

ORIGINAL

RT-PCR multiplex para la detección simultánea de las mutaciones FLT3-ITD/NPM-1/AML1-ETO asociadas a Leucemia Mieloide Aguda

RT-PCR multiplex allowing simultaneous detection of mutations FLT3-ITD/NPM-1/AML1-ETO associated with Acute Myeloid Leukemia

Jordi Martínez-Serra¹⁻⁴, José María Sánchez¹, Antonio Gutiérrez¹⁻⁴, Leyre Bento¹, M^a Antonia Durán¹, Antònia Sampol¹⁻⁴, Irene Aguilar², Daniel Morell², Carmen Santos³, Carmen Vidal³, Juan Carlos Amat¹, Joan Besalduch¹⁻⁴

1. Servicio Hematología, 2. Servicio Análisis Clínicos, 3. Unidad de Secuenciación,
4. Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa)
Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca.

Correspondencia

Jordi Martínez-Serra
Servicio de Hematología - Hospital Universitario Son Espases
Ctra. Valldemossa nº 79, 07010
Tel.: 971 175 000 (65188)
jorgej.martinez@ssib.es

Recibido: 27 – II – 2014**Aceptado:** 14 – III - 2014**doi:** 10.3306/MEDICINABALEAR.29.02.17**Resumen**

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) representa un grupo de neoplasias muy heterogéneo. Las aberraciones citogenéticas detectadas en el momento del diagnóstico son el marcador pronóstico más comúnmente utilizado. Sin embargo, el 20% de los casos de LMA presentan un cariotipo normal. Dentro de este grupo de pacientes la presencia de mutaciones del tipo *FLT3-ITD* se considera de mal pronóstico. Sin embargo, la presencia de la mutación *NPM1* o *AML1-ETO* se asocia a un mejor pronóstico.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es el desarrollo de una técnica de diagnóstico molecular hematológico, que permita la detección simultánea de mutaciones para estos tres genes. Hemos desarrollado un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar y visualizar simultáneamente estos 3 marcadores tanto desde ARN (un paso) como desde ADNc (dos pasos). De las 28 muestras analizadas, 6 (21,42 %) muestras fueron positivas para *FLT3-ITD*, 7 para *NPM-1* (25%) y otras 4 (14,28) para *AML1-ETO*. Al comparar ambos métodos (ADNc vs ARN) con métodos convencionales los resultados de las 28 muestras estudiadas fue equivalente en el 100% de los casos, demostrando la robustez de los mismos.

Abstract

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous group of neoplasms. The cytogenetic aberrations detected at the time of diagnosis are most commonly used as prognostic marker. However, 20% of AML patients exhibit a normal karyotype. Within this group of patients the presence of *FLT3-ITD* mutations type is considered of poor prognosis. However, the presence of *AML1-ETO* or *NPM-1* or mutation is associated with a better prognosis.

In this context, the aim of this work is to develop a technique of molecular diagnostic in hematology, allowing the simultaneous detection of mutations for these three genes. We have developed a method based on PCR that simultaneously amplifies and visualizes these three molecular markers both from RNA (one- step) and from cDNA (step two). Of the 28 samples tested, 6 (21.42%) samples were positive for *FLT3-ITD*, 7 for *NPM-1* (25%) and 4 (14,28) for *AML1-ETO*. When comparing the two methods (cDNA vs RNA) by conventional techniques the obtained results from the 28 samples tested was equivalent in 100% of cases, demonstrating the robustness of this development.

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) comprende un grupo heterogéneo de neoplasias hematopoyéticas malignas caracterizado por la proliferación de precursores mieloides con una capacidad de diferenciación celular reducida. A nivel molecular, la caracterización de alteraciones genéticas en pacientes diagnosticados de LMA con cariotipo normal permite identificar distintos subgrupos pronósticos¹. Estas alteraciones se pueden englobar en: aquellas que se producen en proteínas que interfieren con factores de transcripción relacionados con la regulación de la diferenciación hematopoyética normal (AML1-ETO and NPM1) y aquellas relacionadas con las cascadas de transducción de señal asociadas con la supervivencia celular o vías de muerte celular programada o apoptosis (FLT3). La tirosin-quinasa 3 Fms-like es una proteína codificada por el gen FLT3. Se ha demostrado la presencia de aberraciones genómicas de este gen en el 25-30% de los adultos con LMA. Las mutaciones en el gen de la tirosin-quinasa Fms-like suelen consistir en duplicaciones en tándem (ITD) del dominio citoplasmático en la región próxima a la membrana (JM), induciendo la activación constitutiva del receptor tirosin-quinasa FLT3. La duplicación FLT3-ITD es por sí misma un marcador pronóstico²⁻⁵. Muchos estudios han observado que los pacientes con LMA con mutaciones FLT3-ITD tienen tasas de supervivencia libre de enfermedad peores debido a recaídas. Aproximadamente el 25% de las LMA en adultos presentan duplicaciones en tándem en el dominio cercano a la membrana (JM) del gen FLT3. Esto causa cambios estructurales en la JM, alterando la conformación autoinhibitoria del receptor, promoviendo la activación del receptor y sus dianas moleculares. Por otra parte, el gen NPM1 codifica la proteína nucleofosmina (NPM1), con varias funciones celulares como la formación de proteínas, transporte de ribosomas, replicación del ADN y progresión del ciclo celular^{6, 7}. En el núcleo la NPM1 se une a otra proteína conocida como ARF, un supresor tumoral, manteniéndola en la localización adecuada y protegiéndola de la inactivación. Las mutaciones en el gen NPM-1 ocurren generalmente en el exón 12; existen descritas 40 variantes moleculares de esta mutación, siendo la más común la duplicación TCTG. Una de las características distintivas de las mutaciones NPM1 es su localización aberrante en el citoplasma de las células leucémicas, interfiriendo con las funciones onco supresoras del ARF y esto se cree que lleva a la producción anormal de blastos⁸. La fusión de los genes RUNX1-RUNX1T1 t(8;21)(q22;q22) se observa en el 7% de adultos con reciente diagnóstico de LMA (llegando a más del 40% en el caso de pacientes con LMA-M2). Esta translocación se yuxtapone el gen RUNX1 (AML1) en el cromosoma 21 con el gen RUNX1T1 (ETO) en el cromosoma 8. Este producto desregula múltiples vías de transducción, promoviendo la auto renovación de

células mieloides inmaduras e interfiriendo con la adecuada diferenciación hematopoyética^{9, 10}. La presencia de la proteína de fusión t(8;21) AML1-ETO tiene un pronóstico favorable en adultos pero es un marcador de pronóstico incierto en población pediátrica. Finalmente cabe destacar que AML1-ETO se ha utilizado con éxito como marcador de enfermedad mínima residual en pacientes con AML portadores de la translocación¹¹, por lo tanto además del factor pronóstico es de alta utilidad en el seguimiento posterior de la enfermedad por técnicas de PCR cuantitativa.

Material y métodos

Pacientes, recogida muestras, aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Se analizó el ARNm de 28 pacientes (2006-2013) diagnosticados de LMA en nuestro centro. El protocolo fue aprobado por el comité de Investigación de Hospital Son Espases. La edad mediana de los pacientes fue de 61 años (29-78 años) y el ratio hombre/mujer del 50%. La sangre periférica o Medula Ósea se recogió en tubos que contenían EDTA. La extracción de ARNm se realizó con el RNeasy® mini kit (QIAGEN, Valencia, California), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez aislado, el ARNm se disolvió en 50 µl de agua destilada y se cuantificó con un espectrofotómetro Ultrosec 4300 pro (Amersham Bioscience). Con el objetivo de estandarizar las muestras, la concentración del ARNm se ajustó a 50 ng/µl. La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit DNAC Transcriptor First Strand (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Diseño de Cebadores

Los cebadores utilizados en la reacción PCR Multiplex se obtuvieron de los manuscritos publicados por Noguera et al. (Leukemia 2005) y Gabert et al (Leukemia 2003), sintetizados por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania). Los cebadores se marcaron en su extremo 5' con diferentes fluorocromos 6-FAM (FLT-3), HEX (NPM-1) y TAMRA (AML1-ETO) (**Tabla I**).

Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desde ADNc. Polimerasa de Roche

Las muestras (salvajes y mutantes para los diferentes genes estudiados) fueron previamente anonimizadas. Una vez sintetizado ADNc se procedió a realizar, en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus, la PCR múltiplex con el kit de amplificación Lightcycler® FastStart DNA Master Hybprobe (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). 2 µl del ADNc se amplificaron en un volumen total de 20 µl (**Figura 1**). La mezcla de amplificación contenía 11,8 µl de Agua destilada, 1,2 µl de Cl₂Mg (25mM), 0,5 µl de cada uno de los cebado-

res (4 μ M) (ver **tabla II**) y 2 μ l de la Polimerasa (10X) de Roche. Las condiciones de la PCR vienen descritas en la **Tabla II**.

Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desde ARN. Polimerasa de Boline

Paralelamente se realizó una PCR directamente desde el ARNm con el Kit SensiFAST Probe No-ROX One-Step de Boline. Se hizo una mezcla para PCR de 20 μ l que contenía 4 μ l de ARN, 10 μ l de SensiFAST Probe No-ROX One-Step Mix (2X), 0,4 μ l de RiboSafe RNase Inhibitor, 0,2 μ l de reverse Transcriptase, 2,4 μ l de H₂O y 0,5 μ l de cada cebador (4 μ M). Las condiciones de la PCR vienen descritas en la **Tabla II**.

Detección de la mutación por electroforesis capilar

Una vez realizada la PCR múltiplex los productos de PCR se visualizaron inicialmente en un gel de agarosa (2%) y posteriormente fueron analizados mediante electroforesis capilar. Los productos de PCR obtenidos fueron desnaturalizados a 95°C durante 3 minutos, realizándose posteriormente la electroforesis en el secuenciador ABI PRISM 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystems®, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA). Se aplicó la matriz F (5-FAM, JOE, NED, ROX). Los datos obtenidos fueron analizados con el software GeneMapper v4.1

Sensibilidad de la técnica

Con el objetivo de conocer la sensibilidad de la técnica, se realizaron diluciones seriadas de muestras (50 ng/ μ l) mutadas para FLT3, NPM-1 y AML1-ETO, con muestras (50 ng/ μ l) que no presentaban la mutación (100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 5%). La electroforesis capilar fue capaz de detectar las formas mutantes por encima del 5%.

Resultados

Two-Step RT-PCR vs One-Step RT-PCR

Se comparó el protocolo con retro transcripción previa (Polimerasa Roche)(dos reacciones) con el protocolo que engloba la retro transcripción del ARNm y la amplificación del ADNc en una sola reacción (Polimerasa Boline) (**Tabla II**). De las 28 muestras analizadas, 6 (21,42 %) muestras fueron positivas para FLT3-ITD, 7 para NPM-1 (25%) y otras 4 (14,28) para AML1-ETO. En 3 de las muestras positivas para FLT3-ITD, también se encontró el NPM-1 mutado (10,71%). No encontramos ninguna muestra con reordenamiento AML1-ETO que a su vez presentase las mutaciones FLT3-ITD o NPM-1. Al comparar ambos métodos (ADNc vs ARN) los resultados de las 28 muestras estudiadas fue equivalente en el 100% de los casos, demostrando la solidez de los mismos.

Tabla I: Secuencia de los cebadores utilizados en la Técnica Triplex.

Nombre	Cebador Forward (Fluorocromo)	Cebador Reverse
FLT3 (Noguera et al, Leukemia 2005)	5'- 6FAM-GATCCTAGTACCTTCCCAAATC-3'	5'-GGTGTGCGAGCAGTACTCTAAACAGGT-3'
(Noguera et al, Leukemia 2005)	5'-HEX-ACCATTTCATGTCTGAGCACC-3'	5'-ATCAATTATGTGAAGAATTGCTTAC-3'
AM1-ETO (Gabert et al, Leukemia 2003)	5'-TAMRA-CACCTACCACAGAGCCATCAA-3'	5'-ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT-3'

Tabla II: PCR mix para el protocolo de amplificación a partir de ADNc/ARN.

PCR (ADNc)	Volumen (μ l)	PCR (ARN)	Volumen (μ l)
H ₂ O	11,8	H ₂ O	2,4
Cl ₂ Mg (25 mM)	1,2	RiboSafe RNase Inhibitor	0,4
Reaction Mix (10X)	2	SensiFAST Probe No-ROX One-Step Mix (2X)	10
Cebador FW FLT3 (4 μ M)	0,5	Reverse Transcriptase	0,2
Cebador RV FLT3 (4 μ M)	0,5	Cebador FW FLT3 (4 μ M)	0,5
Cebador FW NPM-1 (4 μ M)	0,5	Cebador RV FLT3 (4 μ M)	0,5
Cebador RV NPM-1 (4 μ M)	0,5	Cebador FW NPM-1 (4 μ M)	0,5
Cebador AML-1 (4 μ M)	0,5	Cebador RV NPM-1 (4 μ M)	0,5
Cebador ETO (4 μ M)	0,5	Cebador AML-1 (4 μ M)	0,5
ADNc	2	Cebador ETO (4 μ M)	0,5
		ARN (50ng/ml)	4

Validación de Resultados

Todas las muestras fueron previamente evaluadas para FLT-3, NPM-1 usando un método ya publicado¹². Asimismo la translocación AML1-ETO se validó por PCR cuantitativa siguiendo el protocolo descrito por Gabert et al.¹³. Paralelamente se secuenciaron varias de las muestras por con el objetivo de comparar nuestros resultados con un método convencional de referencia. La coincidencia entre los resultados obtenidos por secuenciación o PCR a tiempo Real y los dos métodos descritos en este manuscrito fue del 100%

Discusión

LMA es un grupo de neoplasias heterogéneo. Las aberraciones citogenéticas detectadas en el momento del diagnóstico son el marcador pronóstico más comúnmente utilizado. Sin embargo, el 20% de los casos de LMA presentan un cariotipo normal. Dentro de este grupo de pacientes la presencia de mutaciones del tipo FLT3-ITD se considera de mal pronóstico. Sin embargo, la presencia de la mutación NPM1 o AML1-ETO se asocia a un mejor pronóstico. En este contexto, el objetivo de este trabajo es el desarrollo de una técnica de diagnóstico molecular hematológico, que permita la detección simultánea de mutaciones para estos tres genes. La técnica se basa en una PCR multiplex que permite detectar las tres mutaciones desde ARN o ADNc. Hasta la fecha ya se había descrito la posibilidad de realizar la detección simultánea de FLT-3 y NPM-1 desde ADNc¹². Este método también se basa la visualización de bandas

por electroforesis capilar. Desde nuestro laboratorio hemos ampliado el espectro de mutaciones que se pueden analizar añadiendo la detección de la translocación AML1-ETO y además hemos configurado el método para que la PCR se pueda realizar, con idéntica fiabilidad, directamente desde ARNm. Esta adaptación técnica permite ahorrar unas dos horas en el protocolo estándar que obliga a realizar una retro transcripción previa del ARN a ADNc. Con este propósito se ha utilizado el kit SensiFAST Probe No-ROX One-Step comercializado por Biorline, como alternativa a la polimerasa de Roche, Lightcycler® FastStart DNA Master Hybprobe, que a su vez detecta las tres mutaciones desde ADNc. De esta manera evitamos el previo paso de retro transcripción disminuyendo considerablemente el tiempo y coste requerido para la realización de la prueba. Además al minimizar los pasos a realizar se reduce significativamente la probabilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas entre las muestras. Por otra parte, el hecho de combinar el AML1-ETO con FLT-3 y NPM1 en un protocolo diagnóstico permitirá la realización de estudios prospectivos donde se podrá estudiar/analizar el significado clínico de la combinación de estos genes en pacientes con AML. En la bibliografía no existen datos sólidos que presenten de manera inequívoca cuál es el valor pronóstico de la translocación AML-1-ETO cuando se encuentra en combinación con FLT3-ITD, NPM-1 o ambos. Finalmente, debido al creciente auge de las pruebas de diagnóstico molecular dirigidas a la estratificación del tratamiento en pacientes con LMA se plantea la posibilidad de añadir nuevos genes utilizando la estrategia descrita en el presente manuscrito.

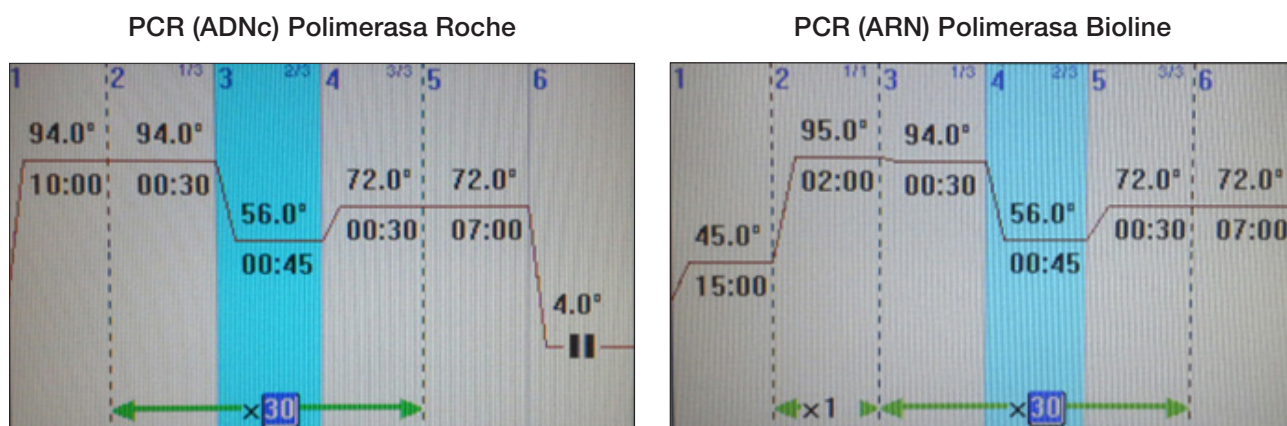
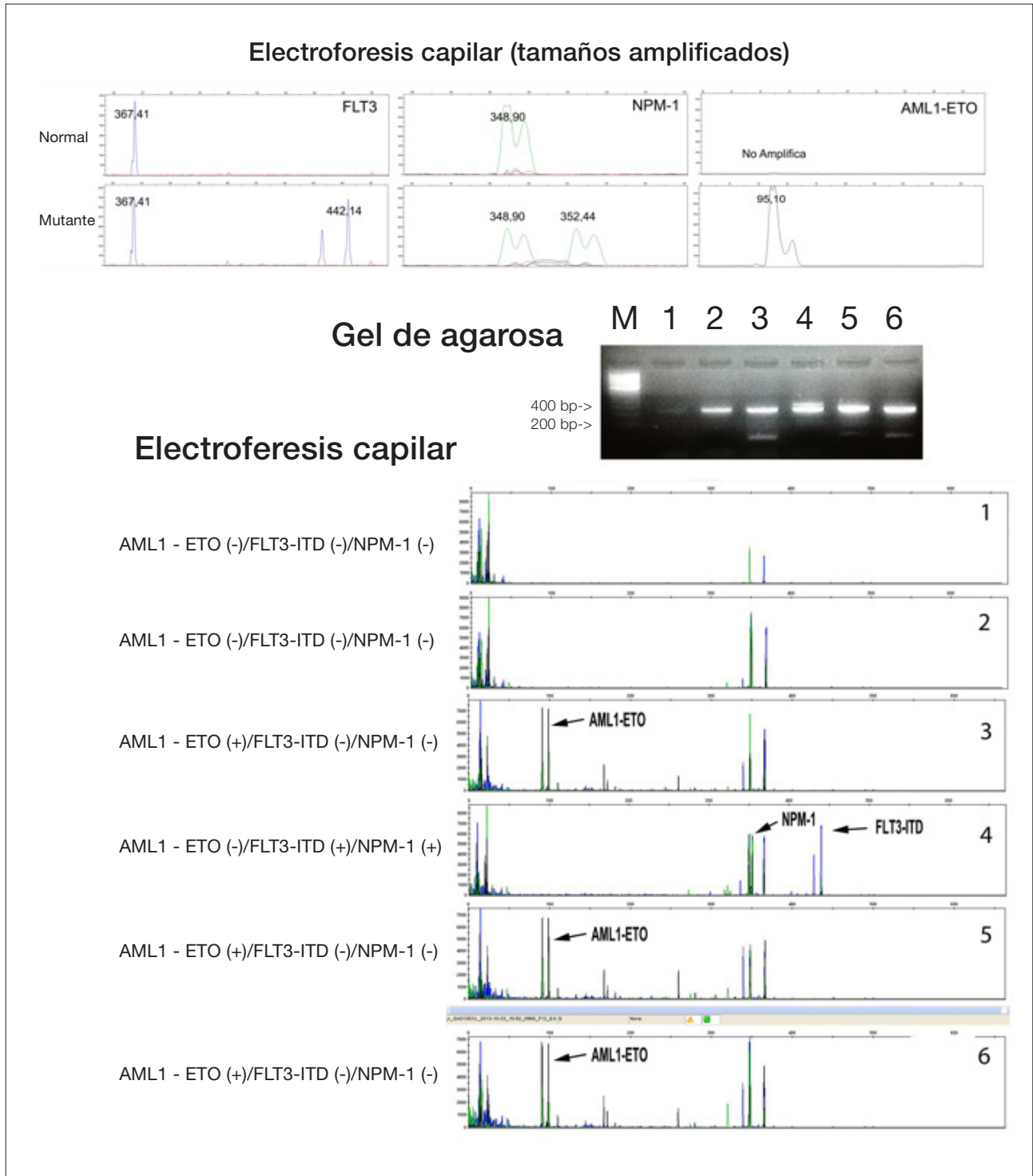


Figura 1: Condiciones del termociclador para la amplificación simultánea de FLT3, NPM-1 y AML1- ETO.

Figura 2: Electroforesis Capilar y gel de agarosa. Tamaños de cada uno de los genes (mutante y salvaje)



Bibliografía

1. Nimer SD. Is it important to decipher the heterogeneity of "normal karyotype AML"? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008 Mar;21(1):43-52.
2. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999 May 1;93(9):3074-80.
3. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1752-9.
4. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003 Jun;44(6):905-13.
5. Frohling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4372-80.
6. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006 May 15;107(10):4011-20.
7. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):254-66.
8. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2854-61.
9. Cho EK, Bang SM, Ahn JY, Yoo SM, Park PW, Seo YH, et al. Prognostic value of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia. *Korean J Intern Med*. 2003 Mar;18(1):13-20.
10. Fu L, Huang W, Jing Y, Jiang M, Zhao Y, Shi J, et al. AML1-ETO triggers epigenetic activation of early growth response gene 1, inducing apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Febs J*. Dec 6.
11. Zhang L, Li Q, Li W, Liu B, Wang Y, Lin D, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Int J Hematol*. Jun;97(6):786-92.
12. Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, Lavorgna S, Divona M, Buccisano F, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1479-82.
13. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, 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 Dec;17(12):2318-57.