

Snelle en eenvoudige screening op mutaties in het NPM1 gen bij AML diagnose

W.H.A. de JONG, A. SIMPELAAR, A.M. MANSHOLT en A.B. MULDER

WHO classificatie van acute myeloïde leukemie (AML) omvat morfologie, immunofenotypering en cytogenetica. De diagnose AML wordt gesteld als meer dan 20% blasten aanwezig zijn in het beenmerg. Progressie van AML is snel en hangt net als prognose en behandeling af van de genetische predispositie van patiënten. Sommige AML subtypen worden ingedeeld op basis van de aanwezigheid van chromosomale afwijkingen, zoals bij translocaties t (8;21) en t (15;17) of een inversie inv (16). Ongeveer 50% van de novo AML patiënten presenteert zich echter met een normaal karyotype (1;2). Deze AML typen kunnen meestal worden geclassificeerd door middel van polymerase ketting reactie (PCR) en sequentie analyse technieken waarmee (punt)mutaties, inserties en deleties worden aangetoond. De meeste voorkomende (incidentie 35%) en specifieke mutatie in volwassen de novo AML is gelegen in het gen voor nucleophosmine-1 (NPM1) (1;3). De aanwezigheid van een mutatie in dit fosfoproteïne bij AML is geassocieerd met een relatief gunstige prognose (4). Het NPM1 gen is gelegen op chromosoom 5 (5q35) en bestaat uit 12 exonen (2). Het eiwit bevindt zich in de nucleolus en is als zodanig betrokken bij verschillende cellulaire processen. NPM1 is vooral belangrijk in de biogenese van ribosomen en fungeert als chaperonne in ribosomaal eiwit transport van kern naar cytoplasma. De directe betrokkenheid in ribosoom uitrijping impliceert een belangrijke rol in eiwitsynthese, celgroei en proliferatie. NPM1 is ook essentieel voor genoom stabiliteit, DNA reparatie, centrosoom duplicatie en regulatie van de tumor suppressor p53 (2). Alle mutaties die beschreven zijn voor het NPM1 gen (>40) resulteren in een netto insertie van vier baseparen (bp) in exon 12. Meest voorkomend zijn mutatie A (TCTG insertie op positie 959) en mutatie B (CATG insertie op positie 959), in respectievelijk 75% and 15% van alle gevallen (2). De inserties veranderen de C-terminus van het NPM1-eiwit. Dit resulteert in de lokalisatie van NPM1 in het cytoplasma in plaats van in de nucleolus met als gevolg dat het transport van ribosomale eiwitten is verstoord (5). De aanwezigheid van een NPM1 mutatie kan worden aangetoond door immunohistochemie (6), vloeistofchromatografie (HPLC) (7), capillaire elektroforese (CE) (8) of gebruik van moleculaire technieken zoals PCR, sequentie analyse (9) of fragmentanalyse (10). De keuze voor de techniek hangt af van ervaring, beschikbare ap-

paratuur en kosten. Fragmentanalyse houdt in dat de lengte van specifieke DNA fragmenten wordt bepaald. Omdat alle bekende NPM1 mutaties resulteren in een 4 bp insertie, wordt de aanwezigheid van een mutatie aangetoond wanneer PCR fragmenten aanwezig zijn die 4 bp langer zijn (196 bp) dan het reguliere NPM1 fragment van 192 bp. Momenteel worden veelal sequentie analyse technieken of real time PCR gebruikt om NPM1 mutaties aan te tonen. Doel van deze studie was om een snelle en eenvoudige fragmentanalyse-methode te ontwikkelen om te kunnen screenen op de aanwezigheid van een NPM1 mutatie bij de diagnose van AML patiënten.

Materiaal en Methoden

Patiëntenmonsters

Gearchiveerde cDNA monsters van 101 bekende AML patiënten, gediagnosticeerd volgens WHO-criteria, werden geanalyseerd. cDNA is gesynthetiseerd uit RNA afkomstig van leukocyten. Monsters zijn verzameld tussen 2005 en 2009 en bewaard bij -80 °C. Eerder diagnostisch onderzoek toonde in deze monsters de afwezigheid van chromosomale translocaties t (15;17), t (8;21) en t (16;16) en inv(16) aan waarmee een normaal karyotype is geïmpliceerd. Alle monsters zijn gemeten in duplo.

Controle monsters

Sensitiviteit van fragmentanalyse voor het aantonen van NPM1-mutaties is bepaald door een NPM1 mutatie positieve cellijn (OC-AML3) te verdunnen. Een HL-60 cellijn is gebruikt als wildtype controle, terwijl DEPC-behandeld water werd gebruikt als negatieve controle.

PCR

Een 192 bp fragment uit exon 12 van het NPM1 gen werd geamplificeerd door PCR met primers 5'-CTTCCGGATGACTGACCAAGAG-3' (forward) en 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACG-3' (reverse, Invitrogen) welke geschikt zijn voor alle bekende NPM1 mutaties. De forward primer is gelabeld met het fluorochroom 6-FAM. Het 25 µl PCR reactie mengsel bestond uit 2 mM cDNA, 0,4 mM forward and reverse primer (20 mM/µl), 2,5 mM MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,4 mM desoxyribonucleosidetriphosphates (GE Healthcare), 1,25 U Taq polymerase (Invitrogen) and 2,5 µl 10x PCR buffer zonder MgCl₂ (Invitrogen). PCR condities waren: 5 min 94 °C, 30 cycli van 1 min 94 °C, 1 min 58 °C en 1 min 72 °C, gevolgd door 7 min 72 °C.

Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen

E-mail: a.b.mulder@lc.umcg.nl

Fragmentanalyse

Het reactiemengsel bestond uit 1 µl verdund PCR product, 11,75 µl Hi-Di™ Formamide en 0,25 µl GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems), in totaal 13 µL. Monsters werden gedenuatureerd bij 94 °C gedurende 2 min en bij 4 °C bewaard tot tenminste 5 min voor analyse. Fragmentanalyse werd uitgevoerd op een ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Resultaten werden geanalyseerd met GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

Sequentie analyse

Sequentie analyse is uitgevoerd om de met fragmentanalyse aangetoonde mutaties te bevestigen. PCR producten afkomstig van positieve patiënten (196 bp fragment) zijn gezuiverd door 3 µl Exo-SAP (USB) toe te voegen aan 7 µl product en het geheel 30 minuten te incuberen bij 37 °C, 15 minuten bij 80 °C en tenslotte tot aan analyse bij 4 °C te bewaren. Na opzuivering is 60 µl buffer met 1,2 g/l trometomol en 37,2 mg/l Na₂EDTA (zelf gemaakt) toegevoegd aan elk monster. Sequentie analyse is uitgevoerd op een ABI 3130 Genetic Analyser met de NPM1-reverse primer (Invitrogen) en een ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Het reactiemengsel bestond uit 1,0 µl 5x Sequencing Buffer, 5,2 µl ultrapuur water, 2,0 µl BigDye Terminator c1.1 RR, 0,8 µl NPM1-reverse primer en 1 µl gezuiverd PCR product. Sequentie condities bestonden uit: 1 min 96 °C, 25 cycli van 0,30 min bij 96 °C, 0,15 min bij 58 °C, 2 min bij 60 °C, met tenslotte incubatie bij 4 °C tot aan analyse. Monsters werden verdund met 2 µl NaOAc (1.5 M)/EDTA (250 mM) buffer en gecentrifugeerd gedurende 1 min bij 4000 rpm. Na toevoeging van 25 µl absolute ethanol werd het monster gecentrifugeerd bij 4000 rpm gedurende 30 min waarna de ethanol werd afgeschonken. Deze stap werd herhaald met 50 µl 80% ethanol en centrifugatie gedurende 5

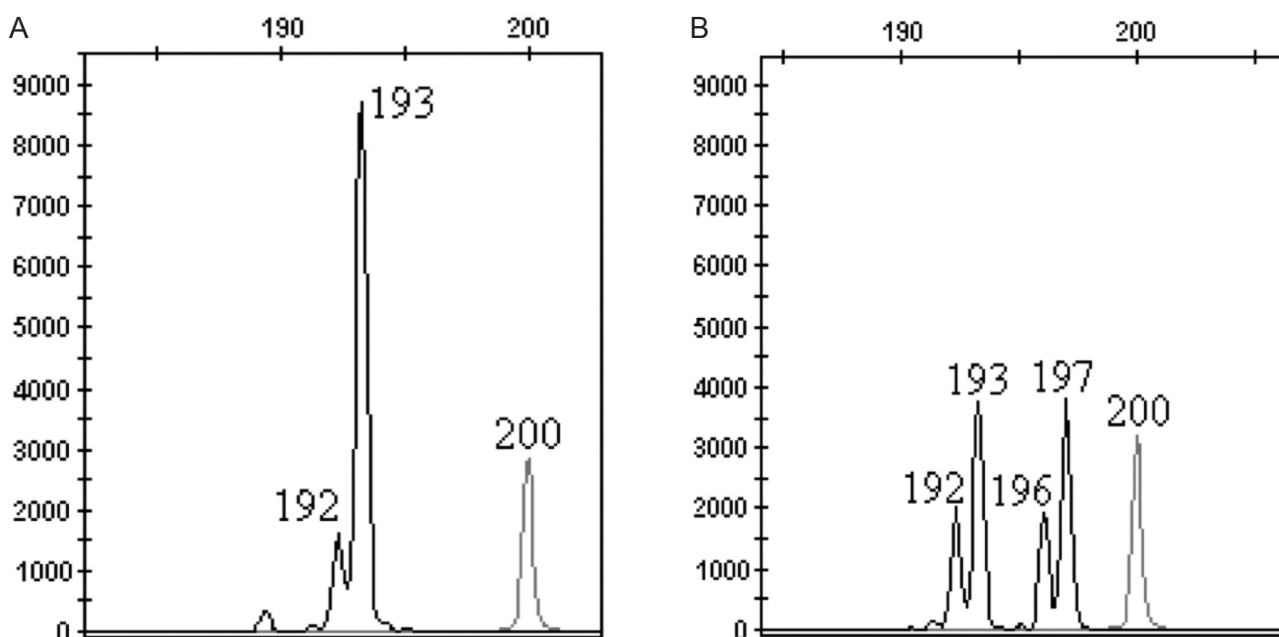
minuten. Uiteindelijk werd het monster geïncubeerd met 15 µl formamide (94 °C gedurende 2 min) en bewaard bij 4 °C voor tenminste 5 min tot aan analyses. Electroforese werd uitgevoerd op een ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Resultaten werden geanalyseerd met BioEdit (Isis Pharmaceuticals). Sequentie resultaten werden vergeleken met de wildtype NPM1 sequentie resultaten.

Resultaten

Een NPM1 mutatie is in 26 van de 101 AML patiënten aangetoond met fragmentanalyse. Deze mutaties werden bevestigd met sequentie analyse, waarbij 8 verschillende (netto) inserties van 4 bp werden aangetoond (tabel 1). Van de 8 gevonden mutaties waren twee niet eerder beschreven. Noemenswaardig is het plus-A artefact (193 en/of 197 bp) dat werd gezien in alle monsters. Dit wordt veroorzaakt door additie van een extra base, de nucleotide adenosine (A), aan het 3'-uiteinde van het DNA fragment door het gebruik van Taq polymerase. De sensitiviteit van fragmentanalyse voor NPM1 mutatie detectie bleek 10%.

Discussie

Deze studie toont aan dat fragmentanalyse een snelle en eenvoudige techniek is voor het aantonen van een NPM1 mutatie in AML patiënten. Wanneer een mutatie aanwezig is, zijn zowel het wildtype DNA als gemuteerd DNA aanwezig. Dit kan worden aangetoond door een bepaald fragment te selecteren, te amplificeren en de lengte te meten. De behaalde sensitiviteit van deze methode was 10%, wat voldoet aan de criteria van Molecular Diagnostics for Hematological Malignancies (MODHEM) voor het opsporen van een heterozygote mutatie. Fragmentanalyse is, vergeleken met sequentie analyse, een snelle en eenvoudige methode bij AML diagnose. Alle verschillende NPM1 mutaties worden opgespoord door middel van dezelfde primers,



Figuur 1. Fragmentanalyse resultaten. A: Wildtype NPM1 fragment (192 bp) met plus-A-artefact (193 bp). B: Mutant NPM1 fragment (196 bp) met plus-A-artefact (197 bp). Het 200 bp fragment is afkomstig van de 500 LIZ® size standard.

Tabel 1. NPM1 mutaties gevonden in 101 AML patiënten met normaal karyotype

Type mutatie	Sequentie	Frequentie
Wildtype	caagatctctg.....gcagt.....ggaggaagtctctttaag	76
Mutatie A	caagatctctg..tctg...gcagt.....ggaggaagtctctttaag	14
Mutatie B	caagatctctg..catg..gcagt.....ggaggaagtctctttaag	4
Mutatie 4	caagatctctg..cttg...gcagt.....ggaggaagtctctttaag	2
Mutatie I	caagatctctg..caga..gcagt.....ggaggaagtctctttaag	1
Mutatie DD-5	caagatctctg..tcag...gcagt.....ggaggaagtctctttaag	1
Mutatie Om	caagatctctg..ttg...gcagt.....ggaggaagtctctttaag	1
Nieuw 1	caagatctctg.....gcagt..ccctccaaa.. aagtctctttaag	1
Nieuw 2	caagatctctg.....gcagt..ccctagctagg...gtctctttaag	1
Totaal		101

terwijl interpretatie van resultaten minder tijdrovend is. Een nadeel is dat de exacte mutatie wordt gemist. Echter, voor de diagnose en de prognose van AML is deze informatie niet noodzakelijk. Sequentie analyse van onze monsters leverde twee niet eerder beschreven mutaties op (tabel 1), en enkele bekende mutaties (2; 11). Mutatie A (56%) en B (16%) zijn de meest voorkomende mutaties, gevolgd door mutatie 4 (8%), mutatie Om, I and DD-5 (allen 4%). De eerste nieuwe mutatie is een 9 bp insertie en een 5 bp deletie, de tweede een 11 bp insertie en een 7 bp deletie, beide resulterend in een 4 bp insertie vergeleken met wildtype. De deleties zijn eerder beschreven, echter niet in combinatie met deze inserties (2).

Conclusie

Fragmentanalyse is een snelle en eenvoudige methode om bij AML diagnose te screenen op de aanwezigheid van een prognostisch gunstige NPM1 mutatie. Bovendien lijkt fragmentanalyse een veelbelovende techniek als vervanger van sequentie analyse of conventionele PCR bij de detectie van andere DNA mutaties door inserties of deleties.

Referenties

1. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005; 352: 254-266.
2. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood.* 2007; 109: 874-885.

3. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood.* 2005; 106: 3618-3620.
4. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1909-1918.
5. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 1989; 56: 379-390.
6. Falini B, Martelli MP, Bolli N, Bonasso R, Ghia E, Pallotta MT, Diverio D, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006; 108: 1999-2005.
7. Ammatuna E, Noguera NI, Zangrilli D, Curzi P, Panetta P, Bencivenga P, Amadori S, et al. Rapid detection of nucleophosmin (NPM1) mutations in acute myeloid leukemia by denaturing HPLC. *Clin Chem.* 2005; 51: 2165-2167.
8. Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, Lavorgna S, Divona M, Buccisano F, Amadori S, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2005; 19: 1479-1482.
9. Gorello, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, Roti G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006; 20: 1103-1108.
10. Yan L, Chen S, Liang J, Feng Y, Cen J, He J, Chang W, et al. Analysis of NPM1 gene mutations in Chinese adults with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2007; 86: 143-146.
11. van den Bergh FAJTM, Bingöl Ö, Slomp J, De Groot MR, Heijs-Oude Groeneger A. Analyse en toepasbaarheid van de nucleofosmine mutaties bij acute myeloide leukemie. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2009; 34: 150-156.