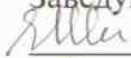


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Шишацкая Е.И.
« 22 » июня 2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология


Исследование экспрессии генов JAK2 и CALR у пациентов с сочетанными
соматическими мутациями при ХМО

Руководители


24.06.16г.

к. б. н. Субботина Т.Н.,
н. с. Горбенко А.С.

Выпускник


24.06.16г.

Николаева П.А.

Красноярск 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	5
1. Обзор литературы.....	5
1.1 Хронические миелопролиферативные опухоли	5
1.1.1 Эссенциальная тромбоцитемия	6
1.1.2. Первичный миелофиброз	7
1. 2 Кальретикулин, его структура и функции.....	10
2 Материалы и методы	15
2.1 Объект исследования	15
2.2 Выделение ДНК с использованием набора "ДНК-Сорб-В"	15
2.3 Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени на приборе «iCycler iQ5» (BioRad).	17
2. 4 Проведение электрофореза для выявления других типов мутаций в гене CALR.....	23
2.5 Статистический анализ.....	25
3. Результаты и обсуждения.....	26
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	28

ВВЕДЕНИЕ

Хронические миелопролиферативные опухоли (ХМО) - это группа заболеваний, включающая несколько клональных Ph-негативных гематологических болезней. К самым частым миелопролиферативным заболеваниям относятся истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). На сегодняшний день установлено наличие трех основных мутаций гемопоэтической стволовой клетки при этих патологиях: в гене янус-киназы (JAK2), в гене рецептора тромбоэтинового рецептора (MPL), в гене калиретикулина (CALR). Встречаемость мутации JAK2 среди пациентов с ИП составляет 95%, с ЭТ - 50-70%, с ПМФ - 40-50%. Встречаемость мутации MPL среди пациентов с ПМФ и ЭТ составляет 8% и 10% соответственно. Встречаемость мутации CALR среди пациентов с ПМФ и ЭТ составляет 35% и 25% соответственно [1].

CALR является многофункциональным кальций-связывающим белком эндоплазматического ретикулума (ЭР) и принимает участие в формировании третичной структуры белков. В гене CALR встречается около 60 мутаций, но выделяют 2 типа стандартных мутаций. При 1 типе происходит делеция 52 нуклеотидов, при 2 типе происходит инсерция 5 нуклеотидов, встречаемость этих двух мутаций составляет 88% от всех мутаций в гене CALR.

Поскольку роль мутаций в гене CALR в развитии ХМО была показана сравнительно недавно, то в России данный анализ только начинает использоваться в некоторых лабораториях, занимающихся анализом соматических мутаций при данных патологиях.

Мутации в гене CALR обуславливают развитие клинической картины ЭТ и ПМФ и предлагаются в качестве обязательного лабораторного теста для подтверждения диагноза. Немаловажное значение имеет количественное определение уровня аллельной нагрузки соматических мутаций в гене CALR - количества пораженных аллелей, выраженное в процентах. Уровень аллельной

нагрузки может значимо отражать стадию развития, прогрессивность заболевания и эффективность терапии [2].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы явилось исследование уровня аллельной нагрузки соматических мутаций в гене CALR у пациентов с ХМО.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать пациентов с подозрением на ХМО на наличие мутаций в гене CALR.
2. Определить распространенность отдельных типов мутаций при ЭТ и ПМФ.
3. Определить уровень аллельной нагрузки соматических мутаций в гене CALR.
4. Сравнить содержание форменных элементов крови среди групп пациентов с различным типом исследуемых мутаций и аллельной нагрузкой в гене CALR.

Работа выполнялась в Красноярском филиале ФГБУ Гематологического научного центра Минздрава России.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обзор литературы

1.1 Хронические миелопролиферативные опухоли

ХМО - это группа, включающая несколько Ph-негативных гематологических болезней. К самым частым миелопролиферативным опухолям ИП, ЭТ и ПМФ. Их происхождение связано с трансформацией гемопоэтической стволовой клетки, результатом чего служит чрезмерная продукция зрелых клеток эритроидного, мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков с относительно чрезмерным течением заболевания [3].

Для группы ХМО характерны следующие признаки:

1. Преобладание клонального гемопоэза над нормальным;
2. Повышенная продукция форменных элементов одного или более ростка гемопоэза при отсутствии физиологических стимулов;
3. Вовлечение в опухолевый процесс полипотентной гемопоэтической клетки;
4. Способность к развитию экстрамедуллярного гемопоэза;
5. Способность к клональной эволюции и трансформации в острый лейкоз [4].

На сегодняшний день установлено наличие трех основных мутаций гемопоэтической стволовой клетки, встречающихся при ХМО: в гене JAK2, в гене MPL, CALR. Встречаемость мутаций в гене JAK2 среди пациентов с ИП составляет 95%, с ЭТ - 50-70%, с ПМФ - 40-50%. Встречаемость мутаций в гене MPL среди пациентов с ПМФ и ЭТ составляет 8% и 10% соответственно. Встречаемость мутаций в гене CALR среди пациентов с ПМФ и ЭТ составляет 35% и 25% соответственно [5].

1.1.1 Эссенциальная тромбоцитемия

Эссенциальная тромбоцитемия - это редкое заболевание клональной неопластической природы, которое характеризуется гиперплазией мегакариоцитарного ростка костного мозга, персистирующим тромбоцитозом и предрасположенностью к тромбозам и кровотечениям [6-8].

Заболеваемость составляет 1,5-2,53 случая на 100000 населения. Максимум заболевания приходится на возраст 50-60 лет, хотя доля лиц молодого возраста тоже значительна. Соотношение мужчин и женщин приблизительно равное. Однако среди больных молодого возраста преобладают женщины.

Этиология и патогенез заболевания не установлены. Ведущей гипотезой возникновения ЭТ считается предрасположенность к болезни, которая реализуется под воздействием главным образом внешних факторов, повреждающих геном нормальной клетки и приводящих к ее злокачественной трансформации [9]. Одним из ключевых моментов патогенеза во всей группе ХМО считается активация сигнального пути JAK/STAT, вызванная наличием мутаций в генах JAK2, MPL и CALR.

Показана прогностическая роль различных молекулярно-генетических маркеров. Трансформация ЭТ в ИП наблюдалась только у пациентов с мутацией JAK2V617F. Наилучшая выживаемость и наименьший риск тромбозов (в 2 раза ниже, чем при JAK2V617F-позитивной ЭТ) были у больных с мутациями CALR. Наихудший прогноз имели больные без клональных маркеров (мутации JAK2V617F, MPL и CALR), так называемые (triple-negative) случаи ЭТ [10].

Симптомы заболевания наиболее часто связаны с нарушениями микроциркуляции: акроцианозом, эритромелалгией (периферическим ангиотрофоневрозом, проявляющимся болью, жжением и перестезией в пальцах кистей и стоп), вторичным синдромом Рейно, прогрессированием сердечно-сосудистых заболеваний, ухудшением зрения, перемежающейся хромотой, приапизмом. Нередко болезнь манифестирует геморрагический

синдром - кровотечениями при минимальных травмах, амбулаторных хирургических манипуляциях.

Обращение к гематологу часто связано с выявлением гипертромбоцитоза при лечении по поводу состоявшегося инсульта, инфаркта миокарда. Возможны тромбозы сосудов сетчатки глаза или кровоизлияния в сетчатку и стекловидное стекло. При ЭТ у лиц молодого возраста нередко могут произойти сосудистые катастрофы с рецидивирующими тромбозами различных локализаций [11].

Для верификации диагноза Международной рабочей группой по диагностике и лечению ЭТ в 2007 г. были разработаны диагностические критерии, принятые Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2008 г. После открытия патогенетической роли мутаций в гене CALR в 2013 г. были пересмотрены диагностические критерии и выдвинуты предложения по новым критериям диагностики ЭТ. В новой редакции диагностические критерии ЭТ состоят из четырех больших и одного малого критериев.

Большие критерии:

1. Постоянный тромбоцитоз более $450 \cdot 10^9$ /л.
2. В биоптате костного мозга пролиферация мегакариоцитов с повышенным числом зрелых форм большого размера.
3. Отсутствие диагностических критериев ВОЗ для ИТ, ПМФ, ХМЛ или других миелоидных неоплазий, согласно классификации ВОЗ-2008.
4. Наличие мутаций JAK2V617F, CALR или MPL.

Малый критерий:

1. Наличие клональных маркеров (например, цитогенетических аббераций) или отсутствие признаков реактивного тромбоцитоза.

Для верификации диагноза ЭТ требуется наличие 4 больших критериев или 3 больших и 1 малого критериев [12].

1.1.2. Первичный миелофиброз

Первичный миелофиброз - это хроническое миелопролиферативное

новообразование, которое характеризуется фиброзом костного мозга, спленомегалией, экстрамедуллярным гемопоэзом. Источником опухолевого роста является клональное расстройство полипотентной гемопоэтической стволовой клетки.

ПМФ - редкое заболевание, число впервые выявленных больных в год составляет приблизительно 1:100000 населения. Соотношение женщины:мужчины 2:1, медиана возраста на момент диагностики заболевания равна 61,8 года.

При ПМФ имеет место клональная пролиферация мегакариоцитов, моноцитов/макрофагов, гистиоцитов, что сопровождается повышенной секрецией этими клетками тромбоцитарного ростового фактора, фактора роста фибробластов, трансформирующего ростового фактора, сосудистого ростового фактора и некоторых других цитокинов, что приводит к реактивной пролиферации фибробластов и вторичному фиброзу, остеосклерозу, неэффективному эритропоэзу. ПМФ характеризуется увеличением числа циркулирующих в крови гемопоэтических клеток-предшественниц, гемопоэтических стволовых клеток, эндотелиальных клеток-предшественниц и экстрамедуллярным гемопоэзом, что сопровождается гепато-спленомегалией с миелоидной метаплазией данных органов [13].

Этиология заболевания до сих пор не установлена. Ведущей гипотезой возникновения считается предрасположенность к болезни, которая реализуется под воздействием внешних факторов, повреждающих геном нормальной гемопоэтической клетки и приводящих к ее злокачественной трансформации [14-16]. Молекулярно-генетические механизмы, приводящие к развитию ПМФ, широко изучаются в настоящее время. Вероятным молекулярно-генетическим механизмом развития болезни могут быть активация JAK2 киназы, мутации в генах CALR или MPL.

Клиническая картина при ПМФ характеризуется многообразием проявлений. Начальный период болезни у большинства больных протекает подчас бессимптомно. Признаки заболевания нередко обнаруживаются

неожиданно при анализе крови при профилактических осмотрах или по поводу сопутствующей патологии. Начальные клинические проявления ПМФ не имеют патогномоничных симптомов и складываются из:

- синдрома опухолевой интоксикации - прогрессирующая слабость, не всегда соответствующая степени тяжести анемия, снижение аппетита, потеря веса, субфебрильная температура, потливость, боли в костях, суставах, кожный зуд, ухудшение течения сопутствующих заболеваний. Признаки данного синдрома можно выявить при внимательном сборе анамнеза у большинства больных;

- синдрома опухолевой пролиферации - боли и чувство тяжести в левом боку, связанные с увеличением размеров селезенки, которое можно определить при пальпаторном исследовании более чем у 90% больных. Нередко обнаруживается также увеличение размеров печени. При длительном течении заболевания очаги экстрамедуллярного кроветворения выявляются в лимфатических узлах, позже в мягких тканях конечностей;

- анемического синдрома - общая слабость, одышка, снижение толерантности к физической нагрузке, бледность кожи и слизистых оболочек, тахикардия, ухудшение течения сердечно-сосудистых заболеваний;

- тромбоэтических осложнений - тромбозы и тромбоэмболии сосудов различных органов и тканей, которые могут возникать даже при бессимптомном течении ПМФ и нередко служат поводом к обследованию установлению диагноза;

- инфекционных осложнений - развитие оппортунистических или более тяжелое течение обычных инфекций;

- геморрагического синдрома - кровоточивость, патехии, кровоизлияния.

С целью верификации диагноз ПМФ международной рабочей группой в 2007 г. разработаны диагностические критерии, утвержденные ВОЗ, и широко используемые для постановки этого диагноза [17]. После открытия патогенетической роли мутаций в гене CALR, в 2014 г. был проведен

пересмотр диагностических критериев, составлены предложения по новым критериям диагностики ПМФ. В новой редакции диагностические критерии ПМФ состоят из 3 больших и 3 малых критериев.

Большие критерии:

1. Проплиферация мегакариоцитов с признаками атипичности в сочетании с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом (при отсутствии фиброза изменения мегакариоцитов сопровождаются повышенной клеточностью, пролиферацией гранулоцитов, часто снижением эритропоэза).

2. Не соответствует критериям ВОЗ для диагностики ХМЛ, ИП или других миелопролиферативных новообразований.

3. Обнаружение мутаций в генах JAK2, CALR или MPL.

Малые критерии:

1. Наличие клональных маркеров (например, аберрантного кариотипа) или отсутствие признаков реактивного фиброза костного мозга.

2. Наличие анемии или пальпируемой спленомегалии.

3. Наличие лейкоэритробластоза периферической крови или повышение уровня лактатдегидрогеназы крови.

Для верификации диагноза ПМФ по вновь разработанным критериям требуется подтверждение 3 больших критериев или первого или второго больших критериев и всех 3 малых критериев [12].

1. 2 Кальретикулин, его структура и функции

Кальретикулин (CALR) представляет собой многофункциональный белок молекулярным весом 46 КДа, расположенный преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Ген CALR расположен на коротком плече 19 хромосомы и состоит из 9 экзонов, составляющих три домена: N-домена, P-домена и C-домена [18]. Схематическое представление структурных доменов CALR представлено на рисунке 1.

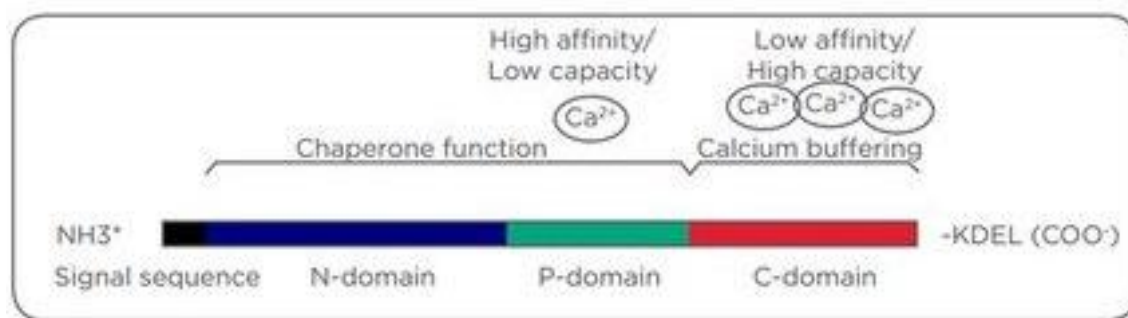


Рисунок 1 - Структура CALR. Схематическое представление структурных доменов CALR

N-домен представляет собой глобулярный домен, содержащий 8 антипараллельных β -нитей [19]. Этот домен может взаимодействовать с α -интегринами ДНК-связывающим сайтом стероидного рецептора [20]. Дисульфидная связь, образованная остатками цистеина в N-домене может взаимодействовать с P-доменом для создания важной шаперонной функции CALR [21]. Богатый пролином P-домен содержит два набора трех повторяющихся регионов [22]. Эти повторяющиеся последовательности аминокислот образуют шаперонную структуру, которая отвечает за сворачивание белков. Кислый C-домен CALR имеет очень важное значение для присоединения Ca^{2+} [23]. Известно, что присоединение Ca^{2+} к этой области играет важнейшую роль в взаимодействии с другими белками шаперонами в ЭР [24]. В ЭР существует аминокислотная последовательность (KDEL), способная связываться с CALR, поэтому ЭР обогащен этим белком. CALR также может концентрироваться в цитозоле и на поверхности клетки [25]. Также известно, что C-домен имеет важное значение для CALR при миграции его из просвета ЭР в цитозоль [26]. Дальнейшие исследования показали, что процесс миграции инициируется истощением ЭР Ca^{2+} [27]. Кроме того, некоторые исследования показали на то, что цитоплазматический CALR может взаимодействовать с цитоплазматическим хвостом α -интегрина [28]. Более того на клеточной поверхности CALR связан с фагоцитарным поглощением и иммуногенностью клеток. Таким образом, CALR является многофункциональным белком, который может участвовать в различных физических и патологических процессах.

Двумя основными функциями CALR внутри ЭР являются шаперонная функция и функция регулирования кальциевого гомеостаза. Кроме того, существующие исследования показывают, что CALR, находящийся не на ЭР, регулирует важные биологические функции, в том числе адгезию клеток, экспрессию гена и стабильность рибонуклеиновой кислоты (РНК).

ЭР является важной органеллой для синтеза, сворачивания и транспортировки секреторных белков. Эти функции выполняются с помощью молекулярных шаперонов, которые обеспечивают правильное сворачивание белков. CALR является одним из хорошо охарактеризованных шаперонов для многих белков [29]. Недавние исследования показали, что CALR участвует в процессе синтеза белков, в том числе интегринов, поверхностных рецепторов и транспортеров.

Ca^{2+} в основном хранится в просвете ЭР и является универсальной сигнальной молекулой, затрагивающая многие области развития и клеточные процессы [30]. CALR рассматривается как внутриклеточный регулятор Ca^{2+} , так как он содержит два Ca^{2+} -связывающих домена. Более 50% клеточного Ca^{2+} , связанного с CALR, хранится в просвете ЭР. Таким образом, высокий уровень содержания CALR может привести к увеличению хранения внутриклеточного Ca^{2+} [31]. В отличие от этого, CALR-дефицитные клетки имеют более низкую способность к хранению Ca^{2+} в просвете ЭР. Таким образом, CALR играет важную роль в процессе гомеостаза Ca^{2+} .

Ген CALR дикого типа высоко консервативен и кодирует 417-аминокислотный белок. В С-домеене гена CALR встречается около 60 типов мутаций, но выделяют два основных типа мутации: 1 тип - с.1092_1143del (p.L367fs*46), при котором происходит делеция 52 нуклеотидов, и 2 тип - с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47), при котором происходит инсерция 5 нуклеотидов. Следует отметить, что в гене CALR на С-концевом домене находятся отрицательно заряженные аминокислоты, которые способны связываться с аминокислотной последовательностью KDEL на ЭР. При мутации происходит сдвиг рамки считывания, поэтому мутантный белок с

положительно заряженным С-концевым доменом не способен связываться с аминокислотной последовательностью KDEL. Мутантный белок мигрирует в цитозоль и присоединяется С-концевым доменом к рецептору MPL, тем самым способствует его активации. На рисунке 2 показано схематическое изображение механизма мутантного CALR, приводящего к опухолевой трансформации.

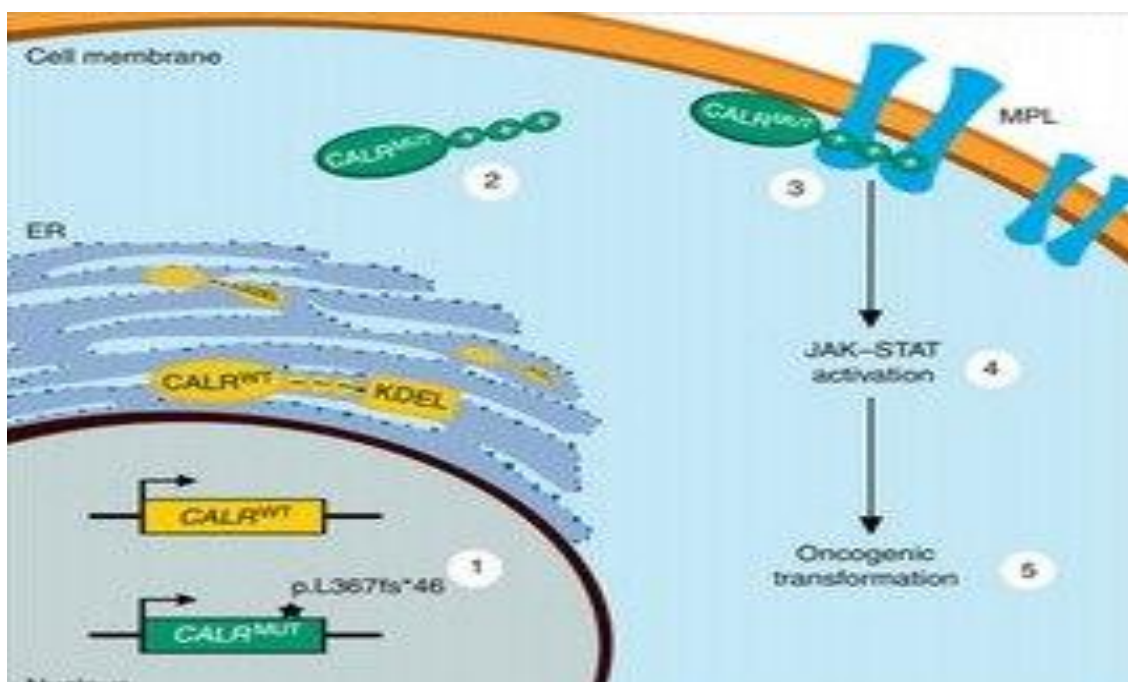


Рисунок 2 - Схематическое изображение механизма мутантного CALR, приводящего к опухолевой трансформации

На 1 этапе происходит мутация в 9 экзоне гена CALR со сдвигом рамки считывания. В результате синтезируется мутантный белок CALR с положительным заряженным С-концевым доменом вместо отрицательно заряженного С-концевого домена дикого типа CALR. На втором этапе показано, что мутантный CALR не способен удержаться на ЭР и мигрирует в цитозоль. На 3 этапе С-концевой положительно заряженный домен присоединяется к тромбопоэтиновому рецептору MPL. На 4 и 5 этапах видно, что связывание мутантного CALR с MPL ведет к активации JAK/STAT пути, приводящего к опухолевой трансформации [32].

1 тип мутации устраняет почти все отрицательные заряда на С-концевом домене гена CALR, в то время как 2 тип мутации устраняет около половины

этих зарядов. У пациентов, имеющих 1 тип мутации, при ЭТ происходит сильное прогрессирование в ПМФ, в отличие от пациентов, имеющих 2 тип мутации. При ЭТ у 51% CALR-позитивных больных обнаруживается 1 тип мутации, у 39% - мутация 2 типа и оставшиеся 10% приходится на другие типы мутаций. При ПМФ у 70% CALR-позитивных больных обнаруживается 1 тип мутации, у 13% - мутация 2 типа и оставшиеся 17% приходится на другие типы мутаций.

Пациенты при ЭТ и ПМФ, имеющие мутацию в гене CALR, имеют более высокие количества тромбоцитов, низкий гемоглобин, более высокую выживаемость, чем пациенты, имеющие мутацию в гене JAK2 [33]. При ЭТ CALR-положительные случаи имеют более низкий риск тромбозов и более низкий риск развития сердечных заболеваний по сравнению с JAK2V617F-положительными случаями [34]. При ПМФ CALR-положительные пациенты моложе, имеют более высокие тромбоциты и лучший прогноз, чем JAK2V617F или MPLW515-положительные пациенты [35].

Для определения мутаций в гене CALR используют различные методы: секвенирование по Сэнгеру, фрагментный анализ, анализ кривых плавления и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с электрофоретической детекцией.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования явилась геномная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), выделенная из лейкоцитов периферической крови пациентов с подозрениями на ХМО. Кровь забиралась в вакутейнеры с ЭДТА.

2.2 Выделение ДНК с использованием набора "ДНК-Сорб-В"

ДНК выделяли стандартным методом с использованием набора "ДНК-Сорб-В" (ИнтерЛабСервис, Москва). Принцип метода основан на том, что исследуемый образец обрабатывается лизирующим раствором. В результате происходит деструкция клеточных мембран, биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. К лизирующему образцу добавляли сорбент. Далее растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и его последующей отмывке. При добавлении буфера для элюции к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования [36].

Выделение ДНК с использованием набора "ДНК-Сорб-В" осуществляли по следующей методике:

1. В 1,5 мл пробирку типа Eppendorf добавить по 1 мл гемолитика. Затем внести в пробирку с гемолитиком 250 мкл исследуемой цельной крови и перемешать на вортексе.
2. Оставить пробирку при комнатной температуре на 5 мин, еще раз перемешать на вортексе и оставить еще на 5 мин.

3. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Отобрать надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем, не задевая осадка.
4. Внести в пробирку 300 мкл лизирующего раствора. Пробу тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.
5. Добавить в пробирку 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирке центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель.
7. Добавить в пробу по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель.
8. Добавить в пробирку 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель.
9. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.
10. Поместить пробирку в термостат при температуре 65°С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышка пробирки должна быть открыта.
11. В пробирку добавить 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65°С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирку при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

2.3 Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени на приборе «iCycler iQ5» (BioRad).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой метод ферментативной наработки *in vitro* определенных, сравнительно коротких двуцепочечных фрагментов ДНК. В основе реакции лежит механизм, который в природе реализован при внутриклеточном удвоении (репликации) молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразой.

ПЦР-цикл состоит из тепловой денатурации ДНК, ее отжига с праймером и удлинения цепи (элонгация); смена этих этапов происходит в результате простого изменения температуры. В реакционную смесь добавляют специфические для данной последовательности олигонуклеотидные праймеры, которые образуют с ней комплекс, и проводят репликацию ДНК *in vitro* - амплификацию. Поскольку праймеры гибридизуются с обеими цепями ДНК, то нативная последовательность и синтезируемые ПЦР-продукты могут служить матрицами в последующих раундах репликации, в результате чего число копий уникальной последовательности экспоненциально увеличивается (Рисунок 3). Этот метод обладает двумя важными преимуществами: высокой чувствительностью и непродолжительностью анализа [37].

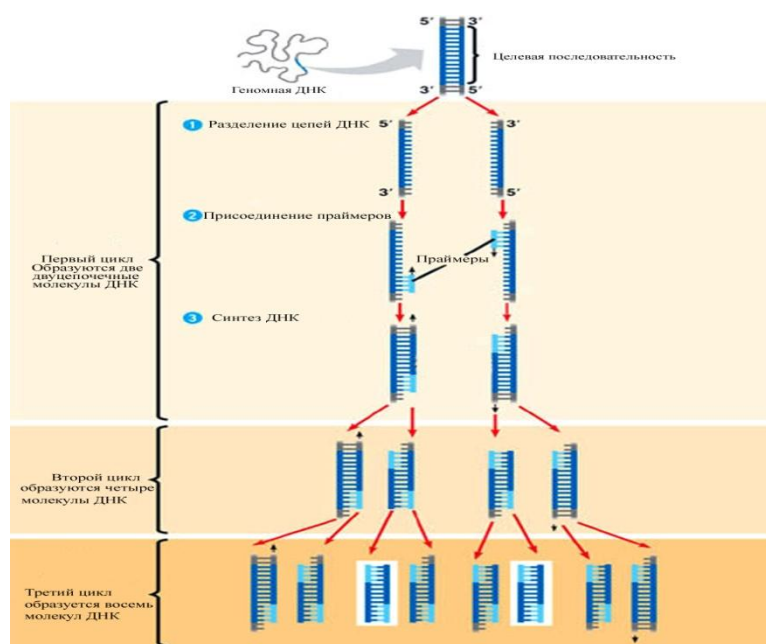


Рисунок 3 - Три цикла реакции ПЦР-амплификации ДНК

Отличительными чертами данного метода, в отличие от классической ПЦР, является возможность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, и автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Отсутствие стадии электрофореза позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов.

Детекция продуктов ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) стала возможной благодаря введению в реакцию флуоресцирующих реактивов, сообщающих об увеличении ДНК пропорциональным увеличением флуоресцентного сигнала. К флуоресцирующим веществам, используемым для этой цели, относятся TaqMan-зонды, присоединяющиеся к ДНК. Этот способ детекции основан на том факте, что флуоресценция значительно возрастает при накоплении ДНК в пробирке. Таким образом, можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации. [38].

Система TaqMan. В 1991 г. П. Холланд с соавт. предложили использовать 5'—>3'-эксонуклеазную активность Taq-полимеразы для контроля за эффективностью прохождения циклов ПЦР по освобождению в реакционную смесь флуоресцентной метки, ассоциированной с 5'-концевым нуклеотидом зонда. Именно этот подход лег в основу одного из наиболее широко распространенных современных методов количественной ПЦР в реальном времени. В разработке фирм Perkin-Elmer-Applied Biosystems данный метод получил название "TaqMan". При реализации этого подхода обычно используют Taq- или Tth-полимеразы, однако, в принципе, те же функции может выполнять любая другая ДНК-полимераза, обладающая 5'—>3'-эксонуклеазной активностью, например, ДНК-полимераза Tfl. В реакционную смесь, кроме двух обычных праймеров, добавляют олигонуклеотидный зонд, меченный по 5-концу флуорофором, а также содержащий в своей центральной или 3-концевой части тушитель флуоресценции. Зонд отжигается в каждом цикле ПЦР с центральным участком ампликона между двумя

амплифицирующими его праймерами. Для того, чтобы сам зонд не использовался в качестве праймера, его 3'-концевую гидроксильную группу блокируют ортофосфатом. Элонгацию праймеров проводят при той же температуре, что и температура отжига праймеров и зонда. Во время ПЦР на стадии элонгации праймера Taq-полимераза, достигнув 5'-конца зонда, начинает вытеснять его из дуплекса, а затем отщепляет 5'-концевой нуклеотид зонда, меченный флуорофором, в точке раздвоения цепей ДНК и зонда. Поскольку экзонуклеазная активность Taq-полимеразы специфична в отношении двухцепочечных ДНК, зонд, находящийся в реакционной смеси в свободном состоянии, остается интактным. По мере углубления ПЦР интенсивность флуоресценции реакционной смеси увеличивается, и это возрастание происходит ступенчато по завершению стадии элонгации праймера в каждом цикле ПЦР. Свободный зонд, находясь в растворе в контакте с тушителем флуоресценции, создает небольшой базальный уровень флуоресценции, который преодолевается по мере накопления свободного флуорофора в реакционной смеси. С этого момента, определяемого числом прошедших циклов ПЦР, которое называют порогом числа циклов (Ct - threshold cycle), появляется возможность наблюдать в реальном времени за кинетикой накопления флуорофора в реакционной смеси. Значение Ct обратно пропорционально количеству амплифицируемой матрицы в пробе. Чем выше концентрация амплифицируемой последовательности в реакционной смеси, тем меньшее количество циклов требуется для того, чтобы интенсивность флуоресценции освободившегося флуорофора в пробе превысила базальный уровень. Физическое разделение флуоресцентных красителей - репортера и тушителя флуоресценции - в процессе гидролитического разрушения зонда снимает подавление флуоресценции в анализируемой части спектра. Максимальный сигнал флуоресценции получают в том случае, если в зонде оба красителя максимально удалены друг от друга, т.е. находятся на 5'- и 3'-концах олигонуклеотида. Это вызвано, по-видимому, более эффективным расщеплением зонда ДНК-полимеразой. Поскольку ДНК-полимераза может

гидролизовать зонд лишь в составе гибрида с ДНК-матрицей, температура стадии элонгации праймера не должна превышать температуру плавления (T_m) гибрида. Большинство используемых зондов обладают $T_m \sim 70^\circ\text{C}$, поэтому на практике при проведении ПЦР в реальном времени в системе TaqMan стадии отжига зонда и праймеров, а также элонгации объединяют и проводят при $60-62^\circ\text{C}$. Это приводит к тому, что ДНК-полимераза функционирует в субоптимальных условиях и делает всю систему TaqMan менее эффективной и гибкой по сравнению с системами ПЦР в реальном времени, основанными на других принципах.

Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени осуществлялось при помощи системы детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «iCycler iQ5» (BioRad).

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «iCycler iQ5» представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 5 каналам через крышки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. По окончании реакции управляющая программа строит кривые накопления фонового сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов.

Особенности ПЦР-РВ при анализе мутаций в гене CALR.

1. Для анализа используется три пробирки на один тест - на дикий аллель, мутантный аллель с мутацией c.1092_1143del (p.L367fs*46) и мутантный аллель с мутацией c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47).
2. Для всех пробирок (дикого и мутантных аллелей) определяется порог обнаружения флуоресцентного сигнала (C_t).
3. Наличие или отсутствие мутации определяется по C_t (см. Анализ данных)
4. Положительные контроли представляют собой человеческую геномную ДНК с наличием мутантного аллеля.

5. Отрицательный контроль представляеи собой человеческую геномную ДНК здорового донора, не имеющего мутаций в гене CALR.

ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени проводилась по следующей методике:

1. Разморозить H₂O, CALR-W, CALR-D, CALR-I и Taq-полимеразу при комнатной температуре, кратковременно центрифугировать на вортексе.

2. Подготовить в трех пробирках необходимого объема реакционную смесь на дикий и мутантные аллели согласно таблице 1 (учитывая ПКО и ОКО). Перемешать на вортексе и кратковременно центрифугировать.

Таблица 1 - Подготовка реакционных смесей (из расчета на 1 тест)

Наименование	Дикий аллель (мкл)	Делеция (мкл)	Инсерция (мкл)
H ₂ O	13,8	13,8	13,8
CALR-W	10	-	-
CALR-D	-	10	-
CALR-I	-	-	10
Taq-полимераза	0,2	0,2	0,2

3. Разлить полученные реакционные смеси по 24 мкл в пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.

4. Разморозить исследуемые образцы, ПКО-D, ПКО-I и ОКО (если образцы содержат сорбент, центрифугировать образцы 1 мин при 10-16 тыс. g.)

5. Внести в подготовленные пробирки (в смесь для дикого и мутантных аллелей) исследуемые образцы ДНК в количестве 20-80 нг, используя наконечники с аэрозольным барьером. Внести ПКО-D, ПКО-I и ОКО по 1,5 мкл. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе.

6. Поместить пробирки в амплификатор.

Условия проведения ПЦР.

Таблица 2 - Протокол

Цикл	Повторы	Шаг	Время	Температура	Камера
1	1	1	5 мин	95 °С	FAM канал
2	40	1	15 с	95°С	
		2	60 с	60°С	
3	1	1	7 мин	60°С	

Анализ данных.

1. Определить пороговый цикл (Ct) для каждой пробирки.
2. Пороговый цикл мутантных аллелей ОКО должен быть более 30, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
3. Пороговый цикл ПКО-D в пробирке "Делеция" должен быть менее 30, а в пробирке "Инсерция" более 30, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
4. Пороговый цикл ПКО-I в пробирке "Делеция" должен быть более 30, а в пробирке "Инсерция" менее 30, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
5. Пороговый цикл одного из анализируемых аллелей в исследуемых образцах (дикого и любого мутантного) должен быть мене 30. Несоблюдение этого условия указывает на малое количество ДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить анализ с добавлением большего количества ДНК.
6. Пороговые циклы одного из анализируемых аллелей (дикого или любого мутантного) должны быть более 13. Несоблюдение этого условия указывает на избыточное количество ДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить анализ с добавлением меньшего количества ДНК.
7. Если у исследуемого образца пороговый цикл в пробирке "Делеция" менее 30, то данный образец считается положительным по мутации c.1092_1143del (p.L367fs*46).

8. Если у исследуемого образца пороговый цикл в пробирке "Инсерция" менее 30, то данный образец считается положительным по мутации c.1154_1155insTTGTC(p.K385fs*47).

Для верификации результатов анализа рекомендуется произвести разделение продуктов амплификации пробирки "Дикий аллель" на 3% агарозном геле при напряжении поля 100В в течение 40 мин.

Уровень аллельной нагрузки измеряли по данной формуле:

$$\text{Аллельная нагрузка} = 2^{(C_{t(W+M)} - C_{tM})} * 100\%$$

2. 4 Проведение электрофореза для выявления других типов мутаций в гене CALR

Электрофорез - метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

Принцип метода:

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам канала, отнесенной к его длине (В/с). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости. Постепенно исходный препарат, состоящий из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одинаковой скоростью. В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул.

Фракционируемые молекулы сталкиваются с нитями полимера, образующую сетку геля, что увеличивает сетку геля и снижает скорость движения молекул. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний размер пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы белков или нуклеиновых кислот вообще не могут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратиться.

Электрофорез проводили по следующей методике:

1. Добавить 3г порошка агарозы в 100 мл банку с ТАЕ-буфером.
2. Нагреть взвесь в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не образует равномерную суспензию. Суспензию довести до начала кипения, затем осторожно удалить из микроволновой печи и охладить смесь.
3. Добавить 10 мкл бромистого этидия и тщательно перемешать.
4. Залить полученную суспензию в форму для агарозы и установить гребенки.
5. После того как гель полностью затвердеет (через 30-45 мин.), осторожно удалить гребенки.
6. С помощью дозатора внести 13 мкл ампликонов в лунки геля и поместить гель в электрофорезную кювету.
7. Добавить достаточное количество электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.
8. Включают прибор на 40 мин при напряжении 100В.
9. После завершения электрофореза перекладывают гель в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы.
10. Рассматривают гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Фиксируют полученное изображение и оформляют результаты, используя гель-документирующую систему.

2.5 Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе "Statistica 6.0". Отличия между несвязанными выборками оценивались с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для определения корреляции между количественными характеристиками пользовались методом корреляции по Спирману. Отличия считали статистически значимыми при значениях p -уровня $< 0,05$.

3. Результаты и обсуждения

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИП - истинная полицитемия

МФ - миелофиброз

ПМФ - первичный миелофиброз

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК - рибонуклеиновая кислота

ХМО - хронические миелопролиферативные опухоли

ХМЛ - хронический миелолейкоз

ЭР - эндоплазматический ретикулум

CALR - ген кальретикулина

JAK2 - ген янус-киназы

MPL - ген, кодирующий рецептор к тромбopoэтину

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Klampfl, T. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan // The new England journal of medicine. - 2013. - № 369 (25). - P. 2379-2389.
2. Ning, L. Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2V617F or MPL mutations / L. Ning, Y. Qui-Mei, L. Jin-Lan // Leukemia Research. - 2015. - № 39. - P. 510-514.
3. Соколова, М. А. Современные представления о «классических» Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях / М. А. Соколова. - 2 с.
4. Моисеев, С. И. Хронические миелопролиферативные заболевания. Классификация, диагностика и лечение / С. И. Моисеев, А. Ю. Зарицкий, Г. Н. Салогуб.- 2005. - 5 с.
5. Tefferi, A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasm: Tye 2008 World Health Organization criteria and point-of care diagnostic algotryms/ A. Tefferi, J. W. Vardiman // Leukemia.- 2008. - №22(1). - P. 14-22.
6. Абдулкадыров, К. М. Клиническая гематология: справочник / К. М. Абдулкадыров. - Санкт-Петербург: Питер Принт. - 2006. - 447 с.
7. Воробьев, А. И. Руководство по гематологии: учебник / А. И. Воробьев. - Москва: Ньюдиамед. - 2003. - Ч.3. - С. 9-15.
8. Абдулкадыров, К. М. Эссенциальная тромбоцитемия: современные представления о диагностике и лечении / К.М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич // Вестник гематологии. - Санкт-Петербург, 2014. - №1. - 49 с.

9. Levine, R. L. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia/ R. L. Levine, M. Heaney //Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. - 2008. - № 5. - P. 76-82.
10. Nangalia, J. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter et. al. // The new England journal of medicine. - 2013. - №369 (25). - 2391 p.
11. Tefferi, A. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel / A. Tefferi, J. Thiele, A. Orazi et. al. // Blood. - 2007. - № 110 (4). - 1092 p.
12. Tefferi, A. An over view on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms / A. Tefferi, J. Thiele, A. M. Vannucchi, T. Barbui// Leukemia. - 2014. - №28(7). - 1407 p.
13. Mesa R. How I treat symptomatic splenomegaly in patients with myelofibrosis / R. Mesa // Blood. - 2009. - № 113(22). - 400 p.
14. Абдулкадыров, К. М. Критерии диагностики и современные методы лечения первичного миелофиброза / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич // Вестник гематологии. - 2013. - №9(3). - P. 44-78.
15. Levine, R. L. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis / R. L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools // Canser Cell. - № 7(4). - 97 p.
16. Vannucchi, A. M. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations / A. M. Vannucchi, P. Guglielmelli // Haematologica. - 2008. - №93(7). - 6 p.
17. 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 // *Blood*. - 2009. - №114(5). - 51 p.

18. Michalak, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions / M. Michalak, E. F. Corbett, N. Mesaeli // *Biochemical Journal*. - 1999. - №2. - P. 281-292.

19. Michalak, M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum / M. Michalak, J. M. R. Parker, M. Opas // *Cell Calcium*. - 2002. - № 5. - P. 269-278.

20. Burns, K. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor / K. Burns, B. Duggan, E. A. Atkinson // *Nature*. - 1994. - P. 476-480.

21. Martin, V. Identification by mutational analysis of amino acid residues essential in the chaperone function of calreticulin / V. Martin, J. Groenendyk, S. S. Steiner // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2006. - № 4. - P. 2338-2346.

22. Krause, K. Calreticulin / K. H. Krause, M. Michalak // *Cell*. - 1997. - № 4. - P. 439-443.

23. Baksh, S. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains / S. Baksh, M. Michalak // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1991. - № 32. - P. 21458-21465.

24. Nakamura, K. Functional specialization of calreticulin domains / K. Nakamura, A. Zuppini, S. Arnaudeau // *The Journal of Cell Biology*. - 2001. - № 5. - P. 961-972.

25. Corbett, E. F. Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones / E. F. Corbett, K. Oikawa, P. Francois // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1999. - № 10. - P. 6203-6211.

26. Michalak, M. Calreticulin / M. Michalak, R. E. Milner, K. Burns, M. Opas // *Biochemical Journal*. - 1992. - № 3. - P. 681- 692.

27. Labriola, C. A. Endoplasmic reticulum calcium regulates the retrotranslocation of Trypanosoma cruzi calreticulin to the cytosol / C. A. Labriola, I. L. Conte, M. L. Medus, A. J. Parodi // PLoS ONE. - 2010. - № 10. - 10 p.
28. Dedhar, S. Novel functions for calreticulin: interactions with integrins and modulation of gene expression? / S. Dedhar // Trends in Biochemical Sciences. - 1994. - № 7. - P. 269-271.
29. Zapun, A. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57 / A. Zapun, N. J. Darby, D. C. Tessier // The Journal of Biological Chemistry. - 1998. - № 11. - P. 6009-6012.
30. Rozzan, T. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores / T. Rozzan, R. Ruzzuto, P. Volpe // Physiological Reviews. - 1994. - № 3. - P. 595-636.
31. Bastianutto, C. Overexpression of calreticulin increases the Ca^{2+} capacity of rapidly exchanging Ca^{2+} stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function / C. Bastianutto, E. Clementi, F. Codazzi // The Journal of Cell Biology. - 1995. - № 4. - P. 847-855.
32. Stanley, R. F. Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation. / R. F. Stanley, U. Steidl // Cancer Discovery. - 2016. - № 6(4). - P. 344-346.
33. Ning, L. Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2V617F or MPL mutations / L. Ning, Y. Qui-Mei, L. Jin-Lan // Leukemia Research. - 2015. - № 39. - P. 510-514.
34. Vannucchi, A. M. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations / A. M. Vannucchi, P. Guglielmelli // Haematologica. - 2008. - №93(7). - 6 p.

35. Nangalia, J. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter et. al. // The new England journal of medicine. - 2013. - №369 (25). - 2391 p.
36. Зорина, В. В. Основы ПЦР : методическое пособие / В. В. Зорина. - Москва : ДНК-Технология, 2012. - 116 с.
37. Андреева, А. П. ПЦР-анализ в научно-исследовательских лабораториях: учебное пособие / А. П. Андреева. – Караганда, 2012. - 98 с.
38. ПЦР "в реальном времени" / Д. В. Ребриков [и др.]. - Москва : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.
39. Mansier, O. JAK2V617F and CALR double mutations are more frequently encountered in patient with low JAK2V617F allelic burdens / O. Mansier, M. Migeon, G. Etienne // Leukemia Lymphoma. - 2015. - P. 10-13.