

DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55



Использование гетеродуплексного анализа для скринингового выявления соматических мутаций в экзоне 9 гена *CALR* у пациентов с Ph-миелопролиферативными новообразованиями

Т.Н. Субботина^{1,2}, Д.В. Курочкин¹, И.Е. Маслюкова¹, А.С. Хазиева³, Е.В. Васильев³, М.А. Михалёв⁴, Е.А. Дунаева⁵, К.О. Миронов⁵

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

⁴КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7»; Россия, 660003 Красноярск, ул. Академика Павлова, 4, стр. 3;

⁵ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора; Россия, 111123 Москва, ул. Новогиреевская, 3а

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

Введение. В соответствии с клиническими рекомендациями Всемирной организации здравоохранения анализ соматических мутаций в гене *CALR*, как и мутаций в генах *JAK2* и *MPL*, включен в перечень критериев диагностики Ph-миелопролиферативных новообразований.

В гене *CALR* выявлено более 50 различных вариантов мутаций, среди которых наиболее распространенными являются делеция 52 (с.1092_1143del) и вставка 5 пар оснований (с.1154_1155insTTGTC) (88 %). Оставшиеся 12 % включают другие варианты делеций/вставок или их комбинаций, которые либо уникальны, либо обнаружены у небольшого числа пациентов.

Удобнее всего для выявления одновременно всех возможных вариантов мутаций *CALR* использовать методы секвенирования. Также актуально предварительное проведение дешевого скринингового теста, позволяющего выявить любые мутации в анализируемом фрагменте ДНК. Таким методом может стать гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ).

Цель работы – разработать, клинически апробировать и продемонстрировать возможность использования метода гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ для выявления мутаций в экзоне 9 гена *CALR* в качестве скринингового теста.

Материалы и методы. Для проведения скринингового исследования соматических мутаций в гене *CALR* методом гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ использовали образцы ДНК от 13 пациентов с различными фенотипическими вариантами Ph-миелопролиферативных новообразований и предварительно выявленными мутациями *CALR*. Для наиболее распространенных вариантов мутаций *CALR* (с.1092_1143del и с.1154_1155insTTGTC) был проанализирован порог определения доли мутантного аллеля. Нуклеотидную последовательность фрагмента экзона 9 гена *CALR* определяли с помощью секвенирования по Сэнгеру. Также для оценки уровня аллельной нагрузки все 13 образцов были проанализированы с помощью метода пиросеквенирования.

Результаты. Метод гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ позволил выявить мутации в экзоне 9 гена *CALR* у всех 13 пациентов. Порог определения доли мутантного аллеля для мутации с.1154_1155insTTGTC составил от 6,25 % аллельной нагрузки, для мутации с.1092_1143del – от 3,13 %.

Заключение. Метод гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ подходит для скрининга любых вариантов делеций/вставок или их комбинаций в гене *CALR*. По наличию гетеродуплексов можно заключить о наличии мутации, даже если мутантный продукт не визуализируется в геле (в случае небольших мутаций).

Ключевые слова: Ph-миелопролиферативное новообразование, ген *CALR*, гетеродуплексный анализ, секвенирование по Сэнгеру

Для цитирования: Субботина Т.Н., Курочкин Д.В., Маслюкова И.Е. и др. Использование гетеродуплексного анализа для скринингового выявления соматических мутаций в экзоне 9 гена *CALR* у пациентов с Ph-миелопролиферативными новообразованиями. Онкогематология 2021;16(2):48–55. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55.

Application of heteroduplex analysis for *CALR* mutation screening detection in patients with Ph-myeloproliferative neoplasms

T.N. Subbotina^{1,2}, D.V. Kurochkin¹, I.E. Maslyukova¹, A.S. Khazieva³, E.V. Vasiliev³, M.A. Mikhalev⁴, E.A. Dunaeva⁵, K.O. Mironov⁵

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;

⁴City Clinical Hospital No. 7; Build. 3, 4 Akademiya Pavlova St., Krasnoyarsk 660003, Russia;

⁵Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Customer Rights Protection and Human Wellbeing; 3a Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russia

Contacts: Tat'yana Nikolaevna Subbotina *stn.25@mail.ru*

Background. In accordance with the World health organization clinical guidelines, the analysis of somatic mutations in the *CALR* gene, as well as mutations in the *JAK2* and *MPL* genes, are included in the list of criteria for the Ph-myeloproliferative neoplasms diagnosis.

More than 50 different mutation variants have been found in the *CALR* gene, among which the most frequent are a 52 bp deletion (c.1092_1143del), also called type 1, and a 5 bp insertion (c.1154_1155insTTGTC), also called type 2 (88 %). The remaining 12 % are other type less frequent indels or combinations thereof.

It is most convenient to use sequencing methods to identify all possible variants of *CALR* mutations. It is also important to develop inexpensive screening test that can detect any mutations in the analyzed DNA fragment of *CALR* gene. This method can be heteroduplex analysis followed by electrophoresis on polyacrylamide gel (PAGE).

The objective: to develop and demonstrate the feasibility of using heteroduplex analysis with separation of the PCR product by electrophoresis on non-denaturing PAGE for the *CALR* exon 9 mutations detection as the screening test.

Materials and methods. DNA samples of 13 *CALR*-positive patients with different phenotypic variants of Ph-myeloproliferative neoplasms were screened by heteroduplex analysis. For the most common variants of *CALR* mutations (c.1092_1143del and c.1154_1155insTTGTC), a threshold determination of the mutant allele presence was analyzed. Nucleotide sequence of exon 9 fragment was determined using Sanger sequencing. Also, all 13 samples were analyzed using the pyrosequencing method to assess the allelic burden level.

Results. Heteroduplex analysis revealed mutations in exon 9 of the *CALR* gene in all 13 patients. The threshold determinations of the method in the case of the c.1154_1155insTTGTC and c.1092_1143del analysis are 6.25 % and 3.13 % of the mutant allele presence in the patient sample, respectively.

Conclusion. The proposed variant of the heteroduplex analysis with separation of the PCR product by electrophoresis on non-denaturing PAGE can be recommended for use as the preliminary screening test which is carried out before the confirming sequencing methods for the different indels (or combinations thereof) *CALR* mutations determine. The presence of heteroduplexes indicates the presence of a mutation, even if the mutant product is not visualized (in case of small mutations).

Key words: Ph-myeloproliferative neoplasm, *CALR*, heteroduplex analysis, Sanger sequencing

For citation: Subbotina T.N., Kurochkin D.V., Maslyukova I.E. et al. Application of heteroduplex analysis for *CALR* mutation screening detection in patients with Ph-myeloproliferative neoplasms. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2021;16(2):48–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55.

Введение

Ph-миелолипролиферативные новообразования (Ph-МЛН) — клональные заболевания, характеризующиеся аномальной пролиферацией одной или нескольких клеточных линий миелопоэза в костном мозге [1]. К наиболее частым Ph-МЛН относятся истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и миелофиброз. Молекулярная основа этих заболеваний была частично выяснена в 2005 г., когда обнаружили мутацию V617F гена *JAK2* у большинства пациентов с истинной полицитемией и примерно у 60 % пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и миелофиброзом [2]. Позднее было показано, что у небольшой части (около 3 % случаев) пациентов

с истинной полицитемией без мутации V617F гена *JAK2* присутствуют соматические мутации в экзоне 12 гена *JAK2*, а примерно в 5 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и миелофиброза присутствуют мутации в экзоне 10 гена *MPL* [3, 4]. В соответствии с клиническими рекомендациями Всемирной организации здравоохранения 2008 г. анализ вышеперечисленных мутаций был включен в перечень критериев диагностики Ph-МЛН [5]. В 2013 г. 2 научные группы независимо обнаружили и описали различные варианты соматических мутаций в экзоне 9 гена *CALR* у 20–25 % *JAK2*- и *MPL*-негативных пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и миелофиброзом [6, 7]. В 2016 г. анализ мутаций в гене *CALR* также был включен

в диагностические критерии Всемирной организации здравоохранения [8]. Важно отметить, что среди пациентов с Ph-МПН неоднократно были выявлены случаи присутствия одновременно 2 соматических мутаций, ассоциированных с данным заболеванием. Например, описаны случаи сочетания мутации V617F в экзоне 14 гена *JAK2* с какой-либо мутацией в экзоне 12 этого же гена, или с мутацией в экзоне 9 гена *CALR*, или с мутацией в экзоне 10 гена *MPL* [9, 10]. Помимо этого, в литературе описаны случаи выявления мутаций *CALR* у пациентов с истинной полицитемией, но остаются неясными клиническое значение таких мутаций и их вклад в развитие патогенеза заболевания [11].

К настоящему времени в гене *CALR* выявлено более 50 различных вариантов мутаций, среди которых наиболее распространенными являются делеция 52 пар оснований (тип 1: с.1092_1143del; L367fs*46, COSV57116546) и вставка 5 пар оснований (тип 2: с.1154_1155insTTGTC; K385fs*47, COSV57116551). Встречаемость этих 2 мутаций составляет 88 % от всех мутаций в гене *CALR*. Оставшиеся 12 % включают другие варианты делеций/вставок или их комбинаций, которые либо уникальны, либо обнаружены у небольшого числа пациентов.

Удобнее всего для выявления одновременно всех возможных вариантов мутаций *CALR* использовать методы секвенирования. Так, нами ранее был предложен количественный формат анализа мутаций в экзоне 9 гена *CALR* – метод пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen, Германия) [12]. Вместе с тем проведение секвенирования для всех пациентов с подозрением на Ph-МПН (в частности, на эссенциальную тромбоцитемию и миелофиброз) не всегда доступно на базе клинических лабораторий. В связи с этим актуально предварительное проведение более простого и менее дорогостоящего скринингового теста, позволяющего выявить любые мутации в анализируемом фрагменте ДНК. Таким скрининговым методом может стать гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ). Ранее мы предложили использование подобного подхода для обнаружения соматических мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* для пациентов с подозрением на истинную полицитемию [13].

Цель исследования – разработать, клинически апробировать и продемонстрировать возможность использования метода гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ для выявления мутаций в экзоне 9 гена *CALR* в качестве скринингового теста.

Материалы и методы

Для проведения скринингового исследования соматических мутаций в экзоне 9 гена *CALR* методом гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ использовали образцы ДНК от 13 пациентов с различными фенотипическими

вариантами Ph-МПН и предварительно выявленными мутациями в гене *CALR*. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента экзона 9 гена *CALR* проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Также для оценки уровня аллельной нагрузки все 13 образцов были проанализированы с применением метода пиросеквенирования в количественном формате на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, Германия) с использованием программного обеспечения PyroMark Q24 2.0.6 в формате SQA (секвенирование неизвестных последовательностей) и AQ (количественное определение мутаций, таких как SNP и InDel), как было описано ранее [12]. В качестве контроля использовали образец ДНК без мутаций в анализируемом участке гена *CALR*. Отсутствие каких-либо мутаций и полиморфизмов в исследуемой области контрольного образца было подтверждено секвенированием по Сэнгеру. ДНК для всех образцов была выделена из лейкоцитов венозной крови с помощью набора реагентов ДНК-Сорб-В (АмплиСенс, Россия).

Метод гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ предусматривает амплификацию с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагмента ДНК экзона 9 гена *CALR* с образованием гетеродуплексов и последующий электрофорез в вертикальном ПААГ.

Амплификацию проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии EVAGreen (Синтол, Россия) и праймеров из работы [14], фланкирующих участок длиной 265 пар оснований: прямой праймер – 5'-GGCAAGG-CCCTGAGGTGT-3'; обратный праймер – 5'-GGCCTCAGTCCAGCCCTG-3'. Количество вносимой ДНК в реакционную пробу составило 30–40 нг. ПЦР с дополнительным этапом для образования гетеродуплексов проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 3 мин – 95 °С; 40 циклов: 10 с – 95 °С, 10 с – 57 °С, 20 с – 72 °С; 1 цикл (образование гетеродуплексов): 1 мин – 95 °С, 1 мин – 45 °С. Далее с продуктами амплификации проводили электрофорез в 8 % вертикальном ПААГ (соотношение акриламид: бисакриламид – 29:1) в 1х TBE-буфере. Детекцию результатов осуществляли путем окрашивания ПААГ бромистым этидием в течение 7–10 мин с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете с использованием системы Gel Doc (Bio-Rad, США). Соответствие молекулярных весов продуктов амплификации оценивали с помощью маркера молекулярного веса GeneRuler Low Range DNA Ladder (размер фрагментов от 700 до 25 пар оснований). Заключение о наличии мутаций в экзоне 9 гена *CALR* в гетерозиготном состоянии составляли по образованию дополнительных полос в геле (гомо- и гетеродуплексов), которые не выявляются в образцах ДНК, не содержащих искомые мутации.

Для анализа порога определения доли мутантного аллеля осуществляли клонирование ДНК, выделенной из клинических образцов, в вектор pGEM-T по стандартной методике (Promega, США) [15]. Отбор клонов «дикого» типа и содержащих мутации с.1154_1155insTTGTC и с.1092_1143del проводили на основании результатов секвенирования на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Контрольные образцы «дикого» типа и содержащие мутацию были смешаны в разных соотношениях. Анализировали смеси, содержащие 3, 13; 6, 25; 12, 5; 25; 50 и 100 % мутантного образца.

Результаты

В таблице представлены результаты анализа мутаций в гене CALR методом секвенирования по Сэнгеру, а также результаты анализа уровня аллельной нагрузки мутаций CALR, определенной методом пиросеквенирования для всех 13 включенных в исследование пациентов с диагнозом Ph-МПП.

Выявленные у 11 (№ 1, 4–13) из 13 обследуемых пациентов мутации ранее уже были описаны в литературе и представлены в базе COSMIC (см. таблицу). Из указанных 11 пациентов 9 имеют наиболее распространенные мутации CALR (у 6 пациентов – делеция 52 пар оснований (тип 1) и у 3 пациентов – вставка 5 пар оснований (тип 2)). У 2 (№ 1 и 4) из 11 пациентов выявлены редкие варианты мутации CALR (вставка 5 пар оснований и делеция 49 пар оснований соответственно). Важно отметить, что обнаруженные у пациентов № 2 и 3 мутации CALR располагаются в том же генетическом локусе, но при этом еще не описаны в литературе и не представлены в базе COSMIC.

Результаты, полученные при исследовании ДНК пациентов на наличие мутаций CALR методом гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ, приведены на рис. 1.

На дорожках № 1–13 представлены результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации

Тип и уровень аллельной нагрузки CALR мутаций, определенные методами секвенирования по Сэнгеру и пиросеквенирования для 13 пациентов с Ph-миелопролиферативными новообразованиями

The type and allele burden level of CALR mutation determined by Sanger sequencing and pyrosequencing technique in 13 Ph-myeloproliferative neoplasm patients

Пациент Patient	Диагноз Diagnosis	Тип мутации гена CALR (NM: 004343.3) CALR mutation type (NM: 004343.3)	Уровень аллельной нагрузки (пиросеквенирование), % The allele burden level (pyrosequencing), %
1	Истинная полицитемия Polycythemia vera	с.1154_1155insGTGTC (p.E386fs*46)	28
2	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1128_1129insCTTTGCTT (p.K377Lfs*56) с.1131_1133delAGA (p.E378del)	39 34
3	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1100_1148del(49)insAGT (p.L367Qfs*48)	13
4	Эссенциальная тромбоцитемия Essential thrombocythemia	с.1111_1141del(31) (p.E371Rfs*49)	16
5	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1092_1143del(52) (p.L367fs*46)	48
6	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1092_1143del(52) (p.L367fs*46)	50
7	Эссенциальная тромбоцитемия Essential thrombocythemia	с.1092_1143del(52) (p.L367fs*46)	46
8	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1092_1143del(52) (p.L367fs*46)	50
9	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1092_1143del(52) (p.L367fs*46)	70
10	Эссенциальная тромбоцитемия Essential thrombocythemia	с.1092_1143del(52) (p.L367fs*46)	49
11	Эссенциальная тромбоцитемия Essential thrombocythemia	с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)	30
12	Миелофиброз Myelofibrosis	с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)	46
13	Эссенциальная тромбоцитемия Essential thrombocythemia	с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)	9

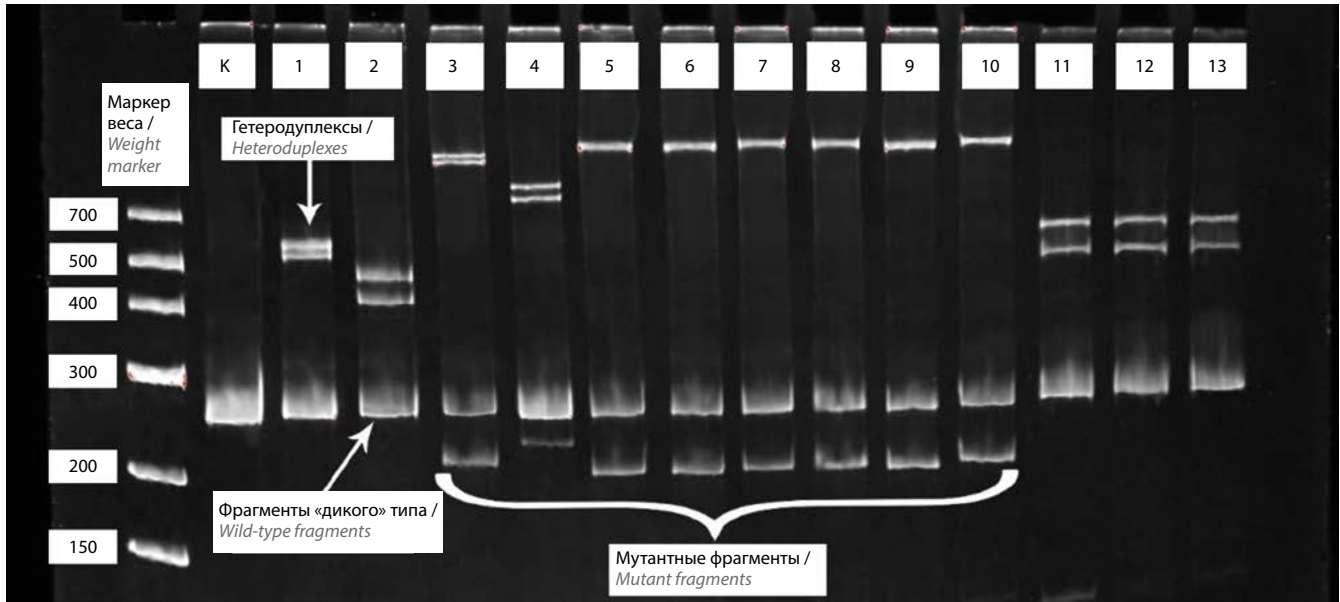


Рис. 1. Результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации ДНК после образования гетеродуплексов
Fig. 1. Results of electrophoretic separation of DNA amplification products after heteroduplex formation

образцов ДНК от 13 пациентов с Ph-МПН, на дорожке К – контрольный образец без мутации.

При анализе электрофореграммы можно наблюдать, что на дорожках от всех проб четко визуализируется основной фрагмент, соответствующий «дикому» типу, – 265 пар оснований. Фрагменты, соответствующие мутантным аллелям, визуализируются не во всех образцах, а именно на дорожке от образца № 1 с мутацией с.1154_1155insGTGTC, от образца № 2 с сочетанными мутациями с.1128_1129insCTTTGCTT и с.1131_1133delAGA, и от образцов № 11–13 с мутацией с.1154_1155insTTGTC фрагмент, соответствующий мутантному продукту, не визуализируется. При этом

во всех пробах, имеющих мутации, визуализируются дополнительные полосы, расположенные выше фрагмента «дикого» типа, соответствующие гетеродуплексам, образованным сочетанием фрагментов «дикого» и мутантного типов аллелей.

Для анализа порога определения доли мутантного аллеля было выполнено разведение заклонированных образцов «дикого» типа и с мутацией для получения проб с различными уровнями аллельных нагрузок 100; 50; 25; 6,25 и 3,13 %, несущих выявленные ранее мутации. Результаты анализа порога определения доли мутантного аллеля для предлагаемого метода представлены на рис. 2, 3. Нужно отметить, что в данном случае

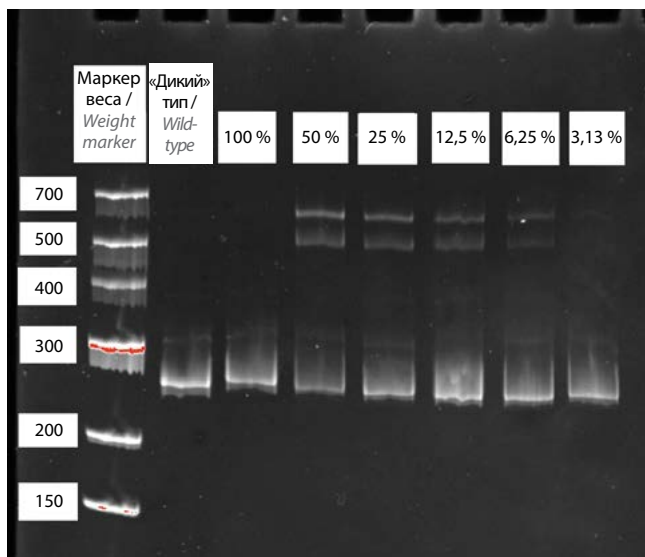


Рис. 2. Электрофореграмма, отражающая результаты анализа порога определения доли мутантного аллеля для мутации с.1154_1155insTTGTC
Fig. 2. Results of the threshold determination in the case of the c.1154_1155insTTGTC mutation

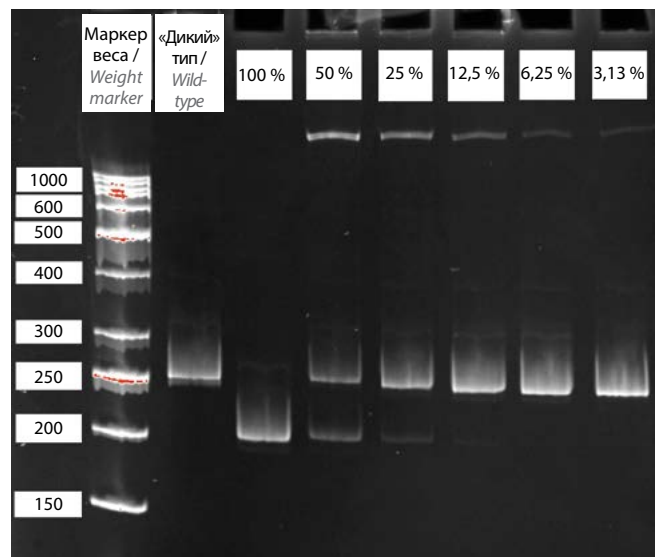


Рис. 3. Электрофореграмма, отражающая результаты анализа порога определения доли мутантного аллеля для мутации с.1092_1143del
Fig. 3. Results of the threshold determination in the case of the c.1092_1143del mutation

были выбраны и заклонированы образцы с двумя наиболее часто встречающимися мутациями в гене *CALR* (с.1092_1143del и с.1154_1155insTTGTC).

Обсуждение

В результате проведенного гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ мутации в области экзона 9 гена *CALR* были обнаружены во всех 13 образцах с предварительно выявленными методами секвенирования по Сэнгеру и пиросеквенирования соответствующими мутациями (см. рис. 1). Стоит отметить, что во всех случаях, когда мутация представляет собой крупную делецию, кроме основного продукта «дикого» типа (265 пар оснований) хорошо визуализируется и мутантный продукт (№ 3 – делеция 46 нуклеотидов, № 4 – делеция 31 нуклеотида, № 5–10 – делеция 52 нуклеотидов). В случаях же небольших вариантов делеций/вставок или их комбинаций (пациенты № 1, 11, 12, 13 – вставка 5 нуклеотидов, пациент № 2 – вставка 8 и делеция 3 нуклеотидов) мутантный продукт не визуализируется, что, по-видимому, обусловлено недостаточным разрешением используемого в данном случае вида электрофореза. Что касается гетеродуплексов, то можно отметить, что в образцах № 1–4 и 11–13 четко визуализируются по 2 полосы, соответствующие гетеродуплексам. Однако в случае образцов № 5–10, имеющих мутацию с.1092_1143del (52), две дополнительные полосы сливаются в одну, что, вероятно, обусловлено образованием в структуре гетеродуплексов крупных шпилек, возникающих в результате крупной делеции. Наличие таких крупных шпилек в структуре гетеродуплексов, вероятно, значительно снижает их подвижность в геле и приводит к слиянию двух полос на электрофореграмме в одну.

По результатам работы можно отметить, что образование гетеродуплексов при проведении предлагаемого метода позволило выявить мутации *CALR* во всех исследуемых 13 образцах ДНК с предварительно выявленными методами секвенирования мутациями.

По результатам анализа порога определения доли мутантного аллеля было показано, что в случае мутации

с.1154_1155insTTGTC полосы, соответствующие гетеродуплексам, четко визуализируются в образцах с уровнем аллельной нагрузки 6,25 % и выше, в случае же мутации с.1092_1143del полоса, соответствующая гетеродуплексам, четко визуализируется в образцах с уровнем аллельной нагрузки 3,13 % и выше.

Как уже было упомянуто, обнаруженные у пациентов № 2 и 3 мутации *CALR*, как и мутации у остальных пациентов, располагаются в области с частыми онкогенными мутациями, но не описаны в литературе и не представлены в базе COSMIC. Результаты анализа экзона 9 гена *CALR* методом секвенирования по Сэнгеру для пациентки № 2 приведены на рис. 4. В результате анализа секвенограммы найдены 2 сочетанные мутации: с.1128_1129insCTTTGCTT (p.K377Lfs*56) с.1131_1133delAGA (p.E378del). У пациента № 3 в гене *CALR* обнаружена комплексная мутация с.1100_1148del(49) insAGT(p.L367Qfs*48). Результаты секвенирования экзона 9 гена *CALR* пациента № 3 представлены на рис. 5.

В результате выявленных у пациентов № 2 и 3 мутаций происходит сдвиг рамки считывания, утрачивается сигнал KDEL, образуется измененный мутантный белок, в С-концевом домене которого, как и при других описанных в литературе мутациях *CALR*, происходит замена отрицательно заряженных аминокислот (глутаминовая и аспарагиновая кислоты) на положительно заряженные (в основном на аргинин) [6]. На основании вышесказанного можно предполагать, что обнаруженные у пациентов № 2 и 3 новые мутации *CALR* имеют такое же значение для онкогенности, как и другие известные мутации в данном гене.

У пациентки № 2, 60 лет, в гене *CALR* обнаружены 2 новые моноаллельные мутации (с.1128_1129insCTTTGCTT и с.1131_1133delAGA). На момент диагностирования заболевания в 2003 г. у больной в периферической крови наблюдались тромбоцитоз до 800×10^9 /л, анемия (уровень гемоглобина до 63 г/л). В 2003 г. проводилось стационарное лечение, после обследования (стеральная пункция, трепанобиопсия) был диагностирован хронический мегакариоцитарный лейкоз. В марте 2011 г.

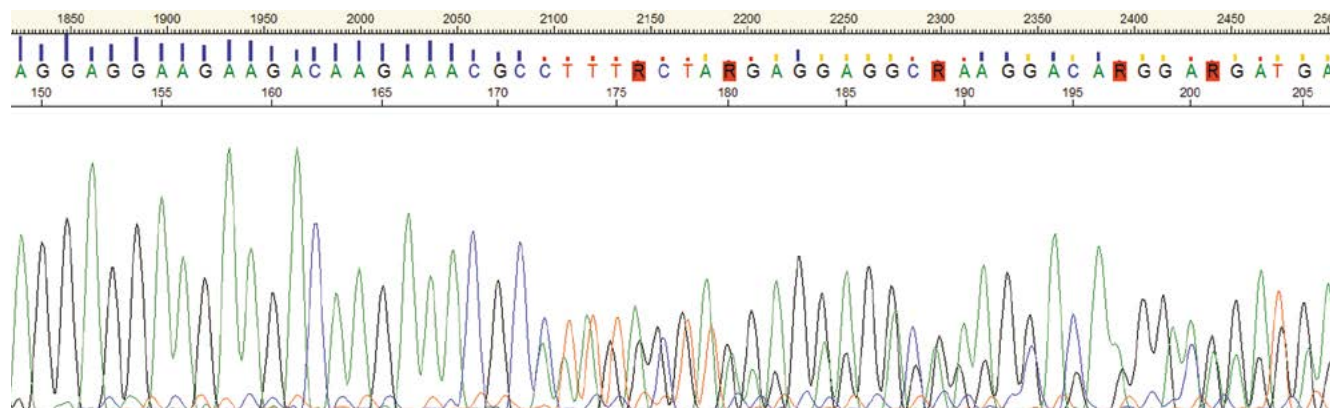


Рис. 4. Результаты секвенирования ДНК от пациентки № 2 с сочетанными мутациями с.1128_1129insCTTTGCTT и с.1131_1133delAGA в экзоне 9 гена *CALR*

Fig. 4. DNA sequencing chromatogram of № 2 patient with с.1128_1129insCTTTGCTT and с.1131_1133delAGA mutations in 9 exon of the *CALR* gene

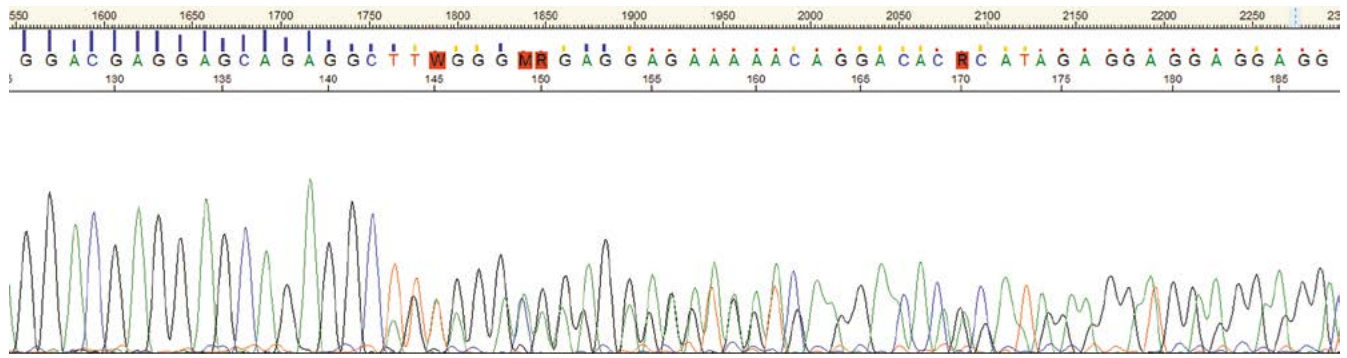


Рис. 5. Результаты секвенирования ДНК от пациента № 3 с комплексной мутацией с.1100_1148del(49)insAGT в экзоне 9 гена CALR
 Fig. 5. DNA sequencing chromatogram of № 3 patient with c.1100_1148del(49)insAGT complex mutation in 9 exon of the CALR gene

пациентка обратилась с жалобами на общую слабость и нарастающую тяжесть в левом подреберье. В феврале 2012 г. была госпитализирована в целях рестадирования заболевания и подбора терапии. В гемограмме: уровень гемоглобина 111 г/л, количество эритроцитов $3,7 \times 10^{12}$ /л, лейкоцитов $5,6 \times 10^9$ /л, тромбоцитов 43×10^9 /л, цветовой показатель 0,9, скорость оседания эритроцитов 15 мм/ч. В миелограмме: бласты 0,2 %, пунктат скудноклеточный, содержит преимущественно зрелые гранулоциты и лимфоциты. Эритропоэз относительно сужен, мегакариоциты не обнаружены. На сегодняшний день пациентка имеет диагноз миелофиброз более 16 лет, состояние стабильное, имеет спленомегалию, тромботические осложнения отсутствуют. Нужно отметить, что кроме обнаруженных мутаций в гене *CALR* у данной пациентки выявлена наиболее распространенная прогностическая мутация в гене *ASXL1* с.1934_1935insG (р.G646fs*12). По данным литературы, наличие мутации в гене *CALR* для пациентов с миелофиброзом имеет благоприятный прогноз, и выживаемость таких пациентов не зависит от статуса мутации *ASXL1* [16]. Анализ мутаций в генах *JAK2* и *MPL* для данной пациентки показал отрицательные результаты.

Анамнез пациента № 3 неизвестен. Других ассоциированных с Ph-МПН мутаций в генах *JAK2* и *MPL*, а также в гене *ASXL1* у данного пациента не выявлено.

Интересно также отметить, что пациенту № 1, у которого выявлена редкая мутация в гене *CALR* (с.1154_1155insGTGTC), по результатам патоморфоло-

гического исследования и с учетом клинико-лабораторных данных поставлен диагноз истинной полицитемии, тогда как мутации в гене *CALR* выявляются почти исключительно при эссенциальной тромбоцитемии и миелофиброзе [11]. Имеются лишь отдельные публикации, в которых описаны подобные случаи присутствия мутации *CALR* у пациентов с диагнозом истинной полицитемии [11].

Заключение

В настоящем исследовании показана возможность использования гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ в качестве скринингового теста, предшествующего секвенированию при выявлении мутаций *CALR* у пациентов с Ph-МПН. Предлагаемый метод подходит для выявления любых вариантов мутаций (делеции/вставки или их комбинации) в гене *CALR*. Даже в случае небольших мутаций, когда не визуализируются фрагменты, соответствующие мутантным продуктам, заключение о наличии мутаций можно сделать по наличию гетеродуплексов. Порог определения в случае анализа мутации с.1154_1155insTTGTC составляет от 6,25 % присутствия мутантного аллеля в пробе, в случае анализа мутации с.1092_1143del – от 3,13 %.

Таким образом, включение данного подхода в качестве скринингового теста в алгоритм лабораторного тестирования позволяет повысить эффективность и доступность молекулярно-генетических технологий диагностики Ph-МПН.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Биология миелопролиферативных новообразований. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2016;9(3):314–25. [Melikyan A.L., Subortseva I.N. Biology of myeloproliferative malignancies. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2016;9(3):314–25. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-314-325.
2. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005;365(9464): 1054–61. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9.
3. Scott L.M., Tong W., Levine R.L. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007;356(5):459–68. DOI: 10.1056/NEJMoa065202.
4. Pikman Y., Lee B.H., Mercher T. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006;3(7):e270. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030270.
5. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.

- Blood 2009;114(5):937–51.
DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262.
6. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–90. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347.
 7. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
 8. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
 9. Lippert E., Mansier O., Migeon M. et al. Clinical and biological characterization of patients with low (0.1–2 %) *JAK2V617F* allele burden at diagnosis. *Haematologica* 2014;99(7):98–101. DOI: 10.3324/haematol.2014.107656.
 10. Nussenzweig R.H., Pham H.T., Perkins S.L. et al. Increased frequency of coexisting *JAK2* exon-12 or *MPL* exon-10 mutations in patients with low *JAK2V617F* allelic burden. *Leuk Lymphoma* 2015;57(6):1429–35. DOI: 10.3109/10428194.2015.1091932.
 11. Chauveau A., Nibourel O., Tondeur S. et al. Absence of *CALR* mutations in *JAK2*-negative polycythemia. *Haematologica* 2017;102(1):e15–6. DOI: 10.3324/haematol.2016.154799.
 12. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П. и др. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. Справочник заведующего КДЛ 2016;(5):33–43. [Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P. et al. Experience of using genetic analysis systems based on pyrosequencing technology. *Spravochnik zaveduyushchego KDL = CDL Head Handbook* 2016;(5):33–43. (In Russ.)].
 13. Субботина Т.Н., Харсекина А.Е., Дунаева Е.А. и др. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена *JAK2*. *Лабораторная служба* 2017;6(1):29–33. [Subbotina T.N., Kharsekina A.E., Dunaeva E.A. et al. Heteroduplex analysis and pyrosequencing in the diagnostic algorithm of polycythemia vera associated with *JAK2* exon 12 mutations. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service* 2017;6(1):29–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/labs20176129-33.
 14. Rozovski U., Verstovsek S., Manshour T. et al. An accurate, simple prognostic model consisting of age, *JAK2*, *CALR*, and *MPL* mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica* 2017;102(1):79–84. DOI: 10.3324/haematol.2016.149765.
 15. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
 16. Tefferi A., Lasho T.L., Finke C.M. et al. *CALR* vs *JAK2* vs *MPL*-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472–7. DOI: 10.1038/leu.2014.3.

Вклад авторов

Т.Н. Субботина: разработка дизайна исследования, научное редактирование, утверждение статьи;
 Д.В. Курочкин, И.Е. Маслюкова: получение данных, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание части текста рукописи;
 А.С. Хазиева, Е.В. Васильев, М.А. Михалёв: предоставление материалов для исследования, научное редактирование, утверждение статьи;
 Е.А. Дунаева, К.О. Миронов: получение данных, анализ полученных данных.

Authors' contributions

T.N. Subbotina: research design development, article editing, article approval;
 D.V. Kurochkin, I.E. Maslyukova: obtaining data, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, writing part of the text;
 A.S. Khazieva, E.V. Vasiliev, M.A. Mikhalev: providing research materials, article editing, article approval;
 E.A. Dunaeva, K.O. Mironov: 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>
 Д.В. Курочкин / D.V. Kurochkin: <https://orcid.org/0000-0003-1063-7702>
 И.Е. Маслюкова / I.E. Maslyukova: <https://orcid.org/0000-0003-1323-2612>
 А.С. Хазиева / A.S. Khazieva: <https://orcid.org/0000-0001-7525-6981>
 Е.В. Васильев / E.V. Vasiliev: <https://orcid.org/0000-0003-3780-3758>
 М.А. Михалёв / M.A. Mikhalev: <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>
 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 комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России». Протокол № 10 от 01.02.2017.
 Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia. Protocol No. 10 dated 01.02.2017.
 All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 26.02.2021. **Принята к публикации:** 20.04.2021.

Article submitted: 26.02.2021. **Accepted for publication:** 20.04.2021.