

Использование программного обеспечения Minor Variant Finder для выявления и количественного определения уровня аллельной нагрузки соматических мутаций при онкогематологических заболеваниях

Т.Н. Субботина^{1,2}, И.Е. Маслюкова¹, А.А. Фалеева^{1,2}, П.А. Николаева^{1,2}, А.С. Хазиева³, Е.А. Дунаева⁴, К.О. Миронов⁴, Л.Б. Полушкина⁵, И.С. Мартынкевич⁵, С.В. Верещагина², Б.В. Баранкин²

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; Россия, 660041 Красноярск, Свободный проспект, 79;

²ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России»; Россия, 660037 Красноярск, ул. Коломенская, 26;

³КГБУЗ «Краевая клиническая больница»; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3а;

⁴ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора; Россия, 111123 Москва, ул. Новогиреевская, 3а;

⁵ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»; Россия, 191024 Санкт-Петербург, ул. 2-Советская, 16

Контакты: Татьяна Николаевна Субботина stn.25@mail.ru

Введение. Известно, что при использовании секвенирования по Сэнгеру для анализа соматических мутаций возникают проблемы, связанные как с количественной оценкой уровня аллельной нагрузки мутантного гена, так и с интерпретацией результатов в образцах ДНК с уровнем аллельной нагрузки менее 15–20 %. Компанией Applied Biosystems (США) было разработано новое программное обеспечение Minor Variant Finder, позволяющее определять мутации с уровнем аллельной нагрузки от 5 %.

Цель исследования — определение уровня аллельной нагрузки и выявление малопрцентных вариантов соматических мутаций в генах *ASXL1*, *JAK2* и в онкогене *BCR-ABL* с помощью программного обеспечения Minor Variant Finder у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями.

Материалы и методы. После анализа точечных соматических мутаций в генах *ASXL1*, *JAK2* и онкогене *BCR-ABL* для 15 пациентов с миелопролиферативными новообразованиями (5 *ASXL1*-положительных, 9 *JAK2*-положительных и 1 *BCR-ABL*-положительный) была проведена оценка уровня аллельной нагрузки выявленных мутаций с помощью программного обеспечения Minor Variant Finder. Использовали биологические образцы с ранее выявленными мутациями. В частности, мутации в гене *ASXL1* и в онкогене *BCR-ABL* выявлены с помощью секвенирования по Сэнгеру, а мутации в гене *JAK2* — более чувствительными методами: пиросеквенированием и полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени.

Результаты. При использовании программного обеспечения Minor Variant Finder уровень аллельной нагрузки во всех 5 *ASXL1*-положительных образцах и *BCR-ABL*-положительном образце был определен как выше 20 %. При анализе 9 *JAK2*-положительных образцов уровень аллельной нагрузки в 2 случаях был выше 20 % и в 7 случаях ниже 20 %.

Заключение. Программное обеспечение Minor Variant Finder может быть использовано для оценки уровня аллельной нагрузки и выявления малопрцентных вариантов соматических мутаций в генах *ASXL1*, *JAK2* и *BCR-ABL*.

Ключевые слова: Minor Variant Finder, *ASXL1*, *JAK2*, *BCR-ABL*, миелопролиферативное новообразование, Ph-миелопролиферативное новообразование, хронический миелоидный лейкоз

Для цитирования: Субботина Т.Н., Маслюкова И.Е., Фалеева А.А. и др. Использование программного обеспечения Minor Variant Finder для выявления и количественного определения уровня аллельной нагрузки соматических мутаций при онкогематологических заболеваниях. Онкогематология 2020;15(2):85–91.

DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-2-85-91



Using the Minor Variant Finder software to identify and quantify the allelic burden level of somatic mutations in oncohematologic diseases

T.N. Subbotina^{1,2}, I.E. Maslyukova¹, A.A. Faleeva^{1,2}, P.A. Nikolaeva^{1,2}, A.S. Khazieva³, E.A. Dunaeva⁴, K.O. Mironov⁴, L.B. Polushkina⁵, I.S. Martynkevich⁵, S.V. Vereshchagina², B.V. Barankin²

¹Siberian Federal University; 79 Svobodnyy Prospekt, Krasnoyarsk 660041, Russia;

²Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia; 26 Kolomenskaya St., Krasnoyarsk 660037, Russia;

³Regional Clinical Hospital; 3a Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

⁴Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance; 3a Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russia;

⁵Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
162-Sovetskaya St., Saint Petersburg 191024, Russia

Background. There are problems related to both quantitative assessment of an allele burden level of a mutant gene and interpretation of results in DNA samples with the burden level of the mutant allele less than 15–20 %, when using Sanger sequencing for analyzing somatic mutations. Applied Biosystems (USA) has developed new software Minor Variant Finder, which allows determining mutations with the allele burden level from 5 %.

The objective: to determine the allele burden level and identification of minor variants of somatic mutations in the *ASXL1*, *JAK2* genes and *BCR-ABL* oncogene using Minor Variant Finder software in patients with myeloproliferative neoplasms.

Materials and methods. The level of mutant allele burden for 15 patients with myeloproliferative neoplasms was determined by the identified mutations using the Minor Variant Finder software, after analysis of point somatic mutations in the *ASXL1*, *JAK2* genes and *BCR-ABL* oncogene by Sanger sequencing.

Results. The allele burden level in all 5 *ASXL1*-positive samples and *BCR-ABL*-positive sample was determined as higher than 20 % using the Minor Variant Finder software. The allele burden level in 2 cases was higher than 20 % and in 7 cases lower than 20 %, when we analyzed 9 *JAK2*-positive samples.

Conclusion. Minor Variant Finder software can be used to estimate the allele burden level and to identify minor variants of somatic mutations in the *ASXL1*, *JAK2* and *BCR-ABL* genes.

Key words: Minor Variant Finder, *ASXL1*, *JAK2*, *BCR-ABL*, myeloproliferative neoplasm, Ph-myeloproliferative neoplasm, chronic myeloid leukemia

For citation: Subbotina T.N., Maslyukova I.E., Faleeva A.A. et al. Using the Minor Variant Finder software to identify and quantify the allelic burden level of somatic mutations in oncohematologic diseases. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2020;15(2):85–91. (In Russ.).

Введение

Соматические мутации в опухолевых клетках играют ключевую роль в патогенезе миелопролиферативных новообразований (МПН), могут служить диагностическими и прогностическими маркерами, а также определять чувствительность к противоопухолевым препаратам.

Зачастую молекулярно-генетическим маркером какого-либо заболевания является соматическая мутация по типу однонуклеотидной замены, например мутация V617F в гене *JAK2* при хронических Ph-миелопролиферативных новообразованиях (Ph-МПН) [1]. В то же время бывают случаи, когда формирование фенотипа заболевания ассоциировано не с одной мутацией, а с целым рядом разных соматических мутаций, локализованных на каком-либо определенном участке ДНК. Примером могут быть диагностические соматические мутации в экзоне 12 гена *JAK2* (более 40 мутаций), обуславливающие развитие истинной полицитемии, а также мутации в экзоне 13 гена *ASXL1* (более 100 мутаций), ассоциирующиеся с неблагоприятным прогнозом при Ph-МПН и других миелоидных заболеваниях. В обоих приведенных примерах спектр мутаций, ассоциированных с заболеванием, разнообразен. Это могут быть точечные мутации, делеции и вставки небольших участков ДНК, а также их сочетания. Кроме этого, соматические мутации могут обуславливать резистентность к определенному типу лечения. Например, основными причинами резистентности у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) являются точечные соматические мутации в киназном домене (KD) химерного онкогена *BCR-ABL*, которые могут изменять структуру KD и ухудшать связывание с препаратом [2]. Перечень таких мутаций очень раз-

нообразен, и они могут встречаться на протяженном участке *ABL* в составе онкогена *BCR-ABL*. Все это обуславливает необходимость использования такого метода генетического анализа, как секвенирование.

Известно, что при использовании секвенирования по Сэнгеру для анализа соматических мутаций существуют проблемы, связанные как с количественной оценкой уровня аллельной нагрузки мутантного гена (что важно при онкогематологических патологиях), так и с интерпретацией результатов в образцах ДНК с уровнем аллельной нагрузки мутантного гена менее 15–20 % [3]. В то же время достаточно часто, в том числе при онкогематологических заболеваниях, соматические мутации (драйверные, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом течения заболевания, или мутации резистентности) присутствуют в небольшом количестве исследуемых аллелей. Это диктует необходимость использования для анализа соматических мутаций более чувствительных молекулярно-генетических методов или дополнительного программного обеспечения (ПО).

Новое ПО Minor Variant Finder (MVF) для генетических анализаторов фирмы Applied Biosystems (США) предлагается как удобное в использовании ПО для поиска малоцентных вариантов соматических мутаций, а также подходящее для оценки уровня аллельной нагрузки соматических мутаций [4]. Разработчики заявляют, что ПО способно обнаружить мутацию при уровне аллельной нагрузки от 5 %. По изученным данным литературы, ПО MVF ранее не использовалось для исследования уровня аллельной нагрузки соматических мутаций при онкогематологических заболеваниях. В то же время такое ПО применяли в ряде работ: в исследовании геномного импринтинга [5]; для уточнения

соматического мозаицизма, связанного с одной из мутаций в гене *FGFR3* [6]; при установлении корреляции полиморфизмов в гене *PDLIM4* с остеопоротическим переломом [7]; в определении онкомаркеров при меланоме [8]. Также чувствительность ПО подтверждалась при скрининге ДНК из солидных опухолей на ряд соматических мутаций [9].

Драйверная мутация V617F в гене *JAK2* встречается в большинстве случаев Ph-МПН. Так, у больных истинной полицитемией мутация V617F выявляется в 96 % случаев, при эссенциальной тромбоцитемии – в 55 %, при миелофиброзе – примерно в 45–68 % [10]. Также в последние годы в ряде исследований показано неблагоприятное прогностическое значение соматических мутаций в гене *ASXL1* при МПН [11]. Выявлено, что мутации этого гена встречаются примерно у 23 % пациентов с миелофиброзом, определяя высокий риск прогрессирования заболевания [12]. Согласно базе данных COSMIC [13] в последовательности экзона 13 гена *ASXL1* описано более 100 соматических мутаций, часть которых относится к точечным мутациям, имеющим неблагоприятное прогностическое значение для пациентов с МПН. Около 40 % пациентов с ХМЛ, принимающих препарат 1-й линии ингибиторов тирозинкиназной активности, и 50 % пациентов, принимающих препараты 2-й и последующей линий ингибиторов тирозинкиназной активности, являются резистентными к лечению. Список аминокислотных замен в *BCR-ABL*, обнаруженных у этих пациентов, постоянно пополняется и включает более 90 различных мутаций, встречающихся с различной частотой [14].

Цель исследования – выявление редких вариантов и определение уровня аллельной нагрузки соматических мутаций в генах *ASXL1*, *JAK2* и *BCR-ABL* с помощью ПО MVF у пациентов с диагнозом МПН.

Материалы и методы

В исследование были включены образцы ДНК 15 пациентов с диагнозом МПН и ранее выявленными соматическими мутациями. В частности, 5 образцов ДНК с мутациями в экзоне 13 гена *ASXL1* от пациентов с диагнозом миелофиброз, 9 образцов с мутацией V617F в гене *JAK2* от пациентов с различными фенотипическими вариантами Ph-МПН и 1 *BCR-ABL*-положительный образец от пациента с ХМЛ. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови: для 11 из 14 пациентов методом адсорбции на силикатной мембране (GeneJET, Thermo Fisher Scientific, США); для 3 образцов ДНК с мутацией в гене *ASXL1* использовали фенол-хлороформный метод. РНК пациента с ХМЛ выделяли из лейкоцитов цельной крови с использованием набора реагентов Рибо-преп (ИнтерЛабСервис, Россия). Реакцию обратной транскрипции с образованием комплементарной ДНК проводили с помощью набора ОТ-М–MuLV-RH (БИОЛАБМИКС, Россия).

Мутации в гене *ASXL1* и в онкогене *BCR-ABL* выявлены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Му-

тации в гене *JAK2*, а также уровень аллельной нагрузки данной мутации определены более чувствительными методами: пиросеквенированием и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени [15]. Уровень аллельной нагрузки находился в диапазоне ~5–40 %. Здесь можно отметить, что в отличие от секвенирования по Сэнгеру, которое не позволяет определять уровень аллельной нагрузки автоматически и требует для этого применения специализированного ПО (например, MVF), использование технологии пиросеквенирования с применением систем генетического анализа серии PyroMark (Qiagen, Германия) позволяет автоматически определять уровень аллельной нагрузки с помощью базовых версий ПО [16].

Участки экзона 13 гена *ASXL1* амплифицировали с использованием 2 пар праймеров (табл. 1). Для амплификации участка гена *JAK2* использовали праймеры, заимствованные из статьи [17]. Амплификацию химерного транскрипта *BCR-ABL* (p210) с последующей вложенной ПЦР для амплификации KD химерного транскрипта *BCR-ABL* проводили с использованием праймеров, заимствованных из статьи [2]. ПЦР выполняли на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США).

Таблица 1. Праймеры для амплификации участков генов *ASXL1*, *JAK2* и онкогена *BCR-ABL*

Table 1. Primers for polymerase chain reaction amplification *ASXL1*, *JAK2* genes and *BCR-ABL* oncogene

Праймер Primer	Последовательность (5'–3') Sequence (5'–3')	Размер фрагмента Fragment size
<i>ASXL1.1</i> прямой <i>ASXL1.1</i> forward	ACAGTCCCTAG- GTCAGATCACC	798 bp
<i>ASXL1.1</i> обратный <i>ASXL1.1</i> reverse	TCCCACTAGAGA- CGGAATGG	
<i>ASXL1.2</i> прямой <i>ASXL1.2</i> forward	CGGATGTTAGAA- CTGAATGTGAGT	803 bp
<i>ASXL1.2</i> обратный <i>ASXL1.2</i> reverse	CATGTCACCATT- CACCTTGG	
<i>JAK2</i> прямой <i>JAK2</i> forward	CAAAGCACATTG- TATCCTCA	377 bp
<i>JAK2</i> обратный <i>JAK2</i> reverse	AGTCCTACAGTG- TTTTTCAGT	
<i>BCR-ABL</i> прямой <i>BCR-ABL</i> forward	TGACCAACTCGTG- TGTGAAACTC	1687/ 1612 bp
<i>BCR-ABL</i> обратный <i>BCR-ABL</i> reverse	TCCACTTCGTCTG- AGATACTGGATT	
<i>ABL1</i> прямой <i>ABL1</i> forward	CGCAACAAG- CCCCTGTCT	713 bp
<i>ABL1</i> обратный <i>ABL1</i> reverse	TCCGACTTGATG- GAGAACTTGT	

Для анализа продуктов амплификации проводили электрофорез в 2 % агарозном геле с последующей визуализацией с использованием системы гель-документирования Gel Doc (Bio-Rad, США). Продукт ПЦР очищали с применением реагента ExoSAP-IT (Applied Biosystems, США). Секвенирующую ПЦР с прямого и обратного праймеров и очистку полученного продукта проводили с помощью BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США) соответственно. Продукт секвенирования анализировали с помощью прибора Генетический анализатор 3500 (Applied Biosystems, США). Уровень аллельной нагрузки мутаций в исследуемых генах определяли с использованием ПО MVF (Applied Biosystems, США). В качестве контроля была взята ДНК пациентов без мутаций в вышеуказанных генах.

Результаты

При анализе мутаций в гене *ASXL1* ПО MVF позволило выявить и рассчитать уровень аллельной нагрузки с прямого и обратного праймеров для всех отобранных 5 пациентов (табл. 2).

Таблица 2. Уровень аллельной нагрузки мутаций в гене *ASXL1*, определенный с помощью программного обеспечения *Minor Variant Finder* после секвенирования по Сэнгеру для 5 пациентов с миелофиброзом
Table 2. The allele burden level in *ASXL1* gene after Sanger sequencing determined by *Minor Variant Finder* software in 5 myelofibrosis patients

№ пациента Patient No.	Мутация в гене <i>ASXL1</i> Mutation in the <i>ASXL1</i> gene	Уровень аллельной нагрузки при секвенировании, % The allele burden level sequencing, %	
		с прямого праймера in forward direction	с обратного праймера in reverse direction
1	c.2077C>T; p.R693*	21,6	32,6
2	c.1815C>A; p.C605*	56,0	38,4
3	c.2122C>T; p.Q708*	46,9	37,2
4	c.2113G>T; p.E705*	32,3	33,1
5	c.2077C>T; p.R693*	35,0	42,3

Примеры визуализации результатов использования ПО MVF для пациентов № 4 и 5 с мутациями в гене *ASXL1* приведены на рис. 1.

При анализе мутации V617F в гене *JAK2* ПО MVF выявило данную однонуклеотидную замену во всех 9 анализируемых образцах (табл. 3).

Примеры результатов использования ПО MVF для пациентов № 1 и 4 с мутацией V617F в гене *JAK2* приведены на рис. 2.

При анализе мутаций резистентности в KD химерного онкогена *BCR-ABL* ПО MVF позволило выявить мутацию c.898C>T (Q300*) и рассчитать уровень

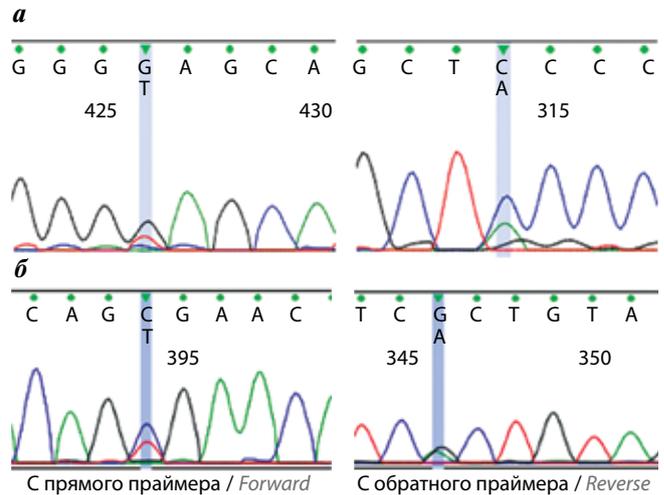


Рис. 1. Секвенограммы, отражающие уровень аллельной нагрузки, обнаруженный с помощью программного обеспечения *Minor Variant Finder* у пациентов с *ASXL1*-мутациями: а – пациент № 4 с мутацией c.2113G>T; p.E705*; б – пациент № 5 с мутацией c.2077C>T; p.R693*
Fig. 1. The allele burden level detected by *Minor Variant Finder* software in patient No. 4 with c.2113G>T; p.E705* *ASXL1* mutation (a) and patient No. 5 with c.2077C>T; p.R693* *ASXL1* mutation (b)

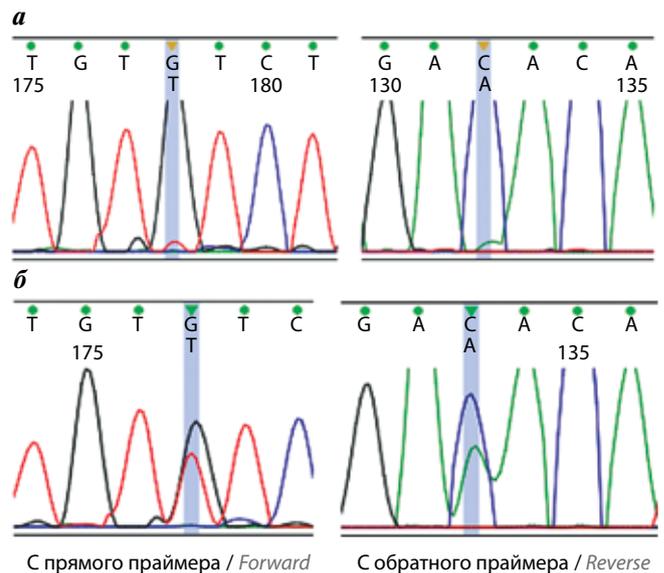


Рис. 2. Секвенограммы, отражающие уровень аллельной нагрузки, обнаруженный с помощью программного обеспечения *Minor Variant Finder* у пациентов № 1 (а) и № 4 (б) с мутацией V617F в гене *JAK2*
Fig. 2. The allele burden level detected by *Minor Variant Finder* software in patient No. 1 (a) and No. 4 (b) with V617F

аллельной нагрузки с прямого и обратного праймеров, который составил 30,3 и 29,7 % соответственно. Визуализация результата использования ПО MVF для этого пациента приведена на рис. 3.

Представленные секвенограммы были сгенерированы ПО MVF на основе данных секвенирования тестовых и контрольных образцов.

Обсуждение

Программное обеспечение MVF имеет существенное ограничение и может быть использовано для поиска

Таблица 3. Уровень аллельной нагрузки мутации V617F в гене JAK2, определенный с помощью программного обеспечения Minor Variant Finder после секвенирования по Сэнгеру, а также методами пиросеквенирования и полимеразной цепной реакции в реальном времени для 9 пациентов с Ph-миелопролиферативными новообразованиями

Table 3. The allele burden level of V617F mutation in JAK2 gene determined by Minor Variant Finder software Sanger sequencing, pyrosequencing technique, and real-time polymerase chain reaction in 11 Ph-myeloproliferative neoplasms patients

№ пациента Patient No.	Уровень аллельной нагрузки, % The allele burden level, %			
	Секвенирование по Сэнгеру Sanger sequencing		Пиросеквенирование Pyrosequencing	Полимеразная цепная реакция в реальном времени Real-time polymerase chain reaction
	с прямого праймера in forward direction	с обратного праймера in reverse direction		
1	5,1	4,7	7,0	5,2
2	15,9	20,5	22,0	27,8
3	14,1	17,7	20,0	20,4
4	41,2	37,8	40,0	35,2
5	12,0	12,8	20,0	15,0
6	13,9	16,2	17,0	20,9
7	26,4	27,9	25,0	27,6
8	6,0	7,4	7,0	2,9
9	17,2	8,9	3,0	19,8

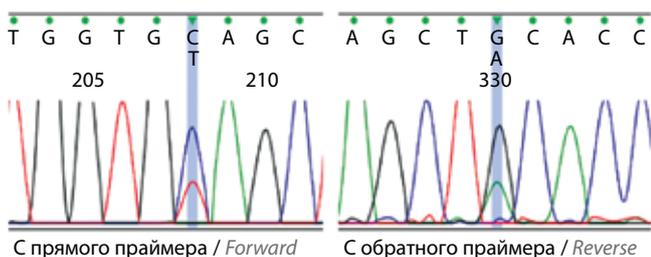


Рис. 3. Секвенограммы, отражающие уровень аллельной нагрузки, обнаруженный с помощью программного обеспечения Minor Variant Finder у пациента с мутацией с.898C>T (Q300*) в киназном домене онкогена BCR-ABL

Fig. 3. The allele burden level detected by Minor Variant Finder software in patient with c.898C>T (Q300*) in kinase domain of BCR-ABL oncogene

редких вариантов соматических мутаций и определения уровня аллельной нагрузки только в случае присутствия в анализируемом образце однонуклеотидных замен и не может быть применено при анализе инсерций и делеций. Указанное ограничение влияет на выбор генетических локусов, для которых возможно использование ПО MVF. В частности, из всего разнообразия диагностических, прогностических и определяющих чувствительность к противоопухолевым препаратам соматических мутаций, ассоциированных с МПН, для выполнения данной работы нами были выбраны лишь некоторые мутации, а именно те, которые связаны с заменой одного нуклеотида на другой.

При анализе мутаций в гене ASXL1 с помощью ПО MVF уровень аллельной нагрузки для всех 5 образцов был определен как выше 20 %. Данные мутации

были бы выявлены при секвенировании по Сэнгеру и без использования дополнительного ПО, но уровень аллельной нагрузки определить было бы возможно лишь приблизительно. Также можно отметить, что для пациентов № 1, 2 и 3 различия в уровне аллельной нагрузки при определении с прямого и обратного праймеров имели более выраженные отличия, чем для пациентов № 4 и 5.

При анализе амплифицированного участка экзона 14 гена JAK2 с помощью ПО MVF в 9 образцах ДНК с ранее выявленной другими методами мутацией V617F во всех 9 образцах применение ПО позволило обнаружить данную мутацию. При этом 2 из них имели уровень аллельной нагрузки выше 20 % (выше предела обнаружения секвенирования по Сэнгеру), т. е. в этих 2 случаях мутация была бы выявлена при секвенировании по Сэнгеру и без использования дополнительного ПО, но уровень аллельной нагрузки определить было бы возможно лишь приблизительно. Остальные 7 образцов имели нагрузку менее 20 % и соответственно при анализе данных результатов секвенирования по Сэнгеру без применения ПО MVF нельзя было бы быть уверенным в наличии мутации.

При анализе мутаций в KD химерного онкогена BCR-ABL с помощью ПО MVF уровень аллельной нагрузки для образца был определен как выше 20 %. Поскольку все мутации онкогена BCR-ABL, обуславливающие лекарственную резистентность у пациентов с ХМЛ, точечные, их перечень очень разнообразен, уровень аллельной нагрузки может меняться и даже

клоны с одной мутацией резистентности могут меняться на клоны с другой мутацией, то секвенирование по Сэнгеру с дальнейшим использованием ПО MVF является очень удобным подходом при исследовании резистентности у пациентов с ХМЛ.

В целом можно отметить, что использование ПО MVF позволяет увеличить выявляемость соматических мутаций при их детекции с помощью секвенирования по Сэнгеру, поскольку в случае присутствия в образце ДНК менее 20 % мутантного аллеля и при анализе результатов секвенирования по Сэнгеру без применения данного ПО нельзя быть уверенным в наличии мутации. В то же время возможность оценки с помощью ПО MVF уровня аллельной нагрузки в не-

которых случаях очень важна, особенно при диагностике, прогнозировании и лечении онкогематологических заболеваний.

Заключение

Программное обеспечение MVF может быть использовано для выявления малоцентных вариантов и оценки уровня аллельной нагрузки соматических мутаций в генах *ASXL1*, *JAK2* и онкогене *BCR-ABL*, однако при планировании использования данного ПО необходимо учитывать, что оно может применяться только в случае анализа одонуклеотидных замен и не может быть использовано в случае мутаций по типу инсерций или делеций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Vannucchi A.M., Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia – negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica* 2008;93(7):972–6. DOI: 10.3324/haematol.13266.
- Иконникова А.Ю., Яценко Ю.Е., Кременецкая О.С. и др. Определение мутаций гена *BCR-ABL* при хроническом миелолейкозе с использованием биочипа. *Молекулярная биология* 2016;50(3):412–6. DOI: 10.7868/S0026898416020087. [Ikonnikova A.Yu., Yatsenko Yu.E., Kremenetskaya O.S. et al. Detection of *BCR-ABL* gene mutations in chronic myeloid leukemia using biochips. *Moлекулярная биология* = *Molecular Biology* 2016;50(3):412–6. (In Russ.)].
- Ogino S., Kawasaki T., Brahmandam M. et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005;7(3):413–21. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60571-5.
- Schreiber E.H., Leong H., Schneider S.J. Minor Variant Finder: New software for detecting somatic mutations at low level in Sanger sequencing traces. *Am Assoc Cancer Res* 2016;76(14):5269. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-5269.
- Zhuo Z., Lamont S.J., Abasht B. RNA-Seq Analyses identify frequent allele specific expression and no evidence of genomic imprinting in specific embryonic tissues of chicken. *Sci Rep* 2017;7(1):11944. DOI: 10.1038/s41598-017-12179-9.
- Bessis D., Plaisancie J., Gaston V., Bieth E. Fibroblast growth factor receptor 3 epidermal naevus syndrome with urothelial mosaicism for the activating p.Ser249Cys FGFR3 mutation. *Acta Derm Venereol* 2017;97(3):402–3. DOI: 10.2340/00015555-2554.
- Chen J., Hong Z., Zhao C. et al. Associations between polymorphisms of the *PDLIM4* gene and susceptibility to osteoporotic fracture in an elderly population of Han Chinese. *Biosci Rep* 2019;39(1):20181505. DOI: 10.1042/BSR20181505.
- Beretti F., Bertoni L., Farnetani F. et al. Melanoma types by *in vivo* reflectance confocal microscopy correlated with protein and molecular genetic alterations: a pilot study. *Exp Dermatol* 2019;28(3):254–60. DOI: 10.1111/exd.13877.
- Jackson S., Gerstner A., Varma K. A capillary electrophoresis-sequencing based screening solution for identifying and quantifying hotspot mutations in solid tumors. *Eur J Cancer* 2016;61(1):156–7. DOI: 10.1016/S0959-8049(16)61553-8.
- Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миело-пролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз). *Гематология и трансфузиология* 2018;63(3):275–315. DOI: 10.25837/HAT.2019.51.88.001. [Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N. et al. National clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis). *Gematologiya i transfuziologiya* = *Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2018;63(3):275–315. (In Russ.)].
- Vannucchi A.M., Lasho T.L., Guglielmelli P. et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27(9):1861–9. DOI: 10.1038/leu.2013.119.
- Sorigué M., Ribera J.M., García O. et al. Highly variable mutational profile of ASXL1 in myelofibrosis. *Eur J Haematol* 2016;97(4):331–6. DOI: 10.1111/ejh.12731.
- Catalogue of somatic mutations in cancer. Available by <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- Soverini S., Abruzzese E., Bocchia M. et al. Next-generation sequencing for BCR-ABL₁ kinase domain mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia: a position paper. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):131. DOI: 10.1186/s13045-019-0815-5.
- Larsen T.S., Christensen J.H., Hasselbalch H.C. et al. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2007;136(5):745–51. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06497.x.
- Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Количественное определение мутации V617F в гене *JAK2* методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика* 2014;59(11):60–3. [Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P. et al. The quantitative testing of V617F mutation in gene *JAK2* using pyrosequencing technique. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Clinical Laboratory Diagnostics* 2014;59(11):60–3. (In Russ.)].
- Wu Z., Zhang Y., Zhang X. et al. A multiplex snapback primer system for the enrichment and detection of *JAK2* V617F and MPL W515L/K mutations in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Biomed Res Int* 2014;2014:458457. DOI: 10.1155/2014/458457.

Вклад авторов

Т.Н. Субботина, С.В. Верещагина, Б.В. Баранкин: разработка дизайна исследования, научное редактирование, утверждение статьи; И.Е. Маслюкова, А.А. Фалеева, П.А. Николаева: получение данных, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание части текста рукописи; А.С. Хазиева, И.С. Мартынкевич: предоставление материалов для исследования, анализ полученных данных, научное редактирование, утверждение статьи; Е.А. Дунаева, К.О. Миронов, Л.Б. Полушкина: получение данных, анализ полученных данных.

Authors' contributions

T.N. Subbotina, S.V. Vereshchagina, B.V. Barankin: developing the research design, article editing, article approval; I.E. Maslyukova, A.A. Faleeva, P.A. Nikolaeva: obtaining data, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, writing part of the text; A.S. Khazieva, I.S. Martynkevich: providing materials for research, analysis of the obtained data, article editing, article approval; E.A. Dunaeva, K.O. Mironov, L.B. Polushkina: obtaining data, analysis of the obtained data.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Субботина / T.N. Subbotina: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>
И.Е. Маслюкова / I.E. Maslyukova: <https://orcid.org/0000-0003-1323-2612>
А.А. Фалеева / A.A. Faleeva: <https://orcid.org/0000-0001-7618-5177>
П.А. Николаева / P.A. Nikolaeva: <https://orcid.org/0000-0002-3863-8347>
А.С. Хазиева / A.S. Khazieva: <https://orcid.org/0000-0001-7525-6981>
Е.А. Дунаева / E.A. Dunaeva: <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>
К.О. Миронов / K.O. Mironov: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России». Протокол № 10 от 01.02.2017.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of Federal State Budgetary Institution "Federal Siberian Scientific Clinical Center of Federal Medico-Biological Agency of Russia". Protocol No 10 dated 01.02.2017.