

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской
программы

_____ Е. И. Шишацкая
«_____»-_____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Определение соматических мутаций методом фрагментного анализа у
пациентов с диагнозом ОМЛ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный
руководитель

подпись, дата

канд-т биол. наук
Т.Н. Субботина

Выпускник

подпись, дата

И.Е. Маслокова

Рецензент

подпись, дата

профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2020

АННОТАЦИЯ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является злокачественным миелопролиферативным заболеванием с активной пролиферацией недифференцированных миелоидных предшественников. Возникновение данного заболевания обусловлено большим спектром, как цитогенетических нарушений, так и генетическими мутациями. Часть из них специфичны по отношению к ОМЛ, другие являются прогностическими. К последним относятся мутации в гене *FLT3*, которые представлены внутренними tandemными дупликациями в юкстамембранном домене, а также миссенс-мутации в кодонах D835 и I836 в петле активации соответствующего белка FMS-подобной тирозинкиназы. Распространенность мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD составляет 20–35% и 7% среди взрослых и 15% и 7% у детей с ОМЛ, соответственно. По рекомендациям ВОЗ и ELN мутации в гене *FLT3* принято определять при постановке диагноза и для определения прогноза течения заболевания, так как они ассоциированы с неблагоприятным исходом. Причем важно не просто обнаружить эти мутации, но также определить уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. С этой целью в мировой практике стали применять фрагментный анализ, который в данном случае имеет явные преимущества перед секвенированием по Сенгэру.

Таким образом, целью данной работы было определение соматических мутаций в гене *FLT3* методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ.

Анализ мутаций в гене *FLT3* проводился с использованием метода фрагментного анализа с определением уровня аллельной нагрузки мутантного аллеля, а также секвенирования по Сэнгера в качестве дополнительного метода. Из 18 пациентов с ОМЛ у 5 пациентов (27,8%), в том числе 2 из которых дети (13,3% из 15 детей), были обнаружены *FLT3*-ITD мутации. Однако в представленной группе не было обнаружено *FLT3*-TKD мутаций.

Ключевые слова: ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГЕН *FLT3*, *FLT3*-ITD МУТАЦИИ, *FLT3*-TKD МУТАЦИИ, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, АЛЛЕЛЬНАЯ НАГРУЗКА.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Определение соматических мутаций методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ» содержит 56 страниц текстового документа, 34 иллюстрации, 8 таблиц и 84 использованных источника.

ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГЕН *FLT3*, *FLT3-ITD* МУТАЦИИ, *FLT3-TKD* МУТАЦИИ, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, АЛЛЕЛЬНАЯ НАГРУЗКА.

Цель исследования – определение соматических мутаций в гене *FLT3* методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать тест-систему на основе фрагментного анализа для выявления ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* у пациентов с диагнозом ОМЛ.
2. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3-ITD* мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
3. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3-TKD* мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
4. Сравнить результаты анализа мутаций в гене *FLT3*, полученные при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что соматические мутации в гене *FLT3* ассоциированы с неблагоприятным исходом течения заболевания у пациентов с диагнозом острый миелоидный лейкоз, на который особенно влияет аллельная нагрузка мутантного аллеля. Таким образом, важно не только обнаружение таких мутаций, но также их количественный анализ. Поэтому в этой области фрагментный анализ имеет явные преимущества перед секвенированием по Сэнгеру.

В ходе работы разработана тест-система для выявления и количественного анализа ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* на основе фрагментного анализа. Использование разработанной тест-системы позволило выявить *FLT3-ITD* мутации у 5 пациентов (2 из которых дети) из 18 случаев ОМЛ, определить длину tandemного повтора у каждого образца и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. Однако в представленной группе не было обнаружено *FLT3-TKD* мутаций. Результаты, полученные при использовании фрагментного анализа, полностью соответствуют результатам, полученным при проведении других молекулярно-генетических технологий. На примере 19 образцов было показано преимущество использования фрагментного анализа для исследования мутаций в гене *FLT3* перед секвенированием по Сэнгеру.

ABSTRACT

The master's thesis on the topic «Determination of somatic mutations by the method of fragment analysis in patients with a diagnosis of AML" contains 56 pages of a text document, 34 illustrations, 8 tables and 84 sources used.

ACUTE MYELOID LEUKEMIA, *FLT3* GENE, *FLT3*-ITD MUTATIONS, *FLT3*-TKD MUTATIONS, SOMATIC MUTATIONS, FRAGMENT ANALYSIS, SANGER SEQUENCING, ALLELE BURDEN.

The aim of the work is determine of somatic mutations in *FLT3* gene by the method of fragment analysis in patients with AML.

Based on the goal, the following tasks were formulated:

1. Develop a test system based on fragment analysis to detect ITD and TKD mutations in the *FLT3* gene in patients with AML
2. Analyze the DNA of patients with AML for the presence of *FLT3*-ITD mutation with determination of allelic burden level using the developed test system
3. Analyze the DNA of patients with AML for the presence of *FLT3*-TKD mutation with determination of allelic burden level using the developed test system
4. Compare the results of the mutation analysis in the *FLT3* gene obtained by fragment analysis with the corresponding results obtained by other molecular genetic technologies.

The relevance of the thesis is that somatic mutations in the *FLT3* gene are associated with an unfavorable outcome of the disease in patients with acute myeloid leukemia, which is especially affected by the allelic burden of mutant allele. Thus, it is important not only to detect mutations, but also to quantify them. Therefore, in this area, fragment analysis has clear advantages over Sanger sequencing.

In the work test system was developed for the identification and quantitative analysis of ITD and TKD mutations in the *FLT3* gene based on fragment analysis. Using the developed test system was possible to identify *FLT3*-ITD mutations in 5 patients (2 of which are children) from 18 cases of AML, to determine the tandem repeat length in each sample and the allelic burden level of the mutant allele. However, no *FLT3*-TKD mutations were detected in the group represented. The results obtained using fragment analysis are fully consistent with the results obtained by other molecular genetic technologies. Using 19 samples as an example, the advantage of using fragment analysis to study mutations in the *FLT3* gene before Sanger sequencing was shown.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Острый миелоидный лейкоз	8
1.2 Рецидивирующие генетические нарушения при ОМЛ.....	10
1.3 FMS-подобная тирозин киназа (FLT3)	14
1.4 Прогностические мутации в гене <i>FLT3</i>	15
1.5 Белок-шаперон нуклеофосмин (NPM1).....	18
1.6 Диагностические мутации в гене <i>NPM1</i>	20
1.7 Молекулярные методы, используемые для определения мутаций в гене <i>FLT3</i>	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Объект исследования	23
2.2 Выделение ДНК из клинического материала с помощью набора «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия).....	24
2.3 Измерение концентрации ДНК с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3. (Invitrogen, США).....	25
2.4 Проведение ПЦР с помощью набора реагентов «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Москва) на приборе CFX 96 (BioRad, США)	26
2.5 Проведение ПДРФ анализа для исследования <i>FLT3</i> -TKD мутаций с помощью рестриктазы EcoRV (СибЭнзим, Россия) на приборе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США).....	27
2.6 Проведение фрагментного анализа с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)	28
2.7 Проведение секвенирования по Сэнгеру с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	32
3.1 Дизайн исследования мутаций в гене <i>FLT3</i> Error! Bookmark not defined.	
3.2 Анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру	Error! Bookmark not defined.
3.2.1 Количественный анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций у детей	Error! Bookmark not defined.
3.2.2 Количественный анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций взрослых пациентов	Error! Bookmark not defined.

3.3 Количественный анализ *FLT3*-TKD мутаций фрагментным анализом **Error! Bookmark not defined.**

3.4 Сравнение результатов анализа мутаций в гене *FLT3*, полученных при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий **Error! Bookmark not defined.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 34

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 35

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является злокачественным миелопролиферативным заболеванием с активной пролиферацией недифференцированных миелоидных предшественников. Возникновение данного заболевания обусловлено большим спектром как цитогенетических нарушений, так и генетическими мутациями. Часть из них специфичны по отношению к ОМЛ, другие являются прогностическими. К последним относятся мутации в гене *FLT3*, которые представлены внутренними tandemными дупликациями в юкстамембранном домене, а также миссенс-мутации в кодонах D835 и I836 в петле активации соответствующего белка fms-подобной тирозинкиназы [1]. Распространенность мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD составляет 20–35% и 7% среди взрослых и 15% и 7% у детей с ОМЛ [2], соответственно. По рекомендациям ВОЗ [3] и ELN [4] мутации в гене *FLT3* принято определять при постановке диагноза и для определения прогноза течения заболевания, так как они ассоциированы с неблагоприятным исходом. Причем важно не просто обнаружить эти мутации, но также определить уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. С этой целью в мировой практике стали применять фрагментный анализ, который в данном случае имеет явные преимущества перед секвенированием по Сенгэру.

Таким образом, целью данной работы было определение соматических мутаций в гене *FLT3* методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать тест-систему на основе фрагментного анализа для выявления ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* у пациентов с диагнозом ОМЛ.
2. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3*-ITD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
3. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3*-TKD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
4. Сравнить результаты анализа мутаций в гене *FLT3*, полученные при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Острый миелоидный лейкоз

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенное клональное заболевание, характеризующееся аномальной пролиферацией миелоидных клеточных предшественников в результате возникновения мутации, приводящей также к блокировке дифференцировки [5]. Миелоидное новообразование, согласно критериям ВОЗ [3], с 20% и более бластов в периферической крови и костном мозге считается ОМЛ *de novo* или же вторичным ОМЛ, если ему предшествовал миелодиспластический синдром (МДС) или миелопролиферативные новообразования (МПН). В 2008 г. [6] был представлен пересмотренный вариант классификации ОМЛ ВОЗ, в который были внесены изменения по нескольким категориям заболеваний (знаком * обозначена группа, введенная в 2016 г):

- ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями
- ОМЛ с генными мутациями*
- ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией
- Миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей химиотерапией
- ОМЛ, по-другому не специфицированные (NOS)
- Миелоидная саркома
- Миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна
- Опухоль из плазмацитоидных дендритных клеток
- Острые лейкозы неопределенной линии дифференцировки

В отличие от классификации франко-американо-британской системы (ФАБ), которая строилась на морфологическом аспекте заболевания, новая классификация выстроена на сочетании клинических, морфологических, иммунофенотипических и генетических особенностей. Особенно интересны две первые группы, представленные в таблице 1, в которых включены подвиды ОМЛ, определяющиеся хромосомными аномалиями (первая группа) и генными мутациями (вторая группа). Именно открытие новых прогностических и диагностических генетических маркеров, а также накопление большого материала по их исследованию привело к тому, что определение мутационного статуса пациента стало обязательным критерием для постановки диагноза ОМЛ.

Таблица 1 – Острый миелоидный лейкоз с рецидивирующими генетическими нарушениями (классификация ВОЗ)

ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями	ОМЛ с генными мутациями*
<ul style="list-style-type: none"> • ОМЛ с t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • ОМЛ с inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> • Острый промиелоцитарный лейкоз с t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> • ОМЛ с t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> • ОМЛ с t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> • ОМЛ с inv(3)(q21q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i> • ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i> • ОМЛ с <i>BCR/ABL1</i>* 	<ul style="list-style-type: none"> • ОМЛ с мутированным геном <i>NPM1</i>* • ОМЛ с биаллельной мутацией гена <i>CEBPA</i>* • ОМЛ с мутированным геном <i>RUNX1</i>*

Недостатком системы ФАБ был критерий классификации – фенотип, который не всегда можно было распознать однозначно, что приводило к недифференцированному ОМЛ. Тем самым обе классификации в каких-то моментах сходятся, например при остром промиелоцитарном лейкозе (М3) транслокация t(15;17)(q22;q12), *PML-RARA*, встречается у 98 % больных. Тогда как при остром миелобластном лейкозе с созреванием (М2) встречаются и t(8;21) (q22;q22), *RUNX1-RUNX1T1* в 40% случаях и t(6;9)(p23;q34), *DEK-NUP214* в 1%. В классификации ВОЗ же ОМЛ с хромосомными транслокациями t(8;21)(q22;q22) и t(6;9)(p23;q34) выделены в отдельные подтипы [7].

В большинстве случаев конкретная причина возникновения мутаций при ОМЛ остается неизвестной. Однако существует несколько этиологических факторов, увеличивающих риск развития заболевания: ионизирующее излучения, воздействие химических веществ, электромагнитные волны, курение и др. Также стоит отметить, что отдельным этиологическим фактором является химиотерапевтическое лечение уже диагностированной онкологии. Риск развития вторичного ОМЛ в 85 % случаев возникает в сроки до 10 лет с момента окончания лечения [8].

Клиническая картина заболевания является следствием замещения нормальных клеток костного мозга мутантным клоном. Наблюдаются нейтропения, анемия, гемморагический синдром, немотивируемая слабость, гиперплазия десен и др. [9]. Дебют ОМЛ может сопровождаться значительным повышением температуры, кровоточивостью, интоксикацией, резкой слабостью, тяжелыми инфекциями. Хотя достаточно часто бывают ситуации случайной постановки диагноза при плановом медицинском осмотре или госпитализации по другой причине (у пожилых людей могут проявляться признаки стенокардии) [10].

Эффективность химиотерапии зависит от специфичности цитостатического воздействия и адекватности сопроводительного лечения, уменьшающей токсический эффект первого. Терапия при ОМЛ состоит из трех этапов: индукция ремиссии, консолидация и поддерживающая терапия [11]. Индукция ремиссии проводится в 1-2 курса для быстрого и существенного сокращения мутантного клона. Полная ремиссия считается достигнутой, когда на фоне применения цитостатических средств в костном мозге обнаруживается менее 5 % опухолевых клеток (морфологическая оценка на 21-28-й день) [12]. Препараты в этот период назначаются по схеме «7 + 3», представляющая собой комбинацию, как правило, цитарабина (7 дней) и даунорубицина (3 дня) [13]. Если после второго курса индукционной терапии не достигается полная ремиссия, констатируется первичная резистентность [14], и пациентам проводят терапию по программам лечения рефрактерных форм лейкемии. Консолидация ремиссии или закрепление достигнутого противоопухолевого эффекта заключается в еще большем уменьшении числа аномальных клеток, включающий более агрессивный курс терапии. После следует этап поддерживающего лечения, заключающегося в продолжение цитостатического или таргетного воздействия на возможно остающийся опухолевый клон. У 50-65% молодых пациентов после использования одного курса индукционной терапии удаётся достичь полной ремиссии, после двух курсов – у 70-75% [15]. Помимо этого постремиссионной терапией для пациентов из групп благоприятного и промежуточного риска может являться ауто-трансплантация гемопоэтических стволовых клеток [16,17]. Однако у пациентов после 55-60 лет прогноз максимально неблагоприятен: возникает резистентность к терапии, а долгосрочная выживаемость не превышает 5-7% [18,19]. При отсутствии лечения ОМЛ является потенциально губительным заболеванием, а пациенты умирают от осложнений в виде инфекций и кровопотерь. При симптоматической терапии выживаемость не превышает 11-20 недель (медиана) [20,21].

Заболеваемость ОМЛ в среднем 3-5 человек на 100 тыс. населения в год [22], но в возрасте старше 80 лет уже составляет 12-13 случаев [23]. Так в США ежегодно диагностируются 10500 новых случаев ОМЛ [24]. Учитывая численность населения, в России расчетный показатель должен составлять 5000 новых случаев в год [25]. Стоит отметить, что мужчины болеют ОМЛ в примерно 1,5 раза чаще женщин (4,6 против 3,0 случаев на 100 000 населения в год) [26].

1.2 Рецидивирующие генетические нарушения при ОМЛ

Как говорилось ранее несколько хромосомных аномалий и генетических мутаций стали отдельными категориями ОМЛ. Часть из них являются прогностическими, часть диагностическими, а некоторые могут сочетать обе функции. Диагностической мутацией можно назвать, когда она

присуща одному конкретному заболеванию, и позволяет, таким образом, его дифференцировать от других. Примером такой перестройки был приведен в предыдущем разделе – $t(15;17)(q22;q12)$ при остром промиелоцитарном лейкозе. Прогностический аспект мутации выражен в корреляции мутации и особенностями заболевания, что получило отражение в Европейской классификации риска лейкемии (ELN) 2017 года [4] (таблица 2).

Таблица 2 – Стратификация генетического риска согласно рекомендациям ELN, 2017

Группа риска	Генетические аномалии
Благоприятная	<ul style="list-style-type: none"> • $NPM1\langle + \rangle / FLT3\text{-ITD}\langle - \rangle$ или $FLT3\text{-ITD}\langle + \rangle$ (низк) • Биаллельная мутация <i>CEBPA</i> • $t(8;21)(q22;q22)$; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • $inv(16)(p13.1q22)$ or $t(16;16)(p13.1;q22)$; <i>CBFB-MYH11</i>
Промежуточная	<ul style="list-style-type: none"> • $NPM1\langle + \rangle / FLT3\text{-ITD}\langle + \rangle$ (выс) • $NPM1\langle - \rangle / FLT3\text{-ITD}\langle - \rangle$ или $FLT3\text{-ITD}\langle + \rangle$ (низк) в отсутствии неблагоприятных генетических аномалий • $t(9;11)(p22;q23)$; <i>MLLT3-KMT2A</i> (ранее <i>MLLT3-MLL</i>) • Цитогенетические аномалии, не классифицированные как благоприятные или неблагоприятные
Неблагоприятная	<ul style="list-style-type: none"> • Комплексный кариотип • Моносомный кариотип • -5 или $del(5q)$; -7; -17/<i>abn(17p)</i> • $T(v;11q23.3)$; <i>KMT2A</i> (перегруппированный аллельный сегмент) • $inv(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$; <i>RPNI-EVII</i> • $t(6;9)(p23;q34)$; <i>DEK-NUP214</i> • $T(9;22)(q34.1;q11.2)$; <i>BCR-ABL1</i> • $NPM1\langle - \rangle / FLT3\text{-ITD}\langle + \rangle$ (выс) • Мутация <i>TP53</i> • Мутация <i>RUNX1</i> (не является неблагоприятной при подтипе ОМЛ из группы благоприятного риска) • Мутация <i>ASXL1</i> (не является неблагоприятной при подтипе ОМЛ из группы благоприятного риска)

Все мутации можно разделить на два типа: первые возникают в генах, кодирующих ферменты, непосредственно являющиеся звеньями сигнальных путей, а вторые – в генах, кодирующие белки эпигенетической регуляции.

К мутациям I класса относят мутации в генах, кодирующих цитозольные или рецепторные протеинкиназы. Среди мутаций, встречающихся при ОМЛ, к этому классу относят мутации в генах *FLT3*, *KIT* и *RAS*. Эти мутации присущи не только ОМЛ, они являются прогностическими и их важно анализировать, хотя они и не выделены в отдельные категории ОМЛ согласно ВОЗ. Соответствующие протеинкиназы обладают большим онкогенным потенциалом, поэтому в клетке существуют системы контроля, в том числе убиквитин-протеосомная система. Но основным механизмом, в особенности для рецепторных тирозинкиназ, является аутоингибирование [27]. В структуре такого фермента присутствует

домен, выполняющий данную функцию, который в неактивной форме киназы (в отсутствии лиганда) ингибирует домен, отвечающий за фосфорилирование нижестоящих компонентов сигнального пути (киназный домен). Как правило, для рецепторных тирозинкиназ можно предугадать расположение мутаций, которые будут приводить к аномальной активации фермента: это мутации в ингибирующем домене и в киназном домене [28]. Именно эти участки и являются онкогенными у *FLT3*, *KIT* и *RAS*.

Основная масса хромосомных аббераций, представленных в классификации ВОЗ, относят к мутациям II класса, а также мутации в генах *NPM1* и *CEBPA*. Также помимо этих к диагностически значимым мутациям можно еще отнести *DNMT3A*, *TET2*, *IDH2*, *WT1*, *TP53* мутации и др., которые не являются специфическими для ОМЛ. Эти мутации влияют на пролиферацию и выживаемость мутантного клона через «посредников», являясь при этом основным звеном эпигенетической регуляции [29]. Нужно также понимать, что при хромосомных абберациях химерный ген, возникающий из участков двух генов, экспрессируется в виде химерного продукта, который приводит к выживаемости собственного мутантного клона за счет аномальных функций. При этом один из изначальных генов выполнял эпигенетическую функцию, а второй при химеризации изменил структуру первого.

Для большинства наиболее значимых мутаций разрабатываются таргетные препараты, следовательно, исследования, направленные на изучения прогностического значения этих мутаций, их частоты встречаемости, являются актуальной задачей. Первый вопрос касается прогноза общей выживаемости пациентов при той или иной мутации или их сочетаний [30]. А второй затрагивает вопрос специфичности и токсичности цитостатиков, поэтому важна персонализация медицинских показаний к этим препаратам.

Хромосомные аномалии и мутации при нормальном кариотипе встречаются примерно в одинаковых пропорциях при ОМЛ: по некоторым данным цитогенетические нарушения показаны в 30% случаев, тогда как на долю нормального кариотипа выпадает 40-50% [31]. При нормальном кариотипе 60% мутаций приходится на мутации в гене *NPM1*, 30% – в гене *FLT3*, 15% – в гене *CEBPA* и 15% на остальные мутации (рисунок 1). По последним данным из всех случаев ОМЛ на долю наиболее часто мутирующих генов приходится: *FLT3* (39%), *NPM1* (33%), *DNMT3A* (31%), *NRAS* (22%), *RUNX1* (15%), *TET2* (15%), *IDH2* (14%), *WT1* (13%), *ASXL1* (11%), *PTPN11* (10%), *SRSF2* (10%), *TP53* (9%), *CEBPA* (8%) и другие [32, 33].

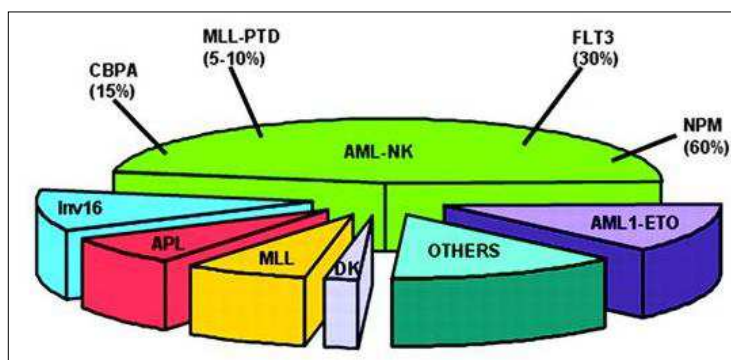


Рисунок 1 – Встречаемость ОМЛ ассоциированных мутаций при нормальном кариотипе

Стоит отметить, что часть мутаций встречаются исключительно при нормальном кариотипе (например, *NPM1*), тогда как другая, например *FLT3* мутации, могут присутствовать вместе с хромосомными нарушениями. Причем во многих исследованиях показаны сочетания различных мутаций при ОМЛ. Возможно, что для развития этого заболевания недостаточно только одной конкретной мутации. Так при исследовании детей с ОМЛ *de novo* было определено, что у 50% обнаружено 3 и более генетических аномалий [34]. У Tripo et al [35] описан интересный клинический случай с сочетанием четырех различных прогностических мутаций. Пациент был гетерозиготным по *FLT3-ITD* (с нагрузкой 86%) и D835, *NPM1* (42%) и *DNMT3A*. Причем для *FLT3-ITD* мутации было выявлено три разных дуплицированных фрагмента. Случай был уникальным, т.к. исследование Mevatee et al. [36] на 100 пациентах среди ОМЛ, предложенное для сравнения авторами, не выявило положительных случаев сочетания *FLT3 + DNMT3A + NPM1*. Сочетание мутаций в разных генах имеет разное прогностическое значения для пациента с ОМЛ. Например, Loghavi et al. [37] сделали вывод, что пациенты с ОМЛ с сочетанием мутациями *NPM1 + DNMT3A* имеют более короткую общую выживаемость по сравнению с *FLT3-ITD + NPM1*-положительными пациентами. Последняя пара мутаций, к слову, поэтому не просто так включена в рекомендации ELN [4]. Встречаемость сочетаний мутаций в этих генах представлена на рисунке 2.

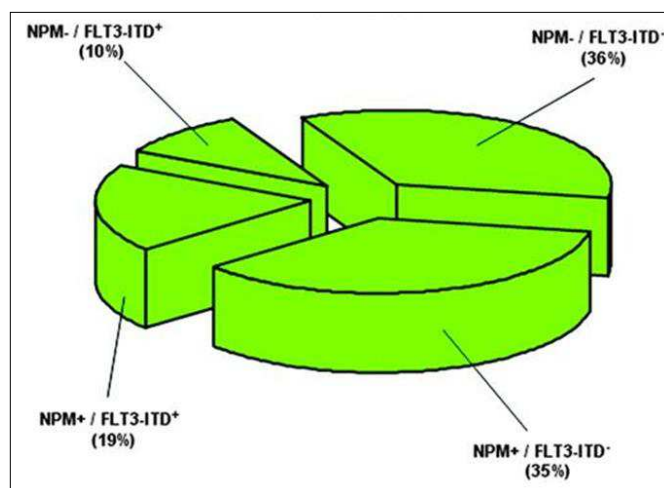


Рисунок 2 – Сочетание вариантов мутаций в генах *FLT3* и *NPM1*

Недавнее исследование (2016 г) Виноградова и др. [32] показало, что в 40% исследованных случаях мутации генов *NPM1* и *FLT3* кооперировались неслучайным образом, и определяли исход заболевания [38]. Ниже подробно разобраны механизмы действия данных мутаций.

1.3 FMS-подобная тирозин киназа (FLT3)

FLT3 (fms-подобная тирозинкиназа 3), также известная как тирозинкиназа-1 стволовых клеток или тирозинкиназа печени-2 плода, является одним из рецепторов тирозинкиназы (РТК) класса III. Ген *FLT3* обычно экспрессируется в незрелых кроветворных предшественниках.

РТК имеют общие структурные элементы: 5 иммуноглобулиноподобных домена во внеклеточных областях для связывания лиганда, трансмембранный домен, юкстамембранный (JM) домен, выполняющий аутоингибирующую функцию, и 2 киназных домена (TK1 и TK2), разделенных доменом вставки киназы и С-терминальный домен во внутриклеточных областях (рисунок 4) [39].

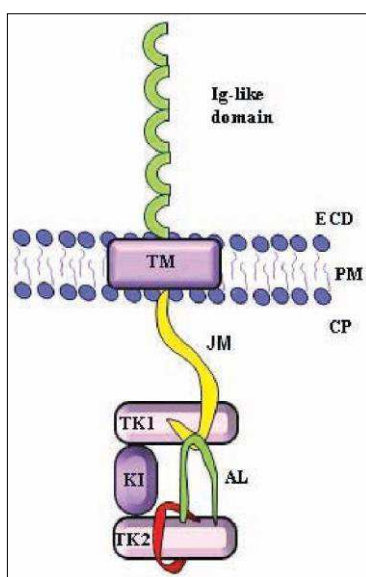


Рисунок 4 – Схематическое изображение мономера рецептора FLT3

Лиганд для FLT3 (лиганд FLT3 или FL) был клонирован в 1993 году. FL экспрессируется в клетках микроокружения костного мозга, включая фибробласты костного мозга, а также в миелоидном ростке кроветворения [40]. FL приводит к димеризации рецептора и его аутофосфорилированию, запуская сигнальные пути, ответственные за пролиферацию клеток. На это взаимодействие влияют и другие цитокины, такие как лиганд Kit (KL). Показано, что при стимуляции *in vitro* клеток-предшественников либо только FL, или либо только KL, достигается незначительный или нулевой пролиферативный ответ, но оба лиганда вместе синергически усиливают рост [41]. Схема активации FLT3 представлена на рисунке 5.

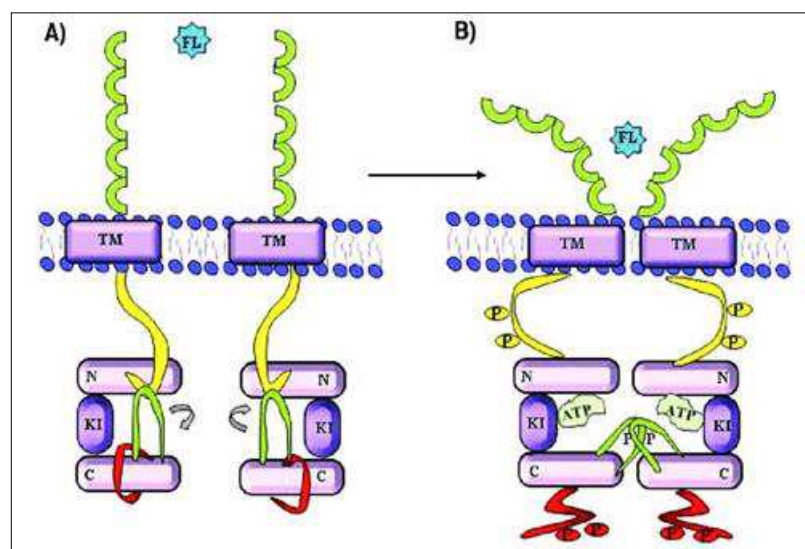


Рисунок 5 – Механизм активации рецептора FLT3:
 А – неактивная форма, В – активная форма

Два киназных домена (TKD1 и TKD2) формируют активный центр фермента, в основе которого лежит петля активации (А-петля). В неактивной форме JM домен принимает такую конформацию, которая блокирует А-петлю, что приводит к ингибированию самодимеризации. При связывании лиганда происходит преодоление ингибирующего эффекта, за счет аутофосфорилирования тирозинкиназы в JM и, как следствие, изменения его конформации. Активная форма тирозинкиназы фосфорилирует нижестоящие элементы сигнальных путей, запуская каскад реакций, ведущих к пролиферации и активации клеток. Такими путями являются MAP-киназный и АКТ пути. Также упоминается STAT путь, однако есть упоминание о патологичности данного пути для FLT3 [42].

1.4 Прогностические мутации в гене *FLT3*

Первый раз заговорили про мутации в гене *FLT3*, когда Nakaо et al. [1] во время исследования экспрессии гена *FLT3* у 30 пациентов с ОМЛ случайно обнаружили неожиданно более длинные транскрипты у пяти из них. Ими оказались внутренние тандемные дубликации (вставка повтора без сдвига рамки считывания). Дупликация (ITD) была переменной как по размеру (от 3 bp и до > 400 bp), так и по расположению у разных людей, но всегда находилась в пределах области JM, кодируемой экзонами 14 и 15. Хотя есть данные, что длина может достигать до 1236 bp [43], и что в JM присутствуют лишь 70% тандемных повторов, тогда как остальные приходятся на тирозинкиназный домен 1 [44]. Дальнейшие исследования выявили, что *FLT3*-ITD мутации возникают у пациентов с ОМЛ в 15-20% случаев [2].

Второй тип мутаций, который встречается в гене *FLT3*, представляет собой ряд однонуклеотидных замен в 20 экзоне в петле активации

тирозинкиназного домена 2 (TKD). Но наиболее часто встречаемыми из них являются мутации в соседних кодонах D835 и I836, включающих по меньшей мере 9 разных замен (рисунок 6). Частота встречаемости колеблется от 6,4% до 7,7% у неотобранных взрослых пациентов с ОМЛ [2].

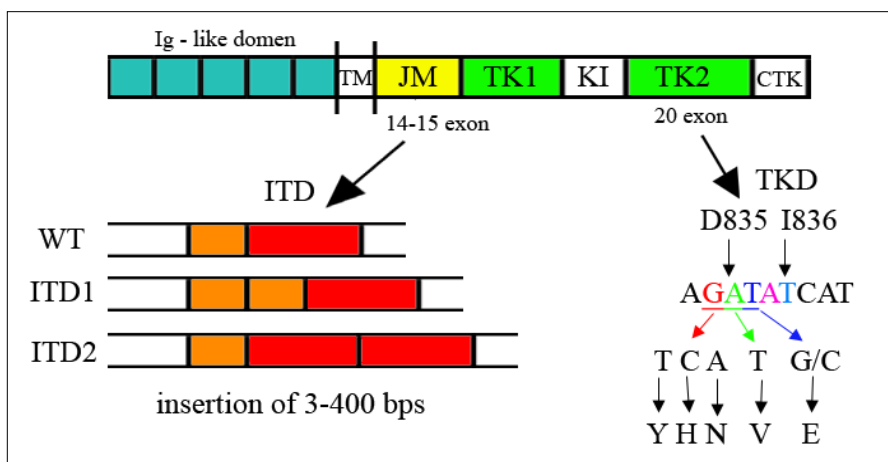


Рисунок 6 – Основные мутации в гене *FLT3*: ITD – тандемные повторы в JM и TKD – однонуклеотидные замены в А-петле

Мутации *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD приводят к схожему действию – нарушению аутоингибирующего эффекта неактивной формы тирозинкиназы в отсутствие лиганда. Но из-за их различной локализации механизм влияния у них разный. Выше упоминалось, что в рецепторных тирозинкиназах легко предугадываются «горячие точки» для мутаций. Так удлинение JM при *FLT3*-ITD мутациях приводит к конформационным изменениям в домене, он перестает удерживать петлю активации в неактивной конформации, что приводит к самопроизвольной димеризации фермента. Точковые мутации в самой А-петле при *FLT3*-TKD меняют ее форму так, что она не блокируется JM доменом при его нормальной длине [45]. Таким образом, оба варианта мутаций приведут к дестабилизации неактивной формы фермента, и соответственно к конститутивной активации рецептора [46]. Бесконтрольное фосфорилирование нижележащих элементов сигнальных путей, упомянутых в прошлом разделе, запускают аномальную пролиферацию мутантного клона [47]. Причем согласно исследованию Janke et al. [42], если принять пролиферацию клеток при *FLT3*-ITD за 100%, то пролиферация *FLT3*-TKD клонов составит 14-42%. При стимуляции FL клоны *FLT3*-ITD не показали никакого ответа, а *FLT3*-TKD – промежуточный ответ, если сравнивать с диким типом (100%). *FLT3*-TKD показали повышенную активность MAPK и АКТ путей по сравнению с диким типом (WT), а *FLT3*-ITD – STAT пути. Также можно предположить, что помимо активной пролиферации для выживания мутантного клона запускаются механизмы дополнительной продукции лиганда FL [48], а также фосфорилирования факторов транскрипции самого гена *FLT3*, что способствует так называемому аресту дифференцировки.

Приведенные выше эффекты объясняют, почему *FLT3*-ITD мутации ассоциированы с неблагоприятным исходом течения ОМЛ. Пациенты с данной мутацией характеризуются повышенным риском рецидивов и более короткой средней продолжительностью жизни [49]. На рисунке 7 показан анализ выживаемости пациентов с *FLT3*-ITD в зависимости от уровня аллельной нагрузки: высокий уровень аллельной нагрузки снижает общую выживаемость, а также безрецидивную выживаемость [50]. Такая же связь прослеживается и с увеличением длины tandemного повтора. Но при этом показано, что повторы менее 15 bp не являются прогностически значимыми [51]. При этом не было никакой связи между длиной дублированного фрагмента и аллельной нагрузкой или возрастом.

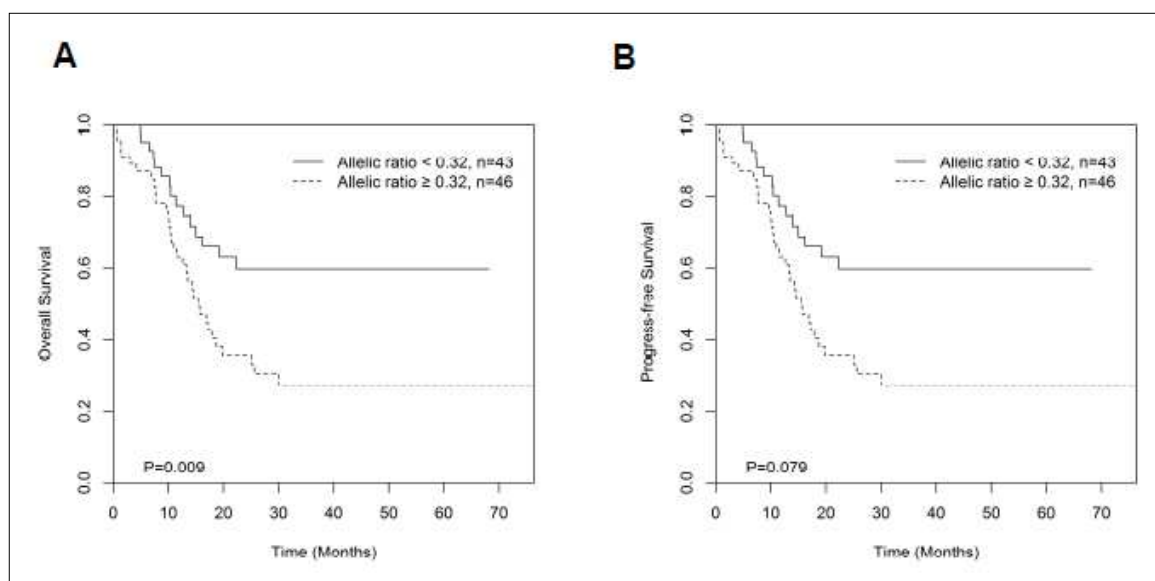


Рисунок 7 – Анализ выживаемости пациентов с *FLT3*-ITD в зависимости от уровня аллельной нагрузки (0,32 или 32% – медиана в данном исследовании):

А – общая выживаемость, В – безрецидивная выживаемость

Данные о влиянии на исход заболевания у *FLT3*-TKD-положительных пациентов противоречивы, однако четко выявлено, что эти мутации могут возникнуть в ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназы, а также сами быть резистентными к этим ингибиторам [52]. Также одновременное присутствие обоих типов мутаций не является благоприятным.

Во многих исследованиях общая встречаемость мутаций в гене *FLT3* близка к 30% для взрослых пациентов. Но для мутаций *FLT3*-ITD она варьируется между ОМЛ пациентами из разных этнических групп. Так при исследовании азиатской группы она составила 12,6% [53], а русской группы – 18,1% [54]. Однако в европейских или американских группах этот тип имели треть взрослых пациентов с ОМЛ [55, 33]. Помимо этого, стоит упомянуть, что распространенность *FLT3*-ITD мутаций увеличивается с возрастом (рисунок 8): у детей в возрасте до года она составляла 1%, 7% – от года до 5 лет, 17% – от 10 до 20 лет, а у пожилых достигает 30%. Для

пациентов с *FLT3*-TKD мутациями встречаемость составляет 5-8% и не повышается с возрастом [2]

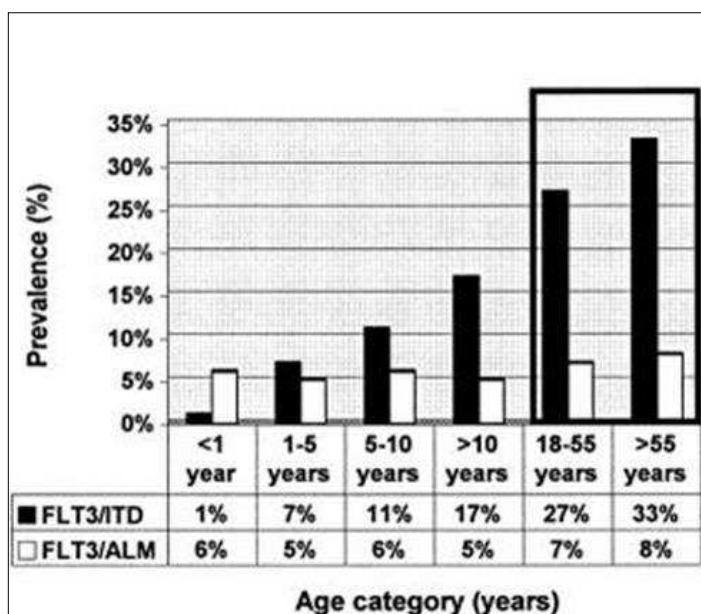


Рисунок 8 – Взаимосвязь встречаемости *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD (здесь обозначено как *FLT3*-ALM) и возраста

Мутации в гене *FLT3* обнаружены во всех подтипах ОМЛ, но чаще всего в исследованиях встречаются в подвидах ОМЛ М2, М3, М4 и М5 системы классификации ФАБ [53, 54]. Также эти мутации обнаруживаются при МДС в 10% случаях, иногда способствуя бластному кризу, и не встречаются при МПН [56].

В литературе также описаны случаи делеций и комплексных мутаций в *JM*, но они редкие и плохо описаны в настоящее время [57].

1.5 Белок-шаперон нуклеофосмин (NPM1)

NPM1 – это ядрышковый фосфопротеин, способный перемещаться между ядром и цитоплазмой. Такой белок-шаперон участвует в биогенезе рибосом (перенос субъединиц), способен связываться с центросомой в цитоплазме, контролируя деление клетки, а также взаимодействует с p53 и его регуляторными молекулами (рисунок 9) [58].

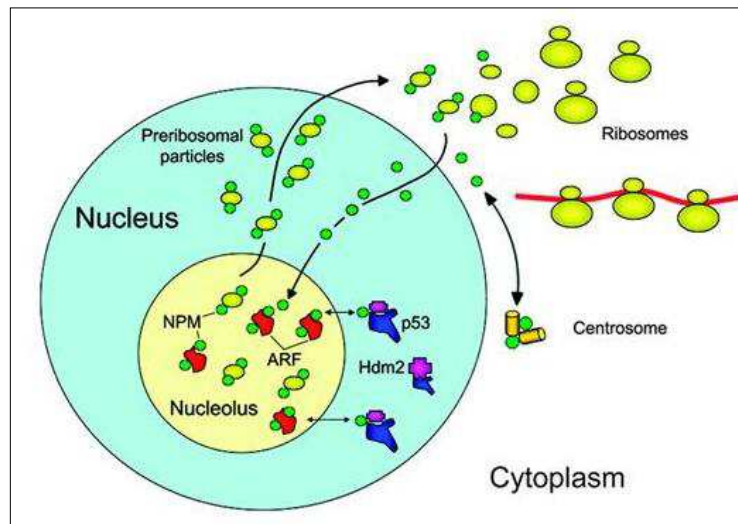


Рисунок 9 – Функции нуклеофосмина в клетке

Изоформа V23.1 белка нуклеофосмина, преобладающая изоформа, имеет несколько функциональных доменов. N-концевой участок содержит гидрофобную область, регулирующую самоолигомеризацию и активность шаперона NPM1 в отношении белков, нуклеиновых кислот и гистонов. Средняя часть содержит 2 кислотных участка, служащие для связывания гистонов, а сегмент между кислотными участками проявляет рибонуклеазную активность. С-концевой домен содержит триптофаны 288 и 290, которые являются критическими для связывания NPM1 с ядрышком [59]. Сигнал ядерной локализации (NLS) и сигнал ядерного экспорта (NES) на поверхности белка обеспечивают его транспорт (рисунок 10).

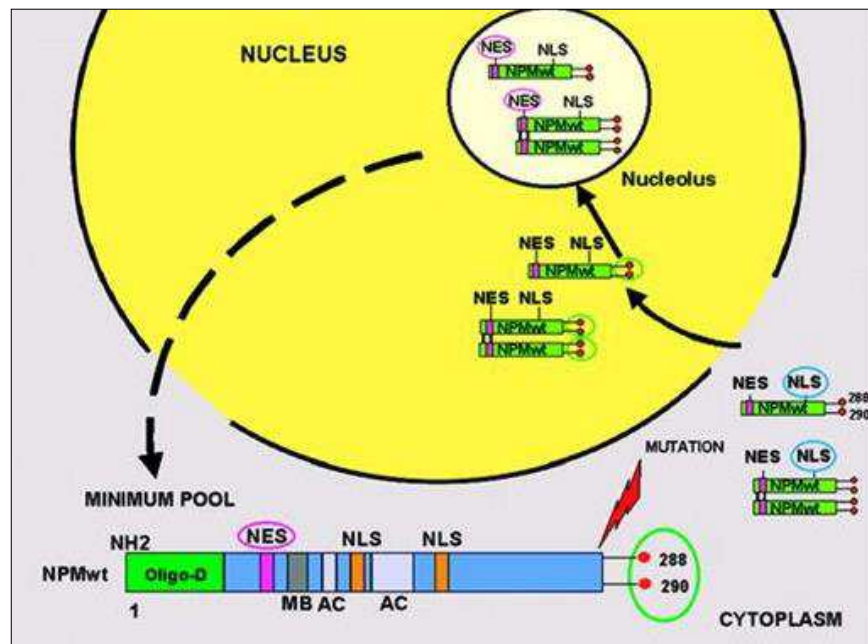


Рисунок 10 – Механизм транспорта белка NPM1

Сигнал NLS направляет нуклеофосмин из цитоплазмы в ядро, а затем через ядрышко связывающий домен (триптофаны 288 и 290) он проникает в

ядрышко. Ядерный экспорт NPM1 опосредуется Crm1 (exportin 1) [60]. Однако, несмотря на мотивы NES, NPM1 остается локализованным в ядрышках, то есть в норме ядерный импорт преобладает над экспортом, т.к. мотив NES имеет слабое взаимодействие с Crm1.

1.6 Диагностические мутации в гене *NPM1*

Мутации, возникающие в гене белка нуклеофосмин, приводят к накоплению aberrантного белка в цитоплазме (рисунок 11). В одном случае может возникнуть дополнительный NES сигнал на С-конце белка, что увеличит его взаимодействие с Crm1. Второй вариант приводит к потере одного или двух триптофанов 288 и 290 и, как следствие, потери связи с ядрышком. Оба варианта приведут к активному экспорту мутантного белка в цитоплазму [61].

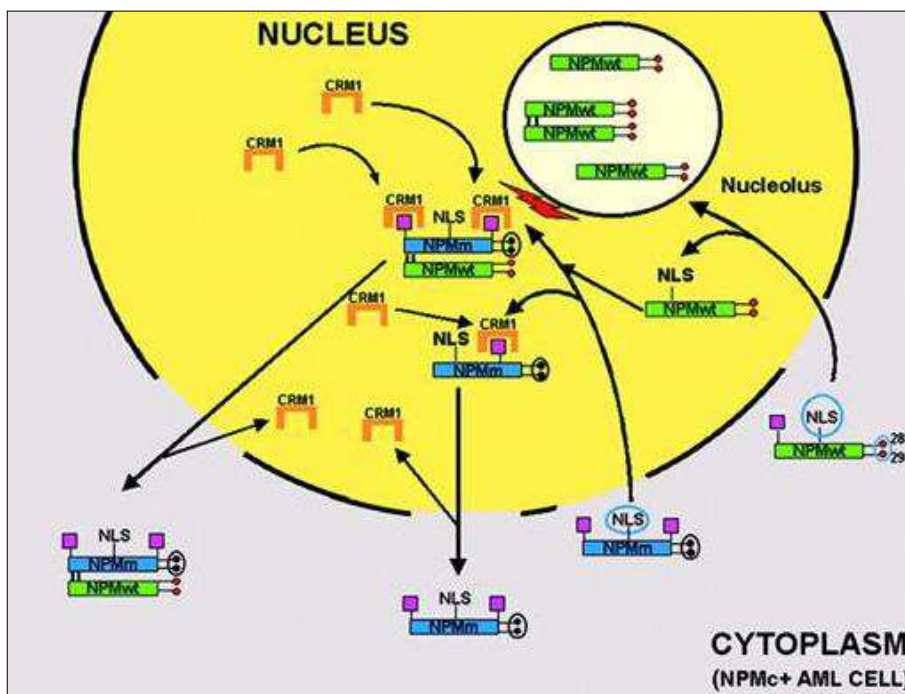


Рисунок 11 – Механизм транспорта цитоплазматического NPM1

Такой белок стали называть цитоплазматическим нуклеофосмином [62]. Горячие точки мутаций расположены в 12 экзоне, причем подавляющее их большинство представляет собой вставку из четырех нуклеотидов и вызывает сдвиг рамки считывания, что приводит к потере какого-либо из триптофанов 288 или 290 [63]. Мутации в гене *NPM1* встречаются в 25% случаев у детей и 35% у взрослых с ОМЛ [64, 65], причем чаще у М1 подтипа [66].

На сегодняшний день обнаружено 37 различных мутаций, ассоциированных с локализацией белка в цитоплазме (рисунок 12). 75-80% приходится на мутацию А – дубликацию TCTG, остальные 15-20% на мутации В, D и остальные [67]

NPM1 mutation type	Nucleotide Insertion	Frequency in de novo AML
Mutation A	c.860_863dupTCTG	~72%
Mutation B	c.862_863insCATG	~12%
Mutation D	c.863_864insCCTG	~4%
Mutation G	c.863_864insTTTG	<1%
Mutation I	c.863_864insTAAG	<1%
Mutation J	c.863_864insCTTG	<1%
Mutation K	c.863_864insTATG	<1%
Others	-	<1%

Рисунок 12 – Частота встречаемости основных мутаций в гене *NPM1*

Прогностически важно не само наличие мутаций в гене *NPM1*, а скорее его сочетание с мутацией *FLT3*-ITD, о котором несколько раз говорилось ранее. Однако *NPM1* используют как диагностический маркер минимальной остаточной болезни при ОМЛ из-за его стабильной экспрессии в ходе заболевания [68].

1.7 Молекулярные методы, используемые для определения мутаций в гене *FLT3*

Для анализа мутаций в гене *FLT3* требуются эффективные, специфические и чувствительные молекулярные методы. Важно определить как длину дублируемого участка, так и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. Также важно учитывать, что проведение анализа мутаций в гене *FLT3* требует хорошей оснащённости молекулярно-генетической лаборатории. Учитывая рекомендации Национальной всеобщей онкологической сети США и ELN, тестирование мутаций в гене *FLT3* должно проводиться на этапе постановки диагноза, то есть в кратчайшие сроки для попадания в терапевтическое окно [69, 4].

Следует отметить, что для выявления *FLT3*-ITD мутаций может быть достаточно детекции продуктов ПЦР электрофорезом в агарозном геле. Но при таком подходе встает вопрос относительно обнаружения мутантного продукта с небольшим дублированным участком. Что касается *FLT3*-TKD мутации, то их также важно детектировать в агарозном геле, но с дополнительным этапом ПДРФ анализа. Однако важно, что оба варианта могут быть использованы лишь для скрининга мутаций, а не для их количественного анализа (определения уровня аллельной нагрузки). С этой целью начали применять фрагментный анализ, который позволяет оценить аллельную нагрузку для обоих типов мутаций и определить длину tandemного повтора [70]. В обзоре литературы для своего исследования Зайкова и др [51]. акцентировали внимание, что как в России, так и за рубежом отсутствуют унифицированные протоколы определения мутаций.

Несмотря на, казалось бы, эффективный фрагментный анализ, коллеги из США и других стран предпочитают лишь скрининг с помощью ПЦР-теста и электрофореза в агарозном геле [71]. В России также предпочтение отдается скрининговой методике, что можно объяснить невозможностью приобретения лабораториями прибора для капиллярного электрофореза. Говорить об полногеномном или полноэкзонном NGS методике в России по этой же причине не приходится, хотя этот метод также применялся для анализа мутаций *de novo* за рубежом [72], однако имеет недостаток в виде продолжительности анализа, исключающий его использование в рамках терапевтического окна.

Зайкова и др. приводят примеры готовых коммерческих наборов для анализа мутаций в гене *FLT3*: два набора для скрининга мутаций ПЦР в режиме реального времени компаний MyBiosource и 3V BlackBio Biotech India Ltd, а также наборы компании Invivoscribe с определением ПЦР-продукта в агарозном геле и с проведением фрагментного анализа [73]. Именно последние наборы зарекомендовали себя по всему миру, в особенности это важно, потому что именно фрагментный анализ на сегодняшний день является рекомендованным методом для анализа мутаций в гене *FLT3* [4]. Однако, учитывая реалии, чувствительность доступного и простого метода ПЦР с детекцией в агарозном геле можно повысить, если в анализ брать наибольшее число мутантных клеток. Это можно достичь за счет использования материала костного мозга [74], желательно свежеприготовленного, во избежание деградации ДНК.

Научно-практическая лаборатория молекулярно-генетических методов исследований в г. Красноярске имеет в своем распоряжении 8-канальный секвенатор «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), что позволяет провести фрагментный анализ мутаций в гене *FLT3* на ее базе.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Исследование было выполнено на базе НПЛМГМИ СФУ в г. Красноярске. В анализ было включено 18 пациентов с подтвержденным диагнозом ОМЛ. Из них 15 составляли дети с разными фенотипическими типами ОМЛ и 3 взрослых (таблица 3). Диагноз был установлен согласно стандартам ВОЗ [3, 6], в том числе на основании цитогенетического исследования костного мозга по анализу хромосомных aberrаций.

Таблица 3 – Выборка пациентов с диагнозом ОМЛ

№ пациента	Диагноз	Хромосомные аномалии	Исход заболевания на момент исследования
Дети			
1	ОМЛ (M4)	t (8;21)	ремиссия
2	ОМЛ (M2)	t (8;21)	неизвестно
3	ОМЛ (M4)	-	умерла
4	ОМЛ (M4)	-	неизвестно
5	ОМЛ (M5a)	t (10;11)	ремиссия
6	ОМЛ (M1)	t (8;21)	ремиссия
7	ОМЛ (M3)	t (15;17)	неизвестно
8	ОМЛ (M2)	t (8;21)	ремиссия
9	ОМЛ (M4)	inv 16	ремиссия
10	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
11	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
12	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
13	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
14	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
15	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
Взрослые			
16	ОМЛ (исход из МДС)	-	первый рецидив
17	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
18	а	ОМЛ (не уточнен)	первый рецидив
	б	ОМЛ (не уточнен)	второй рецидив

В качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК от 18 пациентов (19 образцов), выделенная из клеток костного мозга детей и из лейкоцитов цельной крови взрослых пациентов. Материал костного мозга от 15 детей, находившихся на стационарном лечении в отделении онкологии и гематологии КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства» в разные периоды с 09.2012 г. по 06.2017 г, находился в архиве лаборатории НПЛМГМИ СФУ. Ранее у этих пациентов магистрантом кафедры защиты и современных технологий мониторинга лесов и сотрудником лаборатории НПЛМГМИ СФУ А.А. Фалеевой было

проведено генетическое исследование костного мозга по выявлению хромосомных аномалий с использованием биологических микрочипов. Взятие крови у одного взрослого пациента №16, поступившего с рецидивом ОМЛ (исход из МДС) в КГБУЗ «Краевая клиническая больница» г. Красноярска 01.2020 г., осуществляли из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Три образца ДНК, выделенных фенол-хлороформным методом, от двух взрослых пациентов (2 образца от одного пациента во время первого и второго рецидива ОМЛ), были предоставлены лабораторией молекулярной гематологии НМИЦ гематологии, г. Москва.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови и клеток костного мозга проводили с помощью набора реагентов ДНК-Сорб-В (АмплиСенс, Россия). Далее целевые участки ДНК амплифицировали с помощью набора «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Для анализа *FLT3-ITD* и *FLT3-TKD* мутаций участки 14-15 и 20 экзонов соответственно амплифицировали с флуоресцентно-мечеными праймерами с целью проведения далее фрагментного анализа. Ампликоны участка 20 экзона дополнительно гидролизовали рестриктазой EcoRV (СибЭнзим, Россия). Продукты ПЦР и рестрикты смешивали с GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, США) и подвергали капиллярному электрофорезу с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США). Обработку результатов фрагментного анализа проводили в GeneMarker software (SoftGenetics, США). Дополнительно *FLT3*-положительные образцы амплифицировали (без меченых праймеров) и подвергали секвенирующей ПЦР с прямого и обратного праймеров с помощью набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез также проводили с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), а обработку результатов секвенирования – в Sequence Scanner software (Applied Biosystems, США).

2.2 Выделение ДНК из клинического материала с помощью набора «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия)

ДНК из цельной крови и клеток костного мозга (выделенных и сохраненных ранее в реагенте «Раствор Д») выделяли с помощью набора ДНК-сорб-В (АмплиСенс, Россия).

Лейкоциты цельной крови предварительно отмывали реагентом ГЕМОЛИТИК (АмплиСенс, Россия): к 1 мл гемолитика добавляли 250 мкл предварительно перемешанного образца крови; оставляли пробирки при комнатной температуре на 5 мин, перемешивали и снова оставляли на 5 мин; центрифугировали пробы (8 тыс. об/мин, 2 мин); отбирали надосадочную жидкость, содержащую разрушенные эритроциты.

Из отмывых лейкоцитов выделяли ДНК по следующему протоколу:

1. Предварительно Лизирующий раствор и Раствор для отмывки 1 нагревали на термостате до 65°C.
2. В каждую пробирку с осадком лейкоцитов вносили по 300 мкл лизирующего раствора. Пробы перемешивали на вортексе, прогревали в течение 5 мин на термостате при 65 °С и центрифугировали (5 тыс об/мин, 5 сек).
3. Предварительно сорбент универсальный ресуспендировали на вортексе.
4. В каждую пробирку вносили по 25 мкл сорбента, перемешивали на вортексе, оставляли при комнатной температуре на 2 мин, перемешивали и снова оставляли на 5 мин. Пробы центрифугировали (5 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; удаляли надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем.
5. В каждую пробирку вносили по 300 мкл Раствора для отмывки 1, перемешивали до полного ресуспендирования сорбента на вортексе; центрифугировали (5 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; удаляли надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем.
6. В каждую пробирку вносили по 500 мкл Раствора для отмывки 2, перемешивали до полного ресуспендирования сорбента на вортексе; центрифугировали (10 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; удаляли надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем. Повторяли указанную процедуру отмывки еще раз с последующим удалением надосадочной жидкости.
7. Для подсушивания сорбента открытые пробирки помещали в термостат на 5-10 мин при 65 °С.
8. Для элюции ДНК из сорбента в каждую пробирку вносили по 50 мкл ТЕ-буфера, перемешивали на вортексе и возвращали пробирки с закрытыми крышками в термостат на 5 мин при 65°C, периодически встряхивая на вортексе.
9. Пробирки центрифугировали (13 тыс об/мин, 1 мин). В надосадочной жидкости находилась очищенная ДНК.

2.3 Измерение концентрации ДНК с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3 (Invitrogen, США)

Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3. (Invitrogen, США).

Принцип метода основан на специфичном связывании флуоресцентного красителя с молекулой-мишенью (в нашем случае с ДНК). По уровню флуоресценции, детектируемым прибором, определяется концентрация ДНК в пробе.

Концентрацию ДНК измеряли по следующему протоколу:

1. Предварительно все реагенты размораживали при комнатной температуре.

2. Рабочую смесь готовили из расчета на N+2 проб (где N – число образцов, а 2 – число стандартов для калибровки прибора): 1*(N+2) мкл концентрированного реагента + 199*(N+2) мкл буфера для разведения.
3. В пробирки на 0,5 мл вносили для стандартов – 190 мкл Рабочей смеси и 10 мкл Стандарта; для образцов – 198 мкл Рабочей смеси и 2 мкл ДНК.
4. Пробы тщательно вортиксовали 2-3 сек, сбрасывали капли и инкубировали 2 мин.
5. На флуориметре Qubit 3.0 выбирали анализ dsDNA HS Assay.
6. Калибровку производили с помощью Стандартов №1 и №2.
7. После измеряли концентрацию исследуемых образцов в пмоль/мкл.

2.4 Проведение ПЦР с помощью набора реагентов «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Москва) на приборе CFX 96 (BioRad, США)

ПЦР проводили с помощью набора «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Программа амплификации и схема приготовления реакционной смеси на одну пробу представлены в таблице 4. Общая реакционная смесь готовилась в одной отдельной пробирке из расчета на N+1 проб (образцы + холостая проба) и раскапывалась по 22 мкл в каждую пробирку, затем в эти пробирки вносилось по 3 мкл ДНК. Продукты амплификации детектировали методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Таблица 4 – Протокол реакции ПЦР

Программа амплификации			Реакционная смесь объемом 25 мкл (1 проба)		
95 °С	3 мин	1 цикл	ddH ₂ O	13,25 мкл	
95 °С	30 сек	30 циклов	10x ПЦР буфер Б + EVA Green	2,5 мкл	
			dNTP, 2,5 мМ	2,5 мкл	
			MgCl ₂ , 25 мМ	1,5 мкл	
62 °С	40 сек		Праймеры, 10 пмоль/мкл	Прямой	1 мкл
				Обратный	1 мкл
72 °С	30 сек		SynTaq ДНК-полимераза, 5Е/мкл		0,25 мкл
72 °С	5 мин	1 цикл	Образец ДНК, ~50 нг	3 мкл	

В таблице 5 представлены последовательности праймеров для анализа мутаций в гене *FLT3*, использованные в настоящем исследовании и заимствованные из указанных в таблице статей.

Таблица 5 – Последовательности праймеров

Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер фрагмента	Источник
<i>FLT3</i> -ITD forward	TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA	326 bp	[75]
<i>FLT3</i> -ITD reverse	TTCCATAAGCTGTTGCGTTCATCAC		
<i>FLT3</i> -ITD-FAM forward	FAM-TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA		
<i>FLT3</i> -TKD forward	CCGCCAGGAACGTGCTTG	114 bp	[76]
<i>FLT3</i> -TKD reverse	GCAGCCTCACATTGCCCC		
<i>FLT3</i> -TKD-HEX forward	HEX-CCGCCAGGAACGTGCTTG		
<i>FLT3</i> -TKD-FAM reverse	FAM-GCAGCCTCACATTGCCCC		

Для исследования мутаций *FLT3*-ITD амплифицировали участок 14-15 экзона длиной 326 bp, захватывающего все известные тандемные повторы JM домена. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительный прямой праймер, который на 5'-конце имел флуоресцентную FAM метку.

Для исследования мутаций *FLT3*-TKD амплифицировали участок 20 экзона длиной 114 bp. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительные прямой и обратный праймеры, которые на 5'-конце были флуоресцентно-мечеными: прямой праймер – HEX меткой, обратный – FAM меткой. В данном случае маркировались оба праймера с целью детекции двух типов рестриктов, образующихся при гидролизе рестриктазой в ходе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализа).

Для секвенирования по Сэнгеру *FLT3*-положительных образцов использовались те же пары праймеров, но без флуоресцентных меток.

2.5 Проведение ПДРФ анализа для исследования *FLT3*-TKD мутаций с помощью рестриктазы EcoRV (СибЭнзим, Россия) на приборе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США)

Для исследования *FLT3*-TKD мутаций ампликоны участка 20 экзона подвергали ПДРФ-анализу с помощью рестриктазы EcoRV (СибЭнзим, Россия) на приборе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Схема приготовления реакционной смеси на одну пробу представлена в таблице 6. Пробы инкубировались 1 час 30 мин при 37 °С, а затем 20 мин при 80 °С для инактивации фермента. Продукты рестрикции детектировали методом электрофореза в 8% полиакриламидном (ПААГ) геле.

Таблица 6 – Протокол реакции рестрикции

Реакционная смесь объемом 20 мкл (1 проба)	
ddH ₂ O	10,5 мкл
10x буфер W	2 мкл
BSA, 1 мг/мл	2 мкл
Рестриктаза EcoRV, 20000 е.а./мл	0,5 мкл (10 е.а.)
Образец ампликонов, ~100 нг	5 мкл

Схема рестрикционного анализа для поиска *FLT3*-TKD мутаций, использованная в данной работе, представлена на рисунке 13.

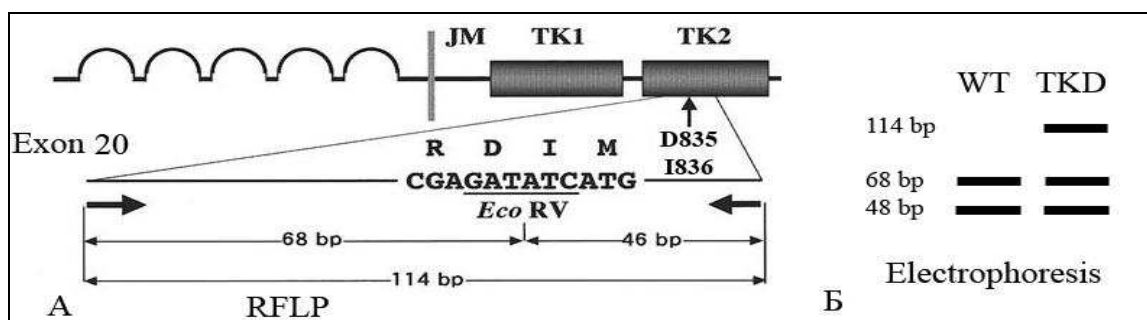


Рисунок 13 – Схема рестрикционного анализа для обнаружения *FLT3*-TKD мутаций: А – сайт узнавания рестриктазы EcoRV [77], Б – теоретическое электрофоретическое разделение продуктов рестрикции для мутантного (TKD) и нормального аллеля (WT)

В основе ПДРФ анализа лежит использование эндонуклеаз рестрикции (рестриктазы) – специфические клеточные ферменты бактерий, входящих в систему рестрикции-модификации для защиты собственной ДНК от чужеродных нуклеиновых кислот и ферментов. За счет свойства рестриктаз расщеплять двуцепочечную молекулу ДНК в строго специфическом для себя сайте узнавания, их стали использовать в молекулярной генетике в качестве молекулярных ножниц, в особенности рестриктазы второго типа. Для анализа точечных мутаций или небольших делеций или инсерций подбирают рестриктазу так, чтобы мутация либо изменяла естественный сайт узнавания фермента, либо, наоборот, из-за мутации возникал новый сайт узнавания. В итоге различные по длине рестрикты для мутантного и нормального аллелей можно легко дифференцировать при электрофорезе.

2.6 Проведение фрагментного анализа с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)

Для проведения фрагментного анализа 0,5 мкл флуоресцентно-меченных продуктов амплификации (*FLT3*-ITD) или рестрикции (*FLT3*-TKD) смешивали с 0,5 мкл GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, США) и 9 мкл Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, США). В постановку был включен отрицательный контроль – образец пациента без мутаций в гене *FLT3*. Приготовленные смеси нагревали в термостате при 95

°C в течение 3 мин и остужали до 4 °C в течение 2 мин. Затем пробы переносили по 10 мкл в 96-луночный планшет генетического анализатора, откручивали на центрифуге для сброса капель и помещали в прибор. Капиллярный электрофорез проводили на 8-капиллярном приборе «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), полимер POP-7 (Applied Biosystems, США). Обработку результатов фрагментного анализа проводили в GeneMarker software (SoftGenetics, США). Схема фрагментного анализа для данного исследования представлена на рисунке 14.

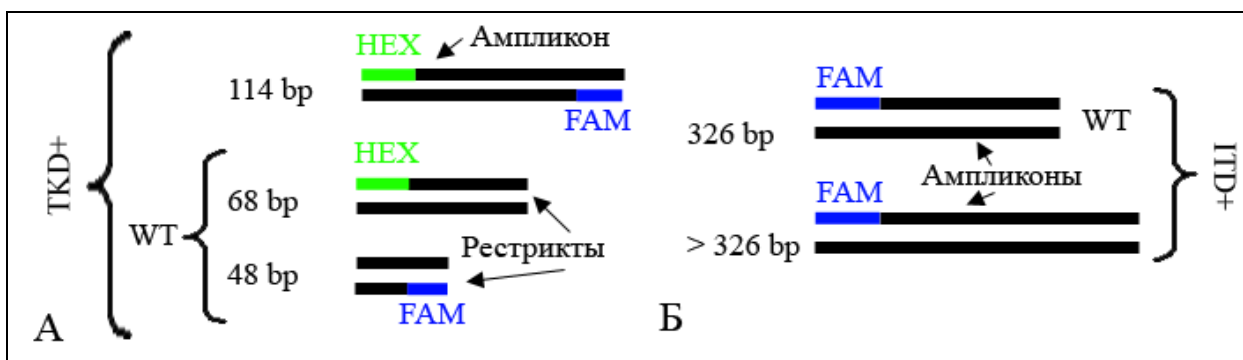


Рисунок 14 – Фрагментный анализ для исследования мутаций в гене *FLT3*: А – для *FLT3*-TKD мутаций, Б – для *FLT3*-ITD мутаций: HEX, FAM – праймеры с соответствующими флуоресцентными метками, WT – дикий тип

Аллельная нагрузка для положительных образцов рассчитывалась по формуле:

$$\frac{\text{Высота пика } mt}{\text{Высота пика } WT + \text{высота пика } mt} * 100\%$$

– где WT – фрагмент, соответствующий нормальному аллелю, mt – фрагмент, соответствующий мутантному аллелю, высота пика выражена в относительных единицах флуоресценции

Фрагментный анализ представляет собой серию методов, в которых флуоресцентно-меченные амплифицированные фрагменты ДНК разделяют с помощью капиллярного электрофореза с определением их длины относительно стандартов размера (рисунок 15). Фрагментный анализ позволяет определять длину фрагмента относительно стандартов в отличие от секвенирования, которое позволяет определять последовательность анализируемого фрагмента ДНК.

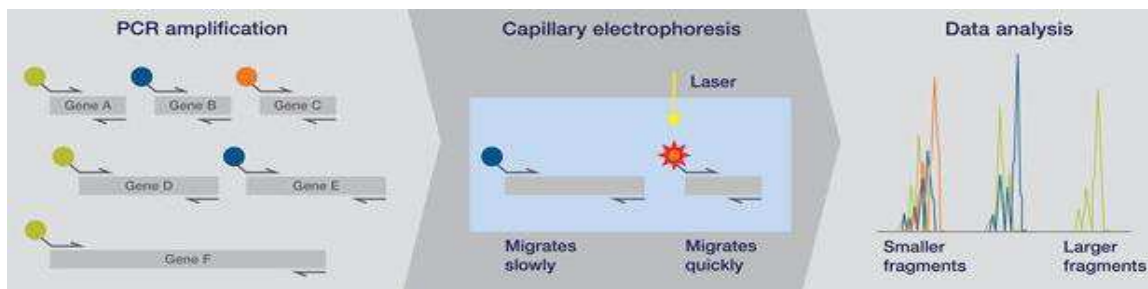


Рисунок 15 – Этапы фрагментного анализа [78]

На первом этапе фрагментного анализа нарабатывается целевой фрагмент ДНК в реакции ПЦР с присоединением к нему флуоресцентной метки. Фрагменты могут маркироваться двумя способами: за счет включения 5'-меченного ген-специфического праймера или меченных dNTPs. Для выполнения данной работы, в связи с необходимостью определения уровня аллельной нагрузки были выбраны флуоресцентно-меченные праймеры, поскольку если выбрать меченые dNTPs, то они могут неравномерно распределиться в разных цепях ДНК. Так, для анализа *FLT3*-ITD использовали один меченый праймер, а для анализа *FLT3*-TKD мутаций – два меченных праймера. При этом уровень аллельной нагрузки определяется по высоте накопления флуоресцентного сигнала, соответствующего количеству специфически провзаимодействованных молекул меченного праймера и одной из цепей ДНК. Это свойство также повышает точность анализа [78]. Второй этап включает разделение меченных фрагментов с помощью капиллярного электрофореза, например на секвенаторе «Генетический анализатор 3500». Для этого к образцу добавляют стандарты размера, которые по аналогии с маркерами молекулярного веса представляют собой фрагменты ДНК разной, уже известной длиной, но при этом, также как и образцы, флуоресцентно-меченные. При капиллярном электрофорезе пробы забираются за счет электрокинетической инъекции (заряд высокого напряжения) в капилляр диаметром 20-100 мкм, заполненный полимером (пористый матрикс). За счет отрицательного заряда фосфатных остатков в нуклеотидах фрагменты ДНК движутся по капилляру, короткие фрагменты движутся быстрее, а длинные медленнее. Недалеко от анода расположен детекторный блок с лазером, вызывающий флуоресценцию красителей, которая детектируется ССD камерой. Третьим этапом специализированные программы переводят информацию о моменте времени детекции сигнала в длину фрагмента относительно уже известных длин фрагментов в стандарте. Для корректного анализа образцов программой в постановку всегда включают отрицательный контроль. Представленная схема фрагментного анализа может включать и дополнительные методы, например рестрикционный анализ как в данном исследовании, или модификации, например мультиплексный MPLA-анализ с зондами.

2.7 Проведение секвенирования по Сэнгеру с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)

FLT3 положительные продукты ПЦР очищали с помощью реагента ExoSAP-IT (Applied Biosystems, США). Реагент очищает ампликоны от неиспользованных dNTPs (щелочная фосфатаза) и праймеров (экзонуклеаза I), оставшихся в смеси продуктов ПЦР, для их использования в последующей секвенирующей ПЦР.

Чистку ампликонов проводили по следующему протоколу:

1. Реагент EhoSAP-IT хранится в морозильнике при -20°C, поэтому реактив нельзя размораживать.

2. В новых пробирках к 5 мкл ПЦР-продукта вносили 2 мкл EhoSAP-IT-реагента.

3. Пробы переносили в MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США) и инкубировали по следующей программе: при 37 °C в течение 15 минут для чистки и при 80°C в течение 15 минут для инактивирования EhoSAP-IT реагента.

Секвенирующую ПЦР проводили с помощью набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на приборе Veriti (Applied Biosystems, США). Программа амплификации и схема приготовления реакционной смеси на одну пробу представлены в таблице 7. Число пробирок составляло N*2 – на каждый образец приходилось по две пробирки для прямого и обратного праймера в отдельности.

Таблица 7 – Протокол секвенирующей ПЦР

Программа амплификации			Реакционная смесь объемом 10 мкл (1 проба)	
96 °C	1 мин	1 цикл	dH ₂ O	3 мкл
96 °C	10 сек	25 циклов	Смесь реакционного буфера и mix*	3 мкл
50 °C	5 сек		Forward/Reverse	2 мкл
60 °C	4 мин		Ампликоны**	2 мкл

*Отдельно готовили смесь на все пробы N*2. На одну пробирку: 1 мкл 5X Sequencing Buffer и 2 мкл BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix.

**Если полоска ампликонов была слабая на электрофореze, то вносили 3,5 мкл ампликонов и 1,5 мкл dH₂O.

Продукты секвенирующей ПЦР очищали с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США) по следующему протоколу:

1. В новые пробирки к 5 мкл сиквенс-продукта добавляли 22,5 мкл реагента SAM™ Solution (для производительности второго компонента).

2. Суспендировали реагент XTerminator™ Solution и вносили по 5 мкл (для удаления меченных ddNTPs).

3. Пробирки переносили на 30 минут в шейкер.

4. После пробы пипетировали и переносили по 31,5 мкл в плашку севенатора и центрифугировали для сброса капель и осаждения XTerminator™ Solution на дне плашки.

Капиллярный электрофорез также проводили с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), а обработку результатов секвенирования – в Sequence Scanner software (Applied Biosystems, США).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 32 по 47 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана тест-система для выявления и количественного анализа ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* на основе фрагментного анализа.

2. Использование разработанной тест-системы позволило выявить *FLT3*-ITD мутации у 5 пациентов (2 из которых дети) из 18 случаев ОМЛ, определить длину tandemного повтора у каждого образца и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля.

3. Среди 18 пациентов, проанализированных разработанной тест-системой, *FLT3*-TKD мутаций не было обнаружено.

4. Результаты, полученные при использовании фрагментного анализа, полностью соответствуют результатам, полученным при проведении других молекулярно-генетических технологий. На примере 19 образцов было показано преимущество использования фрагментного анализа для исследования мутаций в гене *FLT3* перед секвенированием по Сэнгеру.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

bp – base pair
dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат
ELN – Европейской классификации риска лейкемии
FL – лиганд FLT3
FLT3 – *fms*-подобная тирозинкиназа 3
FLT3-ITD – мутации в гене *FLT3*, представленные внутренними тандемными повторами
FLT3-TKD – мутации в гене *FLT3*, представленные однонуклеотидными заменами в петле активации
HRM – High Resolution Melt (плавление с высоким разрешением)
JM – юкстамембранный домен
KL – лиганд Kit
mt – мутантный продукт
NES – сигнал ядерного экспорта
NLS – сигнал ядерной локализации
NPM1 – нуклеофосмин
WT – диким типом
A-петля – петля активации фермента
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
МДС – миелодиспластический синдром
МПН – миелопролиферативные новообразования
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ПААГ – полиакриламидный гель
ПДРФ-анализ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
ПЦР – полимеразная+ цепная реакция
РТК – рецепторные тирозинкиназы
ТК – тирозинкиназный домен
ФАБ – франко-американо-британская система классификации ОМЛ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Nakao M. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia / M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, [et al]. // *Leukemia*. – 1996. – V.10. – I.12. – P.1911-1918.
- 2 Meshinchi S. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML / S. Meshinchi, T.A. Alonzo, D.L. Stirewalt, [et al]. // *Blood*. – 2006. – V.108. – I.12. – P.3654-3661.
- 3 Arber D.A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, [et al] // *Blood*. – 2016. – V.127. – I.20. – P.2391-2405.
- 4 Döhner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade, [et al] // *Blood*. – 2017. – V.129. – I.4. – P.424-447.
- 5 Паровичникова Е.Н.. Итоги многоцентрового исследования по лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко, В.Г. Исаев, [и др.] // *Терапевтический архив*. – 2007. – Т.79. – №7. – С.14-9.
- 6 Vardiman J.W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / J.W. Vardiman, J. Thiele, D.A. Arber, [et al] // *Blood*. – 2009. – V.114. – I.5. – P. 937-951.
- 7 Домнинский Д.А. Гемобластозы миелоидного происхождения / Д.А. Домнинский // *Онкогематология*. – 2011. – Т.6. – №3. – С.82-93.
- 8 Савченко В.Г. Острые лейкозы / В.Г.Савченко, Е.Н.Паровичникова // *Клиническая онкогематология: руководство для врачей*. Под ред. Волковой М.А.. 2-е изд., перераб. и доп. – 2007. – P. 409-502.
- 9 Kulsoom B. Clinical presentation of acute myeloid leukaemia - A decade-long institutional follow-up/ B. Kulsoom // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2017. – V. 67. – I.12. – P. 1837–1842.
- 10 Клинические рекомендации 2020 г. «Острые миелоидные лейкозы» / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России» [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://oncology-association.ru/files/clinical-guidelines-2020/ostrye_mieloidnye_lejkozy.pdf
- 11 Juliusson G. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry / G. Juliusson, P. Antunovic, A. Derolf, [et al] // *Blood*. – 2009. – V.113. – I.18. – P. 4179-87
- 12 Kantarjian H. Questions regarding frontline therapy of acute myeloid leukemia / H. Kantarjian, S. O'Brien // *Cancer*. – 2010. – V.116. – I.21. – P.4896-901.
- 13 Estey E.H. How I treat older patients with AML / E.H. Estey // *Blood*. – 2000. – V.96. – P.1670–1673.

14 Ok, C. Y. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases / C. Y. Ok, K. P. Patel, G. Garcia-Manero // *Leukemia research*. – 2015. – V.39. – I.3. – P.348-354.

15 Burnett A.K. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia / A.K. Burnett, M. Wetzler, B. Lowenberg // *J Clin Oncol*. – 2011. – V.29. – I.5. – P.487-494.

16 Breems D.A. Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation / D.A. Breems, B. Lowenberg // *Semin Hematol*. – 2007. – V.44. – I.4. – P.259-266.

17 Schlenk R.F. Risk adapted post-remission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German Multicenter AML HD93 treatment trial / R.F.Schlenk, A. Benner, F. Hartmann, [et al]. // *Leukemia*. – 2003. – V.17. – I.8. – P.1521-1528.

18 Грицаев С.В. Возраст и кариотип – факторы риска у больных первичным острым миелоидным лейкозом / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Л.С. Мартыненко, [и др] // *Клиническая онкогематология/Фундаментальные исследования и клиническая практика*. – 2010. – Т.3. – №4. – С.359-364.

19 Флейшман Е.В. Возрастные особенности цитогенетических изменений при острых миелоидных лейкозах / Е.В. Флейшман, О.И. Сокова, А.В. Попа // *Онкогематология*. – 2007. – Т.4. – С.12-6.

20 Lowenberg B. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group / B. Lowenberg, R. Zittoun, H. Kerkhofs, [et al] // *J Clin Oncol*. – 1989. – V.7. – P.1268–1274.

21 Pulsoni A. Survival of elderly patients with acute myeloid leukemia / A. Pulsoni, L. Pagano, R. Latagliata, [et al] // *Haematologica*. – 2004. – V.89. – P.296-302.

22 Ковалева Л.Г. Острые лейкозы. – 2-е изд., перераб. и доп. / Ковалева Л.Г. - М.: Медицина, 1990. – 272 с.

23 Appelbaum F.R. Age and acute myeloid leukemia / F.R. Appelbaum, H. Gundacker, D.R. Head, [et al] // *Blood*. – 2006. – V.107. – I.9. – P.3481-5.

24 Sekeres M.A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes / M.A. Sekeres // *Hematol Oncol Clin North Am*. – 2010. – V.24. – I.2. – P.287-94.

25 Shallis R.M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges / R.M. Shallis, [et al]. // *Blood*. – Rev. 2019. – V. 36. – P. 70–87.

26 Parkin D.M . Cancer Incidence in Five Continents / D.M. Parkin, J. Ferlay, L. Raymond, J. Young // *IARC Scientific Pub*. – 1997. – V.7. – I.143.

- 27 Lemmon M. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M. Lemmon, J. Schlessinger // *Cell*. – 2010. – V.141. – P.1117-34.
- 28 Toffalini F. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases / F. Toffalini, J.B. Demoulin // *Blood*. – 2010. – V.116. – P.2429-37.
- 29 Krivtsov A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development / A. Krivtsov, S. Armstrong // *Nat Rev Cancer*. – 2007. – V.7. – P.823-33.
- 30 Bullinger L. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways / L. Bullinger, K. Döhner, H.Döhner // *J Clin Oncol*. – 2017. – V.35. – I.9. – P.934-46.
- 31 Szankasi P. A new DNA-based test for detection of nucleophosmin exon 12 mutations by capillary electrophoresis / P. Szankasi, M. Jama, D.W. Bahler // *J Mol Diagn* – 2008. – V.10. – I.3. – P.236-241.
- 32 Виноградов А.В. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом / А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, Д.В. Изотов, А.Г. Сергеев // *Вестник уральской медицинской академической науки*. – 2016. – №4. – С. 38-51.
- 33 Metzeler K.H. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia / K.H. Metzeler, T. Herold, M. Rothenberg-Thurle, [et al] // *Blood*. – 2016. – V. 128. – №5. – P.686-698.
- 34 Radtke I. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia / I. Radtke, C. Mullighan, M. Ishii, [et al] // *PNAS*. – 2009. – V.106. – P.12944-9.
- 35 Tripon, F. Simultaneous FLT3, NPM1 and DNMT3A mutations in adult patients with acute myeloid leukemia – case study / F. Tripon, G. Crauciuc, V. Moldovan, [et al] // *Revista Romana de Medicina de Laborator*. – 2019. – V.27. – I.3. – P. 245-254.
- 36 Mevatee P. FLT3-ITD, NPM1, and DNMT3A Gene Mutations and Risk Factors in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Patients in Upper Northern Thailand / P. Mevatee, A. Tantiworawit, P. Traisathit, [et al] // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2017. – V.18. – I.11. – P.3031-9.
- 37 Loghavi S. Clinical features of de novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations / S. Loghavi, Z. Zuo, F. Ravandi, [et al] // *J Hematol Oncol*. – 2014. – V.7. – P.74.
- 38 Chou W.C. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution / W.C. Chou, J.L. Tang, [et al] // *Cancer Res*. – 2006. – V.66. – P. 3310-3316.

39 Matthews, W. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations / W. Matthews, C. T Jordan, G. W. Wiegand, [et al] // *Cell*. – 1991. – V.65. – I.7. – P.1143-1152.

40 Gilliland, D.G. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia / D.G. Gilliland, J.D. Griffin // *Blood*. – 2002. – V.100. – I.5. – P.1532-1542.

41 Hannum, C. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs / C. Hannum, J. Culpepper, D.Campbell, [et al] // *Nature*. – 1994. – V.368. – I.6472. – P.643.

42 Janke, H. Activating FLT3 Mutants Show Distinct Gain-of-Function Phenotypes In Vitro and a Characteristic Signaling Pathway Profile Associated with Prognosis in Acute Myeloid Leukemia / H. Janke, F. Pastore, D. Schumacher, [et al] // *PLOS ONE*. – 2014. – V.9. – I.3. – P.e89560.

43 Schnittger S. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (Exons 13–15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data / S. Schnittger, U. Bacher, C. Haferlach, [et al] // *Genes Chromos Cancer*. – 2012. – V.51. – I.10. – P.910–24.

44 Kayser S. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome / S. Kayser, R.F. Schlenk, M.C. Londono, [et al] // *Blood*. – 2009. – V.114. – I.12. – P.2386-2392.

45 Matsumura I. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies / I. Matsumura, M. Mizuki, Y. Kanakura // *Cancer Sci*. – 2008. – V.99. – P.479-85.

46 Griffith J. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain / J. Griffith, J. Black, C. Faerman, [et al] // *Mol Cell* – 2004. – V.13. – P.169-78.

47 Gu T. Survey of Activated FLT3 Signaling in Leukemia / T. Gu, J. Nardone, Y. Wang, [et al]. // *PLoS ONE*. – 2011. – V.6. – I.4. – e19169.

48 Chan P.M. Differential signaling of FLT3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. / P.M. Chan // *Protein Cell*. – 2011. – V.2. – I.2. – P.108-115

49 Kottaridis P. 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 / P. Kottaridis, R. Gale, M. Frew, [et al] // *Blood*. – 2001. – V.98. – I.6. – P.1752-9.

50 Liu S.B. Impact of FLT3-ITD length on prognosis of acute myeloid leukemia. / S.B. Liu, H.J. Dong, X.B. Bao, [et al] // *Haematologica*. – 2019. – V.104. – I.1. – P.9-12

51 Зайкова Е.К. Молекулярная диагностика мутаций гена FLT3 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами / Е.К. Зайкова, Е.В.

Белоцерковская, Д.В. Зайцев, [и др] // Клиническая онкогематология. – 2020. – Т.13. – №2. – С.150-60.

52 Bagrintseva K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L) / K. Bagrintseva, S. Geisenhof, R. Kern, [et al]. // Blood. – 2005. – V.105. – I.9. – P.3679-85.

53 Wang W. Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia Co-operative Group. / W. Wang, X.Q. Wang, X.P. Xu, G.W. Lin // J Int Med Res. – 2010. – V.38. – I.2. – P.432-442

54 Гук Л.В. Анализ частоты и прогностического значения мутаций генов FLT3, с-KIT и NPM1 у детей с острым миелобластным лейкозом / Л.В. Гук, Т.В. Савицкая, Д.А. Домнинский //Онкогематология. – 2009. – № 4. – С.27-32

55 Thiede C. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis / C. Thiede, C. Steudel, B. Mohr, [et al]. // Blood – 2002. – V.99. – I.12. – P.4326-35.

56 Lin P. Activating FLT3 mutations are detectable in chronic and blast phase of chronic myeloproliferative disorders other than chronic myeloid leukemia. / P. Lin, D. Jones, L.J. Medeiros, [et al] // Am J Clin Pathol. – 2006. – V.126 –I.4 – P.530-533

57 Deeb K.K. Deletion and deletion/ insertion mutations in the juxtamembrane domain of the FLT-3 gene in adult acute myeloid leukemia / K.K. Deeb, M.T. Smoskey, H.C. Defedericis, [et al]. // Leuk Res Rep. – 2014. –V.3. – I.2. – P.86-9.

58 Falini B. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features / B. Falini, I. Nicoletti, M. F. Martelli, [et al] // Blood. – 2007. – V.109. – I.3. – P.874-885.

59 Yu Y. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export / Y. Yu, L.B. Maggi Jr, S.N. Brady, [et al] // Mol Cell Biol. – 2006. – V.26. – P.3798-3809.

60 Fukuda M. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal / M. Fukuda, S. Asano, T. Nakamura, [et al]. // Nature. – 1997. – V.390. – P.308-311.

61 Falini B. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML / B. Falini, N. Bolli, J. Shan, [et al]. // Blood. – 2006. – V.107. – P.4514-4523.

62 Falini B. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype / B. Falini, C. Mecucci, E. Tiacci,[et al].// N Engl J Med. – 2005. – V.352. – P.254-266.

63 Lin L. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias / L. Lin, T. Lin, W. Chou, [et al] // *Leukemia* – 2006. – V.20. – P.1899-1903

64 Wertheim G. Nucleophosmin(NPM1) mutations in acute myeloid leukemia: An ongoing (cytoplasmic) tale of dueling mutations and duality of molecular genetic testing methodologies. / G. Wertheim, A. Bagg // *J Mol Diagnost.* – 2008. – V.10. – I.3. – P.198-202.

65 Meshinchi S. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. / S. Meshinchi, R.Arceci // *Oncologist.* – 2007. – V.12. – P.341-55.

66 Силин А. Е. Мутационный анализ генов FLT3 и NPM1 в группе взрослых пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым нелимфобластным лейкозом / А. Е. Силин, Ж. М. Козич, В. К. Шпудейко // *Проблемы здоровья и экологии.* – 2011. – С. 85-90.

67 Kumar D. NPM1 Mutation Analysis in Acute Myeloid Leukemia: Comparison of Three Techniques - Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Real-Time Polymerase Chain Reaction. / D. Kumar, A. Mehta, M.K. Panigrahi, [et al] // *Turk J Haematol.* – 2018. – V.35. –I.1. – P.49-53.

68 Huet S. New Quantitative Method to Identify NPM1 Mutations in Acute Myeloid Leukaemia / S. Huet , L. Jallades, C. Charlot // *Leukemia Research and Treatment.* –2013. – ID 756703.

69 O'Donnell M.R. Acute myeloid leukemia, version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. / M.R. O'Donnell, M.S. Tallman, C.N. Abboud, [et al]. // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2017. – V.15. – I.7. – P.926-57.

70 Kim Y. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length / Y. Kim, G.D. Lee, J. Park, [et al]. // *Blood Cancer J.* – 2015. – V.5. – I.8. – e336.

71 Thiede C. FLT3 mutation Assay Laboratory Cross Validation: Results from the CALGB 10603/Ratify Trial in Patients with Newly Diagnosed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML). / C. Thiede, T. Prior, S. Lavorgna, [et al]. // *Blood.* – 2018. – V.132. – Suppl_1:2800.

72 Daver N. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence / N. Daver, R.F. Schlenk, N.H. Russell, [et al]. // *Leukemia.* – 2019. – V.33. – I.2. – P.299-312.

73 LeukoStrat® CDx FLT3 Mutation Assay [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://invivoshop.wpengine.com/product/leukostrat-cdx-flt3-mutation-assay/>

74 Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? / M. Levis // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* – 2013. – V.2013. – P.220-6.

75 Tan, A.Y. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 - internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia / A.Y. Tan, D.A. Westerman, D.A. Carney, [et al] // J Hematol Oncol. – 2008. – V.1. – I.10.

76 Chang, T.L. Simplified capillary electrophoresis detection of the Flt-3 internal tandem duplications and D835 point mutations in acute myeloid leukemia / T.L. Chang, M. Salto-Tellez, Y.K. Kueh, [et al] // Haematologica. – 2003. – V.88. – I.2. – ELT04.

77 Yamamoto, Y. Nakano, Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies / Y. Yamamoto, H. Kiyoi, Y. Nakano // Blood. – 2001. – V.97. – I.8. – P.2434-2439.



78 DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide, [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/global/forms/fragment-analysis-guide-registration-form.html>

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской
программы


Е. И. Шишацкая
« 13 »-  2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Определение соматических мутаций методом фрагментного анализа у
пациентов с диагнозом ОМЛ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

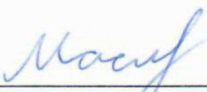
Научный
руководитель



подпись, дата

канд-т биол. наук
Т.Н. Субботина

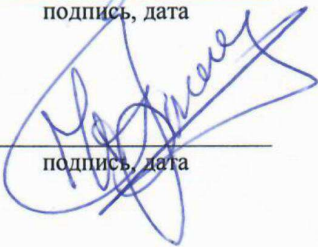
Выпускник



подпись, дата

И.Е. Маслюкова

Рецензент



подпись, дата

профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2020