

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.41-036.11-079.3:577.21

© Коллектив авторов

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА КАЛЬЦИТОНИНА ЧЕЛОВЕКА КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ОСТРОЙ ЛИМФОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ

Д.В. МАРИНИЧ¹, А.Л. УСС¹, Л.А. СМЕРНОВА², И.А. ВОРОБЬЁВ¹, ДЖ.
ХОЛМС³, Г.Е. СУЛИМОВА⁴, Т.В. ШЕВЧУК⁵, Я.И. БУРЬЯНОВ⁵

¹Республиканский центр трансплантации костного мозга, г. Минск,
Республика Беларусь

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

³Отделение трансплантации костного мозга, Госпиталь Королевы Елизаветы,
г. Бирмингем, Великобритания

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 117809 ГСП-1, Москва В-333,
ул. Губкина 3, тел.: 135-50-52, Факс: 132-89-62, эл. почта: sge@vigg.ru

⁵Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино Московской области, тел.: 925-23-42;
Факс: (8-27)79-05-27; эл. почта: buryanov@fibkh.serpukhov.su

Проведен HpaII/MspI блот-гибридизационный анализ метилирования 5'-концевой области гена кальцитонина (КТ) в клетках костного мозга и периферической крови больных острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ). Последние сопровождаются гиперметилованием внутреннего цитозина в последовательностях CCGG в этой области гена КТ. Уровень гиперметилования гена КТ соответствовал степени злокачественности течения заболевания. При достижении длительной клинико-гематологической ремиссии гиперметилование гена КТ не обнаруживается. Если ремиссия не достигалась или была неполной, гиперметилование гена КТ сохранялось. При рецидиве ОЛЛ гиперметилование гена КТ появлялось вновь и регистрировалось за 1- 8 месяцев до клинико-лабораторных признаков рецидива. Большой размер аномальных HpaII-фрагментов 5'-концевой области гена КТ прямо коррелировал с агрессивностью течения ОЛЛ.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, гиперметилование ДНК, ген кальцитонина, рецидив, диагностика.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы наблюдается прогресс в терапии острых лейкозов (ОЛ). В частности, в лечении острых лимфобластных лейкозий (ОЛЛ) используются многочисленные протоколы оптимальных подходов к лечению этого заболевания [1-3]. Тем не менее, существуют значительные трудности в определении статуса заболевания в период консолидационной терапии и в процессе поддерживающего лечения [4]. В связи с этим остро стоит проблема оценки состояния лейкоемического процесса в данный момент времени, определяемого наличием в костном мозге остаточных лейкоемических клеток и степенью их активности после достижения ремиссии. Даже после успешно проведенной химиотерапии в костном мозге больного длительное время сохраняется некоторое количество лейкоемических клеток, определяющих статус минимальной остаточной болезни (МОБ) [5]. В настоящее время существует несколько подходов к мониторингу МОБ при острых лейкозах. Методы, позволяющие дифференцировать лейкоемические клетки от нормальных гемопоэтических предшественников, подразделяются на морфологические, цитохимические, генетические и метод иммунофенотипирования [6]. В прогнозировании рецидива острой лейкемии эти методы могут давать противоречивые результаты. В прогнозировании и диагностике раковых заболеваний особое значение приобретают различные молекулярные биологические маркеры, сопровождающие канцерогенез, в том числе и ДНК-зонды. В основе канцерогенеза лежат точечные или крупномасштабные изменения генома, влияющие на регуляцию клеточного роста и клеточную дифференцировку [7,8]. Анализ специфических перестроек ДНК применяется для слежения за МОБ при гемобластозах [9].

В то же время установлено, что возникновение и прогрессию раковых заболеваний детерминируют не только классические генетические изменения, но и эпигенетические механизмы, связанные с метилированием ДНК [10]. Поиск и использование специфических ДНК-зондов в качестве молекулярных маркеров статуса метилирования ДНК для точной диагностики формы острого лейкоза и состояния лейкоемического процесса является актуальной проблемой клинической лейкологии. В этой связи представляет интерес феномен метилирования 5'-концевой области гена кальцитонина (КТ) человека при некоторых видах неоплазий, включая лейкемии [11-13]. Опубликованных данных по характеру метилирования гена КТ при ОЛЛ очень мало и они довольно противоречивы [14,15]. Остается неясным вопрос о существовании связи между типом острой лейкемии и специфическим характером метилирования гена КТ.

Целью настоящей работы было исследование картины метилирования гена КТ при острых лимфобластных лейкозах в различных стадиях заболевания.

МЕТОДИКА. Исследовали образцы ДНК (всего 21), полученных из общего пула ядродержащих клеток периферической крови или костного мозга десяти больных острым лимфобластным лейкозом. В качестве контроля использовали ДНК периферической крови 12 здоровых доноров и ДНК костного мозга здорового донора. Во всех случаях диагноз и стадия заболевания были подтверждены морфологическими и цитохимическими методами, а также в большинстве случаев методом иммунофенотипирования. Геномную ДНК выделяли из цельной крови или костного мозга путем лизиса клеток додецилсульфатом натрия. Лизат инкубировали в течение ночи в растворе протеиназы К («Sigma», США) и очищали экстракцией фенолом и хлороформом с последующей преципитацией этанолом. Блот-гибридизационный анализ ДНК по

Саузерну проводили по модифицированному методу [16]. В качестве специфического зонда использовали 5'-фрагмент гена КТ человека длиной 1700 пар нуклеотидов, любезно предоставленный доктором S. Baylin, США (Johns Hopkins University Oncology Center, Baltimore). Зонд в виде EcoRI-HindIII фрагмента был клонирован в плазмиде pUC18. Этот фрагмент выделяли методом электрофореза и очищали экстракцией с помощью фенола и хлороформа. ДНК (8-12 мкг) гидролизуют чувствительной к метилированию внутреннего цитозина в последовательности CCGG рестрикционной эндонуклеазой HpaII (12 ед/мкг ДНК; "New England BioLabs," США) и нечувствительной к этому типу метилирования рестрикционной эндонуклеазой MspI (20 ед/мкг ДНК; "New England BioLabs"). Время инкубации ДНК с обоими ферментами 16-18 ч. Затем ДНК подвергают электрофорезу в 0,8% агарозе и переносят на мембрану Hybond+ методом щелочного блоттинга согласно рекомендациям фирмы-производителя ("Amersham", Англия). С помощью метода случайной множественной затравки (NEBlot Kit, "New England BioLabs") зонд метили [α - 32 P]dATP до специфической активности 1×10^9 импульсов в минуту на 1 мкг ДНК. Прегибридизацию, гибридизацию и отмывку мембраны проводят по рекомендации производителя мембраны ("Amersham"). Фильтры экспонировали для получения радиоавтографов или изучали на анализаторе радиоактивности (Phosphorimager, "Molecular Dynamics", США). Образцы анализировали дважды. В качестве маркеров величин фрагментов ДНК использованы продукты гидролиза ДНК фага лямбда рестрикционной эндонуклеазой Hind III. С целью проверки полноты специфического расщепления ДНК ферментом HpaII некоторые образцы гибридизовали с зондом гена *c-myc*. С этой же целью некоторые образцы ДНК гидролизуют с более высокими концентрациями рестриктазы HpaII (25 ед/мкг ДНК); при этом гибридизационная картина не изменялась.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. MspI/HpaII-рестрикционная карта 5'-концевой области гена КТ человека показана на рис. 1. Гидролиз этой области гена рестрикционной эндонуклеазой MspI приводит к появлению нескольких рестрикционных фрагментов, три из которых с размерами 0,5, 0,6 и 1,0 тысяч пар нуклеотидов (тпн) выявляются при гибридизации с используемым зондом гена КТ (рис. 1, рис. 2, дорожка 2). Из-за нечувствительности рестрикционной эндонуклеазы MspI к метилированию внутреннего цитозина в последовательности CCGG MspI-картина блот-гибридизации гена КТ у здоровых и больных людей остаётся одинаковой. Гидролиз рестриктазой HpaII, не способной расщеплять CCGG-сайт с метилированным внутренним цитозином, приводит к появлению дополнительного фрагмента размером 2 тпн из-за частичного метилирования цитозина в специфической последовательности CCGG M₅ в 5'-концевой области гена КТ, что является нормой для здоровых тканей [12, 17] (рис. 1, рис. 2, дорожка 1). В данном исследовании одинаковая картина гибридизации с используемым зондом гена КТ наблюдалась у всех 12 контрольных образцов ДНК периферической крови и ДНК костного мозга здоровых доноров (рис. 2). Лейкемический процесс сопровождается гиперметилированием гена КТ, что можно наблюдать по появлению дополнительных аномальных рестрикционных фрагментов увеличенной длины при блот-гибридизационном анализе гена КТ с помощью фермента HpaII [11, 14]. Так, картина рестрикции гена КТ рестриктазой HpaII при ОЛЛ в фазе первой атаки и при рецидиве, характеризуется появлением специфических аномальных

фрагментов размером 1,2; 2,2; 2,6 и 3,1 тпн (рис.3). При этом интенсивность проявления "нормальных" HpaII-фрагментов может уменьшаться. (Ввиду малой информативности рестрикционной картины гена КТ в области HpaII-фрагментов ниже 1 тпн эта область на рис.3 не приводится.) Специфический внутренний контроль с помощью рестриктазы MspI выполнен со всеми препаратами ДНК, но на рис. 3 приведен лишь однажды (дорожка 6). Гиперметилирование гена КТ обнаружено также у всех первичных больных ОЛЛ как в крови, так и в костном мозге.

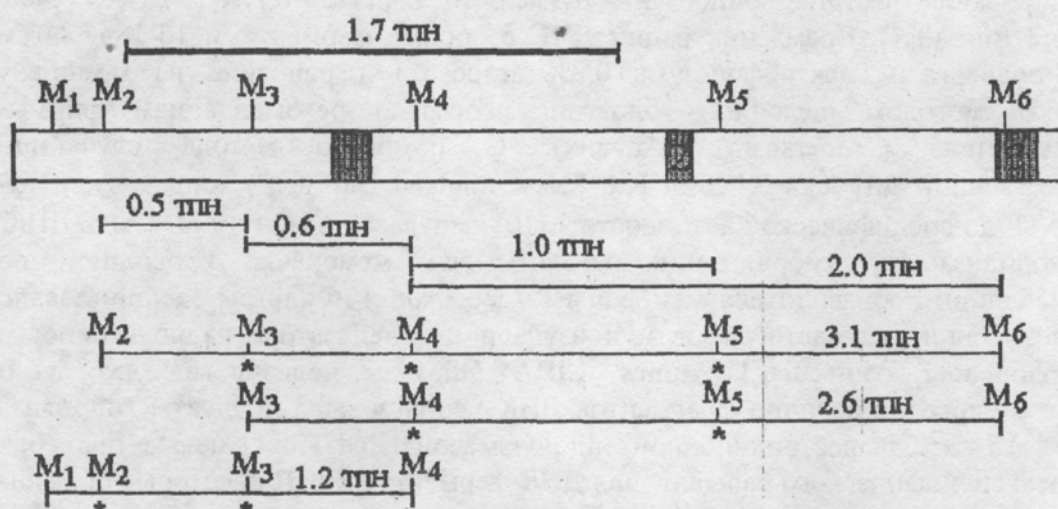


Рисунок 1.

Рестрикционная карта и возможные варианты гидролиза 5'-области гена кальцитонина человека рестриктазами HpaII и MspI. Независимо от метилирования этой области гена рестриктаза MspI всегда выщепляет фрагменты с размерами 0,5, 0,6 и 1,0 тпн (фрагменты без обозначения точек метилирования М). Эти же фрагменты выщепляются рестриктазой HpaII при полном отсутствии метилирования этой области. Фрагменты с размерами 1,2, 2,0, 2,6 и 3,1 тпн (с указанием точек метилирования М) выщепляются только рестриктазой HpaII в условиях разной степени метилирования точек М₂-М₅. Заштрихованные области 1-3 - экзоны. Вверху указаны координаты использованного для анализа зонда.

Так, у пациента 1 при анализе ДНК костного мозга (табл. 1, рис. 3, дорожка 1) обнаружены дополнительные HpaII-фрагменты размером 1,2 тпн, 2,6 тпн и 3,1 тпн после химиотерапевтического курса индукции 2-й ремиссии. Присутствие этих аномальных фрагментов, указывающих на гиперметилирование 5'-области гена КТ, может свидетельствовать о персистировании злокачественного клона, хотя морфологические показатели костного мозга в этот период остаются в пределах нормы (табл. 1). У этого больного аномальные HpaII-фрагменты (за исключением слабо выявляемого фрагмента размером 1,2 тпн) исчезали через 3 недели после проведения очередного курса интенсивной химиотерапии (рис. 3, дор. 2), однако через 4 недели эти фрагменты появились вновь (рис. 3, дор. 3) и уже сохранялись вплоть до клинической констатации рецидива (бластоз в костном мозге свыше 30%) через 6 месяцев (табл.1, рис. 3, дорожки 4 и 5). Таким образом, картина "патологического" гиперметилирования гена КТ появилась на 5 месяцев раньше лабораторных признаков рецидива. В периферической крови пациента 1, несмотря на небольшой процент бластных клеток, также регистрируется гиперметилирование 5'-области гена КТ с

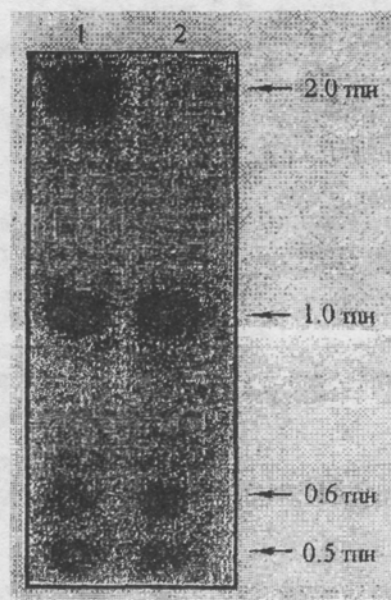


Рисунок 2.

Картина гидролиза 5'-области гена кальцитонина человека из клеток костного мозга и периферической крови рестриктазами HpaII и MspI в норме.
1 - гидролиз рестриктазой HpaII. 2 - гидролиз рестриктазой MspI.

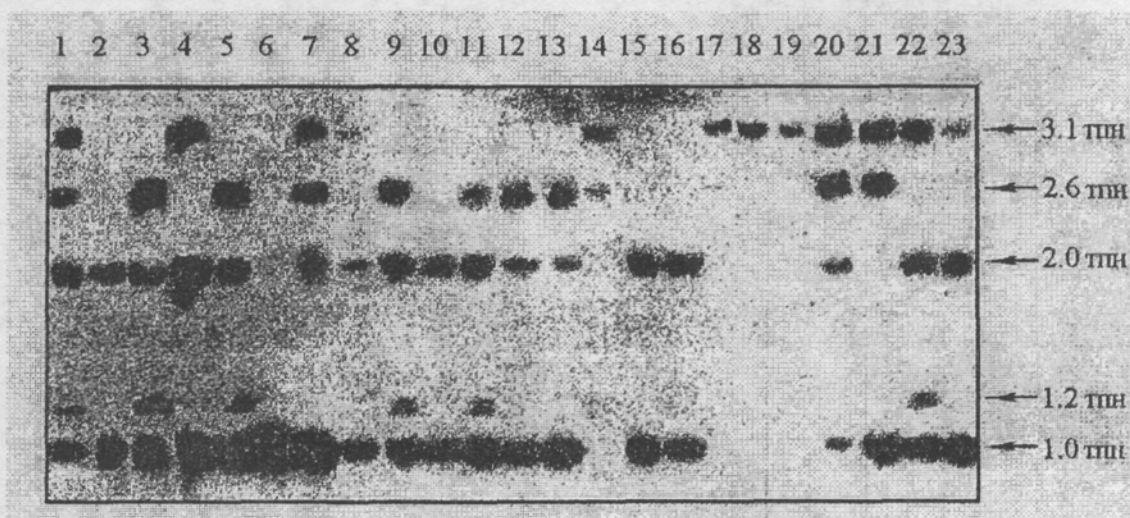


Рисунок 3.

Анализ состояния метилирования последовательностей CCGG 5'-области гена кальцитонина человека из клеток костного мозга и периферической крови при остром лимфобластном лейкозе (пациент I). Везде гидролиз рестриктазой HpaII (кроме дорожки 6, где гидролиз проведен ферментом MspI). Пояснения приведены в таблице 1.

появлением фрагментов размером 1,2 и 2,6 тпн (рис. 3, дорожка 5). Сходная картина обнаружена и у пациента 10, где при относительно низком проценте бластных клеток (3%) в ДНК периферической крови чётко выявляется фрагмент размером 3,1 тпн (рис.3, дорожка 23). У этого пациента было отмечено крайне агрессивное течение болезни с резистентностью к химиотерапии. Гиперметилирование гена КТ в костном мозге этого больного при высоком уровне бластных клеток (56%) характеризуется двумя аномальными HpaII-

фрагментами размером 3,1 тпн и 1,2 тпн (рис. 3, дорожка 22, табл. 1). По-видимому, несмотря на низкое содержание бластных клеток в периферической крови этого больного, четко выявляемый аномальный НраП-фрагмент размером 3,1 тпн может свидетельствовать о наличии значительного по степени активности злокачественного клона клеток.

Таблица 1. Клиническая характеристика больных острым лимфобластным лейкозом и особенности гидролиза гена кальцитонина рестрикционной эндонуклеазой Нра П.

Код пациента	Источник ДНК	Лейкоцитоз (10 ⁹ /л) / %бластов	Дата взятия образца	Номер дорожки на рис.3	Размер аномальных фрагментов, тпн			Статус пациента на момент обследования
					1,2	2,6	3,1	
1	КМ ¹	-/2,75	26.10.95	1	+ ²	+	+	2-я полная ремиссия
1	КМ	-/3,25	20.11.95	2	-	-	-	Тот же пациент после курса интенсивной консолидации ремиссии
1	КМ	-/2,75	28.12.95	3	+	+	-	2-я полная ремиссия
1	КМ	-/83,0	1.07.96	4	-	-	+	2-й рецидив
1	ПК ³	8,6/3,0	2.07.96	5	+	+	-	2-й рецидив
2	КМ	-/85,0	22.12.95	6	-	-	-	Гидролиз MspI
2	КМ	-/85,0	22.12.95	7	-	+	+	1-я атака
2	КМ	-/2,0	10.01.96	8	-	-	+ ²	Полная ремиссия
3	КМ	-/7,5	13.11.95	9	+	+	-	3 месяца полной ремиссии
3	КМ	-/4,75	10.01.96	10	-	-	-	После курса консолидационной химиотерапии ⁵
3	КМ	-/5,5	6.05.96	11	+	+	-	10 месяцев полной ремиссии
4	КМ	-/5,75	28.08.95	12	-	+	-	2 года полной ремиссии
4	КМ	-/86,0	16.01.96	13	-	+	-	Рецидив
5	КМ	-/2,75	11.09.95	14	-	+ ²	+	1-я ремиссия. Рецидив через 60 дней
-	КМ	-/2,75	1.06.94	15	-	-	-	Донорский костный мозг
6	КМ	-/4,0	19.07.95	16	-	-	-	Больной ОЛЛ спустя 9 месяцев после ТКМ ⁴
7	ПК	4,6/-	28.02.96	17	-	-	+	2-я ремиссия
7	КМ	-/4,75	28.02.96	18	-	-	+	2-я ремиссия
7	КМ	-/91,0	1.04.96	19	-	-	+	2-й рецидив
8	ПК	12,2/27,0	21.06.96	20	-	+	+	Первичный
9	ПК	43,0/77,0	9.06.95	21	-	+	+	Первичный
10	КМ	-/56,0	18.05.96	22	+	-	+	Первичный, резистентность к химиотерапии
10	ПК	6,5/3,0	18.05.96	23	-	-	+	То же, периферическая кровь

Примечания: ¹Костный мозг; ²Слабая выраженность фрагмента; ³Периферическая кровь; ⁴Трансплантация костного мозга. ⁵Консолидационная - т.е. закрепляющая химиотерапия

У пациента 3 наблюдается гиперметилирование 5'-области гена КТ спустя 3 месяца после начала лечения (рис. 3, дорожка 9; табл. 1). Это наблюдение согласуется с лабораторными данными, где наблюдается небольшое повышение количества бластных клеток (7,5% при норме до 5%). У этого больного "патологическое" гиперметилирование гена КТ исчезает после проведения очередного курса интенсивной химиотерапии (рис. 3, дор. 10). В этот же период нормализуются и показатели костного мозга. Спустя ещё 4 месяца (на 10-м месяце ремиссии) у этого пациента в условиях поддерживающего лечения в клетках костного мозга вновь обнаруживается гиперметилирование гена КТ. Клинико-лабораторная картина в тот момент времени оставалась нормальной. Клинический рецидив у этого пациента был отмечен через 8 месяцев.

В ДНК костного мозга пациента 4 аномальный НраП-фрагмент размером 2,6 тпн обнаруживается за 4,5 месяца до клинической констатации рецидива. Картины гиперметилирования гена КТ при этом очень сходны (рис. 3, дорожки 12 и 13 соответственно).

У больного 5 гиперметилирование 5'-области гена КТ (2,6 и 3,1 тпн) обнаруживалось за 60 дней до клинических признаков рецидива (рис. 3, дорожки 14).

Картина метилирования гена КТ у пациента 2 в условиях первой атаки и ремиссии приведена соответственно на дорожках 7 и 8 (рис. 3). При этом в фазе ремиссии наблюдается практически полное исчезновение НраП-фрагментов размером 2,6 и 3,1 тпн (сохраняется НраП-фрагмент 3,1 тпн слабой интенсивности).

Спустя 5 месяцев после аутологичной трансплантации донорского костного мозга (рис. 3, дорожка 15) больному ОЛЛ у него нормализовалась картина метилирования 5'-области гена КТ в клетках костного мозга. К моменту последнего исследования больной находился в состоянии полной ремиссии (рис. 3, дорожка 16). Таким образом, в клетках костного мозга и периферической крови больных ОЛЛ при достижении полной ремиссии наблюдается возвращение картины метилирования гена КТ до нормальной.

У пациента 7 обнаружена практически идентичная картина гиперметилирования гена КТ в клетках костного мозга и периферической крови за 1 месяц до рецидива и в момент диагноза 2-го рецидива болезни (рис. 3, дорожки 17-19 соответственно). Как и в предыдущих случаях, гиперметилирование 5'-области гена КТ отмечалось при благополучной клинической картине костного мозга и периферической крови и предшествовало морфологическому рецидиву.

У больных ОЛЛ интенсивность пятен "нормальных" НраП-фрагментов размером 1,0 тпн и 2,0 тпн может значительно уменьшаться вплоть до практически полного их исчезновения (рис. 3, дорожки 17-19, 21), что указывает на значительное сокращение нормальных клонов клеток костного мозга и периферической крови.

Следует отметить, что аномальная картина гиперметилирования гена КТ у больных ОЛЛ может отличаться индивидуальными особенностями. Так, у больных ОЛЛ в фазе 1-й атаки в клетках костного мозга и периферической крови выявлен различный набор НраП-фрагментов (рис. 3, дорожки 20-23; табл. 1).

Данные по частоте встречаемости различных аномальных НраП-фрагментов гена КТ, отражающих состояние гиперметилирования 5'-области этого гена у больных ОЛЛ, приведены в таблице 2. Наибольшая частота

встречаемости аномальных НраII-фрагментов отмечается при первичной манифестации заболевания и снижается в ремиссии. Присутствие аномальных НраII-фрагментов при остром лимфоидном лейкозе в ремиссии объясняется тем, что в большинстве случаев пациенты с ОЛЛ находились в фазе повторной ремиссии, которая обычно непродолжительна. Таким образом, высокая частота встречаемости "патологических" НраII-фрагментов у больных ОЛЛ в ремиссии согласуется с клиническим состоянием данной группы больных. Представляет интерес характер распределения "патологических" НраII-фрагментов в различных подгруппах пациентов. Так, максимальная частота встречаемости фрагмента размером 3,1 тпн отмечается в первой атаке ОЛЛ и при рецидиве заболевания (табл. 2). Аномальный НраII-фрагмент размером 3,1 тпн выявляется при близком к максимальному гиперметилированию последовательностей CCGG в 5'-концевой области гена КТ (рис.1). По-видимому, размер "патологических" НраII-фрагментов гена КТ прямо зависит от степени агрессивности лейкоемического процесса.

Следует отметить, что в случае практически полного исчезновения "нормальных" НраII-фрагментов 5'-концевой области гена КТ в клетках костного мозга и периферической крови больных ОЛЛ лейкоемический процесс, как правило, носил тяжелый, неуклонно прогрессирующий характер с резистентностью к химиотерапевтическому лечению.

Таблица 2. Распределение аномальных Нра II - фрагментов при лейкозах лимфоидного ряда в различных стадиях заболевания. (N – число случаев в данной подгруппе, % - частота встречаемости фрагмента в данной подгруппе в процентах)

Размер аномальных фрагментов, тпн	ОЛЛ ¹ , первичный (5 образцов)		ОЛЛ, ремиссия (12 образцов)		ОЛЛ, рецидив (4 образца)	
	N	%	N	%	N	%
1.2	1	20	4	33	1	25
2.6	3	60	6	50	1	25
3.1	5	100	5	42	3	75

Примечания: Острый лимфобластный лейкоз.

Можно предположить (и это является предметом дальнейших исследований), что реверсия нормальной картины метилирования 5'-концевой области гена КТ на патологическую происходит задолго до появления клинико-морфологических признаков возобновления заболевания. Анализ метилирования этой области гена КТ может иметь диагностическую ценность для разработки новых индивидуальных программ оптимальной химиотерапии острых лейкозов и может оказаться полезным при трансплантации костного мозга больным ОЛЛ. Высказанное предположение опирается на данные, полученные нами в результате мониторинга пациентов с острым лимфобластным лейкозом, начиная от первой атаки заболевания. Подобный метод ранней диагностики может быть упрощен при использовании метода ПЦР [11,15]. Таким образом, специфическое для ОЛЛ гиперметилирование 5'-области гена КТ может служить в качестве прогностического и диагностического маркера лейкозий и требует дальнейшего внимательного изучения.

Авторы выражают благодарность доктору S.Baylin за предоставленный зонд гена КТ, а также признательность докторам D. Baban и P. Dash (Институт исследования рака, Бирмингем, Великобритания) за ценную методическую помощь. Работа поддержана грантом "Геном человека" № 88'99.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.И. (1985) Руководство по гематологии том 1, Москва
2. Воробьев А.И. (1997) Лечение острых лейкозов у взрослых (пособие для врачей), Москва.
3. Larson R.A., Dodge R.K., Burns C.P. et al. (1995) Blood, **85**, 2025-2037.
4. Copelan E.A., McGuire E.A. (1995) Blood, **85**, 1151-1168.
5. Venditti A., Buccisano F., Del Poeta G. et al. (2000) Blood, **96**, 3948-3952.
6. Campana D., Pui C.-H. (1995) Blood, **85**, 1416-1434.
7. Белохвостов А.С., Новик А.А. (1999) Вопросы онкологии, N.6, 599-606.
8. Fenaux P., Preudhomme C., Lai J.L. et al. (1989) Brit. J. Haematol., **73**, 61-67.
9. Судариков А. Б. (1996) Пробл. гематологии и переливания крови, N.1, 49-54.
10. Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R. et al. (1998) Adv. Cancer Res., **72**, 141-196.
11. Fukuhara T., Hooper W.C., Baylin S.B. et al. (1992) Leukemia Res., **16**, 1031 - 1040.
12. Маринич Д.В., Воробьев И.А., Смольникова В.В., Холмс Дж., Бабан Д., Шевчук Т.В., Бурьянов Я.И., Мирошников А.И. (1999) Гематология и трансфузиология, **44**, 7-10.
13. Issa J.-P.J., Vertino M., Wu J. et al. (1993) J. Nat. Cancer Inst., **85**, 1235-1240.
14. Baylin S. B., Fearon E. R., Vogelstein B. et al. (1987) Blood, **70**, 412-417.
15. Ritter M., Dekant E., Huhn D., et al. (1995) Leukemia, **9**, 915-921.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, New-York, 545p.
17. Baylin S.B., Hoppener J.W.M., de Bustros A. et al. (1986) Cancer Res., **46**, 2917-2922.

Поступила 10.04.01.

**HYPERMETHYLATION OF THE HUMAN CALCITONIN
GENE AS A MOLECULAR MARKER OF
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

D.V. MARINITCH¹, A.L. USS¹, L.A. SMIRNOVA², L.A. VOROBYEV¹, J.A. HOLMES³,
G.E. SULIMOVA⁴, T.V. SHEVCHUK⁵, Y.I. BURYANOV⁵

¹ Republican Center of Transplantation of Bone Marrow, Minsk, Byelorussian Republic

² Byelorussian Medical Academy of Post-graduate Education, Minsk, Byelorussian Republic

³ Department of Transplantation of Bone Marrow, Queen Elizabeth Hospital,
Birmingham, Great Britain

⁴ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Gubkin Str.3,
117809 GSP-1, Moscow B-333, Russia, phone: 7 (095)135-5052, Fax: 7 (095)132-8962,
E-mail: sge@vigg.ru

⁵ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian
Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia; phone: 7 (095)925-2342;
fax (8-27) 79-0527; E-mail: buryanov@fibkh.serpukhov.su

HpaII/MspI blot-hybridization analysis of the 5'-end region of the calcitonin (CT) gene methylation in cells of bone marrow and peripheral blood of patients with acute lymphoblastic leukemias (ALL) has been carried out. ALLs are accompanied by hypermethylation of the inner cytosine in the CCGG sequences of this region of the CT gene. The level of hypermethylation of the CT gene corresponded to the degree of disease progression and malignancy. At a long-term remission, hypermethylation of the CT gene is not observed. In case of primary resistance or if the complete remission has not been achieved the CT gene remained hypermethylated. It has been shown that in relapse the normal CT gene methylation pattern reversed to hypermethylation. This phenomenon was detected 1-8 months before the obvious clinical and laboratory signs of the disease progression (relapse). The large size of abnormal HpaII-fragments of the 5'-end region of the calcitonin gene had a direct correlation with the malignancy status of ALL.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, DNA hypermethylation, calcitonin gene, relapse, diagnostics.