

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Е. И. Шишацкая

подпись

«18» июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ соматических мутаций в гене ASXL1
у пациентов с диагнозом миелофиброз

06.04.01 Биология

06.04.01.00.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

к.б.н. Т. Н. Субботина

подпись, дата

Выпускник

П. А. Николаева

подпись, дата

Рецензент

профессор, к.м.н.
Ю.И. Гринштейн

подпись, дата

Красноярск 2018

АННОТАЦИЯ

Миелофиброз – это хроническая миелопролиферативная опухоль, которая характеризуется фиброзом костного мозга, спленомегалией, экстрамедуллярным гемопоэзом.

На данный момент известны драйверные и прогностические мутации при данном заболевании. Среди драйверных мутаций известны мутации в таких генах, как JAK2, CALR, MPL. Среди прогностических мутаций наиболее важное значение при миелофиброзе имеют эпигенетические мутации в таких генах, как TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, IDH1/2. Встречаемость эпигенетических мутаций при миелофиброзе разнообразна, но наибольшая встречаемость приходится на ASXL1 (18-22%). Также мутации в гене ASXL1 являются прогностическими. Было показано, что мутации в гене ASXL1 ухудшают выживаемость пациентов с миелофиброзом и возрастает риск бластной трансформации. Поэтому, очень важно делать скрининг мутаций в гене ASXL1 на ранних стадиях миелофиброза.

Цель данной работы – анализ прогностических соматических мутаций в гене ASXL1 у пациентов с диагнозом миелофиброз.

Анализ мутаций в гене ASXL1 проводили с использованием секвенирования по Сэнгеру. Уровень аллельной нагрузки мутаций в гене ASXL1 считали с использованием нового программного обеспечения «Minor Variant Finder». Различия выживаемости между ASXL(-) и ASXL(+) группами пациентов были посчитаны методом Каплана-Майера.

В ходе исследования была разработана технология для определения соматических мутаций в гене ASXL1 методом секвенирования по Сэнгеру, в частности были подобраны праймеры, оптимизирована ПЦР и прописан алгоритм для дальнейшего анализа.

Из 27 пациентов с диагнозом МФ у 12 человек выявлены соматические мутации в гене ASXL1. Самой распространенной явилась мутация p.G646fs*12, что соответствует литературным данным. У двух пациентов выявлены новые мутации c.2445_2449delGTCTC (p.L815fs*5) и c.1772_1773insAA (p.Y591fs*1), которые на настоящий момент не представлены в базе COSMIC. Программа «Minor Variant Finder» позволила определить уровень аллельной нагрузки для 3-х пациентов, имеющих мутации типа однонуклеотидных замен. Уровень нагрузки составил 9%, 33% и 38%. Различий между выживаемостью ASXL1(-) и ASXL1(+) групп пациентов не было обнаружено (p=1), что может быть вызвано незначительной выборкой.

Ключевые слова: МИЕЛОФИБРОЗ, ASXL1, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, MINOR VARIANT FINDER, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ И ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ, УРОВЕНЬ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Анализ соматических мутаций в гене ASXL1 у пациентов с диагнозом миелофиброз» содержит 49 страниц текстового документа, 22 иллюстрации, 6 таблиц и 58 использованных источников.

МИЕЛОФИБРОЗ, ASXL1, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, MINOR VARIANT FINDER, ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ И ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ, УРОВЕНЬ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ.

Цель данной работы – анализ прогностических соматических мутаций в гене ASXL1 у пациентов с диагнозом миелофиброз. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать технологию для выявления соматических мутаций в гене ASXL1 методом секвенирования по Сэнгеру.
2. Провести анализ мутаций в гене ASXL1 среди пациентов с диагнозом миелофиброз г. Красноярск.
3. Обработать полученные результаты с помощью специализированных программ, позволяющих идентифицировать тип мутации, а также уровень аллельной нагрузки.
4. Оценить влияние обнаруженных мутаций на клиническое состояние пациента с учетом наличия или отсутствия драйверных мутаций.

Поскольку мутации в гене ASXL1 ухудшают выживаемость пациентов с диагнозом миелофиброз и возрастает риск бластной трансформации. Поэтому, очень важно делать скрининг мутаций в гене ASXL1 на ранних стадиях миелофиброза. Актуальность диссертационной работы заключается в том, что была разработана технология для выявления соматических мутаций в гене ASXL1 методом секвенирования по Сэнгеру. В ходе работы было проанализировано 27 пациентов с диагнозом миелофиброз на предмет наличия мутации в гене ASXL1.

ABSTRACT

Master's thesis on the topic "Analysis of somatic mutations in the gene ASXL1 in patients diagnosed with myelofibrosis" contains 49 pages of a text document, 22 illustrations, 6 tables and 58 sources used.

MIELOFIBROSIS, ASXL1, SOMATIC MUTATIONS, SANGER SEQUENCING, MINOR VARIANT FINDER, PROGNOSTIC AND DRIVER MUTATIONS, ALLELE BURDEN.

The aim of this work is to analyze prognostic somatic mutations in the ASXL1 gene in patients diagnosed with myelofibrosis. To achieve this goal, the following tasks were formulated:

1. Develop a technology for detecting somatic mutations in the ASXL1 gene by Sanger sequencing.
2. To carry out the analysis of mutations in the gene ASXL1 among patients diagnosed with myelofibrosis in Krasnoyarsk.
3. Process the results obtained with the help of specialized programs that allow to identify the type of mutation, as well as the allele load level.
4. To evaluate the effect of the detected mutations on the clinical state of the patient, taking into account the presence or absence of driver mutations.

Since mutations in the ASXL1 gene worsen the survival of patients diagnosed with myelofibrosis and the risk of blast transformation increases. Therefore, it is very important to screen mutations in the ASXL1 gene in the early stages of myelofibrosis. The relevance of the thesis is that a technology was developed to detect somatic mutations in the ASXL1 gene by sequencing with Sanger. In the course of the work, 27 patients with a diagnosis of myelofibrosis were examined for the presence of a mutation in the ASXL1 gene.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
1 Обзор литературы	7
1.1 Хронические миелопролиферативные опухоли	7
1.2 Миелофиброз	7
1.3 Соматические мутации, участвующие в патогенезе миелофиброза.....	11
1.3.1 Мутации генов сигнальных путей.....	11
1.3.2 Эпигенетические мутации.....	14
1.4 ASXL1, его структура функции.....	15
1.5 Ассоциации генетических аномалий с клиническими особенностями и прогнозом миелофиброза	18
2 Материалы и методы	20
2.1 Объект исследования	20
2.2 Выделение ДНК с использованием набора «Gene JET Whole Blood Genomic DNA Purification».....	20
2.3 Измерение концентрации ДНК.....	21
2.4 Проведение ПЦР с использованием электрофоретической детекции... ..	22
2.5 Чистка продукта ПЦР с использованием реагента EhoSAP-IT	23
2.6 Проведение секвенирующей ПЦР	23
2.7 Проведение очистки сиквенс-продукта	24
2.8 Специализированные программы для обработки полученных результатов.....	24
3 Результаты и обсуждения.....	26
3.1 Разработка технологии анализа соматических мутаций в гене ASXL1 у пациентов с диагнозом миелофиброз....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2. Характеристика пациентов с диагнозом миелофиброз	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Анализ соматических мутаций в гене ASXL1 у пациентов с диагнозом миелофиброз	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Анализ драйверных мутаций в генах JAK2, MPL и CALR у пациентов с диагнозом миелофиброз	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Использование ПО «Minor Variant Finder» для определения уровня аллельной нагрузки мутаций в гене ASXL1	Ошибка! Закладка не определена.
3.6 Показатели выживаемости у пациентов с диагнозом миелофиброз в зависимости от наличия мутации в гене ASXL1	Ошибка! Закладка не определена.
3.7 Анализ методом NGS.....	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	26
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	28

ВВЕДЕНИЕ

Миелофиброз – это хроническая миелопролиферативная опухоль, которая характеризуется фиброзом костного мозга, спленомегалией, экстрамедуллярным гемопоэзом. Источником опухолевого роста является клональное расстройство полипотентной гемопоэтической стволовой клетки. Также это 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 [7-9].

На данный момент известны драйверные и прогностические мутации при данном заболевании. Среди драйверных мутаций известны мутации в таких генах, как JAK2, CALR, MPL. Встречаемость мутаций при миелофиброзе в гене JAK2 составляет 40-50%, в гене CALR – 35% и в гене MPL – 8%. Среди прогностических мутаций наиболее важное значение при МФ имеют эпигенетические мутации в таких генах, как TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, IDH1/2. Встречаемость эпигенетических мутаций при МФ разнообразна, но наибольшая встречаемость приходится на ASXL1 (18-22%). Также мутации в гене ASXL1 являются прогностическими. Было показано, что мутации в гене ASXL1 ухудшают выживаемость пациентов с МФ и возрастает риск БТ. Поэтому, очень важно делать скрининг мутаций в гене ASXL1 на ранних стадиях миелофиброза.

Цель данной работы – анализ прогностических соматических мутаций в гене ASXL1 у пациентов с диагнозом миелофиброз. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать технологию для выявления соматических мутаций в гене ASXL1 методом секвенирования по Сенгеру.
2. Провести анализ мутаций в гене ASXL1 среди пациентов с диагнозом миелофиброз г. Красноярска.
3. Обработать полученные результаты с помощью специализированных программ, позволяющих идентифицировать тип мутации, а также уровень аллельной нагрузки.
4. Оценить влияние обнаруженных мутаций на клиническое состояние пациента с учетом наличия или отсутствия драйверных мутаций.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Обзор литературы

1.1 Хронические миелопролиферативные опухоли

Хронические миелопролиферативные опухоли (ХМО) – это группа, включающая несколько Ph-негативных гематологических болезней. К самым частым миелопролиферативным опухолям относят истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и миелофиброз (МФ). 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 [1].

Для группы ХМО характерны следующие признаки:

1. Преобладание клонального гемопоэза над нормальным;
2. Повышенная продукция форменных элементов одного или более ростков 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 [2].

На сегодняшний день установлено наличие трех основных драйверных мутаций гемопоэтической стволовой клетки при этих патологиях: в гене янус-киназы (JAK2), в гене тромбоэтинового рецептора (MPL), в гене калиретикулина (CALR). Встречаемость мутаций в гене JAK2 среди пациентов с ИП составляет 95%, с ЭТ – 50-70%, с МФ – 40-50%. Встречаемость мутаций в гене MPL среди пациентов с МФ и ЭТ составляет 8% и 10% соответственно. Встречаемость мутаций в гене CALR среди пациентов с МФ и ЭТ составляет 35% и 25% соответственно [3].

1.2 Миелофиброз

Миелофиброз (МФ) – это хроническая миелопролиферативная опухоль, которая характеризуется фиброзом костного мозга, спленомегалией, экстрамедуллярным гемопоэзом. Источником опухолевого роста является клональное расстройство полипотентной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) [4-6].

МФ – 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 [7-9].

МФ делится на первичный миелофиброз (ПМФ) и вторичный. ПМФ

возникает *de novo*, вторичный миелофиброз возникает в результате трансформации ИП и ЭТ.

При МФ 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. МФ 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 [10].

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 [11, 12]. Молекулярно-генетические механизмы, приводящие к развитию МФ, 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 МФ 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 МФ 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;

- тромботических осложнений – тромбозы и тромбоземболии сосудов различных органов и тканей, которые могут возникать даже при бессимптомном течении МФ и нередко служат поводом к обследованию и установлению диагноза;

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

- геморрагического синдрома – кровоточивость при минимальных травмах или спонтанные патехиальные или синячковые кровоизлияния.

В клиническом течении МФ выделяют 2 фазы, которые отражают степень прогрессирования заболевания: хроническую фазу (ХФ) и бластную фазу (БФ). ХФ является начальной стадией МФ и диагностируется у большинства (более 90%) впервые выявленных больных. Наиболее характерными признаками являются изменения клинического анализа крови, увеличение размеров печени и селезенки, наличие симптомов опухолевой интоксикации. БФ является терминальной стадией развития патологического процесса при МФ. Диагностическим критерием БФ МФ является наличие в периферической крови или в костном мозге $\geq 20\%$ бластных клеток.

С целью верификации диагноза МФ международной рабочей группой в 2007 г. разработаны диагностические критерии, утвержденные всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), и широко используемые для постановки этого диагноза [13]. В 2016 г. был проведен пересмотр диагностических критериев, составлены предложения по новым критериям диагностики МФ. В новой редакции диагностические критерии МФ состоят из 3 больших и 5 малых критериев.

Большие критерии:

1. Наличие мегакариоцитарной пролиферации и атипии, сопровождаемой либо ретикулиновым, либо / или коллагеновым фиброзом.

2. Не соответствует критериям ВОЗ для ИП, ЭТ, BCR-ABL⁺ хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) или другим миелоидным новообразованиям.

3. Наличие мутации в генах JAK2, CALR или MPL. При отсутствии мутаций в этих генах – наличие другого клонального маркера (ASXL1, EZH2, TET2, IDH1 / IDH2, SRSF2, SF3B1).

Малые критерии:

1. Наличие анемии.

2. Лейкоцитоз.

3. Наличие пальпируемой спленомегалии.

4. Повышение уровня лактатдегидрогеназы в крови.

5. Лейкоэритробластоз.

Для верификации диагноза МФ по вновь разработанным критериям требуется подтверждение 3 больших критериев и 1 малого критерия [14].

Прогностические индексы

Продолжительность жизни больных МФ на 31% меньше, чем в популяции у людей того же пола и возраста. Средняя продолжительность

жизни составляет 5 лет, хотя более молодые пациенты могут жить дольше [15]. При постановке диагноза и в процессе лечения больных с МФ необходимо учитывать прогностические факторы, определяющие длительность жизни и прогноз пациентов. В таблице 1 представлены шкалы оценки прогноза МФ.

Таблица 1 – Шкалы оценки прогноза МФ.

Признак	Подсчет риска по системе стратификации IPSS [16].	Подсчет риска по системе стратификации DIPSS [17].	Подсчет риска по системе стратификации DIPSS[18].
Возраст более 65 лет	1	1	1
Уровень гемоглобина менее 100 г/л	1	2	2
Уровень лейкоцитов более $25 \cdot 10^9/\text{л}$	1	1	1
Бласты в периферической крови равно или более 1%	1	1	1
Конституциональные симптомы	1	1	1
Тромбоциты $<100 \cdot 10^9/\text{л}$	1	1	1
Необходимость переливания эритроцитов		1	1
Неблагоприятный кариотип: +8,-7/7q-, (17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, перестройки 11q23			1
Группа риска	• 0 баллов – низкий риск	• 0 баллов – низкий риск	• 0 баллов – низкий риск
	• 1 балл – промежуточный 1	• 1-2 балла – промежуточный 1	• 1 балл – промежуточный 1
	• 2 балла – промежуточный 2	• 3-4 балла – промежуточный 2	• 2-3 балла – промежуточный 2
	• 3 балла или более – высокий риск	• 5-6 балла или более – высокий риск	• 4 балла или более – высокий риск
	Система IPSS (International Prognostic Scoring System) служит для	Система Dynamic IPSS (DIPSS) способна предсказывать риск трансформации в	Система стратификации DIPSS+ позволяет прогнозировать не

	определения прогноза на момент постановки диагноза	любой момент подсчета, а не только при установлении диагноза	только общую выживаемость, но и время до фазы бластной трансформации
--	--	--	--

1.3 Соматические мутации, участвующие в патогенезе миелофиброза

1.3.1 Мутации генов сигнальных путей

Исходя из типа «пусковой» мутации в ГСК, в дальнейшем выступающей маркером клонального процесса, выделяют драйверные мутации (ДМ) в генах JAK2, MPL и CALR. При МФ частота обнаружения данных маркера составляет 60-65%, 5-8% и 17-20% соответственно [19-20].

Мутация JAK2V617F затрагивает псевдокиназный домен тирозинкиназы JAK2, приводя к активации киназного домена и подавлению физиологического ингибирования янускиназы. В результате происходит цитокин-независимая или цитокин-гиперчувствительная активация JAK2/STAT5 сигнального пути, обуславливающая пролиферативное преимущество клетки (рисунок 1) [1].

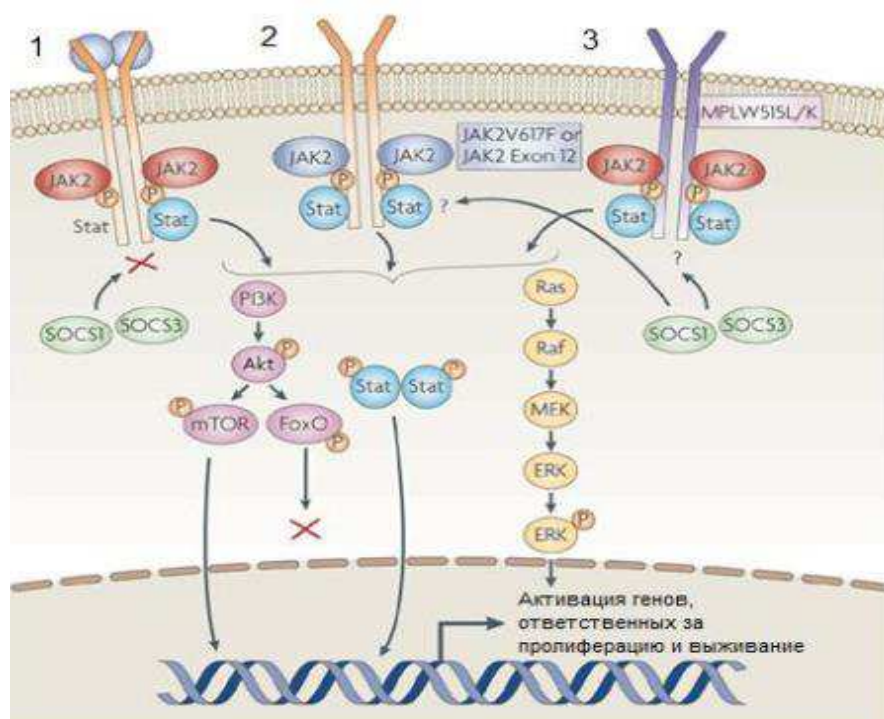


Рисунок 1 – Механизм активации JAK/STAT сигнального пути при мутациях в генах JAK2 и MPL [21]:

1 – активация цитокинового рецептора соответствующим лигандом и запуск каскада фосфорилирования белков семейств JAK и STAT, сопровождающийся активацией сигнальных путей с участием митоген-активированного протеина (МАРК) и

фосфатидилинозитол-3-киназы АКТ (PI3K-АКТ); 2 – цитокин-независимая активация янускиназы JAK2; 3 – цитокин-независимая активация рецептора тромбопоэтина

Этот же сигнальный путь оказывается затронут и при мутациях гена MPL. При замене аминокислоты Trp в 515 положении белка MPL рецептор тромбопоэтина (TPO) c-MPL активируется независимо от стимуляции цитокинами [22].

Пока не до конца ясна роль мутантного CALR в активации STAT5. Физиологически CALR не является сигнальной молекулой. Это шаперон эндоплазматического ретикулума (ЭР) – белок, обеспечивающий конденсацию вновь синтезируемых гликопротеинов для достижения стабильной нативной структуры и моделирующий гомеостаз кальция [23]. Полагают, что мутантный CALR взаимодействует с рецептором TPO c-MPL и индуцирует его структурные изменения, достаточные для активации JAK2 (рисунок 2). Далее запускаются процессы фосфорилирования сигнальных молекул ERK1/2 и STAT5.

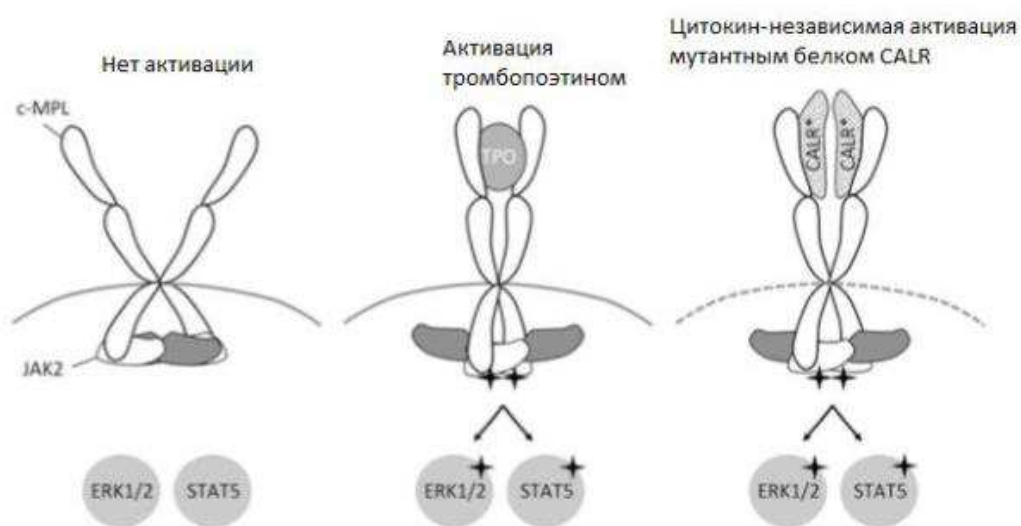


Рисунок 2 – Активация рецептора тромбопоэтина c-MPL мутантным белком CALR

Этот процесс оказывается возможным благодаря смене отрицательного заряда домена С белка CALR на положительный в результате делеций/инсерций в гене CALR, приводящих к сдвигу рамки считывания и изменению С-концевой последовательности полипептида [24]. Структурно белок CALR представлен тремя доменами: N, Р и С. N-домен выполняет функции шаперона, но также может связывать c-MPL. В белке дикого типа этому противодействует домен Р. Мутантный С-конец блокирует Р-домен, освобождая N-домен и делая возможным его связывание с c-MPL (рисунок 3).

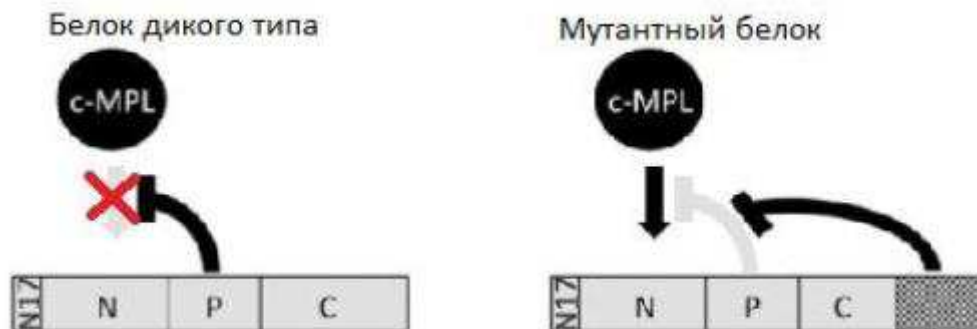


Рисунок 3 – Гипотетическая модель взаимодействия мутантного CALR с рецептором тромбопоэтина

Таким образом, происходит ТРО-независимая активация JAK2. При del52 (мутация типа 1) теряется практически весь отрицательный заряд С-конца молекулы, в то время как как при ins5 – только половина [25]. Принимая это во внимание, можно ожидать, что при мутациях типа 1 CALR прочнее связывает с-MPL и сильнее изменяет его структуру. Это приводит к более выраженной цитокин-независимой пролиферации. На мышинных моделях показано, что при del52 процесс замещения ретикулиновых волокон в костном мозге (КМ) более активен и быстрее приводит к фиброзу, чем при ins5 [26]. С этим фактором согласуются данные зарубежных авторов, показавших, что частота обнаружения мутаций 1 типа при МФ выше, чем мутаций 2 типа [27-28]. При этом выдвигается гипотеза, что фенотип МФ при ins5 формируется под действием дополнительных мутаций. Поскольку мутация в гене CALR является, по всей видимости, инициирующим событием неогенеза при ХМО, в отсутствии дополнительных генетических нарушений заболевание может длительное время протекать индолентно, и лишь при приобретении дополнительных цитогенетических или молекулярных поломок происходит манифестация заболевания [28].

Еще одна возможная патогенетическая причина дисмиелопоэза при мутациях CALR – нарушение обмена Ca^{2+} в клетке. Показано, что цитозольный кальций регулирует функции мегакариоцитов и тромбоцитов. Кальретикулин связывает и удерживает ионы кальция в ЭР. Мутантный белок утрачивает эту способность, что приводит к утечке Ca^{2+} из ЭР в цитоплазму, где он участвует в процессах проведения сигнала [29].

Вне ЭР кальретикулин обнаруживают в меж- и внеклеточном пространстве, а также на поверхности клеток. Вероятно, секретированный мутантный белок может активировать другие клетки, особенно моноциты, провоцируя выработку воспалительных цитокинов, большинство из которых участвует в передаче сигнала по JAK-STAT пути [30].

1.3.2 Эпигенетические мутации

Мутации генов сигнальных путей – не единственное нарушение, обнаруживаемые в клетках патологического клона. Полноэкзомное секвенирование позволило выявить также мутации генов эпигенетических модификаторов (TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, IDH1/2), встречающихся как отдельно, так и сочетанно с ДМ в генах JAK2, MPL, CALR [31-32].

Эпигенетическая регуляция транскрипции заключается в изменении экспрессии генов путем модификации хроматина. Ремоделирование хроматина осуществляется посредством двух основных механизмов: посттрансляционной модификацией гистонов (метилование, ацетилование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование-гликозилирование и убиквитинирование) и ДНК-метилованием с добавлением метильной группы к CpG-динуклеотидным повторам внутри регуляторных последовательностей генов. Активная транскрипция ассоциирована с гиперацетилованием гистонов. Аффинность ДНК и гистонов при этом снижена, что ведет к такой конформации хроматина, при которой транскрипционные факторы и РНК-полимеразы могут достичь промоторные участки генов. Вдобавок, метилирование лизинов H3K4, H3K36 и H3K79 на гистонах, расположенных в промоторных областях, также ведет к активной транскрипции. С другой стороны, ДНК-метилование, гипoaцетилование гистонов или метилирование лизинов H3K9, H3K27 и H4K20 приводит к более компактной упаковке хроматина, результатом чего является его инактивация и угнетение транскрипции [31]. Все эти процессы катализируются рядом ферментов: ДНК-метилтрансферазами, гистон-ацетилтрансферазами и деацетилазами, гистон-метилтрансферазами и деметилазами. Мутации в этих генах, кодирующих данные ферменты могут приводить к существенным изменениям в процессах эпигенетического контроля транскрипции и запускать механизмы канцерогенеза (рисунок 4).

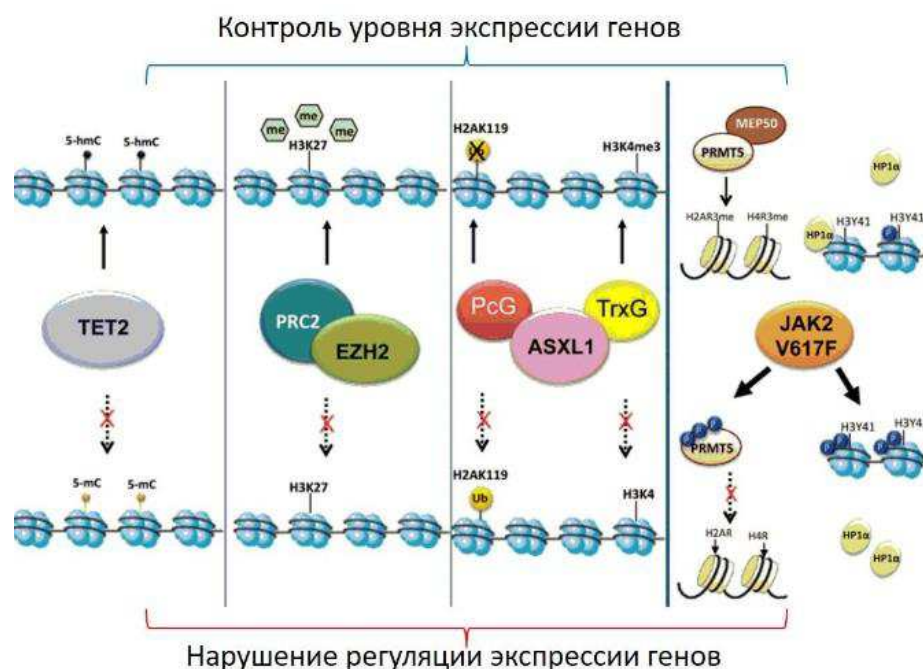


Рисунок 4 – Процессы эпигенетического метчения при участии белков TET2, EZH2, ASXL1, JAK2 [33]

Встречаемость эпигенетических мутаций при МФ разнообразна, но наибольший процент встречаемости приходится на ASXL1 (18 – 22%) [34].

1.4 ASXL1, его структура функции

ASXL1 (additional sex combs like 1) на хромосомной карте располагается в 20q11 (11 локус 20 хромосомы). Ген ASXL1 включает в себя 12(13) экзонов и экспрессируется в большинстве типов кроветворных клеток.

ASXL1 кодирует ядерный белок, состоящий из 1541 аминокислотных остатков и включающий в себя N-концевой спиралевидный домен HARE-NTN [35] и необычный C-концевой домен (PHD), который может связывать метилированные лизины. На рисунке 5 показана локализация гена ASXL1 на 20 хромосоме и схематическое представление структурных доменов белка ASXL1.

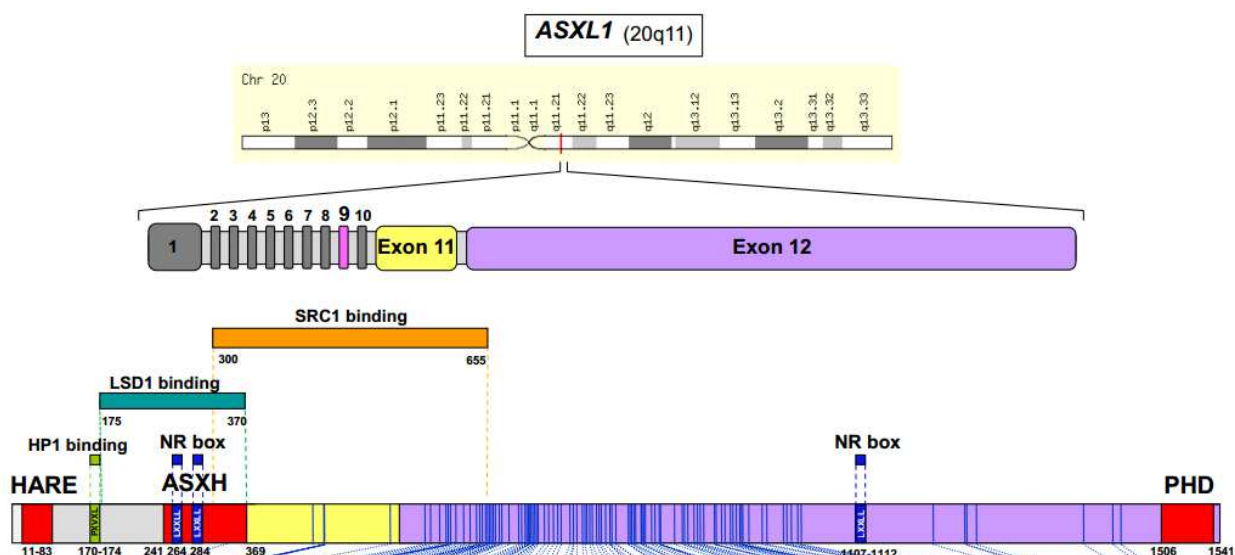


Рисунок 5 – Локализация гена ASXL1 на 20 хромосоме. Схематическое представление структурных доменов белка ASXL1

Центральная часть ASXL1 содержит ASXH глобулярный домен, который может взаимодействовать с поликомбинированной деубиквитиназой (DUB) - фермент, катализирующий отщепление от белков убиквитина-одноцепочечного полипептида, участвующего в деградации дефектных и избыточных белков [36].

ASXL1 участвует в регуляции эпигенетических маркеров и транскрипции через взаимодействие с поликомбинированными комплексными белками и различными активаторами и репрессорами транскрипции [37,38]. Человеческий ASXL1 дикого типа связывается с геном VAP1. VAP1 DUB деубиквитинирует K119ub на гистоне H2A, что приводит к репрессии генов. Тем не менее, роль ASXL1 в лейкогенезе, по видимому, не связана с комплексом DUB [39]. Последние данные показали, что ASXL1 взаимодействует с компонентами комплекса PRC2, а именно с EZH2 и SUZ12, двумя белками, которые участвуют в осаждении репрессивной метки H3K27me3. В компонентах PRC2 также имеются мутации при миелоидных злокачественных заболеваниях [40-43]. Подавление функций ASXL1 приводит к потере гистонового маркера H3K27me3. Роль ASXL1 дополняет PRC2 комплекс с известным лейкогенным локусом таким как HOXA. Кроме того ASXL1 связан с HP1a/CBX5, компонентом гетерохроматинового репрессивного комплекса [44]. HP1a связан с гистон H3. JAK2 фосфолирует гистон H3 и исключает HP1a из хроматина [45]. Следовательно, потенциальную связь между мутациями ASXL1 и JAK2 еще предстоит продемонстрировать. Функция других белков ASXL плохо определена. Было показано, что ASXL2 регулирует развитие костей, сердца [46] и адипогенез. ASXL2 у мышей идентифицирован как регулятор плотности костей и остеокластогенеза [47], в то время как осуществляется репрессия ASXL1, ASXL2 усиливает экспрессию адипогенных генов.

Что касается функциональных особенностей мутации ASXL1, Balasubramani и др. сообщили, что мутантный ASXL1 усиливает активность BAP1, что приводит к деубиквитинированию гистона H2AK119 (H2AK119Ub), однако дикий тип ASXL1 также усиливает активность BAP1 [48].

Yang и др. показали, что мутантный ASXL1 действует с усилением функции; усеченный ASXL1 (ASXL1^{aa1-587}) рекрутирует BET-бромдоменсодержащий белок 4 (BRD4) на ДНК, что приводит к усиленной экспрессии генов, включая Fos и Prdm16 (рисунок 6). То есть ASXL1^{aa1-587} (но не дикий тип ASXL1) связывает BRD4 и активирует транскрипцию генов посредством фосфорилирования РНК-полимеразы II, предположительно опосредованного активацией комплекса рTEFb и ацетилирования H3K27 / H3K122.

Из работы Yang следует, что BRD4 играет важную роль в ASXL1-индуцированном патогенезе и является клинически важным, что может проложить путь к установлению новой стратегии лечения мутантных ASXL1 гематологических злокачественных новообразований, включая использование ингибиторов HDAC и BRD4-бромдомен ингибитор JQ1, который ингибирует связывание BRD4 с хроматином [49].

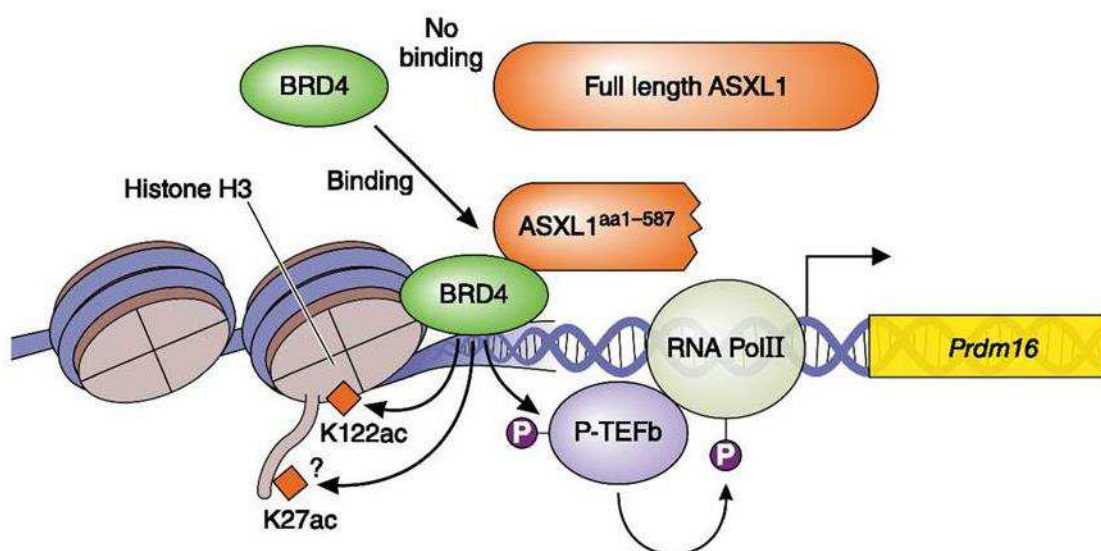


Рисунок 6 – Схематическое представление влияния усеченного белка ASXL1 на экспрессию генов

Подавляющее количество мутаций в гене ASXL1, которые обнаружены при миелоидных злокачественных опухолях, сосредоточены в двенадцатом экзоне гена, но также редко встречаются мутации и в других экзонах [50]. Мутации в гене ASXL1 являются нонсенс мутациями со сдвигом рамки считывания, которые приводят к потере PHD пальца. Сообщается, что функциональная значимость некоторых миссенс мутаций остается неясной. Наиболее частой мутацией, на которую приходится до 50% всех мутаций в гене ASXL1, является дупликация гуанина (с.1934dupG), что приводит к

сдвигу рамки считывания (р.Gly646TrpfsX12). На рисунке 7 показана частота и виды мутаций, встречающихся в гене ASXL1 при миелоидных злокачественных опухолях.

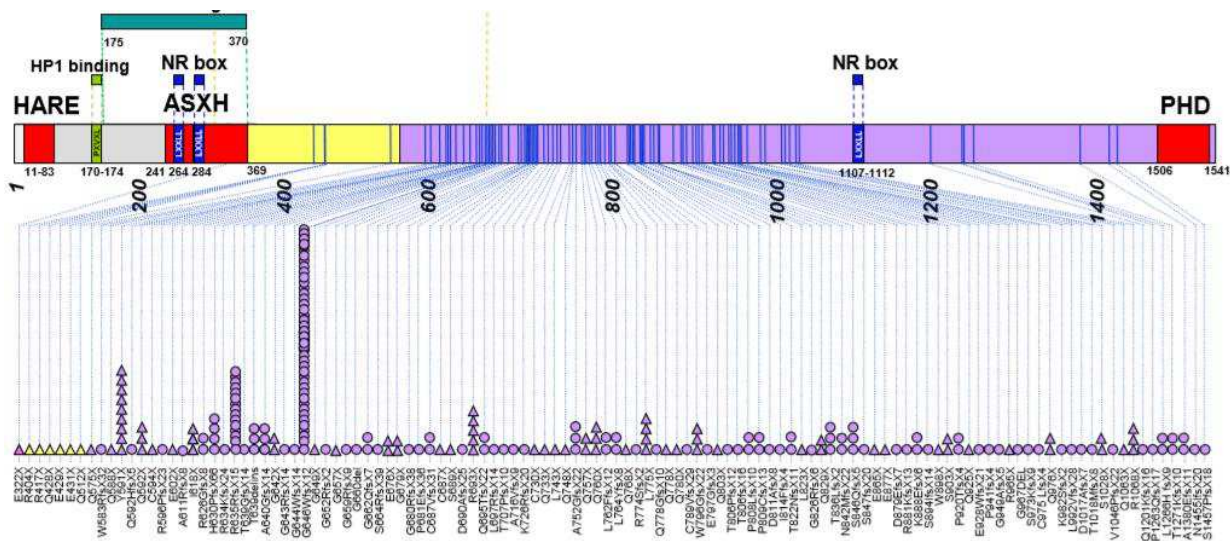


Рисунок 7 – Частота и виды мутаций в гене ASXL1, встречающихся при миелоидных злокачественных опухолях.

Мутации в гене ASXL1 встречаются при всех типах миелоидных заболеваний, включая миелодиспластический синдром (МДС), ХМО, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Согласно многим исследованиям частота мутаций в гене ASXL1 колеблется от нескольких процентов до 50%.

1.5 Ассоциации генетических аномалий с клиническими особенностями и прогнозом миелофиброза

Вместе с определением роли обнаруживаемых при МФ мутаций в патогенезе заболевания предпринимаются попытки определить ассоциации дефектов генома с различными клиническими проявлениями и оценить их влияние на прогноз.

Мутация JAK2V617F ассоциирована со старшим возрастом, высоким уровнем гемоглобина, лейкоцитозом, менее выраженным тромбоцитозом, повышенным риском тромбозов, спленомегалией [19]. Также сообщается об ухудшении выживаемости при МФ в случае низкой аллельной нагрузки [51, 52]. Низкие уровни JAK2V617F отмечались у пациентов с истощением КМ, выраженными цитопениями, инфекционными осложнениями, бластной трансформацией (БТ) [53].

МФ пациенты с мутацией в гене CALR моложе, имеют более высокий уровень тромбоцитов, а также у них реже отмечают анемию и лейкоцитоз [27]. Интересно, что тип мутации также влияет на фенотип заболевания. При

МФ мутация типа 2 ассоциирована с более высокой оценкой риска DIPSS+ , количеством циркулирующих бластов и лейкоцитозом [51].

Тринегативные (ТН) пациенты старше, у них чаще отмечают анемию, тромбоцитопению, а также определяют более высокие оценки по шкале IPSS [27].

Анализ выживаемости пациентов с различными ТН и ДМ показал, что при МФ наиболее длительную выживаемость демонстрируют CALR⁺ пациенты, а наиболее короткую – ТН. Достоверных различий в выживаемости JAK2⁺ и MPL⁺ пациентов не обнаружено [54]. Риск БТ также выше у ТН пациентов по сравнению с пациентами с любым из трех маркеров и наименьший – у носителей мутации в гене CALR по сравнению с ТН и JAK2⁺ [55].

Среди «неспецифических» мутаций дефекты гена ASXL1 ассоциированы с лейкоцитозом, бластозом, анемией, спленомегалией, конституциональными симптомами [56]. Также было показано, что мутации в гене ASXL1 ухудшают выживаемость пациентов с МФ и возрастает риск БТ.

В 2014 году Tefferi с соавторами, анализируя влияние мутационного статуса генов JAK2, MPL, CALR, ASXL1 на клинические особенности МФ и прогноз, установили снижение выживаемости у CALR⁻ и ASXL1⁺ пациентов. Было показано, что среди CALR⁺ наличие мутации в гене ASXL1 было ассоциировано с более низким числом тромбоцитов и уровнем гемоглобина, выраженным лейкоцитозом повышением процента циркулирующих бластов, необходимости в гемотрансфузиях и конституциональными симптомами. Последующий анализ выживаемости с учетом CALR/ASXL1-статуса показал, что более длительную выживаемость демонстрируют CALR⁺ASXL1⁻ пациенты (медиана 10,4 года), а худшую – CALR⁻ASXL1⁺ пациенты (медиана 2,3 года). При сравнении выживаемости CALR⁺ASXL1⁻ и CALR⁺ASXL1⁺ пациентов отмечена статистическая тенденция к снижению общей выживаемости у последних (медиана 7,8 года, p=0,13). Достоверных различий в выживаемости CALR⁺ASXL1⁺ и CALR⁻ASXL1⁻ не было выявлено. CALR⁻ASXL1⁺ пациенты также демонстрировали более короткую выживаемость без БТ. На основании полученных данных Tefferi с соавторами предлагают считать CALR/ASXL1-статус наиболее прогностически значимым фактором выживаемости пациентов с МФ [57].

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследования явилась геномная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), выделенная из лейкоцитов периферической крови пациентов с диагнозом МФ. В исследование были включены 27 пациентов, отобранных врачами гематологами из МБУЗ Городской клинической больницы №7 и КГБУЗ Краевой клинической больницы города Красноярск. Единственным критерием включения пациентов в исследование явился диагноз МФ. Среди пациентов было 10 (37%) мужчин и 17 (63%) женщин в возрасте от 41 до 83 лет (медиана 65 лет). У 24 пациентов диагноз МФ подтвержден трепанобиопсией.

2.2 Выделение ДНК с использованием набора «Gene JET Whole Blood Genomic DNA Purification»

ДНК выделяли методом с использованием набора «Gene JET Whole Blood Genomic DNA Purification» (Thermo Fisher Scientific).

Выделение ДНК осуществляли по следующей методике:

! Перед выделением необходимо прогреть Lysis Solution при 37°C для растворения солей. Затем охладить при комнатной температуре до 25 °C.

! Если используете новый набор для выделения ДНК, необходимо добавить по 30 мл этанола (96-100%) в Wash buffer WB 1 и Wash Buffer WB 2. Протеиназу К после первого использования необходимо хранить при температуре -20°C.

1. Добавить 20 мкл протеиназы К (Proteinase K) к 200 мкл крови, перемешать на вортексе. Добавить 400 мкл лизисного раствора (Lysis Solution) и тщательно перемешать путем вортексирования до получения однородной смеси. (Если использовать объем крови менее чем 200 мкл, необходимо довести объем образца до 200 мкл 1xPBS или TE-буфером. Если использовать больший объем, необходимо следовать другому протоколу).

2. Инкубировать образец 10 минут при 56°C, иногда вортексируя, пока клетки полностью не будут лизированы.

3. Добавить 200 мкл этанола (96-100%) и перемешать пипетированием.

4. Перенести приготовленную смесь на колонку. Центрифугировать 1 минуту при 6000 g (8000 rpm). Выбросить пробирку, которая содержит проточный раствор. Поместить колонку в новую 2 мл пробирку.

5. Добавить 500 мкл Wash Buffer 1. Центрифугировать 1 минуту при 8000 g (10000 rpm). Вылить сточный раствор и поместить колонку обратно в пробирку.

6. Добавить в колонку 500 мкл Wash Buffer 2. Центрифугировать 3 минуты при максимальной скорости (≥ 20000 g, ≥ 14000 rpm). Рекомендация: слить проточный раствор, поместить колонку обратно в пробирку и

центрифугировать колонку повторно 1 минуту при (≥ 20000 g, ≥ 14000 rpm). Вылить сточный раствор из пробирки и поместить колонку в стерильную пробирку 1,5 мл для центрифугирования.

7. Добавить 200 мкл Elution Buffer к центру мембранной колонки для элюции геномной ДНК. Инкубировать 2 минуты при комнатной температуре и затем центрифугировать 1 минуту при 8000 g (10000 rpm).

* Для максимального выхода ДНК необходимо повторить пункт с добавлением 200 мкл буфера для элюции.

* Если требуется ДНК более высокой концентрации или если ДНК была выделена из небольшого количества исходного материала (например, 50 мкл), (например, 50 мкл), то объем буфера для элюции может быть уменьшен до 50-100 мкл. Имейте в виду, что меньшие объемы буфера для элюции могут привести к снижению конечного выхода элюированной ДНК.

8. Перенести элюированную ДНК в стерильные пробирки. Использовать очищенную ДНК сразу или хранить при температуре -20°C .

2.3 Измерение концентрации ДНК

Действие этого метода основано на том, что специфичный флуоресцентный краситель связывается только с молекулой-мишенью в данном случае с ДНК, и определяет точную концентрацию ДНК в образце.

Измерение концентрации ДНК с использованием набора реагентов Quant-iT™ ds DNA Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen) производилось согласно следующей методике:

Разморозить все реагенты при комнатной температуре.

1. Наставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов ДНК плюс 2 стандарта. Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.

2. Приготовить Рабочую смесь: $1 \times n$ мкл Реагента + $199 \times n$ мкл Буфера

3. Раскапать в пробирки:

а) для стандартов 190 мкл Рабочей смеси + 10 мкл Стандарта;

б) для исследуемых образцов: 199-180 мкл Рабочей смеси + 1-20 мкл ДНК

4. Вortexировать 2-3 сек, сбросить капли.

5. Инкубировать 2 мин.

6. Включить Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажать любую кнопку для перехода в рабочий режим.

7. Выбрать вид анализа (dsDNA HS Assay), используя кнопки \uparrow и \downarrow . Нажать GO.

8. Произвести калибровку:

а) Выбрать старую калибровку – Use last calibration. Нажать GO.

ИЛИ

б) Произвести калибровку заново:

- вставить Стандарт №1, нажать GO;

- вставить Стандарт №2, нажать GO.
- 9. Вставить исследуемую пробу, нажать GO. На экране появится число.
- 10. Рассчитать концентрацию ДНК в исходном образце: выбрать Calculate sample concentration используя кнопки ↑ и ↓, нажать GO.
- 11. Записать результат.
- 12. Убрать исследуемую пробу из прибора, вставить следующую и нажать GO.

2.4 Проведение ПЦР с использованием электрофоретической детекции

Участки 13-го экзона гена ASXL1 (798 bp) и (803 bp) амплифицировали, используя 2 пары праймеров: ASXL1_F (5'-ACAGTCCSTAGGTCAGATCACCC-3'), ASXL1_R (5'-TCCCAGTAGAGACGGAATGG-3'); ASXL2_F (5'-CGGATGTTAGAACTGAATGTGAGT-3'), ASXL2_R (5'-CATGTCACCATTCACSTTGG-3') с использованием набора реагентов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) (СИНТОЛ, Москва). Стоит отметить, что для первой пары праймеров использовалась Hot Start Taq ДНК-полимераза (СибЭнзим, Новосибирск). Подготовка реакционной смеси для первой и второй пары праймеров представлена в таблице 2 и 3, соответственно.

Таблица 2 – Подготовка реакционной смеси для первой пары праймеров гена ASXL1 (из расчета на 1 тест).

Компоненты реакционной смеси	Количество, вносимое в пробирку (мкл)
Mg ⁺	0,8
dNTP	2,5
ПраймерF	1
ПраймерR	1
Буфер	2,5
Полимераза (СибЭнзим)	0,25

Таблица 3 – Подготовка реакционной смеси для второй пары праймеров гена ASXL1 (из расчета на 1 тест).

Компоненты реакционной смеси	Количество, вносимое в пробирку (мкл)
Mg ⁺	1,5
dNTP	2,5
ПраймерF	1
ПраймерR	1
Буфер	2,5
Полимераза	0,25

Количество вносимой ДНК в реакционную пробу составило 30-40 нг. Далее реакционная смесь доводилась H₂O до 25 мкл.

ПЦР проводилась на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 3 мин - 95°C; 33 циклов: 10 сек - 95°C, 10 сек - 60°C, 30 сек - 72°C; 3 мин - 72°C.

Для анализа продуктов амплификации проводили электрофорез с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования Gel Doc («Bio-Rad», США).

2.5 Чистка продукта ПЦР с использованием реагента ExoSAP-IT

Реагент ExoSAP-IT предназначен для простой и быстрой очистки продукта ПЦР для последующих применений, таких как секвенирование ДНК или анализа нуклеотидных полиморфизмов (SNP). Когда ПЦР-амплификация завершена, ExoSAP-IT удаляет любые неиспользованные dNTP и праймеры, оставшиеся в смеси продуктов ПЦР. Пример работы реагента ExoSAP-IT представлен на рисунке 8.

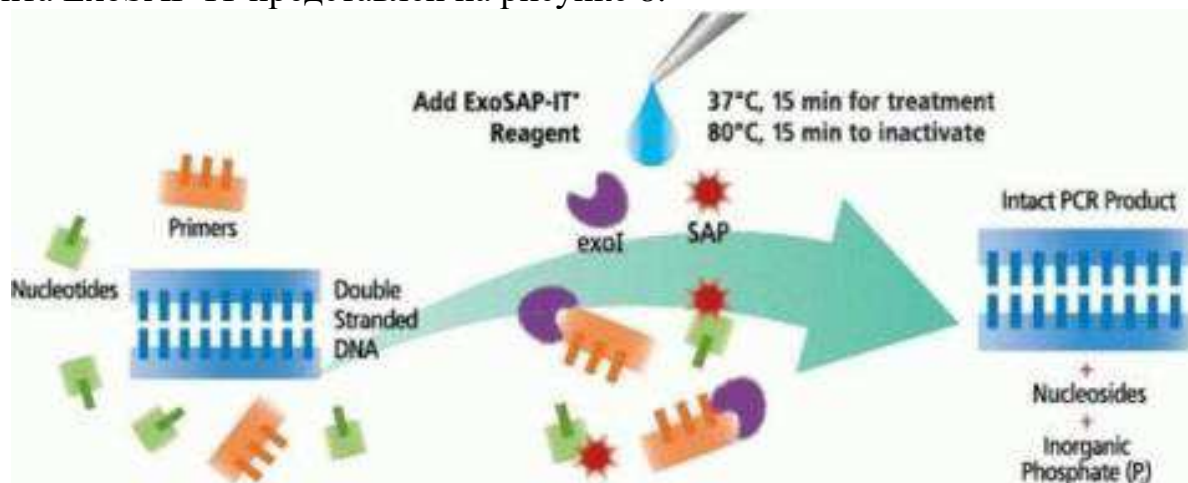


Рисунок 8 – Пример работы реагента ExoSap-IT.

ExoSAP-IT добавляют непосредственно к продукту ПЦР и инкубируют при 37°C в течение 15 минут. После обработки ПЦР-продуктов, ExoSAP-IT инактивируется просто путем нагревания до 80°C в течение 15 минут. ExoSAP-IT содержит два гидролитических фермента: экзонуклеазу I и щелочную фосфатазу (SAP) вместе с буфером для удаления dNTP и праймеров из продукта ПЦР. Экзонуклеаза I удаляет одноцепочечные праймеры, содержащиеся в ПЦР-продукте. SAP удаляет несвязавшие dNTP из смеси ПЦР.

2.6 Проведение секвенирующей ПЦР

Секвенирующую ПЦР с прямого и обратного праймеров проводили с использованием BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems, США). Подготовка реакционной смеси для секвенирующей реакции представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Подготовка реакционной смеси для секвенирующей реакции (из расчета на 1 тест).

Компоненты реакционной смеси	Количество, вносимое в пробирку (мкл)
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	8
Forward primer or reverse primer	2

Количество вносимого ПЦР-продукта в реакционную смесь составило 5-20 нг. Далее реакционная смесь доводилась H₂O до 20 мкл.

Секвенирующая реакция проводилась на приборе Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) по следующей программе: 1 мин - 96°C; 25 циклов: 10 сек - 96°C, 5 сек - 50°C, 4 мин - 60°C.

2.7 Проведение очистки сиквенс-продукта

Очистка сиквенс-продукта проводилась с использованием набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США). Данный набор содержит 2 реагента: XTerminator™ Solution (удаляет концевые красители и свободные соли в секвенирующей реакции), SAM™ Solution (повышает производительность реагента XTerminator™ Solution и стабилизирует реакции после очистки).

Процесс очистки сиквенс-продукта:

1. В каждую пробирку, содержащую сиквенс-продукт, добавить 90 мкл реагента SAM™ Solution.
2. Перемешать реагент XTerminator™ Solution и внести по 20 мкл в пробирку.
3. Далее в течение 30 минут вортексировать, после чего продукт перенести в плашку и отцентрифугировать.

Пробы подвергали капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США).

2.8 Специализированные программы для обработки полученных результатов

SeqScanner Software – программное обеспечение (ПО), позволяющее просматривать результаты секвенирования (секвенограммы) как с прямого так и с обратного праймера. Также с помощью данной программы можно визуально увидеть мутацию, но обозначение мутации данная программа определять не может.

SeqScape Software – ПО, предназначенное для обнаружения и анализа мутаций, обнаружения и проверки SNP и подтверждения

последовательности. Безусловно, плюсом данного ПО является то, что оно может определять тип и обозначение мутаций.

Minor Variant Finder Software – простое в использовании ПО, предназначенное для точного обнаружения от 5% аллельной нагрузки мутаций. Принцип основан на том, что программа сглаживает фоновый шум путем сравнения тестового образца с обычным контрольным образцом в двунаправленных последовательностях секвенирования. Поскольку методом секвенирования можно определить мутации от 20% аллельной нагрузки, то данное ПО удобно для обнаружения мутаций от 5% аллельной нагрузки. У данной программы есть и свои недостатки: она не способна определять мутации со сдвигом рамки считывания (делеции и инсерции) и считать аллельную нагрузку (т.е. подходит только для мутаций типа однонуклеотидных замен).

3 Результаты и обсуждения

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БТ – бластная трансформация
БФ – бластная фаза
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
КМ – костный мозг
ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка
ДМ – драйверные мутации
ИП – истинная полицитемия
КМ – костный мозг
МДС – миелодиспластический синдром
МФ – миелофиброз
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ПМФ – первичный миелофиброз
ПО – программное обеспечение
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТН – тринегативные пациенты
ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз
ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз
ХМО – хронические миелопролиферативные опухоли
ХФ – хроническая фаза
ЭР – эндоплазматический ретикулум
ЭТ – эссенциальная тромбоцитемия
ASXL1 – additional sex combs like 1
BRD4 – BET-бромдомененсодержащий белок
CALR – ген кальретикулина
DIPSS – Dynamic International Prognostic Scoring System – динамическая международная прогностическая шкала
IPSS – International Prognostic Scoring System – международная прогностическая шкала
JAK2 – ген янус-киназы
MAPK – митоген-активированный протеин
MPL – ген тромбопоэтинового рецептора
PI3K-AKT - фосфатидилинозитол-3-киназа АКТ
SNP – single nucleotide polymorphism
TPO – рецептор тромбопоэтина

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Соколова, М. А. Современные представления о «классических» Rh-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях / М. А. Соколова // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2010. – Т.3. – №3. – С. 235-242.
2. Моисеев, С.И. Хронические миелопролиферативные заболевания. Классификация, диагностика и лечение / С.И. Моисеев, А.Ю. Зарицкий, Г.Н. Салогуб. – 2005. – 5 с.
3. Tefferi, A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasm: The 2008 World Health Organization criteria and point-of care diagnostic algorithms / A. Tefferi, J.W. Vardiman // *Leukemia*. – 2008. – Vol. 22. – №1. – P. 14-22.
4. Меликян, А. Л. Клинические особенности эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в зависимости от молекулярных характеристик заболевания / А. Л. Меликян, И. Н. Суборцева, А. Б. Судариков // *Терапевтический архив*. – 2017. – Т.89. – №7. – С. 4-9.
5. Tefferi, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia / A. Tefferi. // *J Clin Oncol*. – 2010. – Vol. 23. – №33. – P. 8520-8530.
6. Tefferi, A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management / A. Tefferi. // *American Journal of Hematology*. – 2016. – Vol. 91. – №12. – P. 1262-1271.
7. Абдулкадыров, К. М. Критерии диагностики и современные методы лечения первичного миелофиброза / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич. // *Вестник гематологии*. – 2013. Т.9. – №3. – С. 44-78.
8. Абдулкадыров, К. М. Миелопролиферативные новообразования / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич. – Москва: Литтерра, 2016. – 304 с.
9. Абдулкадыров, К. М. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич // *Онкогематология*. – 2015. – Т.10. - №2. С. 25-35.
10. Mesa R. How I treat symptomatic splenomegaly in patients with myelofibrosis / R. A. Mesa // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – №22. – P. 5394-5400.
11. 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. Coombs // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 7. – №4. – P. 387-397.
12. Vannucchi, A. M. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations / A. M. Vannucchi, P. Guglielmelli // *Haematologica*. – 2008. – Vol. 93. – №7. – P. 972-976.
13. 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. – Vol. 114. – №5. – P. 937-951.

14. Arber D.A. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R.Hasserjian, et al. // *Blood*. – 2016. – Vol.127. – №10. – P. 2391–2405.

15. Tefferi, A. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: analysis based on 334 patients from a single institution / A. Tefferi, J. Huang, S. Schwager et al. // *Cancer*. – 2007. – Vol.109. – P. 2083–2088.

16. Quintás-Cardama, A. Spleen deflation and beyond: the pros and cons of Janus kinase 2 inhibitor therapy for patients with myeloproliferative neoplasms / A.QuintásCardama, S. Verstovsek // *Cancer*. – 2012. – Vol.118. – №4. – P.870-877.

17. Verstovsek, S. Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage in comparison to matched historical controls / S.Verstovsek, H.M.Kantarjian, Z.Estrov et al. // *Blood*. – 2012. – Vol.120. –№ 6. – P.1202-1209.

18. Gangat, N. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status / N. Gangat, D. Caramazza, R. Vaidya et al. // *JCO*. – 2010. – Vol29. – №4. – P. 392-397.

19. Tefferi, A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1 / A. Tefferi // *Leukemia*. – 2010. – Vol. 24. – №6. – P. 1128-1138.

20. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms. A contemporary review / A. Tefferi, A. Pardanani // *JAMA Oncology*. – 2015. – Vol. 1. – №1. – P. 97-105.

21. Levine, R. L. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders / R. L. Levine, A. Pardanani, A. Tefferi et al. // *Nat Rev Cancer*. – 2007. – Vol. 7. – №9. – P. 673-683.

22. Pardanani, A. D. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients / A. D. Pardanani, R. L. Levine, T. Lasho, et al. // *Blood*. – 2006. – Vol. 108. – №10. – P. 3472-3476.

23. Michalak, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum / M. Michalak, J. Groenendyk, E. Szabo, et al. // *Biochem J*. – 2009. – Vol. 417. – №3. – P. 651-666.

24. Araki, M. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms / M. Araki, Y. Yang, N. Masubuchi, et al. // *Blood*. – 2016. – Vol. 127. – №10. – P. 1307-1316.

25. Nangalia, J. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter, et al // *N Engl J Med*. – 2013. – Vol. 369. – №25. – P. 2391-2405.

26. Pietra, D. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms / D. Pietra, E. Rumi, V. V. Ferretti, et al // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30. – №2. – P. 431-438.

27. Rumi, E. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis / E. Rumi, D. Pietra, C. Pascutto, et al. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124. – №7. – P. 1062-1069.
28. Vainchenker, W. Recent advances in understanding myelofibrosis and essential thrombocytemia / W. Vainchenker, S. N. Constantinescu, I. Plo // *F1000Research*. – 2016.
29. Klampfl, T. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan, et al. // *N Engl J Med*. – 2013. – Vol. 369. – №25. – P. 2379-2390.
30. Garbati, M. R. Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism / M. R. Garbati, C. A. Welgan, S. H. Landefeld et al. // *Am J Hematol*. – 2016. – Vol. 127. – №10. – P. 1317-1324.
31. Mascarenhas, J. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies / J. Mascarenhas, N. Roper, P. Chaurasia, et al. // *Clin Epigenet*. – 2011. – Vol. 2. – №2. – P. 197-212.
32. Shih, A. H. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies / A. H. Shih, O. Abdel-Wahab, J. P. Patel, et al. // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – №9. – P. 599-612.
33. Vannucchi, A. M. Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms / A. M. Vannucchi, F. Biamonte // *Haematologica*. – 2011. – Vol. 96. – №10. – P. 1398-1402.
34. Campregher, P. V. The presence of ASXL1 mutations as well as a total number of myeloid driver mutations higher than two is strongly associated with the diagnosis of primary myelofibrosis as opposed to essential thrombocythemia / P. V. Campregher, R. Helman, W. O. Pereira, et al. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124. – №21. – P. 4595.
35. Aravind, L. The HARE-HTH and associated domains: novel modules in the coordination of epigenetic DNA and protein modification / L. Aravind, L. M. Lyer // *Cell Cycle*. – 2012. – Vol. 11, №1. – P. 119-131.
36. Scheuermann, J. C. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB / J. C. Scheuermann, K. Oktaba, S. Fraterman et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 465. – №7295. – P. 243-247.
37. Cho Y. C. Additional sex comb-like 1 (ASXL1), in cooperation with SRC-1, acts as a ligand-dependent coactivator for retinoic acid receptor / Y. C. Cho, E. J. Kim, U. H. Park et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – №26. – P. 17588-17598.
38. Boultonwood J. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia / J. Boultonwood, J. Perry, A. Pellagati et al. // *Leukemia*. – 2010. – Vol. 24. – №5. – P. 1062-1065.
39. Abdel-Wahab O. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression / O. Abdel-Wahab, M. Adli, L. M. LaFave et al. // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 22. – №5. – P. 188-193.

40. Ernst T. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders / T. Ernst, A. J. Chase, J. Score et al. // *Nature Genetics*. – 2010. – Vol. 42. – №8. – P. 722-726.
41. Nikoloski G. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes / G. Nikoloski, S. M. Langemeijer, R. P. Kuiper et al. // *Nature Genetics*. – 2010. – Vol. 42. – №8. – P. 665-667.
42. Brecqueville M. Mutations and deletions of the SUZ12 polycomb gene in myeloproliferative neoplasms / M. Brecqueville, N. Cervera, J. Rey et al. // *Blood Cancer*. – 2011. – Vol. 1. – №8. – P. 1-3.
43. Score J. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic myeloproliferative neoplasms / J. Score, C. Hidalgo-Curtis, A. V. Jones et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – №5. – P. 1208-1213.
44. Lee S. W. ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LCD1 / S. W. Lee, Y. S. Cho, J. M. Na et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290. – №10. – P. 6008 p.
45. Dawson M. A. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin / M. A. Dawson, A. J. Bannister, S. D. Foster et al. // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – №7265. – P. 819-822.
46. Bascind H. A. Functional conservation of ASXL2, a murine homolog for the Drosophila enhancer of trithorax and polycomb group gene ASX / H. A. Bascind, L. Na, Q. Ma et al. // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – №3. – P. 1-11.
47. Farber C. R. Mouse genome-wide association and systems genetics identify ASXL2 as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis / C. R. Farber, B. J. Bennett, L. Orozco et al. // *PLoS Genetics*. – 2011. – Vol. 7. – №4. – P. 1-15.
48. Balasubramani, A. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex / A. Balasubramani, A. Larjo, J. A. Bassein et al. // *Nat Commun*. – 2015. – P. 7307-7313.
49. Kitamura, T. ASXL1 mutations gain a function / T. Kitamura // *Blood*. – 2018. – Vol. 131. – №3. – P. 274-275.
50. Abdel-Wahab O. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms / O. Abdel-Wahab, A. Pardanani, J. Patel et al. // *Leukemia*. – 2011. – Vol. 25. – №7. – P. 1200-1202.
51. Guglielmelli, P. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele / P. Guglielmelli, G. Barosi, G. Specchia, et al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 114. – №8. – P. 1477-83.
52. Tefferi, A. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival / A. Tefferi, T. L. Lasho, J. Huang, et al. // *Leukemia*. – 2008. – Vol. 22. – №4. – P. 756-761.

53. Singh, N. R. Genomic diversity in myeloproliferative neoplasms: focus on myelofibrosis / N. R. Singh // *Transl Pediatr.* – 2015. – Vol. 2. – №2. – P. 107-115.
54. Tefferi, A. CALR vs JAK2 vs MPL mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic, and molecular comparisons / A. Tefferi, T. L. Lasho, C. M. Finke, et al. // *Leukemia.* – 2014. Vol. 28. – №7. – P. 1472-1477.
55. Tefferi, A. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis / A. Tefferi, P. Guglielmelli, D. Larson // *Blood.* – 2014. – Vol. 124. – №16. – P. 2507-2513.
56. Vannucchi, A. M. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis / A. M. Vannucchi, T. L. Lasho, P. Guglielmelli, et al. // *Leukemia.* – 2013. – Vol. 27. – №9. – P. 1861-1869.
57. Tefferi, A. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients / A. Tefferi, P. Guglielmelli, T. L. Lasho, et al. // *Leukemia.* – 2014. – Vol. 28. – №7. – P. 1494-1500.
58. Gelsi-Boyer, V. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases / V. Gelsi-Boyer, M. Brecqueville, R. Devillier et al. // *J Hematol Oncol.* – 2012. – Vol.5. – №12. – P. 1-6.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


подпись

Е. И. Шишацкая

«18» июня 2018 г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ соматических мутаций в гене ASXL1
у пациентов с диагнозом миелофиброз

06.04.01 Биология

06.04.01.00.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель

14.06.2018 
подпись, дата


к.б.н. Т. Н. Субботина

Выпускник

14.06.2018 
подпись, дата

П. А. Николаева

Рецензент

15.06.2018 
подпись, дата

профессор, д.м.н.
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2018