

lek. Jacek Krzanowski

"Analiza ekspresji wybranych mikroRNA w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B (B-ALL) z obecnością mikrodelecji genów dla czynników transkrypcyjnych"

Streszczenie

Wstęp

Ostra białaczka limfoblastyczna jest chorobą nowotworową spowodowaną klonalnym rozrostem limfoblastów tj. komórek progenitorowych wywodzących się z linii limfocytów. Większość przypadków białaczek stanowi B-ALL powstała z szeregu limfocyta B. B-ALL jest chorobą o agresywnym przebiegu, jest to najczęstszy nowotwór oraz najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych chorobą nowotworową wieku dziecięcego. W B-ALL stwierdza się szereg powtarzalnych zmian genetycznych wpływających na przebieg i rokowanie choroby. Jednymi z nich są mikrodelecje genów dla czynników transkrypcyjnych, prowadzące do rozwoju ostrej białaczki limfoblastycznej. Przykładem mogą być mutacje *IKZF1*, genu czynnika transkrypcyjnego Ikaros swoistego dla hemopoezy. Mutacje genu *IKZF1* są niezależnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym ostrej białaczki limfoblastycznej. Patogeneza ostrych białaczek limfoblastycznych uwarunkowana jest również nieprawidłową epigenetyczną regulacją ekspresji genów. Jednym z głównych filarów epigenetyki są mikroRNA. MikroRNA to krótkie niekodujące cząsteczki RNA, które potranskrypcyjnie regulują ekspresję genów. Zaburzenia ekspresji mikroRNA są efektem i cechą niestabilności genomu prowadzącej do akceleracji transformacji nowotworowej.

Cele pracy

Celem pracy była ocena zależności pomiędzy ekspresją wyselekcjonowanych cząsteczek mikroRNA a obecnością mutacji genów czynników transkrypcyjnych oraz cechami przebiegu dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej. Ponadto oceniono ekspresję wyselekcjonowanych cząsteczek mikroRNA w liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej.

Wyniki

Analizie poddano 90 próbek szpiku kostnego dzieci <18 r.ż. pobranego w momencie diagnozy ostrej białaczki limfoblastycznej. Mediana wieku pacjentów w momencie diagnozy w grupie badanej wynosiła 8,36 lat (3.62-12.88). U większości dzieci (73,33%, 66 przypadków) rozpoznano B-ALL, pacjenci z T-ALL stanowili 26,67% (24 przypadki). Obecność mikrodelecji genów *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* oraz *EBF1* stwierdzono u 66 pacjentów (73,33%). Mikrodelecje genów *IKZF1* oraz *ETV6* występowały z większą częstością w B-ALL w porównaniu do T-ALL (odpowiednio 40.63% vs. 10.53%, $p=0.0147$ oraz 24.28% vs. 0%, $p=0.029$). Nie odnotowano innych znaczących różnic w profilu mikrodelecji pozostałych czynników transkrypcyjnych pomiędzy B-ALL a T-ALL.

Do analizy wyselekcjonowano 5 cząsteczek mikroRNA: miR-31, miR-24, miR-708, miR-542, miR-128, przy użyciu narzędzi bioinformatycznych, baz danych mikroRNA (*mirancer.ecu.edu*, *miRWalk data base*, *miRTarBase*, *microRNA.org*) oraz przeglądu danych literaturowych. Ekspresję wyselekcjonowanych mikroRNA zmierzono w 76 (84,44%) próbkach szpiku kostnego oraz w 5 liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej.

Porównanie ekspresji wyselekcjonowanych cząsteczek mikroRNA pomiędzy T-ALL a B-ALL wykazało, że przypadki B-ALL charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji miR-708 oraz niższym poziomem miR-542 w porównaniu z T-ALL (odpowiednio $p=0.0144$, $p=0.0380$). Wykazano negatywną zależność pomiędzy wiekiem w momencie diagnozy a ekspresją miR-542 wśród pacjentów z B-ALL ($p=0.043$). Ekspresja miR-31 oraz miR-708 negatywnie korelowała z poziomem MRD w dniu 15 schematu chemioterapii w przypadkach B-ALL (odpowiednio $p=0.017$, $p=0.016$). Innych zależności pomiędzy ekspresją wyselekcjonowanych mikroRNA a cechami przebiegu ALL nie stwierdzono. Odkryto, że u pacjentów z delecją genu *IKZF1* poziom ekspresji miR-128 jest znacząco niższy niż u pacjentów bez delecji ($p=0.0265$). Poziom ekspresji miR-128 był znacząco obniżony u pacjentów z delecją genu *PAX5* ($p=0.01208$). Ponadto przypadki z obecnością delecji genu *PAX5* cechowały się znacząco niższym poziomem ekspresji miR-31, miR-24 oraz miR-708 w porównaniu do przypadków bez delecji *PAX5* (odpowiednio $p=0.0376$, $p=0.0118$, $p=0.0318$). Kolejną stwierdzoną zależnością była znacząco wyższa ekspresja miR-708

u pacjentów z obecnością delekcji genu *ETV6* ($p=0.0341$). Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem ekspresji badanych mikroRNA a obecnością delekcji genu *EBF1*.

Ekspresję wyselekcjonowanych mikroRNA oznaczono w liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej SUP-B15, NALM-6, 697, Bv173 oraz Rs 4;11. Wykryto niższą ekspresję mir-128 w liniach komórkowych B-ALL z obecnością delekcji *IKZF1* oraz *PAX5*. Linia komórkowa powstała w momencie kryzy limfoblastycznej przewlekłej białaczki szpikowej wykazuje odmienny profil ekspresji badanych mikroRNA w porównaniu do linii B-ALL *BCR/ABL* dodatniej oraz badanych linii B-ALL.

Wnioski

Podsumowując, cztery z wyselekcjonowanych *in silico* mikroRNA: miR-128, miR-542, miR-708, miR-24, miR-31 wykazuje związek z immunofenotypem ALL oraz delekcjami genów czynników transkrypcyjnych. Na szczególną uwagę zasługują korelacja pomiędzy niekorzystną rokowniczo delecją *IKZF1* a obniżonym poziomem ekspresji miR-128 oraz negatywna korelacja pomiędzy ekspresją miR-31, miR-708 a wysokim poziomem minimalnej choroby resztkowej. Identyfikacja zaburzeń ekspresji mikroRNA może być przydatna w zrozumieniu patomechanizmów ALL. MikroRNA mogą być użyteczne jako markery molekularne w ocenie ryzyka jak i indywidualizacji terapii. Znaczenie miR-128, miR-542, miR-708, miR-24, miR-31 jako potencjalnych markerów delekcji czynników transkrypcyjnych *IKZF1*, *PAX5* oraz *ETV6* wymaga dalszych badań obejmujące większe kohorty pacjentów.

Abstract

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia is a malignant disease caused by clonal proliferation of lymphoblasts - early lymphoid precursors. Most cases of ALL are B-ALL, being transformed from B lymphocyte lineage cells. The B-ALL course of the disease is aggressive. It is the most common malignancy and the leading cause of cancer related death in children. It is characterized by repetitive genetic lesions, which influence the course of the disease and prognosis. One kind of genetic lesions

are transcriptional factors microdeletions, which leads to ALL development. An example may be *IKZF1* deletion. *IKZF1* encoded Ikaros, transcriptional factor that plays crucial functions in the hematopoietic system. *IKZF1* deletions have been associated with poor outcomes in B-ALL patients. Abnormal epigenetic regulation of these genes expression is also an important mechanism in ALL development. One of the most important mechanisms of epigenetic genes regulations is microRNA expression. MicroRNA are small noncoding RNA molecules. MicroRNA post-transcriptionally regulate genes expressions. MicroRNAs expression deregulation is an effect and feature of genomic instability, which leads to the acceleration of neoplastic transformation.

Aims of the study

The main objective of the study was the analysis between selected microRNAs expression level and transcriptional factors microdeletions status together with ALL clinical features. Secondly, the expression of selected microRNAs was assessed in B-ALL cell lines.

Results

Analysis was performed on 90 bone marrow samples collected from children < 18 years old at the time of ALL diagnosis. Median age was 8,36 years (3.62-12.88) of which 66 (73.33%) were diagnosed with B-ALL and 24 (26.67%) were diagnosed with T-ALL. Microdeletions of *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* and *EBF1* were determined in 66 (73,33%) patients. *IKZF1* deletions and *ETV6* deletions were more common in patients with B-ALL than in patients with T-ALL (40.63% vs. 10.53%, $p=0.0147$ and 24.28% vs. 0%, $p=0.029$). We found no other significant differences in the microdeletions profile between T-ALL and B-ALL. For analysis of the microRNA profiles, five microRNAs (miR-31, miR-24, miR-708, miR-542, miR-128) were selected using bioinformatics tools, databases (*mirancer.ecu.edu*, *miRWalk data base*, *miRTarBase*, *microRNA.org*), and literature review. The expression levels of all selected microRNAs were measurable in 76 (84.44%) of selected bone marrow samples and in 5 acute lymphoblastic leukemia cell lines. Comparison of the

expression levels of the selected miRNAs between T-ALL and B-ALL patients revealed that B-ALL patients were characterized by a significantly elevated level of miR-708 and reduced level of miR-542. Analyses revealed a negative correlation between age at diagnosis and miR-542, and between MRD at day 15 and miR-31 and miR-708 in B-ALL patients. We found that the expression level of miR-128 was lower in patients with *IKZF1* deletions than in patients without *IKZF1* deletions. Patients with *PAX5* deletions had significantly lower expression levels of miR-31, miR-24, miR-708, and miR-128 in comparison with patients without deletions of *PAX5*. Deletions of *ETV6* were associated with a high expression of miR-708. MicroRNA expression was assessed in acute lymphoblastic leukemia cell lines SUP-B15, NALM-6, 697, Bv173 and Rs 4;11. We noticed lower miR-128 expression level in B-ALL cell lines with *IKZF1* and *PAX5* mutations. Cell lines established at the moment of B lymphoblastic CML crisis have different miRNA expression profile than B-ALL *BCR/ABL1* positive cell lines.

Conclusions

In summary, five selected microRNAs: miR-128, miR-542, miR-708, miR-24, miR-31, are associated with the ALL immunophenotype and *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* microdeletions status. We would point out the correlation between poor outcome *IKZF1* deletions and lower miR-128 expression levels and the negative correlation between miR-31, miR-708 and MRD status. Identifying the microRNA expression status in ALL patients could be useful in understanding ALL pathomechanisms. MicroRNAs may be used as molecular markers to assess risk at the time of diagnosis and to tailor specific therapies to the individual patient. Additional studies with larger cohorts are needed to examine the potential use of these microRNAs (miR-128, miR-542, miR-708, miR-24, miR-31) as markers of genetic lesions.