

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г.Волова
подпись инициалы, фамилия
« _____ » _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
Разработка стандартных образцов для детекции химерных онкогенных
транскриптов
тема работы

06.04.01 Биология
06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____ подпись, дата	<u>д-р.биол.н., профессор</u> должность, ученая степень	<u>С. В. Прудникова</u> инициалы, фамилия
Научный консультант	_____ подпись, дата	<u>к.м.н., доцент</u> должность, ученая степень	<u>И. А. Ольховский</u> инициалы, фамилия
Выпускник	_____ подпись, дата		<u>К.А. Табакова</u> инициалы, фамилия
Рецензент	_____ подпись, дата	<u>к.м.н., доцент</u> должность, ученая степень	<u>В.А. Бабушкин</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему: «Разработка стандартных образцов для детекции химерных онкогенных транскриптов» содержит 52 страницы текстового документа, 11 иллюстраций, 10 таблиц, 3 графика, 56 использованных источников. Ключевые слова: острый лейкоз, стандарты, химерные транскрипты, онкогены, WT1, HMGA2, AML-ETO, MLL-AF9, ETV6-RUNX1.

Целью работы стало разработка стандартных образцов для детекции химерных онкогенных транскриптов. В задачи исследования входило: 1) Проведение исследования оптимальных условий реакции методом ПЦР-РВ; 2) Экспериментальное определение эффективности ПЦР-РВ стандартных образцов; 3) Исследование аналитической чувствительности и линейности разработанных стандартных образцов для детекции химерных транскриптов; 4) Определение онкогенных химерных транскриптов у пациентов с ОЛ с помощью разработанного метода анализа.

Тема исследования связана с актуальным направлением – ранняя диагностика острого лейкоза, а так же возможность контроля над эффективностью терапии лечения. В наше время существует проблема поздней диагностики острых лейкозов, в связи с этим большой процент смертности и рецидивов болезни. Разработка стандартных образцов в комплексе с онкогенами поможет уменьшить процент смертности детей с ОЛ. Так же данный метод эффективен в подборе индивидуальной терапии лечения до появления клинических проявлений.

Оглавление

Введение	5
1. Обзор литературы	7
1.1. Геомопоэз	7
1.2. Острый лейкоз	8
1.3. Минимальная остаточная болезнь	14
1.4. Ген WT1	16
1.5. Ген HMGA2	18
1.6. Химерные транскрипты	20
1.6.1. AML1/ETO t (8; 21)	20
1.6.2. ETV6/RUNX1 t (12; 21)	22
1.6.3. MLL/AF9 t (9; 11)	23
1.7. Методы детекции	25
1.7. Мультиплексная ПЦР (ПЦР)	27
1.8. Экспериментальное определение эффективности ПЦР-РВ создаваемого набора	28
1.8.1. Исследование аналитической чувствительности и линейности разрабатываемой технологии с использованием стандартов	29
2. Материалы и методы	30
2.1. Объект исследования	30
2.2. Методы	30
2.2.1. Выделение РНК набором «РИБО-золь-D»	30
2.2.2. Метод обратной транскрипции	31
2.2.3. Исследование оптимальных условий реакции методом мультиплексной ПЦР-РВ	31
2.2.4. Метод ПЦР-РВ	32

2.2.5. Выделение целевой вставки	32
3. Результаты и обсуждения	39
3.1 Исследование оптимальных условий реакции методом мультиплексной ПЦР-РВ	39
3.2. Оценка эффективности	39
3.3. Оценка минимальной остаточной болезни пациентов с ОЛ	41
3.4. Выявление химерных транскриптов	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	47

Введение

Лейкозы – это частое онкологическое заболевание детского возраста, которое чаще всего встречается в первые 5-7 лет жизни. Большинство лейкозов у детей имеют острую форму течения заболевания.

Лечение данного заболевания проводится с помощью химиотерапии. Несмотря на успехи терапии детских лейкозов, примерно у 30% пациентов возникает рецидив болезни. Самой частой причиной смерти являются инфекции, которые возникают потому, что заболевание и лечение приводят к значительному снижению сопротивляемости организма. Современное лечение химиопрепаратами обеспечивает 5 лет без рецидива у детей от 50 до 80% случаев. Если в течение 7 лет отсутствие рецидива есть шанс на полное излечение. Поэтому выявление генетических маркеров является важным для мониторинга минимальной остаточной болезни и раннего выявления рецидивов [8].

В нескольких работах было показано, что повышенная экспрессия мРНК гена WT1 сопровождается увеличением риска рецидива миелоидного варианта острого лейкоза почти в 4 раза, что может служить прогностическим маркером, поскольку не обнаруживался у здоровых доноров. Недавно на мышинной модели было показано, что уровень экспрессии мРНК гена HMGA2 значительно увеличен у первичных пациентов с острыми лейкозами и не снижается в случаях отсутствия полного ответа на терапию и последующего развития рецидива [55]. Однако в настоящий момент отсутствуют исследования, доказывающие прогностическое значение экспрессии HMGA2 для детей с острыми лейкозами.

Диагноз острый миелобластный лейкоз ставится когда в пунктате костного мозга/в периферической крови обнаруживается не менее 20% бластных клеток и при наличии патогномоничных для ОМЛ хромосомных

транслокаций : t(8;21) (q22; q22) AML/ETO, t(15;17) (q12; q11-12) PML/RAR- α , inv(16) или t(16;16) (p12; q23) CBF/MYH11, t(1;22) [31].

А диагноз острый лимфобластный лейкоз ставится при обнаружении в пунктате костного мозга более 25% лейкемических клеток, а так же при выявлении основных транслокаций, имеющие клиническое значение – t(9;22)(q34;q11) или BCR-ABL при В-линейном ОЛЛ и t(4;11)(q21;q23) у детей до года [32].

На сегодняшний день в доступной литературе нет данных о взаимосвязи уровня экспрессии химерных транскриптов и онкогенов WT1 и HMGA2, кроме того, отсутствуют наборы реагентов, позволяющие с помощью мультиплексной ПЦР-РВ в одной постановке оценить наличие и химерных транскриптов, и онкогенов, что важно для сокращения времени диагностики ОЛ.

Поэтому целью данной работы являлось разработка стандартных образцов для детекции химерных онкогенных транскриптов

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение исследования оптимальных условий реакции методом ПЦР-РВ;
2. Экспериментальное определение эффективности ПЦР-РВ стандартных образцов;
3. Исследование аналитической чувствительности и линейности разработанных стандартных образцов для детекции химерных транскриптов;
4. Определение онкогенных химерных транскриптов у пациентов с ОЛ с помощью разработанного метода анализа.

1. Обзор литературы

1.1. Гемопоз

Гемопоз (кровотворение) – это образование и развитие форменных элементов крови [5].

Кровь содержит различные типы клеток, которые выполняют разные функции - от транспорта кислорода до выработки антител [6].

Эритроциты-красные кровяные тельца крови, осуществляющие перенос кислорода из легких к тканям тела и двуокиси углерода (углекислый газ) в обратном направлении.

Тромбоциты- маленькие кровяные пластинки, образуются в красном костном мозге, основная их функция - участие в свертывании крови.

Лейкоциты- белые кровяные клетки, выделенные по признаку отсутствия самостоятельной окраски и наличия ядра [6]. Лейкоциты по морфологическим признакам подразделяются на:

1. Гранулоциты (к ним относятся нейтрофильные, базофильные и эозинофильные лейкоциты);
2. Агранулоциты (к ним относятся лимфоциты и моноциты) [5].

По своему строению и «функциональным обязанностям» лимфоциты делятся на большие и малые формы. Основная масса больших лимфоцитов представлена NK-клетками — они контролируют «качество» всех клеток организма и умеют разрушать раковые клеточные образования.

Малые формы лимфоцитов делятся на 2 разновидности:

1. В-клетки. Их основная функция заключается в выработке специализированных антител, которые они начинают продуцировать сразу же после обнаружения чужеродных структур.
2. Т-клетки. Они представлены тремя подгруппами: «хелперы», «киллеры» и «супрессоры», которые соответственно стимулируют, регулируют или тормозят выработку антител [6].

Именно лимфоциты отвечают за иммунитет и участвуют в регуляции работы других клеток организма, поэтому острый лейкоз относится к системным злокачественным патологиям, представляющим реальную угрозу жизни.

1.2. Острый лейкоз

Острый лейкоз (ОЛ) - это заболевание, которое возникает из одной измененной клетки крови, которая относится либо к очень ранним, либо к коммитированным клеткам-предшественникам [21].

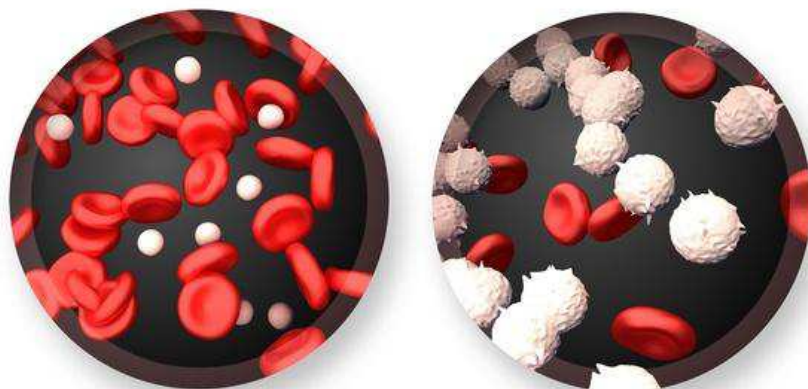


Рисунок 1. С левой стороны - кровь в нормальном состоянии, с правой стороны - при лейкозе.

Таким образом, ОЛ - злокачественная опухоль, возникающая из бластных клеток [8].

Происхождение ОЛ у детей по морфологии разделяется на: ОЛЛ (80%) и ОМЛ (20%), они отличаются друг от друга биологически и клинически. Клиническое течение болезни отличается высокой скоростью нарастания симптомов [7].

ОЛЛ – это заболевание крови, при котором происходит перерождение лимфоцитов в лейкозные и раковые формы клеток.

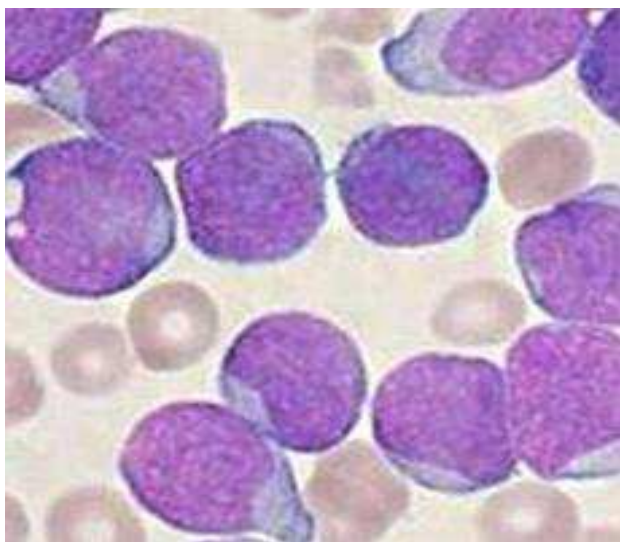


Рисунок 2.Бластные клетки среди нормальных клеток крови.

Поражение начинается с костного мозга. Появление и неконтролируемое деление изменённых форм молодых незрелых лимфоцитов – лимфобластов, препятствует нормальной репродукции других форменных элементов крови: эритроцитов, тромбоцитов и остальных видов лейкоцитов. Из-за этого очень быстро нарушается нормальная жизнедеятельность человеческого организма. Но на этом изменения не заканчиваются.

Покидая место своего рождения – костный мозг, раковые лейкозные клетки попадают в плазму крови и атакуют практически все жизненно важные органы и системы организма. Разрастание и распространение видоизменённых лимфобластов происходит настолько стремительно, что любое промедление с лечением грозит летальным исходом спустя всего несколько месяцев от момента появления первой раковой клетки.

ОЛЛ является самым часто встречаемым заболеванием среди детей в возрасте до 5 лет. Риск медленно снижается к 20 годам и начинает возрастать после 50 лет. Третья часть случаев заболевания приходится на взрослое население [27].

По статистике вероятность заболевания составляет 1 из 750 человек, риск заболевания более выше у мужчин, чем у женщин, а также у белых по

сравнению с афроамериканцами. Наиболее часто болезнь поражает детей, но наибольшее количество летальных случаев приходится на взрослую часть населения (4 из 5) [16].

Острый лимфобластный лейкоз у детей лечится гораздо легче и лучше, чем у взрослых. По статистке, тактика лечения этого заболевания на настоящий момент, даёт положительный прогноз для 70% заболевших детей, как минимум на 5 лет устойчивой ремиссии и с минимальным риском рецидива [26].

ОМЛ - это злокачественное новообразование миелоидного ростка крови, которое характеризуется неконтролируемым, быстрым делением изменённых форм лейкоцитов.

Злокачественными клетками при остром миелобластном лейкозе являются миелобласты. В обычном кроветворении миелобласты – это незрелые предшественники лейкоцитов миелоидного ряда. Типичные миелобласты со временем созревают, в последующем превращаются в типичные лейкоциты. Между тем, при остром миелобластном лейкозе в каком-то из миелобластов накапливаются генетические изменения, которые останавливают развитие клетки в незрелом состоянии, замораживая процесс клеточной дифференциации. Такая мутация не вызывает лейкоз, но когда «остановка дифференциации» соединяется с другими мутациями, то это приводит к утрате генетического контроля над ростом клеток, результатом которого является неуправляемое размножение незрелого клеточного клона, определяющего клиническую сущность ОМЛ.

Многообразность и генетическая различность ОМЛ происходит из-за того, что лейкозная трансформация может возникнуть на разных этапах дифференциации клетки. Современные схемы классификации ОМЛ признают факт зависимости свойств и поведения лейкозных клеток, а также течения лейкоза от того, на каком этапе остановилась дифференциация.

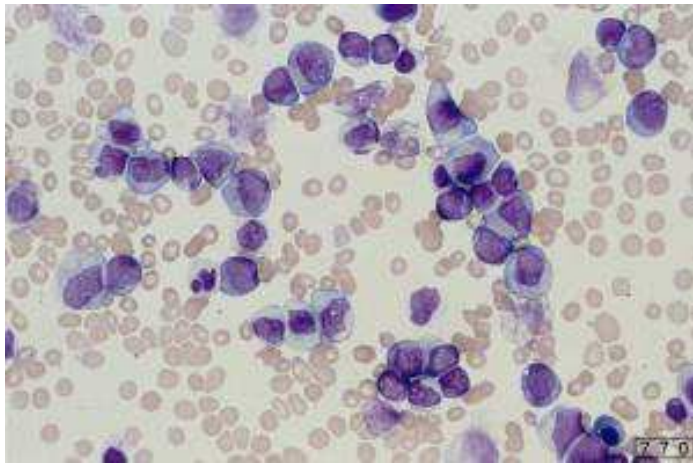


Рисунок 3. На фото – клетки с транслокаций 8;21 (FAB M2). Видны зрелые бласты. Они характеризуются наличием гранул (три клетки чуть ниже центра), локализованных в цитоплазме.

Франко – американско-британская классификационная (ФАБ) система различает ОМЛ на 9 подвидов, от M0 по M8, беря за основу типы клеток — предшественниц лейкоцитов, а так же на степени зрелости изменённых клеток. Определение злокачественных клеток проводят на основании внешних признаков при световой микроскопии и/или цитогенетически, выявляя лежащие в основе отклонений изменения в хромосомах. У разных подвидов ОМЛ разный прогноз и ответ на лечение [22].

В 2016 году была пересмотрена классификация ВОЗ миелоидных новообразований и острых лейкозов, в которой принципы выделения специфических цитогенетических и молекулярно-генетических подтипов ОМЛ и ОЛЛ были сохранены. Но были внесены некоторые корректировки обусловленные переименованием ряда генов. После публикации классификации в 2008 году появился ряд публикаций, подтверждающих клиническую значимость выделяемых нозологических форм и их подразделение на генетические подгруппы.

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) и родственные новообразования ОМЛ с повторяющимися генетическими аномалиями

- ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22.1)$; RUNX1-RUNX1T1
- ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; CBFB-MYH11

- ОМЛ (промиелоцитарный) с PML-RARA
- ОМЛ с t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
- ОМЛ с t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
- ОМЛ с inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
- ОМЛ с BCR-ABL1
- ОМЛ с мутированным NPM1
- ОМЛ с биаллельными мутациями СЕВРА
- ОМЛ с мутированным RUNX1

Новообразование из бластных плазматоидных дендритных клеток

Острые лейкозы (ОЛ) неопределенного линейного происхождения

- Острый недифференцированный лейкоз
- ОЛ со смешанным фенотипом (ОЛСФ) с t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 +
- ОЛСФ с t(v;11q23.3); с перестройкой КМТ2А
- ОЛСФ В/миелоидный неуточненный
- ОЛСФ Т/миелоидный неуточненный

В-клеточные лимфобластные лейкозы/лимфома

- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома неуточненный
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с повторяющимися генетическими аномалиями
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(v;11q23.3); с перестройкой КМТ2А
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1

- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с гипердиплоидностью
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с гиподиплоидностью
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома BCR-ABL1-подобный
- В-клеточный лимфобластный лейкоз/лимфома с iAMP21 [2].

Большая часть симптомов ОМЛ пробуждается замещением нормальных клеток крови лейкозными клетками. Недостаточное образование лейкоцитов создает высокую восприимчивость больного к инфекциям — несмотря на то, что лейкемические клетки происходят от предшественников лейкоцитов, способность противостоять инфекциям у них отсутствует. Анемия может вызывать усталость, бледность, и одышку. Недостаток тромбоцитов может привести к легкой повреждаемости кожи и повышенной кровоточивости [23].

Существуют различные факторы, способствующие возникновению ОМЛ — иные расстройства системы кроветворения, влияние вредных веществ, ионизирующее излучение и генетическое влияние [22].

Для ОМЛ общий прогноз выживаемости находится в пределах от 20 до 40 процентов, а для молодых пациентов, перенёвших трансплантацию — от 40 до 50%. Для детей до 15 лет прогноз лучше, чем у взрослых. Можно рассчитывать на 5-летнюю выживаемость в 70%.

Самый критический прогноз для жизни — всего лишь 15% и частотой возникновения рецидивов около 80%, можно отнести к ОМЛ с мутациями в 3,5 и 7 хромосомах. Лучшими шансами обладают больные с подтипами M2,

М3 и М4. Для них 5-летняя выживаемость равна 70%, а риск развития рецидива снижен до 30% [36].

1.3. Минимальная остаточная болезнь

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) - это небольшое количество опухолевых клеток, оставшиеся в организме после достижения клинико-гематологической ремиссии [13].

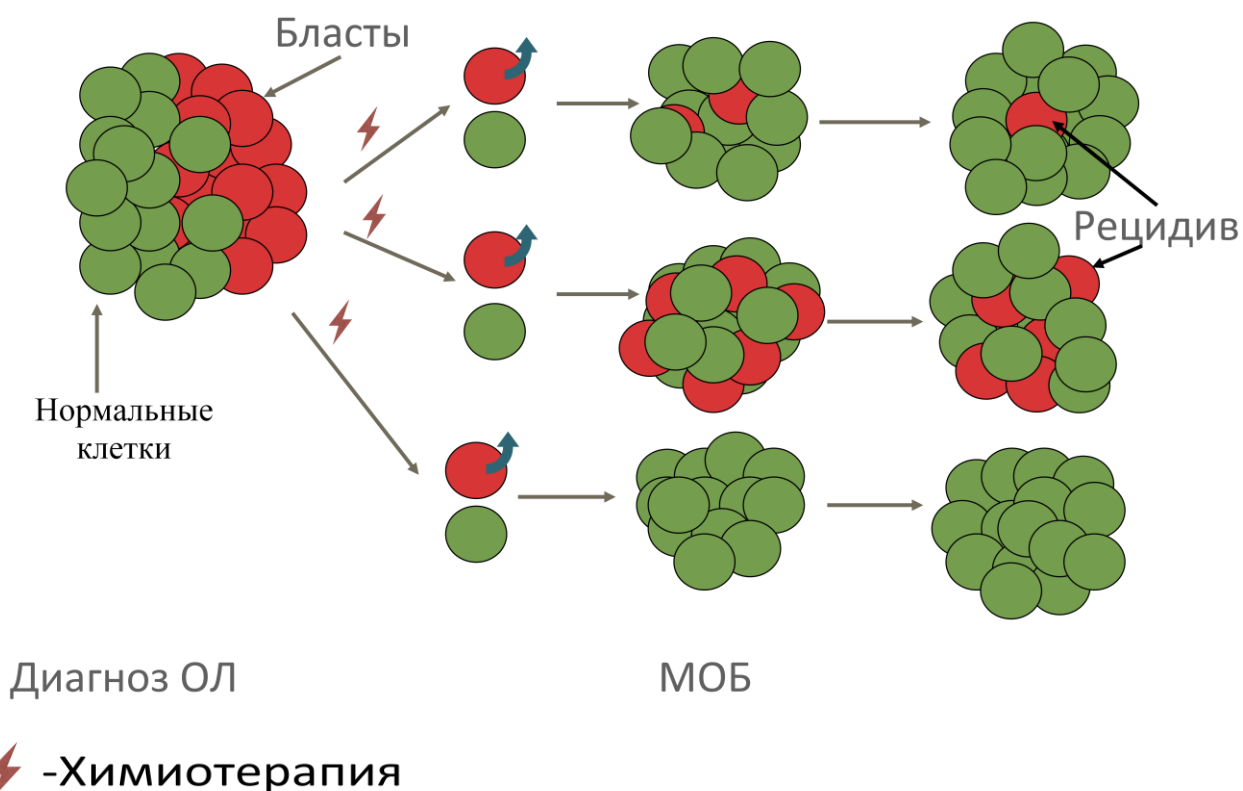


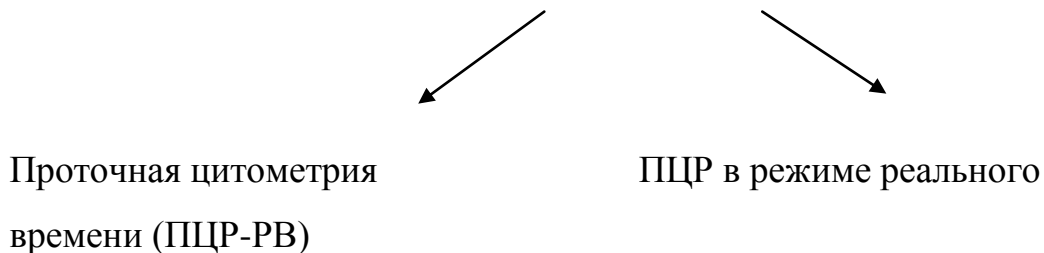
Рисунок 4. Влияние химиотерапии на опухолевые клетки с диагнозом ОЛ и дальнейшие прогнозы течения заболевания.

Для контроля МОБ используются высокочувствительные методы, основанные на анализе ДНК. Молекулярно-генетический анализ с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет выявлять даже очень небольшие количества лейкоэмических клеток, характеризующихся известным генетическим дефектом.

Так как лейкоэмические клетки часто характеризуются необычным набором белков на их поверхности, для контроля МОБ может использоваться также проточная цитометрия. Возможны и другие методы изучения МОБ [13].

Но для каждого метода анализа МОБ есть свои плюсы и минусы:

Методы диагностики МОБ



Низкая доступность оборудования	Имеется в стандартном комплекте лабораторий ПЦР - анализа
Дорогостоящие реактивы	Доступные реактивы отечественных производителей
Сложность и трудоемкость методики	Отсутствуют коммерческие наборы для оценки экспрессии генов WT1 и HMGA2 с РУ Росздравнадзора
Проблемы интерпретации результатов т.к. опухолевые клетки могут терять белки-маркеры	

Также для мониторинга МОБ оценивают наличие химерных транскриптов. Простым необходимым объемом исследования, проводимым при ОЛЛ у больных любого возраста, является стандартное

кариотипирование и тестирование на наличие химерных генов методом FISH или «real-time» ПЦР. В диагностике ОМЛ, цитогенетическое исследование методом G-полос остается «золотым стандартом», т.к. хромосомные перестройки выявляются в 85-95 % случаев [1].

Мониторинг МОБ может служить нескольким целям:

1. Оценка эффективности лечения
2. Сравнение разных видов терапии
3. Контроль над сохранением ремиссии
4. Максимально раннее обнаружение рецидивов для своевременной коррекции тактики лечения [13].

1.4. Ген WT1

Wilms tumor protein - белок опухолей Вильмса является белком, который у человека кодируется геном WT1 на хромосоме 11 в положении 13. Локализован в ядре.

В ряде работ было показано, что повышенная экспрессия гена WT1 сопровождается увеличением риска рецидива острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) почти в 4 раза и может служить прогностическим маркером [21, 23, 26].

Ген WT1 кодирует белок, необходимый для развития почек и гонад (яичники у самок и яичек у мужчин). В этих тканях белок WT1 играет роль в клеточном росте, процесс, с помощью которого клетки созревают для выполнения определенных функций (клеточная дифференциация) и саморазрушения клеток (апоптоз). Для осуществления этих функций белок WT1 регулирует активность других генов путем присоединения (связывания) с областями ДНК. На основании этого действия белок WT1 называется транскрипционным фактором, [33] кроме того он играет важную роль в клеточном росте.

В опухолевых клетках происходит расщепление WT1, что приводит к высоким уровням экспрессии генов c-Myc и JunB и последующему апоптозу

раковых клеток. В нормальных клетках экспрессия c-Мyc и JunB снижается, потому что их подавляет WT1, за счет этого клетка выживает. (Рисунок 5)

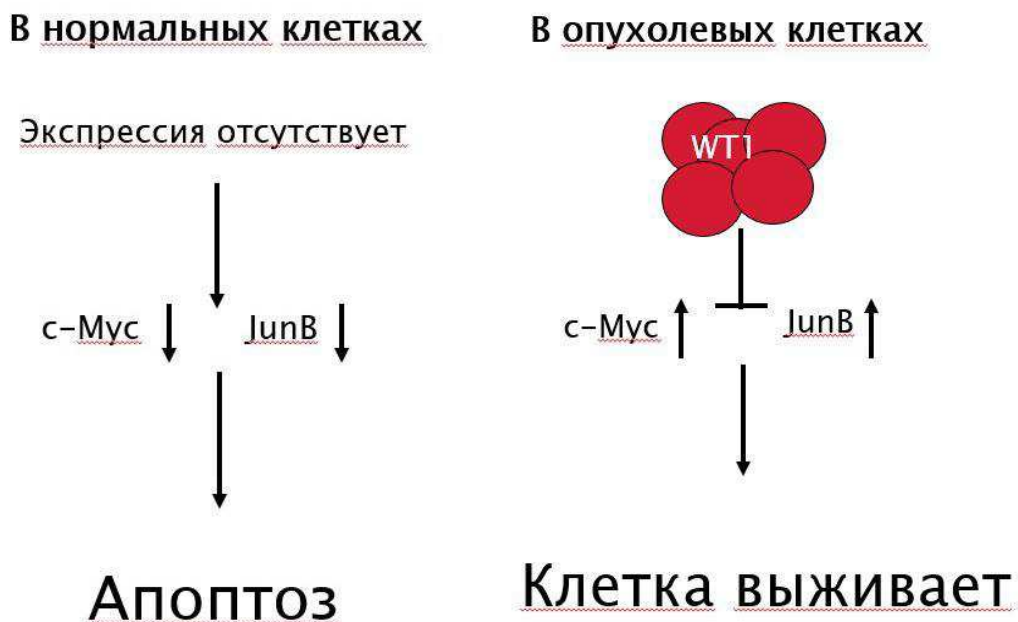


Рисунок 5. Схема действия гена WT1 под влиянием проапоптических генов c-Мyc и JunB.

Инактивация гена WT1 вызывает опухоль Вильмса и синдром Дениса-Драша, что приводит к нефропатии и аномалиям половых органов. Также было обнаружено, что белок WT1 связывает множество клеточных факторов [21].

Перемены в активности (экспрессии) гена WT1 связаны и с несколькими другими формами рака. В частности, ген WT1 необычно экспрессируется в определенных типах рака легких, предстательной железы, молочной железы и яичников. Повышенная экспрессия гена WT1 также встречается у пациентов с диагнозом ОЛЛ, ХМЛ и ОМЛ. Неясно, какую роль играет белок WT1 в развитии или прогрессировании рака [55].

Экспрессия WT1 может быть повышена как в начале ОМЛ, так и на этапе развития рецидивов. После ТГСК уровень экспрессии гена WT1 может быть ниже, чем в костном мозге доноров, но при рецидиве он достигает максимума. В одной из статей было показано, что у молодых больных уровень экспрессии гена WT1 значительно выше, чем в старших возрастных

группах, но мало зависел от цитогенетического и морфо-цитохимического вариантов лейкоза, также, как и от степени выраженности органомегалии.

И в то же время, экспрессия WT1 тесно связана с содержанием бластных элементов в костном мозге и с уровнем экспрессии специфических молекулярных маркеров, характерных для изученных лейкозов [9].

В нескольких работах было показано, что повышенная экспрессия мРНК гена WT1 сопровождается увеличением риска рецидива миелоидного варианта острого лейкоза почти в 4 раза, что может служить прогностическим маркером, поскольку не обнаруживался у здоровых доноров [39,40,42,44,47].

1.5. Ген HMGA2

High-mobilitygroup AT-hook 2 - группа AT-крючка с высокой подвижностью, также известная как HMGA2, представляет собой белок, который у человека кодируется геном HMGA2.

Этот ген кодирует белок, который относится к семейству белков хромосомной группы с высокой подвижностью (HMG). ХМГ - белки функционируют как архитектурные факторы и являются важными компонентами белкового комплекса. Этот белок содержит структурные ДНК-связывающие домены и может действовать как регулирующий транскрипцию фактор. Идентификация делеции, амплификации и перегруппировки этого гена, связанных с липомами, указывает на роль в адипогенезе и мезенхимальной дифференцировке. Исследование нокаута гена мышинового аналога показало, что этот ген участвует в диетическом ожирении.

Недавно было установлено, что уровень экспрессии онкогена HMGA2, являющегося фактором транскрипции, значительно увеличен у первично диагностированных пациентов с острым миелобластным лейкозом и не снижается в случае предстоящего рецидива, что может быть прогностическим маркером [27]. Семейство мкРНК Let-7 особенно подробно

изучено в опухолевых клетках и опухолевой ткани. Они были представлены как ключевые мкРНК, которые участвуют в онкогенезе и регулируют эмбриональное развитие. Рост интенсивности экспрессии Let-7 ингибирует клеточную пролиферацию, создавая переход от фазы G₁ к фазе S клеточного цикла с помощью регуляции ключевых протоонкогенов.

Let-7 ингибирует продукцию белков путем комплементарного связывания с транскриптами мРНК. Зрелая мРНК транскрипта HMGA2 содержит семь регионов, комплементарных let-7 в своей 3'-нетранслируемой области (UTR).

Экспрессия Let-7 очень низкая в раннем развитии человека, что совпадает с наибольшей транскрипцией HMGA2. Понижение экспрессии HMGA2 вызвано повышением экспрессии let-7. (Рисунок 6)

Многие виды рака имеют нормальный белок HMGA2, но зрелый транскрипт мРНК усечен, отсутствует часть 3'UTR, которая содержит let-7 комплементарные области. Без них let-7 не может связываться с мРНК HMGA2 и, таким образом, не может подавить его. Усеченные мРНК могут возникать из-за хромосомной транслокации, что приводит к потере части гена HMGA2 [22].

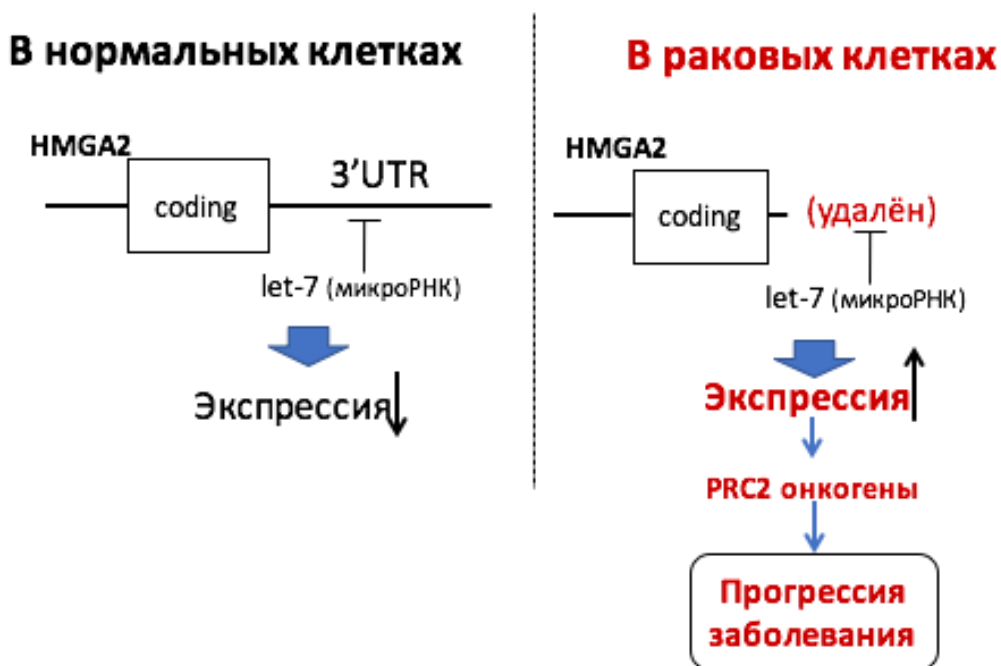


Рисунок 6. Схема действия HMGA2.

Экспрессия HMGA2 во взрослых тканях обычно ассоциируется как с образованием злокачественных, так и с доброкачественными опухолями, а также с некоторыми характерными мутациями, способствующими развитию рака. Гомологичные белки с высоко консервативными последовательностями встречаются у других видов млекопитающих, включая лабораторных мышей (*Mus musculus*).

Недавно было показано, что уровень экспрессии мРНК гена HMGA2 значительно увеличен у первичных пациентов с острыми лейкозами и не снижается в случаях отсутствия полного ответа на терапию и последующего развития рецидива [51].

1.6. Химерные транскрипты

Химерные гены — частое событие в канцерогенезе. На сегодняшний день известно более 440 химерных генов, которые описаны как для злокачественных, так и для доброкачественных новообразований. Химерные белки являются идеальными маркерами, специфичными для опухолевой нозологии, одновременно представляя собой потенциальными мишенями для терапии потому что являются пусковыми элементами канцерогенеза [4].

1.6.1. AML1/ETO t (8; 21)

ОМЛ с t(8;21)(q22;q22), составляет около 5% от всех ОМЛ, встречается в большинстве случаев у молодых пациентов [33].

Транслокация t (8; 21) является событием, инициирующим лейкемию, и последовательности слитых генов можно найти задолго до появления лейкемии в крови новорожденных детей. Однако индукция полностью развитого ОМЛ у t (8; 21) пациентов требует вторичных генетических изменений, что затрудняет создание *in vitro* [20].

Среди тканей человека ген AML1 экспрессируется практически во всех тканях, кроме сердца и головного мозга. Ген AML1 состоит из 12 экзонов,

распределенных по > 260 кб ДНК. Альтернативное сплайсинг и дифференциальное использование 3'-последовательностей полиаденилирования приводит к образованию форм AML1 с различными количествами С-концевой последовательности [52].

Ген AML1 на 21-й хромосоме слит с геном ETO на 8-й хромосоме. Точка разрыва в локусе AML1 находится между экзонами 5 и 6, а сайты расщепления топоизомеразой II обнаруживаются вблизи области точки разрыва. Во всех случаях полученный слитый белок дает слитый транскрипт, который кодирует исходные 177 аминокислот AML1, связанных с последовательностями ETO (восемь двадцать один онкоген). Слитый транскрипт AML1-ETO может быть обнаружен с помощью обратной транскрипции / ПЦР. Слияние AML1-ETO ингибирует дифференцировку на определенной стадии развития миелоида [51].

t(8;21) Creates the AML-1/ETO Fusion Protein

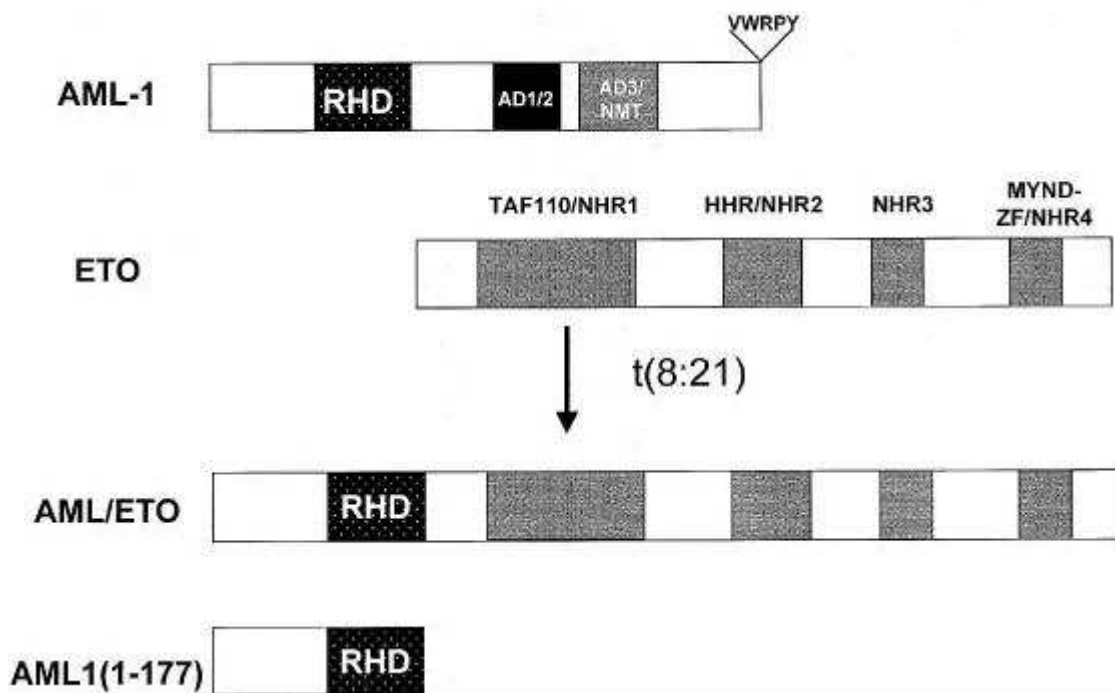


Рисунок 7. Доменная структура AML, ETO и слитых белков.

AML1-ETO можно обнаружить в периферической крови и костном мозге пациентов с длительной полной ремиссией после лечения химиотерапией или трансплантацией стволовых клеток. AML1-ETO-

положительные мультипотентные клетки-предшественники, которые дают нормальные колонии клеток крови, включая В-клетки, могут быть продемонстрированы у этих пациентов наряду с нормальными предшественниками [52].

С большей стандартизацией и использованием количественных методов, таких как ПЦР в реальном времени, определение уровня транскрипта AML1-ETO в периферической крови и костном мозге пациентов может быть полезным инструментом для прогнозирования ремиссии. После длительной ремиссии и после пересадки стволовых клеток в некоторых исследованиях было обнаружено, что пациенты становятся ПЦР–отрицательными [51].

Повышение уровня экспрессии транскрипта у бессимптомных пациентов предвещает рецидив.



Рисунок 8. Кариотип с транслокацией 8;21. В 30% таких случаев происходит потеря половой хромосомы (Y и X).

1.6.2. ETV6/RUNX1 t (12; 21)

Хромосомная транслокация t(12;21)(p13;q22), продуктом которой является химерный транскрипт ETV6 - RUNX1, обнаруживается примерно в 25% случаев детской В-клеточной лимфобластной лейкемии – наиболее распространённом варианте острой лимфобластной лейкемии (ОЛЛ). Данную невозможно обнаружить при стандартном цитогенетическом исследовании, поэтому для ее диагностики используют обратно - транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) или флуоресцентную гибридизацию insitu [43].

Гены ETV6 и RUNX1 кодируют ядерные транскрипционные факторы, играющие критическую роль в нормальном гемопоэзе. Их слияние ведет к возникновению и развитию лейкоза путем нарушения нормальной функции ETV6 и/или снижения уровня экспрессии гена RUNX1. Существует два типа транслокации ETV6- RUNX1:

- ✓ Наиболее частый вариант. Возникает при локализации точки разрыва гена RUNX1 в интроне 1 и гена ETV6 в интроне 5.
- ✓ Менее распространённый вариант, который составляет 10% среди всех ETV6- RUNX1 случаев. Образуется путем разрыва во 2 интроне RUNX1 и 5 интроне гена ETV6(см. Рис.9).

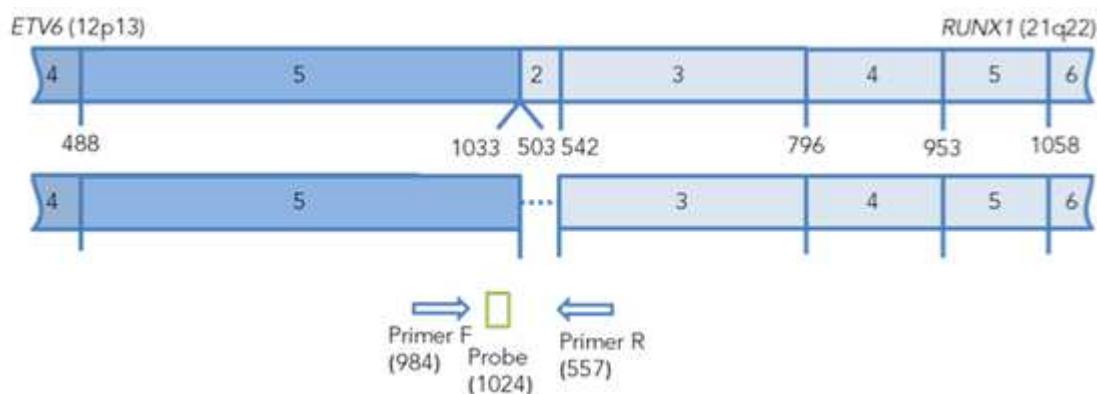


Рисунок 9. Схема образования химерных транскриптов ETV6- RUNX1.

Обозначены места связывания праймеров и зондов для ПЦР-РВ. Положения праймеров и зондов указаны относительно 5'-конца нуклеотидных последовательностей нормальных транскриптов.

Химерный транскрипт ETV6-RUNX1 считается маркером благоприятного прогноза и длительной ремиссии для пациентов с ОЛЛ, и соответственно, является важной мишенью при диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни [49].

1.6.3.MLL/AF9 t (9; 11)

ОМЛ с t(9;11)(p22;q23), составляет около 2% от всех острых миелоидных лейкозов у взрослых и 9–12% ОМЛ у детей.

Транслокация t (9; 11) (p22; q23), которая приводит к слиянию MLL с AF9, является наиболее распространенной из хромосомных аномалий 11q23, наблюдаемых при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) при лейкозе, связанном с терапией (t -ОМЛ) и редко при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) [32].

Слитый ген MLL-AF9 связан с агрессивными лейкозами миелоидного и лимфоидного происхождения у детей. У взрослых слияние MLL-AF9 преимущественно связано с миелоидной лейкемией, было зарегистрировано очень мало случаев заболевания лимфоидной болезнью. Напротив, этот ген слияния обнаруживается с довольно сходной частотой при лейкозах у детей как миелоидных, так и лимфоидных линий.

Хромосомные транслокации смешанной линии лейкоз (MLL) гена на хромосоме 11q23 обнаруживаются в ~ 7% острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и 10% от острого лимфолейкоза (ОЛЛ) случаях.

Авторы одного из исследований сделали предположение, что гены партнера по транслокации MLL играют критическую роль в лейкемогенном процессе. А также, что точка слияния в гене AF9 и, следовательно, количество материала AF9, включенного в продукт гена слияния MLL-AF9, могут влиять на фенотип лейкемии. Это также подтверждает предположение, что гены партнера по транслокации MLL играют критическую роль в лейкемогенном процессе [48].

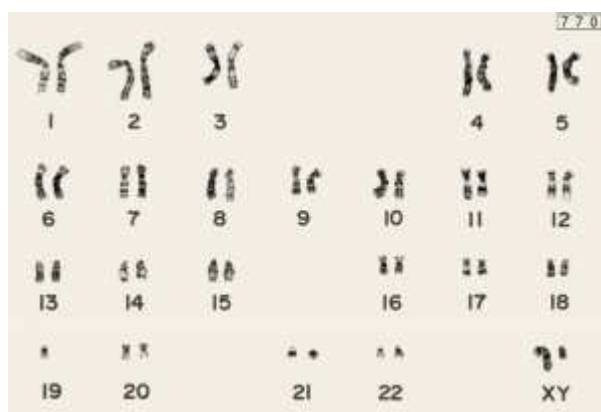


Рисунок 10. Кариотип с транслокацией 9;11.

1.7. Методы детекции

Клинические проявления у больных ОЛ очень неспецифичны и связаны с развитием тех или иных симптомов, обусловленным вытеснением опухолевыми клетками нормального кроветворения. Острый лейкоз может развиваться очень стремительно. Важно, чтобы в кратчайшие сроки были проведены все диагностические мероприятия по установлению варианта заболевания. Определение варианта острого лейкоза необходимо для выбора лечения, применения правильных схем химиотерапии и позволяет избежать фатальных последствий в дальнейшем. Ошибка в диагнозе может быть неисправима. Полноценный диагноз острого лейкоза - это диагноз комплексный при участии различных врачей и методов диагностики [31].

Методы диагностики ОЛ:

Цитогенетический метод исследования - это получение хромосомных препаратов и их анализ. Кариотипирование (исследование кариотипа) позволяет определить число и провести анализ структуры всех хромосом с использованием различных типов дифференциальной окраски.

Стандартное цитогенетическое исследование является необходимым компонентом диагностических процедур у пациента с подозрением на ОЛ. Для определения кариотипа достоверным считается только исследование как минимум 20 метафаз. Аномалии в кариотипе могут устанавливаться и на основании исследования клеток периферической крови. Большинство хромосомных аномалий, обнаруживающихся при ОЛ, являются структурными и обычно представляют собой транслокации. Идентифицировано более 30 различных неслучайных транслокаций. Специфические хромосомные перестройки являются независимыми диагностическими и прогностическими маркерами, и служат в выборе тактики терапии. Но данный метод является очень трудоемким и дорогостоящим по сравнению с ПЦР.

Метод флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) - это метод молекулярной цитогенетики, при помощи которого идентифицируется конкретная хромосома или часть хромосомы клетки. Методом FISH можно определить небольшие изменения в хромосомах, которые невозможно определить обычными цитогенетическими методами.

Всем больным ОЛ рекомендуется выполнить детекцию реарранжировок генов методом флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) из аспирата костного мозга для определения транслокаций. Преимуществом метода FISH является возможность исследовать десятки и сотни не только делящихся клеток, но и тех, что находятся в интерфазе. Но необходимо иметь в виду, что метод FISH позволяет анализировать только те участки хромосом, для выявления которых имеются молекулярные зонды, а не весь хромосомный набор целиком. Метод позволяет быстро (в течение максимум 2-х дней) выявить искомые поломки. Стандартное цитогенетическое исследование является единственным методом, позволяющим анализировать весь хромосомный набор клетки целиком. Однако его выполнение требует достаточно длительного времени, а также в ряде случаев констатируется отсутствие делящихся клеток (митозов) [31].

Количественная ПЦР (ПЦР-РВ) — метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце. Метод является самым доступным, по сравнению с выше перечисленными методами детекции, т.к. оборудование (амплификатор) есть у многих медицинских и научных учреждениях, а так же метод более дешевый и не требует больших временных затрат (анализ идет 2 часа).

1.7. Мультиплексная ПЦР (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод получения множества копий определенных фрагментов ДНК (генов) в биологическом образце [10].

Основные компоненты реакционной смеси:

- ✓ Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования.
- ✓ Праймеры - синтетические олигонуклеотиды размером 15-30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям определяемого фрагмента и ограничивающие его.
- ✓ Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - смесь четырех нуклеотидных оснований, предназначена для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.
- ✓ Таq-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.
- ✓ Буферный раствор - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, в том числе ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента [19].
- ✓ ТаqMan-зонды — искусственно синтезированные олигонуклеотиды небольшого размера (около 30 нуклеотидов), комплементарные специфическим ампликонам (продуктам реакции). Благодаря прикрепленным к ним изотопным или флуоресцентным меткам ДНК-зонды могут использоваться для детекции продуктов реакции [11].

Реакция проводится за 30-50 циклов, каждый из них состоит из трех стадий. Структура одного цикла:

- Денатурация ДНК- это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую, при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур- 95°C 1 или 2 минуты
- Отжиг праймеров - это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа - температура данной стадии определяется нуклеотидным составом праймеров - 1 минута
- Элонгация ДНК-после отжига праймеров Taq - полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера- 72°C- время зависит от длины синтезируемого фрагмента [19].

При мультиплексной ПЦР в одной и той же реакционной смеси происходит процесс коампликации нескольких ДНК-матриц с участием нескольких пар праймеров. Важным условием является отсутствие комплементарности праймеров для мультиплексной ПЦР-РВ друг другу, а также подбор таких условий анализа, которые подходят для равно-эффективного отжига всех участвующих в реакции праймеров, чтобы обеспечить одинаковый выход амплифицируемых продуктов [18].

1.8. Экспериментальное определение эффективности ПЦР-РВ создаваемого набора

Эффективность ПЦР является ключевым параметром при использовании количественной оценки молекул ДНК или РНК в образце. Эффективность реакции можно определить с помощью проведения ПЦР с последовательным разбавлениями исследуемого образца. В итоге строится прямая в координатах $\log [N]/C \cdot t$. По углу такой наклона прямой можно определить эффективность [29].

Эффективность ПЦР показывает, во сколько раз за один цикл реакции изменяется количество фрагментов ДНК. Для выражения эффективности ПЦР в процентах используют следующую формулу:

$$N_n = N_0 (1+E)^n$$

В идеальном варианте, когда все компоненты и условия проведения ПЦР сбалансированы, на каждом цикле реакции количество ДНК удваивается и количество продуктов реакции будет на определенном цикле n равно начальному числу молекул, умноженному на E^n :

$$N_n = N_0 E^n$$

где n – номер цикла реакции; N_0 – количество молекул на первом цикле;

N_n – количество молекул на цикле n ; E – коэффициент эффективности ПЦР.

Эффективность ПЦР оценивалась с использованием десяти последовательных разведений плазмиды. Каждая проба анализировалась в двух повторах.

Экспериментальная установка для определения линейности для каждой цели ПЦР в мультиплексном методе такая же, как и установка, использованная для определения эффективности ПЦР. При выполнении линейного регрессионного анализа полученных данных Excel предоставляет коэффициент корреляции R^2 кривой, который является мерой линейности реакции ПЦР [41].

1.8.1. Исследование аналитической чувствительности и линейности разрабатываемой технологии с использованием стандартов

Аналитическая чувствительность метода исследования отражает способность разработанного метода определять наименьшее различие между двумя концентрациями анализируемого соединения. Этот параметр отражается количественно в виде наклона калибровочного графика и в виде отношения прироста значений измерения на единицу анализируемого

компонента в диапазоне линейности калибровочного графика. Линейность метода представляется как интервал значений, в котором ожидаемое значение и действительное значение различаются случайным образом.

Чувствительность - это минимальное количество копий, которое выявляется тест-системой. Для каждой транслокации свой минимальный порог копий.

2. Материалы и методы

2.1. Объект исследования

Объектом исследования были анонимные пробы, взятые у 9 пациентов с подтвержденным острым миелобластным лейкозом (4 женского пола и 5 мужского пола в возрасте от 6 до 68 лет), 14 пациентов с острым лимфобластным лейкозом (8 девочек и 6 мальчиков в возрасте от 2 до 17 лет) и 11 здоровых добровольцев (4 женщины и 7 мужчин в возрасте от 22 до 24 лет), составляющих группу контроля.

2.2. Методы

2.2.1. Выделение РНК набором «РИБО-золь-D»

Компанией Ampli Sens проверен и рекомендован к использованию набор реагентов для выделения РНК компании ООО «ИнтерЛабСервис».

Метод выделения РНК набором реагентов «РИБО-золь-D» заключается в предварительном лизисе клеток специфическим реагентом и последующим разделением на две фазы: верхняя (водная) фаза содержит РНК, а нижняя (фенольная) – белки и ДНК [15]. Переносим верхнюю фазу в чистые пробирки на 1,5 мл и продолжаем выделение, следуя инструкции. После чего происходит отмывка клеток и высушивается осадок, содержащий РНК.

Раствор РНК можно хранить при температуре не выше минус 68°C в течение года.

2.2.2. Метод обратной транскрипции

Обратная транскрипция предназначена для синтеза первой цепи кДНК с одноцепочечной РНК-матрицы. В ходе этого процесса определенные последовательности, присутствующие в виде уникальных копий в РНК, должны быть дуплицированы, чтобы образовать длинные концевые повторы на обоих концах ДНК-продукта. Для проведения обратной транскрипции необходимо смешать в пробирке следующие компоненты реакционной

смеси: безнуклеазную воду, буфер для синтеза первой цепи (5X ОТ-буфер), дитиотреитол, нуклеотидтрифосфаты (25 мкМ), случайные праймеры. Фермент для обратной транскрипции (Ревертаза MMLV) вынимается из морозильной камеры непосредственно перед добавлением в смесь [17]. Затем проводится инкубация по программе: 37°C – 30 мин, 92°C – 5 мин. Готовую кДНК можно заморозить при -20°C или использовать сразу для постановки ПЦР.

2.2.3. Исследование оптимальных условий реакции методом мультиплексной ПЦР-РВ

Температура отжига праймеров является одним из важнейших факторов в реакции ПЦР [18].

Температурой плавления олигонуклеотида берут температуру, при которой половина молекул находится в двуцепочечном состоянии, а половина переходит в одноцепочечное состояние. Под температурой отжига принято понимать оптимальную температуру, при которой происходит комплементарное связывание олигонуклеотида с исследуемой матрицей.

В настоящее время нет методов, позволяющих очень точно предсказать температуру отжига. Поэтому для достижения лучших результатов её необходимо подбирать эмпирически.

Для определения оптимальной температуры отжига праймеров проводили ПЦР-РВ с использованием градиента температур отжига, значения которых приведены в таблице.

2.2.4. Метод ПЦР-РВ

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют разные методики, которые выбираются в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в извлечении ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения чистого препарата ДНК, который пригоден для постановки реакции амплификации [25].

ПЦР-РВ обладает возможность одновременно проводить амплификацию и измерение количества искомой молекулы ДНК. Преимуществом данного подхода является совмещение детекции и количественного определения специфической последовательности ДНК в пробе в реальном времени после каждого цикла амплификации [14].

Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК или модифицированные дезоксинуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК [19].

Состав реакционной смеси: H_2O , $MgCl_2$, ПЦР-Буфер, dNTP, праймеры, TaqMan-зонды, Taq-полимераза.

ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad) в соответствии с программой: $95^{\circ}C$ – 5 мин, 50 циклов: $95^{\circ}C$ – 15 сек, $60^{\circ}C$ – 1 мин.

2.2.5. Выделение целевой вставки

Приготовление компетентных клеток.

1. Бактериологической петлей сняли с чашки Петри со средой LB без антибиотика 1-3 колонии культуры *E.coli*, перенести в 5 мл жидкой среды SOB. Инкубировали в течении ночи при $37^{\circ}C$ в суховоздушном термостате. Эту культуру использовали и хранили для дальнейших посевов не более 20 дней при $4-8^{\circ}C$;

2. На следующий день из инкубированной пробирки отобрали 100 мл культуры, перенесли в 5мл жидкой среды SOB. Инкубировали 2-4 ч. При $37^{\circ}C$ до оптической плотности 0.2-0.5 за вычетом ОП дистиллированной воды. Одновременно с этим подготовили ледяную баню, заполнили специальную емкость водой и поставили на ~ 2 часа в морозильную камеру, периодически разламывая образующийся слой льда;

3. Добавили по 2 мл культуры в 2 пробирки объемом 2 мл, поместили пробирки в лёд на 5 минут. Вместе с этим поставили используемые

наконечники для пипеток в морозильную камеру для их охлаждения. В дальнейшем использовали только охлажденные наконечники;

4. Центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 мин (или при 6000 об/мин на вортексе в течение 3-х минут), слили водную часть;

5. Добавили в каждую пробирку по 750 мкл охлажденного раствора Mg^{2+}/Ca^{2+} , пипетировали;

6. Добавили в каждую пробирку по 750 мкл охлаждённого раствора Mg^{2+}/Ca^{2+} , пипетировали;

7. Инкубировали на льду в течение 30 мин;

8. Центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 мин, слили водную часть;

9. Добавили в каждую пробирку по 80 мкл охлаждённого раствора $CaCl_2$ (или другое количество, необходимое для разовой трансформации в расчёте 100 мкл на 1 пробу, но не более 150 мкл раствора для каждой пробирки), пипетировали;

10. Инкубировали на льду в течение 20 мин, затем слили клетки в одну пробирку, поставили 40% глицерин в холодильник для охлаждения.

Трансформация компетентных клеток

1. Включили водяную баню на 42 °С;

2. В чистую пробирку на 1.5 мл отобрали 100 мкл клеток, добавили к ним 100-200 нг (~2 или 10 мкл) плазмиды, инкубировали на льду в течение 30 мин;

3. Поместили пробирку с клетками в водяную баню на 45 сек, после этого перенесли в лёд на 2 мин;

4. Добавили в пробирку 450 мкл SOB среды, пипетировали, инкубировали в термостате 1 час при 37 °С;

5. Произвели высев 200мкл культуры из пробирки на чашки с LB агаром и антибиотиком, тщательно растирли культуру шпателем или петлёй, инкубировали чашки при 37 °С в течение 24-48 часов до появления видимых колоний;

6. Белый цвет колоний на среде для бело-голубой селекции говорит об успешном встраивании плазмиды в вектор. Синий/голубой – об отсутствии вставки.

Подготовка клеток к выделению плазмидной ДНК

1. Взяли 3 чистых пробирки на 1.5 мл и добавили в них по 1 мл среды SOB;

2. Сняли единичную белую колонию без голубого центра с чашки бактериологической петлей и размешали в пробирке. Прodelали выше указанное для двух оставшихся пробирок;

3. Инкубировали пробирки на мешалке в термостате при 37 °С в течение 24 часов;

4. На следующий день отобрали 200 мкл из каждой пробирки для хранения, поставили в холодильник. Оставшийся объём использовали для выделения;

5. Пробирки с клетками, у которых методом ПЦР обнаружена целевая вставка, подготовили для хранения по инструкции в данной методике и поместили в криохранилище.

Приготовление Mg^{2+}/Ca^{2+} раствора

1,625 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

0,226 г $CaCl_2$ б/в

100 мл деиониз. H_2O

Хранили в холодильнике

Приготовление $CaCl_2$ раствора

1,114 г $CaCl_2$ б/в

100 мл деиониз. H_2O

Стерилизовали

Хранили в холодильнике

Приготовление сред

Агар LB по Lennox – 35 г на 1 л дист. H₂O, кипятят до растворения агара, стерилизуют, разливают по чашкам до слоя в 0.5-0.7 см, крышки на чашках приоткрывают, через час ставят в холодильник;

Агар LB по Миллеру с ампициллином – 40 г на 1 л дист. H₂O, кипятят до растворения агара, не стерилизуют, разливают по чашкам до слоя в 0.5-0.7 см, крышки на чашках приоткрывают, через час ставят в холодильник;

Среда SOB – 28 г на 1 л дист. H₂O, кипятят до растворения агара, стерилизуют, хранят во флаконе в холодильнике.

Готовые среды хранят не более 30 дней. Среда, заклеенная парафином, можно хранить до 3-х месяцев.

ПЦР-РВ характеризуется возможностью одновременного проведения качественного и количественного анализа. Регистрируемое в процессе амплификации нарастание сигнала от отделенного флуорофора прямо пропорционально увеличению концентрации синтезированных специфических продуктов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице [47].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «STATISTICA».

Исследование аналитической чувствительности и линейности разрабатываемой технологии с использованием цифровой ПЦР

Таблица 1 - Расчет количества копий

Образец	Концентрация, копий/мкл образца
WT1	3641600
MLL-AF9	20198300
AML1-ETO	71030
ETV6-RUNX1	16117000

Экспериментальное определение эффективности ПЦР-РВ создаваемого набора проводилось с использованием реакционных смесей концентрации компонентов, которых представлены в таблице.

Таблица 2- Состав реакционных смесей

Компонент реакционной смеси	Концентрация
Буфер W	2 мкл
Вода	12 мкл
Плазмида*	5 мкл
Рестриктаза MiraX I	1 мкл

* различные плазмиды, в зависимости от стандарта

Готовые реакционные смеси перемешали и поставили в термостат на 2 часа при температуре 37°C. Затем поставили на инактивацию на 20 минут при температуре 65°C. После чего произвели разведение проб, добавив в каждую пробу 480 мкл ТЕ буфера, перемешали и сбросили каплю. Затем произвели разведение в $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}$.

Таблица 3- Описание пропорций разведенных проб

	Описание	Разведение плазмидной ДНК, раз
исходная проба	рестрикционная смесь + 480 мкл ТЕ-буфера	10^2
1	из исходной пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^3
2	из 1 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^4
3	из 2 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^5
4	из 3 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^6
5	из 4 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^7

6	из 5 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^8
7	из 6 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^9
8	из 7 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^{10}
9	из 8 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^{11}
10	из 9 пробы 5 мкл + 45 мкл ТЕ-буфера	10^{12}

После разведений поставили ПЦР для выявления пороговых циклов в зависимости от разведений стандарта ДНК.

Таблица 4- Состав реакционной смеси для ПЦР на одну пробу

Компонент реакционной смеси	Концентрация
ПЦР буфер	1X
MgCl ₂	2,5 мМ
Праймеры	15 пкмоль
Зонд	15 пкмоль
Вода	до 25 мкл
Тaq-полимераза	1 Ед
дНТФ	0,25 мМ

После проведенной реакции ПЦР построили таблицу пороговых циклов в зависимости от разведений ДНК.

3. Результаты и обсуждения

Изъято 6 страниц

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Наилучший пороговый цикл для всех разрабатываемых реакций наблюдается при температуре 60°C;
2. Для всех разработанных стандартных образцов эффективность находилась в пределах от 94 до 108%;
3. Для транслокации AML-ETO минимальная чувствительность тест-системы составляет 2 копии, для MLL-AF9 – 1 копия, для ETV6-RUNX1 – 1 копия, для WT1 – 1 копия. Для всех стандартных образцов наблюдалась линейная зависимость порогового цикла ПЦР от количества ДНК-матрицы;
4. В ходе апробации разработанного метода у 1 из 6 пациентов выявлена транслокация AML1-ETO.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТ-крючки – аденин-тиминовые крючки
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- дНТФ - дезоксинуклеотидтрифосфат
- МОБ - минимальная остаточная болезнь
- ОЛ - острый лейкоз
- ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз
- ОМЛ - острый миелобластный лейкоз
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ТГСК- трансплантации гемопоэтических стволовых клеток
- ФАБ - Франко-американско-британская классификационная
- HMGA2 - High-mobility group AT-hook 2
- UTR- нетранслируемая область
- WT1 –Wilms tumor protein

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритм цитогенетического исследования при различных заболеваниях. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://monographies.ru/ru/book/section?id=5838>
2. Глузман Д.Ф. Новое в классификации ВОЗ миелоидных новообразований и острых лейкозов (пересмотр 2016г.)/Глузман Д.Ф., Складенко Л.М., Ивановская Т.С., Коваль С.В., Завелевич М.П., Украинская Н.И., Телегеев Г.Д., Дыбков М.В.//Онкология, 2016, том 18, №3.
3. Цаур Г.А. Значение определения химерного транскрипта ETV6-RUNX1 методом полимеразной цепной реакции у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников с наличием транслокации t (12;21)(p13;q22)./Цаур Г.А., Ригер Т.О., Попова А.М., Вержбицкая Т.Ю., Вахонина Л.В., Власова А.А., Ольшанская Ю.В., Казакова А.Н., Стренева О.В., Макарова О.В., Цвиренка С.В., Савельев Л.И., Аракаева О.Р., Фечина Л.Г.//Онкогематология, 2017.
4. Кекеева Т.В. Химерные гены и транскрипты в онкологии. /Кекеева Т.В., Завалишина Л.Э., Франк Г.А., Залетаев Д.В. // Молекулярная биология, 2011, том 45, № 5, с. 793-804
5. Козинцев Г.И. Атлас клеток крови и костного мозга./Козинцев Г.И.//Медицинская литература, книга по медицине, учебник.- 1998.
6. Козинцев Г.И. Кровь. Клинический анализ. Диагностика анемий и лейкозов. Интерпретация результатов. /Козинцев Г.И., Погорелов В.М., Дягилева О.А., Наумова И.Н.//Медицина XXI.- 2006.
7. Лейкозы у детей: причины, виды, симптомы, современные методы лечения. [Электронный ресурс]: Режим доступа:

https://myfamilydoctor.ru/lejkozy-u-detej-prichiny-vidy-simptomy-sovremennye-metody-lecheniya/#toc_i-6

8. Лейкемия острая (острый лейкоз). [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.medicin-germany.ru/bolezni/rak/lejjkemiya-ostraya-ostryjj-lejjkoz/>
9. Мамаев Н.Н.
Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена WT1 после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. / Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Бархатов И.М., Гудожникова Я.В., Гиндина Т.Л., Катерина В.А., Волчков Е.В., Алянский А.Л., Бабенко Е.В., Слесарчук О.А., Станчева Н.В., Бондаренко С.Н., Афанасьев Б.В. // Клиническая онкогематология 8(3)-2015. Стр. 309-320
10. Метод ПЦР. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.ld.ru/PCR/ilist-4208.html>
11. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaja-reaktsiia>
12. Механизм процесса обратной транскрипции. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://students-library.com/library/read/26915-mehanizm-processa-obratnoj-transkripcii>
13. Минимальная остаточная болезнь. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.podari-zhizn.ru/main/node/7753>
14. Мультиплексная ПЦР (Multiplex PCR). [Электронный ресурс]: Режим доступа: https://myzooplanet.ru/zaschita-rasteniy_841/multipleksnaya-ptsr-multiplex-18952.html

15. Мультипраймерная (мультиплексная) ПЦР. [Электронный ресурс]: Режим доступа: http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00000dc4.htm
16. Острый лимфобластный лейкоз у взрослых. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://thebestmedic.com/onkogematologiya-lechenie-raka-krovi-v-izraile-lechenie-leukoza-v-izraile/ostryy-limfoblastnyy>
17. Обратная транскриптаза MMLV и набор "MMLV RT kit". [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://evrogen.ru/products/MMLV/MMLV.shtml>
18. Основы метода ПЦР. [Электронный ресурс]: Режим доступа: http://www.lytech.ru/articles_128.htm
19. Саматов Г.А. ПЦР в реальном времени. /Саматов Г.А., Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю. //Бином. Лабораторий знаний,2018
20. Острая миелоидная лейкемия (ОМЛ). [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.oncology.ru/books/monograph/leukaemia/chapter5-1.pdf>
21. Острый лейкоз. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://medportal.ru/enc/oncology/types/ostryj-lejkoz/>
22. Волкова С.А. Основы клинической гематологии. /Волкова С.А., Боровков Н.Н. //Учебное пособие, НижГМА, 2013.
23. Острый миелоидный лейкоз — симптомы промиелоцитарного, монобластного, миеломоноцитарногомиелолейкоза. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://redkrov.ru/patologii/lejkoz/ostryj-mieloidnyj-lejkoz-simptomu.html>
24. Поболелова Ю.И. Мультиплексная ПЦР для совместной амплификации генов бактериальных ферментов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D /Поболелова Ю.И. ,Уляшова

- М.М. Рубцова М.Ю., А.М. Егоров А.М. // Биохимия, 2014, том 79, вып. 6, с. 718 - 723
25. Полимеразная цепная реакция. [Электронный ресурс]: Режим доступа:
http://www.ckrgene.ru/left/polimeraznaya_cepnaya_reakciya/
26. Причины и симптомы острого Т-клеточного и В-клеточного лимфобластного лейкоза. [Электронный ресурс]: Режим доступа:
<http://redkrov.ru/patologii/lejkoz/prichiny-i-simptomy-ostrogo-limfoblastnogo-lejkoza.html>
27. Прогноз лейкоза. [Электронный ресурс]: Режим доступа:
<https://www.no-onco.ru/lejkoz/prognoz-lejkoza.html>
28. ПЦР в реальном времени. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://med-gen.ru/o-tcentre/struktura/tcentr-kollektivnogo-pol-zovaniia-genom/ptcr-v-real-nom-vremeni/>
29. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади А.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в реальном времени. - 2изд. - М.: БИНОМ, 2009. - 223 с.
30. Румянцев А.Г. «Клинические рекомендации (протоколы лечения). Общие положения» /Румянцев А.Г., Масчан А.А. //Федеральные клинические рекомендации. ГОСТ Р. 56034-2014.
31. Румянцев А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого миелоидного лейкоза./Румянцев А.Г., Масчан А.А. //Общественная организация Национальное общество детских гематологов, онкологов; ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 2014.
32. Румянцев А.Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков. /Румянцев А.Г., Масчан А.А., Румянцева Ю.В., Карачунский А.И. //Общественная организация Национальное

общество детских гематологов, онкологов; ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 2015.

33. Савченко В.Г. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. /Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Грицаев С.В., Семочкин С.В., Бондаренко С.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н., Кузьмина Л.А., Клясова Г.А., Гапонова Т.В., Баранова О.Ю., Лапин В.А., Константинова Т.С., Самойлова О.С., Капорская Т.С., Шатохин С.А.//Национальное гематологическое общество, 2014.
34. Соколова Т. А. Цитогенетическая диагностика при онкогематологических заболеваниях /Соколова Т. А., Котловский Ю. В., Дубынина Е. В., Ивановская О. В., Веселова В. К., Кузнецова Е. Ю. //Учебно-методическое пособие для студентов, курсантов высших учебных заведений, практических врачей. Академия естествознания, 2012.
35. Флуоресцентная гибридизация IN SITU (FISH). [Электронный ресурс]: <https://tomonco.ru/patient/services/fluorestsentnaya-gibridizatsiya-in-situ-fish/>
36. Хронический и острый миелобластный лейкоз. [Электронный ресурс]: Режим доступа:<http://redkrov.ru/patologii/lejkoz/xronicheskij-i-ostryj-mieloblastnyj-lejkoz-krovi.html>
37. Цитогенетический метод исследования (кариотипирование). [Электронный ресурс]: Режим доступа: https://sechenovclinic.ru/treatments/detail.php?SECTION_ID=&ELEMENT_ID=2716
38. Шевчук Д.В.Сравнение эффективности выделения РНК методиками «RNEASYMINIKITQIAGEN» И «РИБО-ЗОЛЬ-D» для последующего анализа с использованием технологии

«БИОЧИП» / Шевчук Д.В., Ануфриева Е.Е. //IX Всероссийская конференция «Молодёжь и наука» 2013.

39. Ayatollahi H. Quantitative assessment of Wilms tumor 1 expression by real time quantitative polymerase chain reaction in patients with acute myeloblastic leukemia./Ayatollahi H., Sadeghian M., Naderi M., Jafarian A., Shams S., Motamedirad N., Sheikhi M., Bahrami A., Shakeri S.//Journal of Research in Medical Sciences. №22: P. 54. Doi: 10.4103 -2017.
40. Barragan E. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia./Barragan E, Cervera J., Bolufer P., Ballester S., Martin G., Fernandez P., Collado R., Sayas M., Sanz M. //Acute Myeloid Leukemia.-2004. №89, P. 926-933.
41. Broeders S. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods./ Broeders S., Huber I., Grohmann L., Berben G., Taverniers I., Mazzara M., Roosens N., Morisset D. // Trends in food science & Technology. – 2014. Volume 37. Issue 2. Pages 115-126.
42. Cilloni D. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients./Cilloni D., Gottardi E., Micheli D., Serra A., Volpe G., Messa F., Rege-Cambrin G., Guerrasio A., Divona M., Lo Coco and Saglio G.// Leukemia.-2002. №16. P. 2115-2121.
43. ETV6-RUNX1. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://inogene.ru/etv6-runx1-2.html>
44. Hou H. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system./Hou H., Huang T., Lin L., Liu C., Chen C., Chou W., Tang J., Tseng M., Huang C., Chiang Y.,

Lee F., Liu M., Yao M., Huang S., Ko B., Hsu S., Wu S., Tsay W., Chen Y., and Tien H. // BLOOD.-2010 Vol.115. No.25


45. Identification of complex genomic breakpoint junctions in the t(9; 11) MLL-AF9 fusion gene in acute leukemia. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/9331569/>
46. Jonathan D Licht. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8; 21) AML. /Jonathan D Licht//Oncogene 20, 5660–5679 (2001).
47. Marjanovic I. Use of Wilms Tumor 1 Gene Expression as a Reliable Marker for Prognosis and Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype Patients. /Marjanovic I., Karan-Djurasevic T., Ugrin M., Virijevic M., Vidovic A., Tomin D., Vukovic N., Pavlovic S., Tosic N.//Original Study.-2017. Vol.17, No. 5, 312-9.
48. MLL–AF9-mediated immortalization of human hematopoietic cells along different lineages changes during ontogeny. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/leu2012343>
49. Ptasinska A. Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. /Ptasinska A., Assi S.A., Mannari D., James S.R., Williamson D., Dunne J., Hoogenkamp M., Wu M., Care M., McNeill H., Cauchy P., Cullen M., Tooze R.M., Tenen D.G., Young B.D., Cockerill P.N., Westhead D.R., Heidenreich O., Bonifer C.// Leukemia volume 26, pages 1829–1841 (2012)
50. Real time PCR ПЦР в реальном времени [Электронный ресурс]: Режим доступа: http://www.lytech.ru/articles_129.htm

51. Tan L. Amplified HMGA2 promotes cell growth by regulating Akt pathway in AML./Tan L., Wei X., Zheng L., Zeng J., Liu H., Yang S., Tan H.//J Cancer Res ClinOncol; Vol.142, №2, P. 389-99.
52. The leukemogenic t(8; 21) fusion protein AML1-ETO controls ribosomal RNA genes and associates with nucleolar organizing regions at mitotic chromosomes. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904240/>
53. UNIPROTКВ - P19544 (WT1_HUMAN). [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.uniprot.org/uniprot/P19544>
54. UNIPROTКВ - P52926 (HMGA2_HUMAN).[Электронныйресурс]: Режимдоступа: <https://www.uniprot.org/uniprot/P52926>
55. WT1 gene. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/WT1>
56. Wilms Tumor Predisposition. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk1294/>

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г.Волова

подпись инициалы, фамилия

« 18 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
Разработка стандартных образцов для детекции химерных онкогенных
транскриптов
тема работы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология


Научный
руководитель


подпись, дата

д-р.биол.н., профессор
должность, ученая степень

С.В. Прудникова
инициалы, фамилия

Научный
консультант


подпись, дата

к.м.н., доцент
должность, ученая степень

И. А. Ольховский
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

К.А. Табакова
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

к.м.н., доцент
должность, ученая степень

В.А. Бабушкин
инициалы, фамилия

Красноярск 2021