny genové exprese vykazující dvojnásobné Výsledky a diskuse

Na Atlas Plastic Human 8K Microarray je naneseno 8 327 genových sond, přičemž pozitivní signál (nad úroveň pozadí) byl detekován průměrně u 16% genů. Podíl genů vykazujících signifikantní změny exprese při srovnání s kontrolním vzorkem se pohyboval v rozmezí 10-20% (z exprimovaných genů) v závislosti na jednotlivých pacientech. Zbývající geny pacientů se v expresi nelišily od kontrolního vzorku. U některých genů bylo možné detekovat podobné změny v expresi u všech pacientů např. zvýšená exprese - *lactotransferrin* (LTF), *proteoglycan 2* (PRG2), *elastase 2* (ELA2), *metalloproteinase 9* (MMP9), *defensin alpha 1/3/4* (DEFA1, DEFA3, DEFA4), *peptidoglycan recognition protein* (PGLYRP), *cathepsin G* (CTSG), *myeloperoxidase* (MPO), *proteinase 3* (PRTN3), *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI); snížená exprese - *CD68 antigen* (CD68), *cathepsin B* (CTSB), *H factor* (CFH), *integrin-alpha X* (ITGAX), *interferon induced transmembrane protein* (IFITM), *interleukin 8* (IL8), *preB cell colony enhancing factor* (IL6), *neurogranin* (NRGN) (Obr. 2). Řada genů dále vykazovala signifikantní změny exprese pouze u některých pacientů jako např. *reticulon 3* (RTN3), *T cell receptor beta locus* (TCRB), *hemoglobin alpha 1* (HBA1), *hemoglobin alpha 2* (HBA2), *arrestin* (SAG), *polymerase RNA II polypeptide E* (POLR2E), *small inducible cytokine A5* (CCL5), *tumor protein* (HLA-A) atd.

Obrázek 2.: Signifikantní změny genové exprese (normalizovaná data) detekované u většiny CML pacientů v době diagnózy pomocí Atlas Plastic Human 8K Microarrays (Clontech). Změny exprese jsou vyjádřeny barevnou škálou, kdy červené barvy představují zvýšení a modré barvy snížení genové exprese u pacienta. Zelená barva vyjadřuje stejnou expresi genu jako u standardu (bílá barva – nedetekovatelná exprese/pod úroveň pozadí).



Obrázek 3.: Expresí genu defensin alpha 3 detekovaná plastikovými mikročipy u CML pacientů a standardu.



Výrazně silnou expresi u všech pacientů vykazovaly geny *defensin alpha 1,3 a 4* (DEFA1, DEFA3, DEFA4) (Obr.3). Defensiny kódují skupinu peptidů s protibakteriálními a cytotoxickými účinky, které zajišťují obranyschopnost hostitele a jsou produkovány především neutrofily. Vysoká expresí defensinů u myeloidních leukemických buněk byla již prokázána v několika studiích (14,15) a stejně jako *myeloperoxidase* (MPO) mohou defensiny sloužit jako marker myeloidní diferenciace (16). Právě také gen MPO byl u všech pacientů exprimován na zvýšené hladině. Protein MPO je syntetizován během diferenciace myeloidních buněk, a je proto využíván pro určování subtypů AML (17). V jádře se MPO může vázat na DNA a chránit ji před poškozením kyslíkovými radikály, které vznikají při maturaci myeloidních buněk. MPO byla nalezena v jádře a cytoplasmě normálních i myeloidních leukemických buněk (18). Další gen se zvýšenou transkripční aktivitou u všech pacientů byl *secretory leukocyte proteinase inhibitor* (*antileukoproteinase*, SLPI), jehož produkt chrání epitelové tkáně před proteasami jako je *cathepsin G* a *neutrophil elastase*. Geny kódující obě zmíněné proteasy vykazovaly u testovaných pacientů zvýšenou expresi. *Elastase 2* (ELA2) je proteasa produkována krevními neutrofily a podílí se na štěpení proteinů v pojivových tkáních (19). *Cathepsin G* (CTSG) je proteasa produkována také neutrofily, která se uplatňuje v imunitních procesech (20). Vyšší expresí námi detekovaných genů MPO, DEFA1, DEFA3, DEFA4 a CTSG byla zjištěna i u pacientů s akutní promyelocytární leukémií (15). Zvýšená expresní aktivita genů kódujících proteasy v neutrofilech u pacientů s CML poukazuje zřejmě na vyšší aktivitu těchto myeloidních buněk či na jejich zvýšené početní zastoupení. Právě expanze terminálně diferenciovovaných neutrofilů je charakteristická pro chronickou fázi CML (21). Dále u testovaných pacientů byl silněji exprimován gen *lactotransferrin* (LFT), jehož produkt zajišťuje transport železa v extracelulárních tekutinách a uplatňuje se i v imunitní obraně. U několika genů byla sledována snížená či žádná (resp. nedetekovatelná) expresí při porovnání se standardním profilem. Mezi takovéto geny s nízkou expresí u všech pacientů patřil gen *CD68 antigen* (CD68). CD68 je transmembránový glykoprotein neznámé funkce, který je vysoce exprimován v lidských monocitech a tkáňových makrofágách (22). Signi-

fikantní pokles expresí byl dále detekován u genu *H factor* (CFH), což je pozitivní regulační kofaktor komplementové kaskády (23). Nízkou transkripční aktivitu vykazovaly také geny kódující proteasy *cathepsin B* (CTSB) a *ADAM*. CTSB je lysosomální cystein-protease účastnící se maturace amyloidních prekurzorů (24). Protein *a disintegrin and metalloprotease domain 15* (ADAM) je členem ADAM proteasové rodiny podílející se na regulaci buňka-buňka a buňka-matrix interakcí. ADAM proteiny jsou také schopny interakce s integriny či *Scr* kinasami (25). Ačkoliv integriny u CML pacientů vykazovaly většinou vyšší expresi, v případě *integrin alpha X* (ITGAX) tomu tak nebylo. Gen *ITGAX* je součástí *integrin alpha*, což je adhezivní receptor na povrchu krevních buněk, který zprostředkovává adhezi k vaskulárnímu endotelu, migraci, chemotaxi atd. (26).

PreB-cell colony-enhancing factor (IL6) je cytokin zvyšující aktivitu MGF (stem cell factor) a interleukinu 7 (27). Expresí tohoto genu byla pod hranici detekovatelnosti. Dalším cytokinovým genem s velmi nízkou expresní aktivitou byl *interleukin 8* (IL8). IL8 je cytokin hrající důležitou roli především v chemotaxi a aktivaci neutrofilů (28).

Výrazné expresní změny byly pozorovány především u genů podílejících se na regulaci imunitních procesů, což naznačuje, že u pacientů byly zřejmě aktivovány obranné mechanismy.

Závěr

Leukemie se vyznačuje velkou variabilitou jak na klinické, tak i na molekulární úrovni. Proto variabilita v genové expresi u pacientů s CML zjištěná v této studii není nijak překvapující. Příčinou této variability mohou být inter-individuální rozdíly mezi pacienty ve věku, pohlaví, stádiu choroby atd. Ale i přes tuto variabilitu bylo možné vysledovat stejné změny expresí některých genů u všech či většiny pacientů v souboru, které mohou být asociovány s rozvojem onemocnění či „udržováním“ maligního klonu. Kromě genů, jejichž účast u leukemii je z hlediska funkce jasná, odhalilo naše testování i změny expresí genů, o jejichž významu u CML není zatím nic známo, a které tak představují cíle dalšího výzkumu.

Atlas Plastic Microarrays představují novou zajímavou platformu pro testování genové expresí, neboť co do objemu získaných výsledků jsou srovnatelné s dalšími typy microarrays, ale po finanční stránce představují mnohem levnější alternativu díky možnosti opakovaného použití. Microarray technologie díky své výkonnosti zcela jistě najdou své uplatnění v našich laboratořích nejen při řešení výzkumných projektů, ale i v rutinní diagnostice.

Poděkování

Autoři děkují Mgr. J. Polákovi (Oddělení molekulární genetiky, ÚHKT) za poskytnutí molekulárních dat týkajících se BCR/ABL fúzního genu. Studie byla podpořena VZ 000237601 MZ ČR.

Literatura a odkazy

1. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocation specifies a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002;30:41-7
2. Niimi T, Vetteranta K, Hollmen J, et al. Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia - a cDNA array study. *Leukemia* 2002, 16(11):2213-21
3. Cohen N, Rozenfeld-Granot G, Hardan I, et al. Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;128:114-9
4. Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3118-30

5. Cho JH, Lee D, Park JH, et al. Optimal approach for classification of acute leukemia subtypes based on gene expression data. *Biotechnol Prog* 2002, 18(4):847-54
6. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002, 1(2):133-43
7. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7
8. Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99(15):10008-13
9. Ohmine K, Ota J, Ueda M, et al. Characterization of stage progression on chronic myeloid leukemia by DNA microarrays with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 2001;20:8249-57

10. Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D, et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia to the tyrosine kinase inhibitor ST1571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet* 2002, 359 (9305):481-6
11. Bruchova H, Borovanova T, Klamova H, Brdicka R. Gene expression profiling in chronic myeloid leukemia patients treated with hydroxyurea. *Leukemia and Lymphoma* 2002, 43(6):1289-1295
12. www.clontech.com
13. Chomczynsky P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156-159
14. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 1992, 79(6):1538-44
15. Hirata RK, Chen ST, Weil SC. Expression of granule protein mRNAs in acute promyelocytic leukemia. *Hematol Pathol* 1993, 7(4):225-38
16. Tsuruta T, Tani K, Shimane M, et al. Effects of myeloid cell growth factors on alkaline phosphatase, myeloperoxidase, defensin and granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA expression in haemopoietic cells of normal individuals and myeloid disorders. *Br J Haematol* 1996, 92(1):9-22
17. Adam Z, Vorlíček J a kol. Hematologie II: Přehled maligních hematologických nemocí. Grada Publishing 2001, Praha
18. Murao S, Stevens FJ, Ito A, Huberman E. Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85(4):1232-6
19. Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K et al. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* 1988, 263(29):14 739-47
20. Hohn PA, Popescu NC, Hanson RD, et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin G gene. *J Biol Chem* 1989, 264(23):13412-9
21. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001, 293(5531):876-880
22. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993, 81(6):1607-13
23. Perkins SJ, Goodship TH. Molecular modelling of the C-terminal domains of factor H of human complement: a correlation between haemolytic uraemic syndrome and a predicted heparin binding site. *J Mol Biol* 2002, 316(2):217-24
24. Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Steiner DF. Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83 (20):7721-5
25. Poghosyan Z, Robbins SM, Houslay MD, Webster A, Murphy G, Edwards DR. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2002, 277(7):4999-5007
26. Shelley CS, Teodoridis JM, Park H, et al. During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J Immunol* 2002, 168(8):3887-93
27. Samal B, Sun Y, Stearns G, et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994, 14(2):1431-7
28. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, et al. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991, 253(5025):1278-80