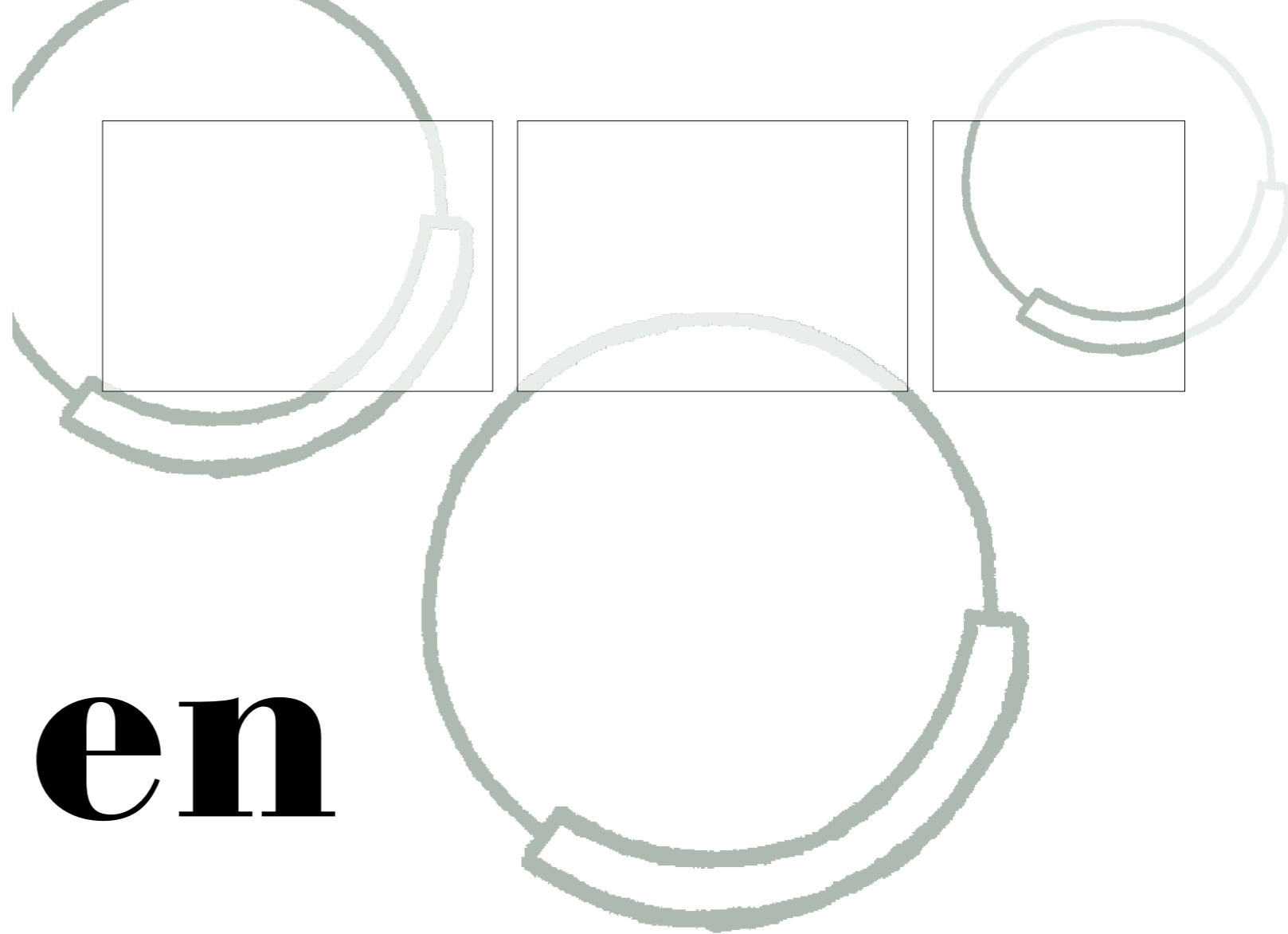
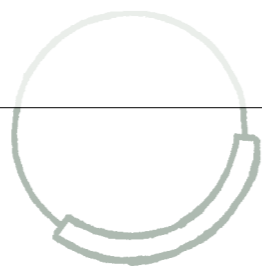




Bioanalytiker, **Trine Charlotte Larsen**
Klinisk Immunologisk Afdeling, Holbæk Sygehus



Regulering af

Leukæmigen

Resultater fra bioanalytikerstuderendes bachelorprojekt peger på, at promotorregionen for genet for kronisk lymfatisk leukæmi ligger inden for 1000 basepar foran genet

Trine Larsen har udført sit professionsbachelorprojekt ved Leukæmilaboratoriet, Hæmatologisk Institut, Rigshospitalet under vejledning af seniorforsker Anne Mette Buhl.

Projektet blev udført i forlængelse af Leukæmilaboratoriets identifikation af leukæmigenet CLLU1 og resulterede i præliminære data, der peger på, at CLLU1 promotorregion ligger indenfor 1000 basepar foran CLLU1-genet.

Anne Mette Buhl og samarbejdspartnere arbejder nu videre med en detaljeret analyse og karakterisering af CLLU1-genets regulering. Denne forskning kan resultere i en meget specifik behandlingsterapi med minimale sideeffekter for patienter med kronisk lymfatisk leukæmi, hvis det viser sig, at CLLU1-genet reguleres af promotorregionen alene.

Hyppigste leukæmi i Vesten

Kronisk lymfatisk leukæmi, CLL, er den hyppigste leukæmi i den vestlige verden (4). Her i Danmark ses der om-

kring 250 nye tilfælde hvert år. CLL rammer overvejende den ældre population af befolkningen (1,2).

CLL er en abnorm proliferativ tilstand, hvor der ophobes små lymfocytter i blodet, lymfeknuder, knoglemarv, milt, lever og eventuelt andre organer. I de fleste tilfælde er CLL en klonal sygdom i B-lymfocytterne, men i 2-4% sker der en proliferation af T-lymfocytterne. Disse leukæmiceller er ikke længere underlagt de normale reguleringsmekanismer for cellevækst og celledød (1,2).

CLL er en heterogen sygdom med et varierende klinisk forløb. Mens mange patienter kan leve relativt uproblematisk med sygdommen i årtier, vil der hos andre patienter ses en hurtig sygdomsprogression og relateret død i løbet af 5-10 år (4). CLL er en leukæmitype, der på nuværende tidspunkt ikke kan helbredes (2).

Leukæmigen fundet i 2005

A.M. Buhl et al. har identificeret et gen, CLLU1 (Chronic Lymphocytic Leukemia

Upregulated gene 1) i de leukæmiramte celler fra patienter med CLL. Det har vist sig, at dette gen kun findes udtrykt hos patienter med CLL (3). CLLU1-genet kan fungere som prognostisk faktor hos CLL patienter, idet der er sammenhæng mellem genekspression og sygdomsprogression hos den enkelte patient (4).

På nuværende tidspunkt vides det ikke, hvilken proces der får CLLU1-genet til at blive opreguleret hos CLL-patienter, men promotorregionen foran CLLU1-genet er formodentlig med til at regulere, om genet bliver transkriberet eller ej (4). En promotor er en DNA-sekvens, som aktiverer et gen, idet den bliver genkendt af RNA-polymerasen, der efterfølgende sætter gang i transkriptionen (5).

Isolering af promotorregion

I mit bachelorprojekt ville jeg prøve at isolere promotorregionen for at finde ud af, om denne region er med til at regulere CLLU1-genet. Dette har jeg

gjort ved almindelig PCR-amplifikation af hhv. 1000 og 2000 basepar foran CLLU1-genet, og efterfølgende er de amplificerede DNA-fragmenter introduceret i en vektor indeholdende et luciferase-gen, se figur 1, side 11. Vektoren transfekteres derefter ind i leukocytter fra CLL-patienter, der herefter vil syntetisere luciferase, hvis promotorregionen, der er til stede i vektoren, har promotor-aktivitet. Enzymet luciferase katalyserer oxidation af substratet luciferin under produktion af lys, hvilket kan måles på et luminometer.

Metode

Leukocytter fra to CLL-patienter, som vides at have et højt udtryk af CLLU1-genet, blev anvendt til at oprense DNA. Leukocytterne fra disse patienter var i forvejen isoleret ved hjælp af Ficoll-reagens, som er et reagens, der adskiller de forskellige blodlegemer fra hinanden i en blodprøve på grund af forskelle i massefylde.

Efter oprensningen blev der udført

PCR-amplifikation på de to prøver. Til at opformere den formodede promotorregion ved CLLU1-genet blev der anvendt Cloned Pfu DNA polymerase til DNA-syntesen. Der blev anvendt følgende tre primere:

- en upstream primer designet til at binde ca. 2000 basepar foran CLLU1-genet
- en upstream primer designet til at binde ca. 1000 basepar foran CLLU1-genet
- en downstream primer, som fungerer som reverse primer for begge upstreams primerne.

En primer medfører, at DNA-polymerasen binder og starter DNA-syntesen og dermed opformering af det valgte DNA-fragment.

Som kontrol blev DNA fra raske leukocytter anvendt.

Der blev udført elektroforese på de amplificerede DNA-fragmenter, og efterfølgende blev båndene identificeret med UV-lys for at kontrollere, om PCR-

amplifikationen var lykkedes. PCR-produkterne (de amplificerede DNA-fragmenter) blev oprenset ved phenol-/chloroform-ekstraktion efterfulgt af fældning med ethanol. De oprensede DNA-fragmenter samt vektoren blev skåret med udvalgte restriktionszymer og efterfølgende ligeret sammen. Dermed fås en vektor der indeholder det opformerede DNA-fragment placeret foran vektorens luciferasegen.

Vektor med det klonede DNA-fragment blev opformet i E. coli bakterier og oprenset ved brug af et kommercielt kit. Herefter blev konstruktet sekventeret for at kontrollere ligeringen og for at detektere mulige baseændringer i de opformerede DNA-fragmenter i forhold til det normale genom.

Efter sekventeringen blev vektor indeholdende DNA-fragment transfekteret ind i leukæmiceller fra CLL-patienter og luciferase-aktivitet påvist ved måling af lysudsendelse.

Resultater og diskussion

PCR-amplifikation

Ved elektroforesen kunne en sekvens på 1000 basepar findes, hvilket var tilfældet for både DNA fra leukocytter hos en CLL-patient samt DNA fra raske leukocytter. Et fragment på 2000 basepar kunne kun amplificeres fra DNA fra raske leukocytter. Det er ikke til at sige med sikkerhed, hvad grunden er til dette. Der har ikke været noget galt med PCR-amplifikationen, da begge sekvenser fra de raske leukocytter kom frem ved elektroforesen. Det kan måske skyldes en mutation i 2000 basepar-sekvensen hos CLL-patienten på det sted, som primeren genkender ved PCR-amplifikationen. Dette kunne resultere i, at primeren ikke bindes til DNA'et, og dermed opformeres DNA-fragmentet ikke. Problemet kunne måske løses ved anvendelse af en anden primer med et andet bindingsite. Men mest sandsynligt skyldes den manglende amplifikation dog, at det kromosomale DNA fra CLL-patienterne havde en lidt dårlig kvalitet, hvorfor det var vanskeligt at opformere det forholdsvis lange 2000 basepar-fragment.

Den efterfølgende skæring og ligering blev derfor kun udført med sekvensen på de 1000 basepar.

Sekventering

Ved sekventeringen blev det påvist, at

sekvensen på de 1000 basepar fra DNA fra leukocytter hos CLL-patienter og DNA fra raske leukocytter er ens. Dette antyder, at det ikke er en punktmutation eller en anden genetisk ændring i selve promotorregionen, der ligger til grund for den specifikke transkription af CLLU1-genet i leukæmicellerne. Det kan muligvis betyde, at det er intracellulære faktorer i cellen i sammenspil med promotoren, der afgør, om CLLU1-genet bliver transkriberet (6). Denne hypotese kan undersøges ved transfektion af CLLU1-promotoren ind i flere leukæmiramte celler samt i andre cellyper, hvor det formodes, at den ikke vil blive aktiveret.

Luciferase-aktivitet

Som det kan ses i histogrammet figur 2, kunne der måles luciferase-aktivitet i leukæmiceller transfekteret med vektor indeholdende 1000 basepar-sekvensen. Denne aktivitet forhøjes, når leukocytterne fra CLL-patienten transfekteres med en større mængde vektor-kompleks. Det tyder på, at promotoren ligger inden for de 1000 basepar, da den målte luciferase-aktivitet er væsentlig højere i de celler, der indeholder vektor med et indsat DNA-fragment i forhold til de celler, der er transfekteret med vektoren alene.

Det er lidt bemærkelsesværdigt, at der er blevet målt en luciferase-aktivitet i den blinde prøver, som kun inde-

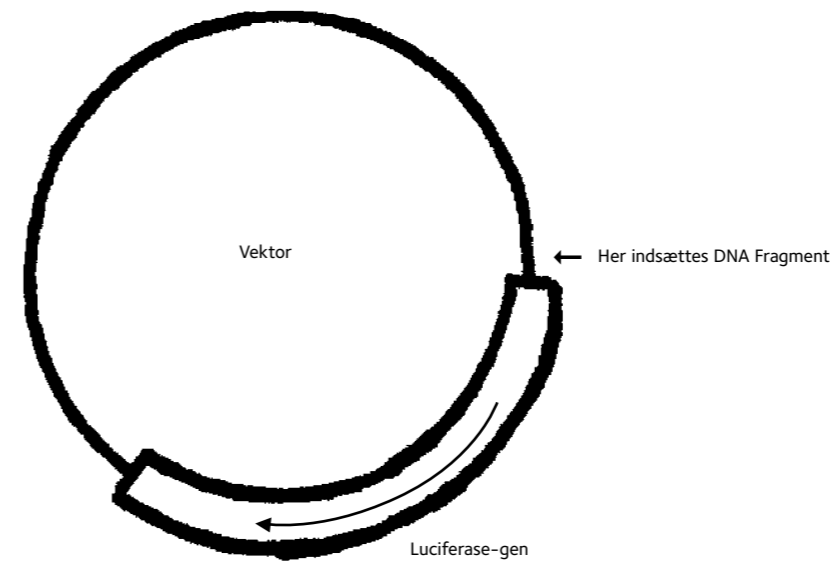
holder utransfakterede leukocytter fra CLL-patienten. Dette skyldes formentlig, at luminometeret ikke blev nulstillet/kalibreret efter de første målinger.

Da mit projekt kun omfattede ganske få transfektionsforsøg, er det ikke muligt at afgøre, hvor i de 1000 basepar promotoren for CLLU1-genet ligger, og om den alene er ansvarlig for den øgede ekspresion af genet hos CLL-patienter.

Fremtidsperspektiver

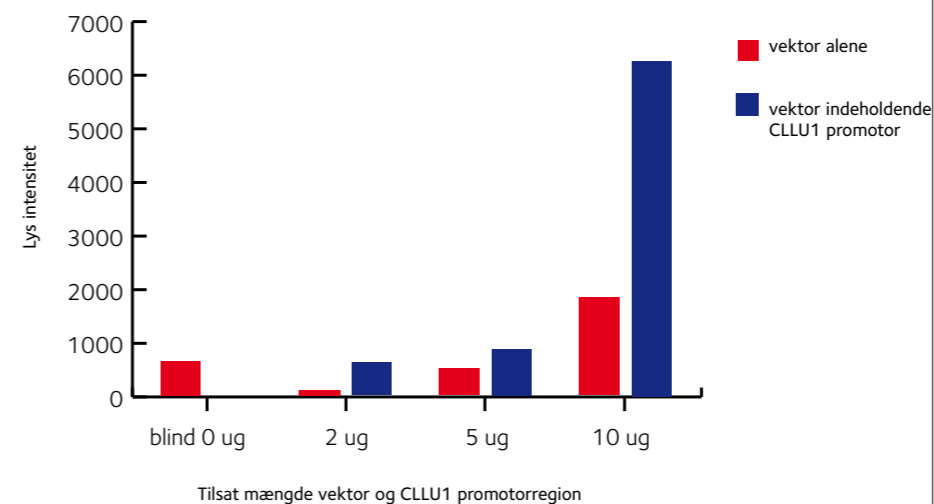
Hvis det viser sig, at promotoren alene styrer ekspresionen af CLLU1-genet i leukocytter hos CLL-patienter, vil man måske engang i fremtiden kunne koble promotorregionen til et såkaldt suicide-gen. Et suicide-gen koder for proteiner, som kan omdanne inaktive medikamenter til aktive celledræbende stoffer. Ved at introducere suicide-genet med CLLU1-promotoren i leukocytter hos CLL-patienter, vil suicide-genet blive aktiveret i leukæmicellerne. Når patienter efterfølgende behandles med det inaktive medikament, vil der i leukæmicellerne dannes et aktivt medikament, som slår dem ihjel. Denne behandlingsmetode vil ikke ramme andre celler, da promotoren kun starter en transkription i de leukæmiramte celler (7).

Dette kan betyde en meget specifik behandlingsterapi for CLL-patienter i fremtiden med minimale sideeffekter.



Figur 1. Vektoren indeholdende luciferase-gen. DNA-fragmentet indsættes foran genet.

VEKTOR VS. CLLU1 PROMOTOR PÅ 1000 BASEPAR



Figur 2. Luciferase-aktivitet for CLL-patient: Grafen viser luciferase-aktiviteten for CLLU1-promotoren i vektoren i forhold til vektoren alene i CLL-patient, ved en stigende tilsat mængde vektor og CLLU1-promotorregion.

LEGATER TIL STUDERENDE

Trine Charlotte Hansen, der har skrevet artiklen "Regulering af leukæmigen", har i år modtaget et legat for sit bachelorprojekt. Bioanalytikeruddannelsen København uddeler 3 legater pr. semester til studerende, der har skrevet et professionsbachelorprojekt, der udmærker sig med hensyn til fagligt fokus og fagligt niveau. Hvert legat er på kr. 15.000,- og udbetales under forudsætning af, at de studerende omskriver deres bachelorprojekt til en artikel, der efterfølgende publiceres. Legaterne uddeles på baggrund af begrundede indstillinger fra de studerendes vejledere. Der er på nuværende tidspunkt uddelt 6 legater.

LITTERATURLISTE

1. Karle, Hans: Hæmatologi, 4. udg., 1. oplag, Munksgaard, København 1994.
2. www.apoteket.dk/servlet/apoteket/leksikon?id=502.
3. Buhl, Anne Mette et al.: Identification of a Gene on Chromosome 12q22 Uniquely Overexpressed in Chronic Lymphocytic Leukemia, November 2005, submitted.
4. Buhl, Anne Mette et al.: CLLU1 Expression Levels Predict Time to Initiation of Therapy and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia, November 2005, submitted.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Promoter>.
6. Alberts, Bruce m.fl.: Essential Cell Biology, Garland Publishing Inc, 1998.
7. Pedersen, N et al.: The Insulinoma-associated 1: a Novel Promoter for Targeted Cancer Gene Therapy for Small-cell Lung Cancer, Cancer Gene Therapy, 1-10, 2005.