

Сравнение методов фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза для обнаружения мутаций *FLT3-ITD* у пациентов с острым миелоидным лейкозом

И.Е. Маслюкова^{1,2}, Д.В. Курочкин^{1,2}, Е.В. Мартынова³, В.И. Бахтина^{3,4}, Т.Н. Субботина^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; Россия, 660041 Красноярск, Свободный пр-кт, 79;

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

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

⁴ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Контакты: Ирина Евгеньевна Маслюкова lejsmie@gmail.com

Введение. Наличие мутаций *FLT3-ITD* у пациентов с острым миелоидным лейкозом служит маркером плохого прогноза, который включен в перечень для стратификации риска ELN 2017 г. Основным критерием для разделения пациентов на группы по прогнозируемым исходам стало аллельное соотношение (allelic ratio, AR) с границей 0,5: показатель AR <0,5 считается низким, ≥0,5 – высоким. При этом если важность определения AR не вызывает сомнения, то значение информации о длине повтора и локализации все еще остается спорным. Распространены 2 подхода к скринингу *FLT3-ITD*. Первый – более доступный и дешевый метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией, второй – более дорогостоящий и требующий наличия специального оборудования метод фрагментного анализа, позволяющий не только обнаружить мутацию и определить длину повтора, но и провести количественную оценку, т. е. рассчитать AR.

Цель исследования – сравнить методы фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза при поиске мутаций *FLT3-ITD* в образцах ДНК от пациентов с диагнозом острого миелоидного лейкоза.

Материалы и методы. За период 2020–2022 гг. методами фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза были проанализированы образцы крови и/или костного мозга от 45 пациентов с подтвержденным диагнозом острого миелоидного лейкоза, получавших лечение в Краевой клинической больнице г. Красноярска. Подтверждение и идентификацию мутаций *FLT3-ITD* проводили секвенированием по Сэнгеру.

Результаты. Среди 45 пациентов оба метода позволили выявить мутации *FLT3-ITD* у 11 (24,45 %) пациентов. По результатам фрагментного анализа медиана длины повтора составила 42,70 (26,01–99,84) пары оснований, AR – 0,532 (0,027–3,328), уровень аллельной нагрузки (allelic frequency, AF) – 34,71 (2,67–76,90) %. В 1 образце выявлено 3 разных ITD. Секвенирование по Сэнгеру позволило идентифицировать мутации у 9 из 11 пациентов.

Заключение. Фрагментный анализ и ПЦР-электрофорез показали сходные результаты при оценке образцов с разной длиной ITD и разным AR. Можно предполагать, что в случае небольшого размера ITD и низких значений AR и AF при использовании ПЦР-электрофореза мутантный аллель не будет визуализироваться, что может привести к получению ложноотрицательного результата. Недостатком использования метода ПЦР-электрофореза является также то, что без применения специальных программ, позволяющих определить размер и интенсивность свечения полосы, соответствующей мутантному аллелю, нельзя определить значение AR, что важно для стратификации риска острого миелоидного лейкоза. Таким образом, для обнаружения *FLT3-ITD* мы рекомендуем использовать метод фрагментного анализа.

Ключевые слова: фрагментный анализ, ПЦР-электрофорез, *FLT3-ITD*, острый миелоидный лейкоз, секвенирование по Сэнгеру

Для цитирования: Маслюкова И.Е., Курочкин Д.В., Мартынова Е.В. и др. Сравнение методов фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза для обнаружения мутаций *FLT3-ITD* у пациентов с острым миелоидным лейкозом. Онкогематология 2022;17(4):118–25. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-118-125

Comparison of fragment analysis and PCR electrophoresis methods for the detection of *FLT3-ITD* mutations in patients with acute myeloid leukemia

I.E. Maslyukova^{1,2}, D.V. Kurochkin^{1,2}, E.V. Martynova³, V.I. Bakhtina^{3,4}, T.N. Subbotina^{1,2}

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

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

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

⁴Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia

Contacts: Irina Evgen'evna Maslyukova lejsmie@gmail.com

Background. The presence of the *FLT3-ITD* mutations in patients with AML serves as a marker of poor prognosis, which is included in the ELN 2017 risk stratification guideline. The main criterion for dividing patients into groups according to the predicted outcomes was the allelic ratio (AR) with a cutoff of 0.5: an AR value <0.5 is considered low, and ≥0.5 is considered high. At the same time, if the importance of AR determination is beyond doubt, the value of information about the length of the repeat and localization is still controversial. There are two common approaches for *FLT3-ITD* screening. The first, more accessible and cheaper method is the method of PCR electrophoresis and the second, more expensive and requiring special equipment, is the fragment analysis method, which allows not only to detect a mutation and determine the repeat length, but also to quantify or calculate AR.

Aim. To compare fragment analysis and PCR electrophoresis in the search for the *FLT3-ITD* mutations in DNA samples from AML patients.

Materials and methods. For the period of 2020–2022 fragment analysis and PCR electrophoresis were used to analyze blood and/or bone marrow samples taken from 45 patients with a confirmed diagnosis of AML who were treated at the Regional Clinical Hospital (Krasnoyarsk). Confirmation and identification of the *FLT3-ITD* mutations was performed by means of Sanger sequencing.

Results. Both methods revealed the *FLT3-ITD* mutations in 11 (24.45 %) patients among the 45 patients studied. According to the results of fragment analysis, the median repeat length was 42.70 base pairs (range 26.01–99.84 base pairs), AR was 0.532 (0.027–3.328), and the allelic frequency (AF) was 34.71 (2.67–76.90) %. Three different ITDs were identified in one sample. Sanger sequencing identified mutations in 9 of 11 patients.

Conclusion. Fragment analysis and PCR electrophoresis showed similar results when analyzing samples with different ITD lengths and with different allelic ratios. But it can be assumed that in the case of a small ITD and low AR and AF values, when using PCR electrophoresis, the mutant allele will not be visualized, which can lead to a false negative result. The disadvantage of using the PCR electrophoresis method is also that without the use of special programs that allow determining the size and intensity of the band corresponding to the mutant allele, it is impossible to determine the AR value, which is important for AML risk stratification. Thus, for detection of the *FLT3-ITD* we recommend using the fragment analysis method.

Keywords: fragment analysis, PCR electrophoresis, *FLT3-ITD*, acute myeloid leukemia, Sanger sequencing

For citation: Maslyukova I.E., Kurochkin D.V., Martynova E.V. et al. Comparison of fragment analysis and PCR electrophoresis methods for the detection of *FLT3-ITD* mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Onkologematologiya = Oncohematology* 2022;17(4):118–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-118-125

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — гетерогенное злокачественное миелопролиферативное заболевание с активной пролиферацией недифференцированных миелоидных предшественников. Возникновение заболевания обусловлено большим спектром как цитогенетических нарушений, так и генетическими мутациями. Поэтому определение мутационного статуса пациента — обязательный этап диагностики в дебюте ОМЛ. Одними из таких маркеров служат мутации в гене FMS-подобной тирозинкиназы 3 (*FLT3*).

FLT3 принадлежит к семейству рецепторных тирозинкиназ и представляет собой димер, который состоит из 5 иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточных областях, трансмембранного домена, юкстамембранного домена (JM), тирозинкиназного домена (TKD), разделенного на 2 части доменом вставки киназы (обозначенные как TKD1 и TKD2), и С-терминального домена во внутриклеточных областях [1]. В структуре *FLT3* можно выделить 2 «горячие» области, мутации в которых будут приводить к лиганд-независимой активации рецептора, — ингибирующий JM

и каталитический TKD. Мутации наблюдаются в 30–40 % случаев ОМЛ и могут встречаться как при нормальном кариотипе, так и в сочетании с хромосомными перестройками (*t(15;17)/PML-RARA*, *t(6;9)/DEK-NUP214*, *t(5;11)/NUP98-NSD1*, *inv(16)/CBFB-MYH11*) и другими соматическими мутациями (*NPM1*, *DNMT3A*) [2]. Мутации в гене *FLT3* делят на внутренние tandemные повторы (*FLT3-ITD*) в экзонах 14 и 15 и однонуклеотидные замены (*FLT3-TKD*) в экзоне 20.

Мутации *FLT3-ITD* встречаются в 25–30 % всех случаев ОМЛ у взрослых пациентов [3]. Они способствуют активной пролиферации за счет конститутивного фосфорилирования рецептора *FLT3* и одновременно подавляют апоптоз за счет рекрутирования транскрипционных факторов. При мутациях *FLT3-ITD* возникают, как правило, дубликации от 3 до нескольких сотен пар оснований (bp) [4, 5], которые приводят к удлинению JM, нарушая тем самым его аутоингибирование. В ранних исследованиях акцентировали внимание на мутациях *FLT3-ITD* лишь в JM (мотивы JM-B, JM-S, JM-Z и hinge region (шарнирная область)) [6]. F. Breitenbuecher и соавт. в исследовании показали, что

на долю JM приходится только 70 % *FLT3-ITD*, тогда как оставшиеся 30 % располагались в домене TKD1 (beta1-sheet, NBL, beta2-sheet) [7, 8]. *FLT3-ITD* обычно связаны с повышенным количеством лейкоцитов (до гиперлейкоцитоза) и повышенным количеством миелобластов в миелограмме и гемограмме (до тотальной бластемии) [1]. Для *FLT3-ITD*⁺-пациентов характерны высокий риск развития раннего рецидива и снижение общей выживаемости [9]. Во многих исследованиях прослеживается тенденция к увеличению риска рецидива и снижению общей выживаемости с ростом уровня мутантного аллеля *FLT3-ITD* [2, 5, 9]. Более длинные tandemные повторы приводят к снижению общей выживаемости, но в исследованиях редко учитывают локализацию мутации, что, по мнению ряда авторов, напрямую должно влиять на прогноз [5, 6, 9–11]. Различий по влиянию мутаций *FLT3-ITD* в разных фенотипических группах по франко-американо-британской классификации ОМЛ не выявлено [9]. Однако при остром промиелоцитарном лейкозе наблюдается минимальное влияние, что, возможно, связано с t(15;17)/*PML-RARA* [12].

FLT3-ITD служит маркером плохого прогноза, который включен в перечень для стратификации риска ELN 2017 г. [13]. При ОМЛ принято рассчитывать не уровень аллельной нагрузки (allelic frequency, AF), а аллельное соотношение (allelic ratio, AR), равное отношению доли мутантного аллеля к доле аллеля «дикого» типа. Основным критерием для разделения пациентов на группы по прогнозируемым исходам стало AR с границей 0,5. Так, показатель <0,5 считается низким AR, ≥0,5 — высоким AR. Поскольку мутации *FLT3-ITD* часто обнаруживают в сочетании с мутациями в гене *NPM1*, которые, наоборот, положительно влияют на выживаемость и течение заболевания, то пациентов с диагнозом ОМЛ стали делить на 3 группы по прогнозируемым исходам с использованием обоих маркеров. В группу благоприятного риска входят пациенты с мутацией *NPM1* и либо отсутствием *FLT3-ITD*, либо при наличии *FLT3-ITD* с низким AR; в группу промежуточного риска — либо с *NPM1* и *FLT3-ITD* с высоким AR, либо без *NPM1* и *FLT3-ITD* или при наличии *FLT3-ITD* с низким AR; в группу неблагоприятного риска — без мутаций *NPM1* и с наличием *FLT3-ITD* с высоким AR. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток — альтернативный вариант консолидирующей терапии при достижении первой полной ремиссии. Считается, что пациентам группы благоприятного риска не требуется аллогенная трансплантация, тогда как для пациентов групп промежуточного и неблагоприятного риска она рекомендуется, если нет иных противопоказаний. Также при лечении *FLT3-ITD*⁺-пациентов с диагнозом ОМЛ групп промежуточного и неблагоприятного риска к индукционной терапии с 8-го дня рекомендовано добавлять ингибиторы тирозинкиназ (например, мидостаурин) [9]. По этой причине скрининг мутаций *FLT3-ITD* должен быть проведен в течение

2–3 дней с момента постановки диагноза [13]. При этом если важность определения AR не вызывает сомнения, то значение информации о длине tandemного повтора и его локализации все еще остается спорным [14].

В настоящее время для анализа мутаций *FLT3-ITD* исследователи стремятся перейти от более дешевого и доступного скринингового метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией к методу фрагментного анализа, который проводится на специальных приборах и позволяет не только обнаружить мутацию и определить длину повтора, но и провести количественную оценку, т.е. рассчитать AR.

Цель исследования — сравнить методы фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза при поиске мутаций *FLT3-ITD* в образцах ДНК от пациентов с диагнозом ОМЛ.

Материалы и методы

За период 2020–2022 гг. были проанализированы 45 образцов ДНК от пациентов с подтвержденным диагнозом ОМЛ, получавших лечение в Краевой клинической больнице г. Красноярск. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ПК) и/или клеток костного мозга (КМ) с помощью набора реагентов ДНК-Сорб-В (АмплиСенс, Россия).

Для выявления мутаций *FLT3-ITD* методом ПЦР-электрофореза целевой участок амплифицировали с помощью набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии EVA Green (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя. Праймеры, заимствованные из статьи А.У. Тап и соавт. [15], фланкируют участок экзонов 14 и 15 длиной 326 bp, тем самым охватывая все описанные на сегодняшний день варианты tandemных повторов в доменах JM и TKD1 по данным базы COSMIC [16]: прямой праймер — 5'-TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA-3'; обратный праймер — 5'-TTCCATAAGCTGTTGCGTTTCATCAC-3'. В реакцию ПЦР брали 50 нг ДНК. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК пациента без мутаций в анализируемом участке (образец «дикого» типа). ПЦР проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) согласно следующей программе: 3 мин — 95 °C; 35 циклов: 30 с — 95 °C, 40 с — 62 °C, 40 с — 72 °C; 1 цикл финальной элонгации 20 мин — 72 °C. Для контроля наработки ПЦР-продукта считывание плашки производили по каналу FAM на этапе отжига праймеров. Продукты амплификации разделяли в 3 % агарозном геле в течение 1 ч и в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) в течение 2 ч. Соответствие молекулярных весов продуктов амплификации в обоих случаях оценивали с помощью маркера молекулярного веса GeneRuler Low Range DNA Ladder (Applied Biosystems, США) — размер фрагментов от 700 до 25 bp. Результат считали положительным при наличии дополнительной полосы, расположенной выше полосы «дикого» типа длиной 326 bp.

Для выявления и количественной оценки мутаций *FLT3-ITD* методом фрагментного анализа использовали

тот же протокол ПЦР и те же праймеры, что и для проведения ПЦР-электрофореза, но к прямому праймеру на 5'-конце была добавлена флуоресцентная FAM-метка. Каждый образец анализировали в 2 повторах. Далее 0,5 мкл меченых ПЦР-продуктов, предварительно разведенных в 10 раз, смешивали с 0,2 мкл GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, США) и 9,3 мкл Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, США). Приготовленные смеси нагревали в термостате при температуре 95 °C в течение 3 мин и остужали до 4 °C в течение 2 мин. Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США), а обработку результатов фрагментного анализа – в программе GeneMapper® Software (Applied Biosystems, США). Результат считали положительным при наличии дополнительных пиков справа от пика, соответствующего фрагмента «дикого» типа длиной 326 bp. Длину tandemного повтора считали как разность между длиной фрагмента мутантного типа (*FLT3-ITD*) и «дикого» типа (*FLT3-WT*). AR и AF определяли по площади под кривой (AUC) по рекомендуемым формулам: $AR = AUC_{FLT3-ITD} / AUC_{FLT3-WT}$; $AF = AUC_{FLT3-ITD} / (AUC_{FLT3-ITD} + AUC_{FLT3-WT})$ и выражали в процентах. Для образцов с несколькими повторами считался их общий вклад в AR и AF как сумма AUC всех *FLT3-ITD*.

Выявленные мутации *FLT3-ITD* подтверждали и идентифицировали секвенированием по Сэнгеру. Для этого ПЦР-продукты, полученные при использовании того же протокола и тех же праймеров, что и для проведения ПЦР-электрофореза, очищали с помощью

реагента ExoSAP-IT (Applied Biosystems, США). Секвенирующую ПЦР проводили с помощью набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя на приборе Veriti (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирующей ПЦР очищали с помощью набора BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США), а обработку результатов – в программе Sequence Scanner Software (Applied Biosystems, США). В качестве референса использовали последовательность транскрипта NM_004119.3 (NCBI).

Результаты

Среди 45 пациентов оба используемых метода позволили выявить мутации *FLT3-ITD* у 11 (24,45 %) пациентов.

По результатам фрагментного анализа медиана длины повтора составила 42,70 (26,01–99,84) bp, AR – 0,532 (0,027–3,328), AF – 34,71 (2,67–76,90) %.

На рис. 1 представлены результаты анализа мутаций *FLT3-ITD* методом фрагментного анализа для 3 из 11 *FLT3-ITD*⁺-образцов. В образце № 744 были наименьшие в группе значения AR и AF (ниже стандартного порога обнаружения фрагментного анализа) [14]. В образце № 879 были наибольшие в группе значения AR и AF. У 6 из 11 *FLT3-ITD*⁺-пациентов значение AR было $\geq 0,5$, что соответствует плохому прогнозу. Образец № 902 был единственным, в котором выявлено более одного ITD. При этом аллель ITD3 с длиной

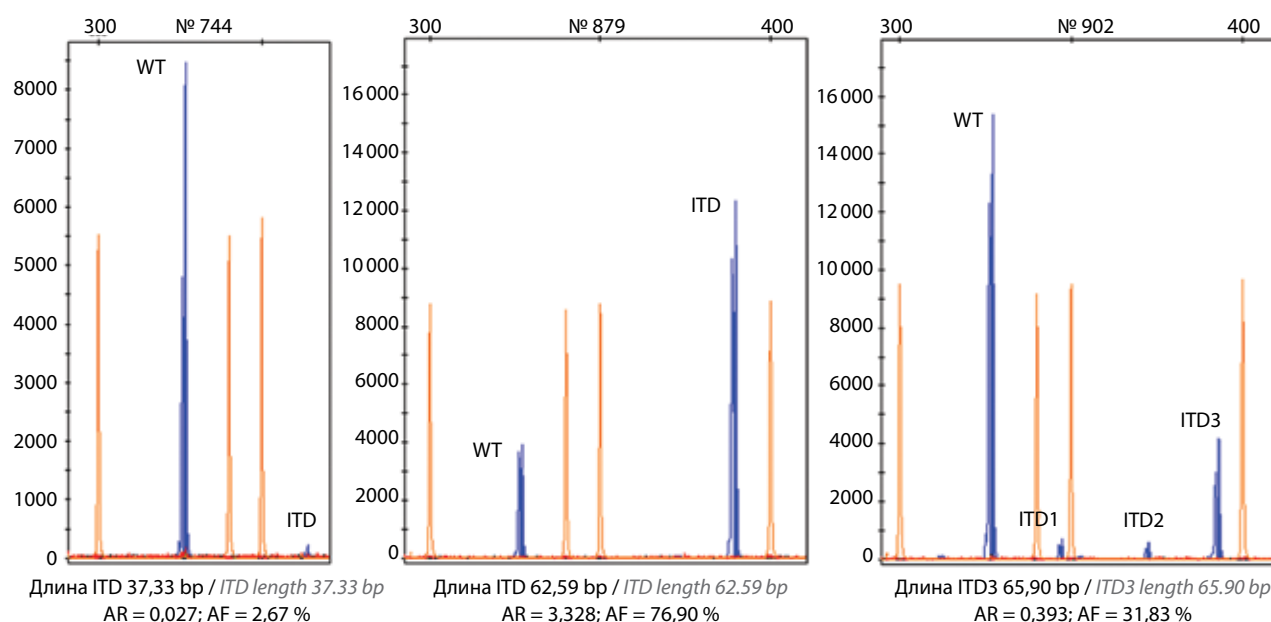


Рис. 1. Результаты анализа мутаций *FLT3-ITD* методом фрагментного анализа. Здесь и на рис. 2: WT – фрагмент «дикого» типа длиной 326 bp; ITD – фрагмент мутантного типа; AR – аллельное соотношение; AF – уровень аллельной нагрузки; bp – пары оснований. Для образца № 902 указаны суммарные значения AR и AF всех 3 мутантных аллелей

Fig. 1. Results of *FLT3-ITD* mutations analysis by means of the fragment analysis. Here and in fig. 2: WT – 326 bp wild type fragment; ITD – mutant type fragment; AR – allelic ratio; AF – allelic frequency; bp – base pairs. For sample No. 902, the total values of AR and AF from all three mutant alleles are indicated

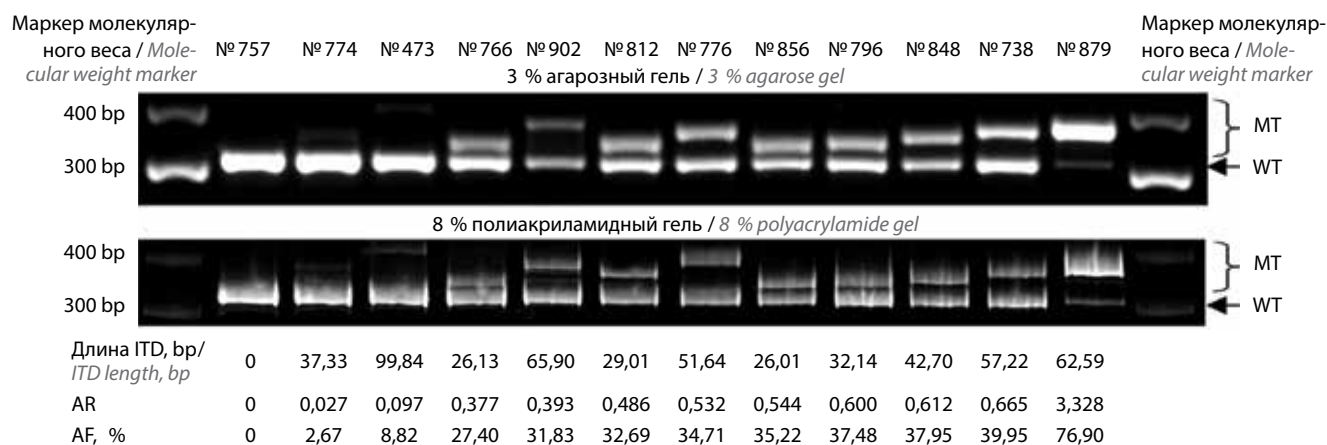


Рис. 2. Результаты анализа мутаций *FLT3-ITD* методом ПЦР-электрофореза и количественные показатели, выявленные методом фрагментного анализа. ПЦР — полимеразная цепная реакция; MT — фрагмент мутантного типа; образец № 757 — контроль WT
Fig. 2. Results of *FLT3-ITD* mutations analysis by means of the PCR electrophoresis and quantitative indicators identified by fragment analysis. PCR — polymerase chain reaction; MT — mutant type fragment; sample No. 757 — WT control

65,90 bp является доминирующим и вносит основной вклад в значения показателей AR и AF (0,305 и 23,35 % соответственно). Два же других аллеля ITD1 (длина 20,16 bp, AR = 0,046 и AF = 4,42 %) и ITD2 (длина 45,52 bp, AR = 0,042 и AF = 4,06 %) вносят незначительный вклад в суммарные значения показателей AR и AF (0,393 и 31,83 % соответственно).

На рис. 2 представлены электрофореграммы результатов анализа всех 11 *FLT3-ITD*⁺-образцов и контрольного образца «дикого» типа методом ПЦР-электрофореза в агарозном геле и ПААГ. Для всех *FLT3-ITD*⁺-образцов при использовании как ПААГ, так и агарозного геля, полосы, соответствующие нормальным и мутантным продуктам, визуализируются. В образцах с низкими значениями AR и AF (№ 774 и № 473) полосы, соответствующие мутантным аллелям, также визуализируются, но интенсивность свечения гораздо слабее, чем в образцах с более высокими значениями AR и AF. Размер ITD в образцах № 774 и № 473 составляет 37,33 и 99,84 bp, чего достаточно для четкого разделения основного и мутантного аллелей и в ПААГ, и в агарозном геле. Однако можно предполагать, что в случае небольшого размера ITD и низких значений AR и AF мутантный аллель не будет визуализироваться, что может привести к получению ложноотрицательного результата. Также недостатком использования метода ПЦР-электрофореза при анализе мутаций *FLT3-ITD* является то, что без использования специальных программ, позволяющих определить размер и интенсивность свечения полосы, соответствующей мутантному аллелю, нельзя определить значение AR. В образце № 902 с 3 дупликациями на электрофореграммах в обоих случаях кроме полосы, соответствующей «дикому» типу, визуализируются также одна широкая полоса (доминирующий ITD3) и одна узкая полоса (не разделившиеся ITD1 и ITD2) фрагментов мутантного типа.

Секвенирование по Сэнгеру позволило идентифицировать мутации у 9 из 11 *FLT3-ITD*⁺-пациентов.

В 2 образцах (№ 774 и № 473) уровень мутантного аллеля был ниже уровня порога обнаружения для данного вида анализа. Все 9 мутаций *FLT3-ITD* располагались в экзоне 14 (рис. 3): 6 из них локализовались в мотиве JM-Z, 1 — в hinge region и 2 — на границе между hinge region и beta1-sheet (между доменами JM и TKD1 соответственно). При мутациях с.1719_1778dup (№ 738, COSV54051798) и с.1801_1802ins (№ 902) дублировался фрагмент, охватывающий мотивы JM-B, JM-S и JM-Z; при с.1778_1779ins (№ 796), с.1761_1785dup (№ 766) и с.1761_1805dup (№ 848) — JM-S и JM-Z; при с.1779_1805dup (№ 856) — JM-Z; при с.1789_1818dup (№ 812, COSV54078758) и с.1827_1828ins (№ 776) — JM-Z и hinge region; при с.1762_1827dup (№ 879) — JM-S, JM-Z и hinge region. В 6 образцах мутация представлена классической для *FLT3-ITD* дупликацией в пределах рамки считывания. В 3 других образцах перед дублированным фрагментом наблюдались от 1 до 16 дополнительных нуклеотидов неизвестной природы, которые вместе с дупликацией не нарушали рамку считывания. Поскольку нет четкой номенклатуры для подобного вида мутаций и выявленные нами 3 мутации не представлены в базах данных COSMIC и NCBI, в нашем исследовании они названы как инсерции.

Длины ITD, рассчитанные по результатам фрагментного анализа, оказались меньше, чем длины по результатам секвенирования по Сэнгеру (медиана разницы 2,30 (0,86–3,41) bp), и не всегда были кратны 3. При этом длины ITD при секвенировании всегда были кратны 3.

Обсуждение

В нашем исследовании помимо показателя AR, который используется для оценки стратификации исхода, присутствует показатель AF, отражающий долю мутантного аллеля среди всех аллелей. Этот показатель рассчитывался по той причине, что порог обнаружения мутантного аллеля при использовании фрагментного

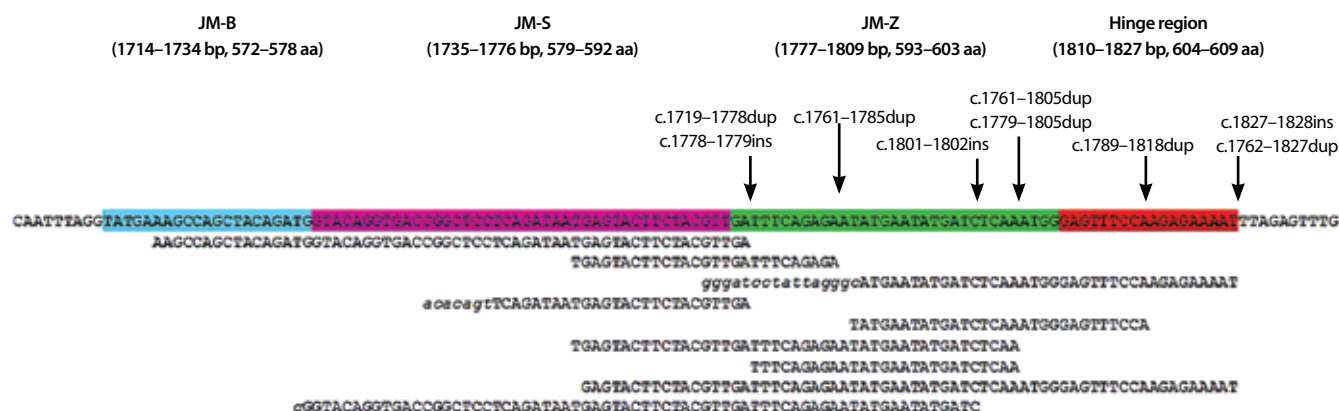


Рис. 3. Расположение выявленных у 9 пациентов мутаций *FLT3-ITD*. Стрелками показаны места вставки ITD на референсной последовательности экзона 14 транскрипта NM_004119.3; цветами выделены последовательности в экзоне 14, кодирующие указанные домены; прописными буквами под референсом показаны последовательности дупликаций, курсивом — дополнительные нуклеотиды неизвестного происхождения в составе ITD

Fig. 3. Location of the *FLT3-ITD* mutations identified in 9 patients. The arrows show the ITD insertion sites on the reference sequence of exon 14 of the NM_004119.3 transcript; sequences in exon 14 encoding the indicated domains are highlighted in colors; capital letters below the reference show sequences of duplications, cursive is used for additional nucleotides of unknown origin in the ITD

анализа отражается уровнем AF и является более привычным и наглядным показателем для исследователей, чем AR.

Как было сказано ранее, оба сравниваемых метода (фрагментный анализ и ПЦР-электрофорез) позволили обнаружить мутации *FLT3-ITD* в ДНК у всех 11 *FLT3-ITD*⁺-пациентов. Секвенированием по Сэнгеру были подтверждены 9 из 11 мутаций. Однако, несмотря на то что в 2 оставшихся образцах № 473 и № 744 секвенирование по Сэнгеру не позволило выявить мутации из-за низкой чувствительности метода, мы все же считаем эти образцы *FLT3-ITD* положительными, поскольку на электрофореграммах при анализе обоими методами в обеих пробах кроме основного продукта визуализируется дополнительный продукт.

М. Sakaguchi и соавт., работая с заклонированными образцами, определили, что для мутаций *FLT3-ITD* порог обнаружения при проведении ПЦР-электрофореза колеблется в диапазоне AR от 0,034 до 0,072 (что эквивалентно AF от 3,3 до 6,7 %), а при проведении фрагментного анализа от AR = 0,017 (эквивалентно AF = 1,7 %) [1]. В соответствии с этим образец № 473 с низкими значениями AR и AF (AR = 0,097 и AF = 8,82 %) может интерпретироваться как положительный по результатам и ПЦР-электрофореза, и фрагментного анализа. Образец № 774 с еще более низкими значениями AR и AF (AR = 0,027 и AF = 2,67 %) может интерпретироваться как положительный только по результатам фрагментного анализа, но не ПЦР-электрофореза. Также можно предполагать, что на уровень порога обнаружения при использовании ПЦР-электрофореза может влиять и размер ITD, т.е. чем меньше размер вставки, тем меньше вероятность визуализировать мутантный аллель. При использовании же фрагментного анализа такой проблемы нет.

Медиана тандемного повтора в нашем исследовании (42,70 bp) близка к данным других исследовате-

ских групп (диапазон 39–51 bp) [5, 6, 10]. S. Schnittger и соавт. показали, что в 50 % случаев длина ITD составляла 24–60 bp [5]. Обнаруженные нами мутации *FLT3-ITD* располагались в мотиве JM-Z и hinge region, что также соответствует данным литературы [17]. Мутации в этом мотиве могут приводить как к смещению положения JM-S относительно TKD2 и, соответственно, к неправильной ориентации мотива JM-B между TKD1 и TKD2, открывая доступ к петле активации, так и к нарушению взаимодействия JM-Z и TKD1. С учетом того что длины мотивов JM-B, JM-S и JM-Z составляют всего 7, 14 и 11 аминокислотных остатков соответственно, подавляющее большинство ITD будут дублировать фрагменты ДНК из нескольких разных мотивов, что, в свою очередь, объясняет прогностическую значимость размера ITD [6]. В нашем случае лишь 1 из 9 идентифицированных мутаций остается в пределах 1 мотива (с.1779_1805dup, которая не представлена в базах данных COSMIC и NCBI). В исследовании S. B. Liu и соавт. обсуждается, что дупликации размером менее 15 bp (менее 5 аминокислотных остатков) не будут нарушать аутоингибирующую конформацию JM [10]. На наш взгляд, такое предположение несколько сомнительно, поскольку небольшие дупликации также могут затрагивать основные сайты фосфорилирования в JM и, соответственно, влиять на аутоингибирующую конформацию JM. В нашем исследовании не выявлено ITD с размером менее 15 bp.

Как и в нашем случае, в ряде исследований [5, 6] также среди *FLT3-ITD*⁺-образцов при секвенировании по Сэнгеру наряду с классическими дупликациями находили дупликации, перед которыми присутствовали от одного до нескольких десятков дополнительных нуклеотидов неизвестного происхождения, причем такие мутации не нарушали рамку считывания.

В нашем исследовании в 1 из 11 образцов выявлено присутствие 3 тандемных повторов одновременно,

1 из которых является доминирующим. Позже нами был выявлен еще один *FLT3-ITD*⁺-пациент с двумя ITD (ITD1: длина повтора 23,30 bp, AR = 0,326, AF = 24,57 %; ITD2: длина повтора 31,81 bp, AR = 0,357, AF = 26,30 %; суммарное AR = 0,683 и AF = 50,87 %). Поскольку разница в длине ITD фрагментов в данном случае небольшая, то при использовании ПЦР-электрофореза оказалось сложным определить количество ITD. Присутствие 2 и более ITD встречается в 20–25 % всех *FLT3-ITD*⁺-случаев, но значимой корреляции числа ITD с клиническим исходом не наблюдалось [6, 9].

Мутации *FLT3-ITD* возникают в бластных клетках, поэтому при скрининге важно преимущественно анализировать ДНК из КМ, тем самым повышая шанс выявления мутации и снижая риск получить ложно-отрицательный результат [12], однако не всегда это возможно. Тогда используют ПК, но с осторожностью при низком содержании бластных клеток в крови. М. Sakaguchi и соавт. приводят пример, когда мутация *FLT3-ITD* выявлялась методом ПЦР-электрофореза только в образце КМ и не обнаруживалась в образце ПК, при этом количество бластных клеток в крови было вдвое меньше, чем в КМ [1]. В нашем исследовании у 2 пациентов, у которых были доступны для исследования и КМ, и ПК, AR и AF оказались выше в образцах КМ: в первом образце разница AR составила 0,045, AF – 1,79 %, во втором AR – 0,175, AF – 6,51 %. В обоих случаях AR было $\geq 0,5$ как в образцах КМ, так и в образцах ПК.

При скрининге *FLT3-ITD* методом ПЦР-электрофореза удалось обнаружить мутации во всех анализируемых 11 образцах с разной длиной ITD (диапазон 26,01–99,84 bp) и с разным AR (диапазон 0,027–3,328). При этом образец с минимальным уровнем AR имел размер ITD 37,33 bp. Можно предположить, что данный метод не сможет выявить ITD-мутации при размере tandemного повтора менее 20 bp. Метод фрагментного анализа позволил не только выявить мутации *FLT3-ITD*, но и определить AR, AF и длину ITD.

В нашем исследовании, как и в других [14, 18], наблюдались расхождения между длинами ITD по данным фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру. К. I. Mills и соавт. связывают эти различия с особенностями оценки длины на основе максимумов пиков [18]. Также к возможным проблемам при интерпретации относят задвоение пиков (пики «заикания») [14]. Это объясняется свойством коммерческой полимеразы присоединять к 3'-концу ампликона дополнительный аденин. В пробе образуются 2 фракции ПЦР-продуктов с разницей по длине в один нуклеотид, чего можно избежать, увеличив время финальной элонгации. Таким образом, при равных временных затратах на выполнение обеих технологий и с учетом требований, предъявляемых к срочности получения результатов, мы склоняемся к использованию фрагментного анализа для обнаружения мутаций *FLT3-ITD* из-за возможности определения AR и длины ITD, которые коррелируют с клиническим исходом.

Заключение

В данной работе проведено сравнение использования методов фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза для обнаружения мутаций *FLT3-ITD* на ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ. Обе используемые технологии показали сходные результаты при анализе образцов с разной длиной ITD и разным AR. Однако можно предполагать, что при небольшом размере ITD и низких значениях AR и AF в случае использования ПЦР-электрофореза мутантный аллель не будет визуализироваться, что может привести к получению ложноотрицательного результата. Недостатком использования метода ПЦР-электрофореза при анализе мутаций *FLT3-ITD* является также то, что без использования специальных программ, позволяющих определить размер и интенсивность свечения полосы, соответствующей мутантному аллелю, нельзя определить значение AR, что важно для стратификации риска ОМЛ. Таким образом, для обнаружения *FLT3-ITD* мы рекомендуем использовать метод фрагментного анализа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sakaguchi M., Nakajima N., Yamaguchi H. et al. The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep* 2020;13:100198. DOI: 10.1016/j.lrr.2020.100198
2. Grimwade D., Ivey A., Huntly B.J. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016;127(1):29–41. DOI: 10.1182/blood-2015-07-604496
3. Mead A.J., Linch D.C., Hills R.K. et al. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;110(4):1262–70. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015826
4. Chang P., Kang M., Xiao A. et al. FLT3 mutation incidence and timing of origin in a population case series of pediatric leukemia. *BMC Cancer* 2010;10:513. DOI: 10.1186/1471-2407-10-513
5. Schnittger S., Bacher U., Haferlach C. et al. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13–15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;(10):910–24. DOI: 10.1002/gcc.21975
6. Meshinchi S., Stirewalt D.L., Alonzo T.A. et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008;111(10):4930–3. DOI: 10.1182/blood-2008-01-117770
7. Breitenbuecher F., Schnittger S., Grundler R. et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane

- domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* 2009;113(17):4074–7. DOI: 10.1182/blood-2007-11-125476
8. Kayser S., Schlenk R.F., Londono M.C. et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009;114(12):2386–92. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209999
 9. Gale R.E., Green C., Allen C. et al. Linch; on behalf of the Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party, The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111(5):2776–84. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109090
 10. Liu S.B., Dong H.J., Bao X.B. et al. Impact of FLT3-ITD length on prognosis of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019;104(1):e9–12. DOI: 10.3324/haematol.2018.191809
 11. Stirewalt D.L., Kopecky K.J., Meshinchi S. et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107(9):3724–6. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3453
 12. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:220–6. DOI: 10.1182/asheducation-2013.1.220
 13. Döhner H., Estey E., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196
 14. Shires K., Shankland I., Gerdener T. et al. FLT3 ITD detection: a closer look at the options. *Med Technol SA* 2011;25:39–46.
 15. Tan A.Y., Westerman D.A., Carney D.A. et al. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 – internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2008;1:10. DOI: 10.1186/1756-8722-1-10
 16. Tate J.G., Bamford S., Jubb H.C. et al. COSMIC: the Catalogue of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research* 2019;47(D1):D941–7. DOI: 10.1093/nar/gky1015
 17. Griffith J., Black J., Faerman C. et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004;13(2):169–78. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00505-7
 18. Mills K.I., Gilkes A.F., Walsh V. et al. Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. *Br J Haematol* 2005;130(2):203–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05589.x

Вклад авторов

И.Е. Маслокова: разработка дизайна исследования, получение данных, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

Д.В. Курочкин: получение данных, анализ полученных данных;

Е.В. Мартынова: предоставление материалов для исследования, анализ полученных данных;

В.И. Бахтина, Т.Н. Субботина: разработка дизайна исследования, научное редактирование, утверждение статьи.

Authors' contributions

I.E. Maslyukova: research design development, obtaining data, analysis of the obtained data, review of publications of the article topic, article writing;

D.V. Kurochkin: obtaining data, analysis of the obtained data;

E.V. Martynova: providing materials for research, analysis of the obtained data;

V.I. Bakhtina, T.N. Subbotina: research design development, article editing, article approval.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Е. Маслокова / I.E. Maslyukova: <https://orcid.org/0000-0003-1323-2612>

Д.В. Курочкин / D.V. Kurochkin: <https://orcid.org/0000-0003-1063-7702>

Е.В. Мартынова / E.V. Martynova: <https://orcid.org/0000-0002-2504-7265>

В.И. Бахтина / V.I. Bakhtina: <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>

Т.Н. Субботина / T.N. Subbotina: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. 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». 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 Local Ethics Committee of Federal Siberian Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency. Protocol No. 10 dated 01.02.2017.

All patients gave written informed consent to participate in the study.