

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского
кафедра генетики

Кулаева Елизавета Дмитриевна

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ В
ГЕНАХ *DNMT3A* И *ASXL1* ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОМ
СИНДРОМЕ И ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
по направлению 06.03.01 Биология**

**Научный руководитель
профессор кафедры генетики
Академии биологии и биотехнологии Д.И. Ивановского, д.б.н.
Машкина Елена Владимировна**

Ростов-на-Дону – 2021

РЕФЕРАТ

Объем работы - 59 страниц, 10 рисунков, 20 таблиц, 67 использованных источников.

МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИЙ СИНДРОМ, ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ОНКОГЕНЕТИКА, *ASXL1*, *DNMT3A*

Целью исследования является определение частот мутаций R882H в гене *DNMT3A* и с.1934dupG в гене *ASXL1* соответственно в образцах периферической крови пациентов с МДС и ОМЛ.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, полученные из периферической крови от 62 пациентов, которым в период с сентября 2019 по декабрь 2020 года поставили диагноз в клинике Ростовского государственного медицинского университета и городской больнице №7 г. Ростова-на-Дону. Пациенты были разделены на группы в зависимости от поставленного диагноза – острый миелоидный лейкоз и миелодиспластический синдром.

Для выделения ДНК из периферической крови использовали набор реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-1» (Синтол, Россия). Полимеразную цепную реакцию для амплификации фрагментов генов *DNMT3A* и *ASXL1* осуществляли с использованием мастер-микса «БиоМастер LR HS-ПЦР (2x) для амплификации длинных (до 30 кб) и сложных фрагментов ДНК». Рестриктию продукта амплификации фрагмента гена *DNMT3A* проводили с помощью рестриктазы Fsp4HI (Сибэнзим, Россия). Разделение продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального гель-электрофореза в 2,5 % агарозном геле. Анализ электрофореграмм проводили в гель-документирующей системе ChemiDoc MP (BioRad, США).

В ходе исследования не было обнаружено мутации R882H ни у одного из пациентов из исследуемых групп. Были получены различающиеся на уровне тенденции частоты мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* у пациентов с диагностированным ОМЛ и МДС (80,65 %; 58,06 %; $p = 0,054$). Также в работе было установлено, что мутация с.1934dupG статистически значимо связана с

повышенным риском наличия бластов в периферической крови у пациентов с острым миелоидным лейкозом (отношение шансов 7.33 (1.16-41.00), $p = 0.03$).

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ОГЛАВЛЕНИЕ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Миелодиспластический синдром и острый миелоидный лейкоз	8
1.2 Мутационный ландшафт миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза	11
1.3 ДНК-метилтрансфераза 3А и её роль в развитии миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза	15
1.4 Ген <i>ASXL1</i> и его роль в миелодиспластическом синдроме и остром миелоидном лейкозе	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Материал для исследования.....	23
2.2 Выделение ДНК	24
2.3 Полимеразная цепная реакция для амплификации целевого участка гена <i>DNMT3A</i>	26
2.4 Рестрикционный анализ для детекции мутации R882H в <i>DNMT3A</i>	30
2.5 Электрофорез продуктов рестрикции	31
2.6 Анализ эффективности амплификации для обнаружения мутации с.1934dupG в гене <i>ASXL1</i> : подготовка контролей	32
2.7 Полимеразная цепная реакция в реальном времени для обнаружения мутации <i>ASXL1</i> с.1934dupG	33
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Детекция мутации R882H в гене <i>DNMT3A</i>	36
3.2 Дополнительные результаты рестрикционного анализа <i>DNMT3A</i>	36
3.3 Детекция мутации с.1934dupG в гене <i>ASXL1</i>	38
3.4 Влияние мутации с.1934dupG в <i>ASXL1</i> у пациентов с миелодиспластическим синдромом на выживаемость и клинически значимые показатели	40

3.5 Мутация с.1934dupG в <i>ASXL1</i> у пациентов с острым миелоидным лейкозом и её влияние на выживаемость, ремиссию и клинически значимые показатели	45
ВЫВОДЫ.....	49
БЛАГОДАРНОСТИ.....	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	51

ВВЕДЕНИЕ

В 2021 году, согласно данным, предоставленным Центром экспертизы и контроля качества медицинской помощи, в России на оплату молекулярно-генетических исследований при онкологических заболеваниях, заложено более 2 млрд рублей (<https://rosmedex.ru/oplata-molekulyarno-geneticheskix-testov/>), но одной из проблем такого типа исследований является недостаточная представленность данных по связи частот мутаций, выживаемости пациентов и значений клинически значимых показателей. Этот тезис справедлив и для гематоонкологических заболеваний, таких как миелодиспластический синдром (МДС) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Для данных заболеваний существует перекрывающееся множество часто мутирующих генов, среди которых присутствуют гены, ответственные за эпигенетическую регуляцию: *DNMT3A*, кодирующий субъединицу А ДНК-метилтрансферазы 3, и *ASXL1*, кодирующий одноименный белок, регулирующий процессы транскрипции и эпигенетической регуляции в комплексе с белками Polycomb. В данных генах при указанных выше заболеваниях наблюдаются частые мутации – R882H и c.1934dupG соответственно (Martín et al, 2017, Montes-Moreno et al., 2018), и существует ряд работ, рассматривающих значимость этих мутаций в прогностическом ключе отдельно друг от друга (Walter et al., 2011; Thol et al., 2011, Montes-Moreno et al., 2018), но не предполагающих возможного совместного действия данных мутаций на выживаемость или клинически значимые показатели, характеризующие тяжесть течения заболевания и/или прогноз. Таким образом, исследование частоты мутаций в генах *DNMT3A* и *ASXL1* при МДС и ОМЛ является актуальным для определения значимости указанных соматических мутаций, влияющих на развитие заболевания, а также для создания молекулярно-генетической системы оценки тяжести МДС и ОМЛ в дополнение к существующим шкалам оценки. Также частота данных мутаций не была проанализирована у пациентов Ростовской области.

В данной работе впервые будут совокупно проанализированы и сравнены частоты мутаций R882H в *DNMT3A* и с.1934dupG в *ASXL1* (в частности, с использованием метода оценки эффективности амплификации 8G- и 9G-праймеров) у пациентов Ростовской области с МДС и ОМЛ.

Целью исследования является определение частот мутаций R882H в гене *DNMT3A* и с.1934dupG в гене *ASXL1* соответственно в образцах периферической крови пациентов с МДС и ОМЛ.

В задачи исследования входило:

1. Выделение ДНК из образцов периферической крови от 31 пациента с МДС и 31 пациента с ОМЛ;
2. Идентификация мутации R882H в гене *DNMT3A* с помощью ПЦР и рестрикционного анализа;
3. Идентификация мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* с помощью сравнительного анализа эффективности амплификации матрицы при проведении количественной ПЦР в реальном времени;
4. Установление частоты мутаций в указанных выше генах и оценка их влияния на выживаемость и клинически значимые показатели.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Миелодиспластический синдром и острый миелоидный лейкоз

Миелодиспластический синдром (МДС) – это группа миелоидных новообразований, возникающих вследствие воздействия повреждающих факторов на гемопоэтические стволовые клетки. Синдром характеризуется цитопенией (дефицитом одного или нескольких типов клеток крови), дисплазией костного мозга, кариотипическими аномалиями и клональной нестабильностью с тенденцией к прогрессированию в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), а также очень редко в острый лимфобластный лейкоз (De Kouchkovsky et al., 2016; Mohammad, 2018). Клетка, положившая начало заболеванию, находится в компартменте гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников гемопоэза. Клоны пораженной клетки могут в течение нескольких лет накапливаться в костном мозге в результате сложного взаимодействия между генетическими и эпигенетическими изменениями, микроокружением клеток костного мозга и иммунной системой, а затем выходить в периферическую кровь и обнаруживаться в ней (De Kouchkovsky et al., 2016).

Согласно рекомендации Международной рабочей группы (IWG) главными критериями МДС считаются: стабильная цитопения, дисплазия и исключение других потенциальных расстройств как основной причины дисплазии или цитопении или того и другого (Hamid et al., 2019).

В последние 20 лет были предложены различные системы классификации МДС для прогностической оценки. Франко-американо-британская классификация (FAB) была рекомендована вначале и модифицирована Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). В системе классификации ВОЗ используется процентное соотношение бластов в костном мозге, кольцевых сидеробластов и диспластических изменений для дифференциации подтипов МДС. Международная расширенная прогностическая система оценки (IPSS-R) основана на многовариантной оценке прогноза (Hamid et al., 2019), которая рассчитывается, исходя из

содержания гемоглобина, количества нейтрофилов, тромбоцитов, процента blasts и оценки цитогенетических нарушений (<https://www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator/>).

В основном МДС поражает людей после 40 лет, расчетная заболеваемость МДС возрастает с возрастом от 0,7 на 100 000 населения в возрасте 60 лет до 20.8-36.3 на 100 тыс. после возраста 70 лет, а общая заболеваемость составляет около 4,9 на 100 тыс. человек в год по данным Surveillance, Epidemiology & End Reports (SEER) в 2017 (Ma, 2012; Mohammad, 2018). Стоит также отметить, что частота встречаемости МДС в 1,7 раз выше среди мужчин (van Spronsen et al., 2019). МДС редко встречается в возрасте до 40 лет, согласно данным SEER (2017), предполагаемая заболеваемость увеличивается с возрастом с повышением риска в 5 раз между 60 и 80 годами (Mohammad, 2018).

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является наиболее распространенным острым лейкозом взрослых, на него приходится ~ 80% случаев в этой группе пациентов. Тем не менее, ОМЛ в целом встречается довольно редко, составляя лишь около 1 % всех онкологических заболеваний (<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html#:~:text=AML%20is%20slightly%20more%20common,Rates%20for%20Acute%20Myeloid%20Leukemia>).

Независимо от этиологии, патогенетическая картина ОМЛ всегда включает в себя аномальную пролиферацию и дифференцировку клональной популяции миелоидных стволовых клеток. В основном это связывают с явлением хромосомных транслокаций (например, t (8:21) *CBF-AML*), которые приводят к трансляции слитых белков (RUNX1-RUNX1T1), которые изменяют нормальный процесс созревания миелоидных клеток-предшественников. Помимо крупных хромосомных перестроек, в развитие ОМЛ также вовлечены небольшие в п.н. генетические изменения (вставки, небольшие инсерции и делеции), которые наблюдаются при ОМЛ в 97% случаев даже без крупных транслокаций – такой ОМЛ называется

«цитогенетически нормальным» (De Kouchkovsky et al., 2016; Saultz et al., 2016). Больные с такой категорией ОМЛ имеют средний риск рецидива, но у них обнаруживается значительная неоднородность с точки зрения клинических исходов. Молекулярный скрининг биоматериала от больных с этой категорией ОМЛ имеет большое значение для категоризации прогноза и стратегии лечения (Saultz et al., 2016).

Критерий ОМЛ, установленный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2016 г. - не менее 20 % миелобластов в костном мозге (или крови) с миелоидным происхождением, установленным с помощью многопараметрической проточной цитометрии. Исключениями из критерия ≥ 20 % являются случаи ОМЛ с хромосомными транслокациями, мутациями в *NPM1* или наличие промиелоцитов - в данных случаях диагноз не зависит от процента бластов (Estey, 2018).

Примерно у 35-40 % пациентов моложе 60 лет ОМЛ поддается лечению, но для тех, кому больше 60 лет, прогноз резко ухудшается (Saultz et al., 2016). По данным Американского общества клинической онкологии (ASCO) 5-летняя выживаемость людей с ОМЛ младше 20 лет составляет 67 %, а старше – около 25 % (<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html>). ОМЛ обычно является заболеванием пожилых людей и редко встречается в возрасте до 45 лет. Медиана возраста для ОМЛ составляет около 68 лет, но заболевание может встречаться и у детей. ОМЛ незначительно чаще встречается среди мужчин, чем среди женщин, но средний риск заболеть ОМЛ в течение жизни у представителей обоих полов составляет около $\frac{1}{2}$ от 1 % (<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html#:~:text=AML%20is%20slightly%20more%20common,Rates%20for%20Acute%20Myeloid%20Leukemia>).

В среднем у 30 % пациентов МДС в конечном итоге прогрессирует до ОМЛ, диагностированному по увеличению количества бластов до ≥ 20 % от общего количества ядерных клеток в костном мозге. Такой ОМЛ обычно

называют вторичным по отношению к МДС. Вторичный ОМЛ составляет 25 %-35 % от общего числа случаев, причем большая его часть (60 % - 80 %) связана с предшествующим МДС. Пациенты с МДС, у которых развивается вторичный ОМЛ, обычно имеют более низкие показатели полной ремиссии и отсутствия рецидивов и выживаемости по сравнению с ОМЛ *de novo* (Menssen et al., 2020).

1.2 Мутационный ландшафт миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза

При МДС могут мутировать более 100 генов, из которых мутируют более чем в 10% случаев следующие гены: *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1* и *DNMT3A*. Похожее количество генов мутирует и при ОМЛ, хотя некоторые с более высокой частотой 20-30 % (Caronetti et al., 2020). В таблице 1 приведены основные гены, мутирующие при МДС с частотой более чем 5 %.

Таблица 1 - Функциональные категории генов, которые часто подвергаются мутациям при МДС (обобщение таблицы из (Caronetti et al., 2020))

Категория	Гены	Роль в МДС
Факторы сплайсинга	<i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>U2AF1</i>	Создание паттернов aberrантного сплайсинга, подавление экспрессии некоторых митохондриальных генов и участие в процессе образования кольцевых сидеробластов, общее нарушение сплайсинга как процесса.

Продолжение Таблицы 1

Категория	Гены	Роль в МДС
Эпигенетические регуляторы	<i>TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, BCOR, BCORL1, IDH1/2</i>	Глобальное гипометилирование и локальное гиперметилирование путем снижения уровня 5-hmC, нарушение процесса модификации хроматина и подавление функции цитохром с-оксидазы.
Когезиновый комплекс	<i>STAG2, RAD21, SMC3, SMC1A</i>	Изменение степени доступности хроматина для матричных процессов, нарушенная модуляция архитектуры хроматина.
Факторы транскрипции и опухолевые супрессоры	<i>RUNX1, TP53, PHF6, NPM1</i>	Потеря функции, усиление повреждений ДНК и неспособность контролировать протоонкогены.
Сигнальные пути	<i>HPAC, KPAC, JAK2, FLT3</i>	Усиление функции и предоставление пролиферативного преимущества опухолевым клеткам.

Более 95 % пациентов с ОМЛ имеют в геноме те или иные мутации независимо от наличия крупных цитогенетических нарушений. Соматические мутации, которые предположительно играют роль в патогенезе ОМЛ, классифицируются на семь категорий в соответствии с их биологической функцией, включая мутации, которые связаны с генами факторов

транскрипции, *NPM1* (нуклеофозмином), опухолевыми супрессорами, генами сигнальных путей, метилированием ДНК, модификациями хроматина, когезиновым комплексом и факторами сплайсинга (таблица 2) (Hou et al., 2020).

Таблица 2 - Функциональные категории генов, которые часто подвергаются мутациям при ОМЛ (из (Hou et al., 2020))

Категория	Гены	Роль в ОМЛ
Факторы транскрипции	Слияние генов факторов транскрипции посредством хромосомных перестроек, таких как t (8; 21) (q22; q22); <i>RUNX1 - RUNX1T1</i> и inv (16) (p13.1q22) или t (16; 16) (p13.1; q22); <i>CBFB-MYH1</i> , <i>GATA2</i> , <i>RUNX1</i> и <i>CEBPA</i>	Нарушение регуляции транскрипции и гемопоэтической дифференцировки
Нуклеофозмин	<i>NPM1</i>	Аберрантная цитоплазматическая локализация <i>NPM1</i> и взаимодействующих с ним белков
Гены-супрессоры опухолей	<i>TP53</i> , <i>WT1</i> , <i>PHF6</i>	Нарушение регуляции транскрипции и деградации протоонкогенов
Сигнальные пути	<i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RAS</i> , <i>JAK2</i>	Обеспечение опухолевым клеткам преимущества в пролиферации за счёт активации сигнальных путей <i>RAS-RAF</i> , <i>JAK-STAT</i> и <i>PI3K-AKT</i>

Продолжение Таблицы 2

Категория	Гены	Роль в ОМЛ
Модификации хроматина	<i>ASXL1, EZH2, KMT2A</i>	Нарушение регуляции модификации хроматина и функции метилтрансфераз
Метилирование ДНК	<i>DNMT3A, TET2, IDH1/2</i>	Нарушение регуляции метилирования ДНК и продукции онкометаболитов
Когезиновый комплекс	<i>STAG1, STAG2, RAD21, SMC1A, SMC3</i>	Нарушение обособления хромосом и регуляции транскрипции
Факторы сплайсинга	<i>SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2</i>	Нарушение нормального процесса сплайсинга и создание его aberrантных паттернов

Хромосомные аномалии, инверсии и транслокации часто встречаются при МДС и вторичном ОМЛ. Имеется много общих цитогенетических аномалий между МДС и вторичным ОМЛ, такие как del5q, del7q, del20q и другие. Фактически, существует набор цитогенетических аномалий, связанных с МДС, которые также считаются диагностически важными для ОМЛ (Le Beau et al., 1996; Haase, 2008).

Крупномасштабные исследования с использованием секвенирования нового поколения выявили мутации в генах не менее шести основных клеточных путей, общих для МДС и вторичного ОМЛ: сплайсинг, эпигенетическая модификация, регуляция транскрипции, сигнальные каскады, когезины и *TP53* (Walter et al., 2013; Papaemmanuil et al., 2013; Saez et al., 2017).

Несмотря на то, что гены, мутирующие при МДС и вторичном ОМЛ, в значительной степени совпадают, частота генных мутаций часто различается между МДС и вторичным ОМЛ: мутации в эпигенетических модификаторах

(например, *TET2*, *DNMT3A*) а также *TP53* распространены среди множества клональных гемопоэтических заболеваний (клональный гемопоэз неопределенного потенциала, МДС, вторичный и *de novo* ОМЛ), а мутации факторов транскрипции генов сигнальных каскадов чаще встречаются при вторичном ОМЛ. Всё это позволяет предполагать, что МДС и ОМЛ делят общий начальный мутационный ландшафт, и новые мутации приобретаются в процессе прогрессирования заболевания из МДС в ОМЛ в генетически расходящихся линиях опухолевых бластов (Sperling et al., 2017), что можно заметить также из рисунка 1, приведенного ниже.

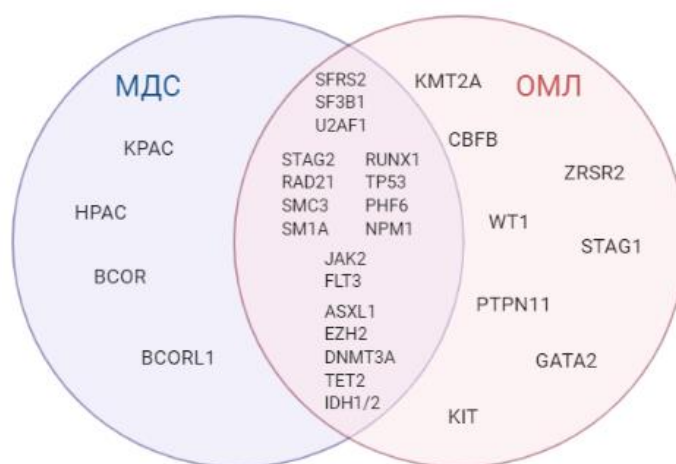


Рисунок 1 - Общность мутационного ландшафта для МДС и ОМЛ

1.3 ДНК-метилтрансфераза 3А и её роль в развитии миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза

ДНК-метилтрансфераза 3А (*DNMT3A*) – белок массой 130 кДа, кодирующийся геном из 23 экзонов на 2 хромосоме человека. У *DNMT3A* существует 2 изоформы: более длинная *DNMT3A1* и укороченная *DNMT3A2*, которая была обнаружена в эмбриональных стволовых клетках (ESCs) и тканях раннего эмбриона. Доменная структура *DNMT3A* млекопитающих, включает в себя регуляторную N-концевую часть, состоящую из доменов PWWP и ADD, которые способствуют ядерной локализации фермента, его нацеливанию на хроматин и взаимодействию с аллостерическими

регуляторами, и высококонсервативного С-концевого домена, который в основном участвует в связывании фермента с ДНК и катализе метилирования 5'-цитозина в CpG-динуклеотидах, используя S-аденозилметионин в качестве донора метильной группы (Venugopal et al., 2020). Для выполнения своей функции DNMT3A олигомеризуется или формирует с другими DNMT3 большие мультимерные комплексы белок/ДНК, которые необходимы для эффективного катализа (Rajavelu et al., 2012). Наиболее частым является гетеротетрамерный комплекс, состоящий из гомодимера DNMT3A, связанного с помощью двух некаталитических субъединиц DNMT3L в структуру типа 3L-3A-3A-3L (Jurkowska et al., 2011). Два мономера DNMT3A кометируют два соседних CpG-сайта, разделенных 14 п.н. в пределах одного и того же ДНК-дуплекса (Zhang et al., 2018).

В норме DNMT3A осуществляет метилирование ДНК *de novo* как в уникальных последовательностях, так и в повторяющихся элементах, а также метилирует линкерную ДНК между нуклеосомами (Yang et al., 2015). Данный ген экспрессируется как в костном мозге, так и в клетках периферической крови (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1788>).

DNMT3A является одним из наиболее часто мутирующих генов при гематологических опухолях у взрослых (Sun et al., 2017). Соматические мутации в *DNMT3A* распределены по всей площади открытой рамки считывания и могут представлять собой миссенс-мутации, нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания и специфические точковые мутации, которые приводят к замене аргинина в положении 882 (R882) в основном на гистидин (Venugopal et al., 2020).

Мутации в *DNMT3A*, как правило, являются ранним событием в развитии гематологических опухолей, которое часто требует дополнительных мутаций в других генах. Тем не менее, мутации в *DNMT3A* были обнаружены примерно у 20 % пациентов с *de novo* и вторичным ОМЛ (Sun et al., 2017) и определены как негативный прогностический фактор при оценке выживаемости (Shivarov et al., 2013). В России мутации *DNMT3A* исследовали

у больных ОМЛ с помощью прямого автоматического секвенирования, частота мутаций составила 7,1 % (Виноградов и др., 2018).

Помимо ОМЛ, мутации в *DNMT3A* также были зарегистрированы при других миелоидных злокачественных новообразованиях, таких как МДС и МПН (миелопролиферативное новообразование), хотя их распространенность в этих случаях намного ниже, чем при ОМЛ. Кроме того, мутации в *DNMT3A* также неоднократно обнаруживались при лимфоидных злокачественных новообразованиях (Sun et al., 2017).

Связь мутаций в *DNMT3A* с онкогенезом в гематологических новообразованиях неоднозначна: предполагается, что мутации (в частности, R882) снижают активность белка, что приводит к глобальному гипометилированию в области CpG-островков и их «берегов» в промоторных и регуляторных областях множества генов, в том числе и протоонкогенов, что может приводить к активации их экспрессии, но эта концепция не представляет собой явный механизм влияния *DNMT3A* на онкогенез (Yang et al., 2015).

Что касается непосредственно МДС, факт влияния мутаций в *DNMT3A* на прогноз остается дискуссионным: существуют исследования, где мутации в данном гене коррелируют с более низкой выживаемостью и высокой скоростью трансформации в ОМЛ (Walter et al., 2011; Thol et al., 2011), но есть и работы, которые не нашли такой связи (Papaemmanuil et al., 2013; Bejar et al., 2012; Roller et al., 2013). Поэтому исследования частоты мутаций в *DNMT3A* и установление взаимосвязи мутаций в этом гене и мутаций в других маркерах МДС (например, SF3B1 (Lin et al., 2018)) важно для составления более полного спектра aberrаций, определяющих прогноз для пациента.

Мутация *DNMT3A* R882H представляет собой наиболее частую миссенс-мутацию в данном гене при ОМЛ и ухудшает ферментативную активность данного фермента и дестабилизирует его тетрамерную форму *in vitro* и *in vivo* (рисунок 2) (Martín et al., 2017; Anteneh et al., 2020). Также исследования показали, что мутация R882H может влиять на «предпочтение» *DNMT3A*

различных CpG-фланкирующих последовательностей для связывания: по сравнению с DNMT3A дикого типа, мутантный фермент демонстрирует более сильное предпочтение метилированию мотива CG (G / A) по сравнению с мотивом CG (T / C) в качестве субстрата (Emperle et al., 2019), что коррелирует с aberrантным метилированием ДНК и измененной экспрессией генов при ОМЛ, подтверждая вклад мутации *DNMT3A* R882H в патогенез ОМЛ (Emperle et al., 2018, a).

Также считается, что R882H влияет на процесс гетеромеризации фермента, нарушая его и образуя крупные олигомеры, что обуславливает потерю метилтрансферазной активности, общее гипометилирование генома клеток и aberrантный лейкомогенез (Nguyen et al., 2019), при этом комплекс, состоящий из мутантной и нормальной форм DNMT3A (1:1) не показал снижения каталитической активности по сравнению с нормальным гетеротетрамером; вероятно, главное влияние на потерю функции оказывают комплексы, в которых большую часть занимают мутантные формы DNMT3A (Emperle et al., 2018, b).

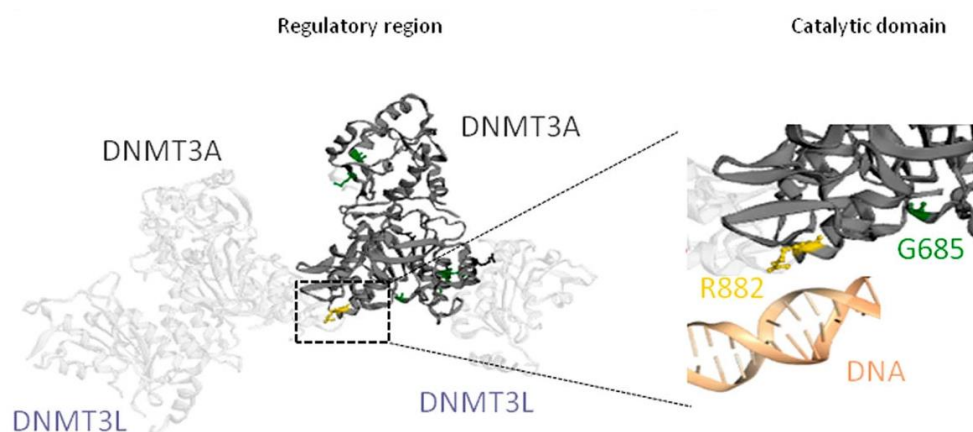


Рисунок 2 - Строение каталитического региона гетеротетрамера DNMT3A/DNMT3L. Желтым цветом выделен функционально значимый R882, мутация в котором снижает ферментативную активность DNMT3A (из (Martín et al, 2017))

Мутация R882H определяется в исследованиях различными способами: количественно с помощью аллель-специфической ПЦР в сочетании с

контролем в форме R882H-положительной плазмиды (Berenstein et al., 2015), а также качественно с помощью рестрикционного анализа (рестриктазы *TauI* (Mancini et al., 2015) и *Fnu4HI* (Berenstein et al., 2020)).

1.4 Ген *ASXL1* и его роль в миелодиспластическом синдроме и остром миелоидном лейкозе

Мутации в гене *ASXL1* (additional sex combs like 1) были впервые описаны в 2009 г. в геномах пациентов, страдающих миелодиспластическим синдромом (Gelsi-Boyer et al., 2009). *ASXL1* локализуется в 20q11, состоит из 12 экзонов и экспрессируется в большинстве типов гемопоэтических клеток. Данный ген кодирует белок из 1084 аминокислот с ядерной локализацией, состоящий из N-концевого домена с мотивом «спираль-поворот-спираль», центрального ASXH-домена и C-концевого PHD-домена, который связывает метилированный лизин (Gelsi-Boyer et al, 2012). ASXH-домен способен к взаимодействию с Polycomb-ассоциированной деубиквитиной (Scheuermann et al., 2010).

Основная функция *ASXL1* заключается в регуляции процессов установки и «стирания» эпигенетических меток и транскрипции посредством взаимодействия с белками комплекса Polycomb, а также с различными активаторами и репрессорами транскрипции. *ASXL1* взаимодействует с такими компонентами комплекса Polycomb, как EZH2 и SUZ12 - двумя белками, участвующими в триметилировании гистона H3 и репрессии транскрипции, которые также мутируют при миелоидных злокачественных заболеваниях. Ингибирование функции *ASXL1* приводит к потере гистоновых меток H3K27me3, приводя к увеличению экспрессии протоонкогенов (Gelsi-Boyer et al, 2012). Роль *ASXL1* также может заключаться в рекрутировании комплекса Polycomb в локусы генов HOXA, нарушение этого процесса приводит клетки в состояние лейкемической трансформации (Abdel-Wahab et al., 2011, a).

Подавляющее большинство мутаций *ASXL1* у пациентов с миелоидными злокачественными новообразованиями расположены в 12 экзоне (Abdel-Wahab et al., 2011, b) и представляют собой мутации сдвига рамки считывания и нонсенс-мутации, которые, вероятно, приводят к усечению С-конца белка. Согласно имеющимся данным, мутации *ASXL1* обычно гетерозиготны, что позволяет предположить, что в развитии патологического процесса играет роль гаплонедостаточность – явление, при котором экспрессии нормального продукта с одного аллеля недостаточно для обеспечения функции белка (доминирование нефункционального аллеля над функциональным) (Abdel-Wahab et al., 2011, a).

ASXL1 мутирует при всех типах злокачественных миелоидных заболеваний, включая миелодиспластические синдромы, миелопролиферативные новообразования, хронический миеломоноцитарный лейкоз и острый миелоидный лейкоз. Частота мутаций в *ASXL1* варьирует от 2-3 % до более чем 50 % в зависимости от заболевания. При ОМЛ мутации в *ASXL1* чаще обнаруживаются при вторичном ОМЛ (30 %), а не в случаях *de novo* (6,5 %) (Gelsi-Boyer et al, 2012). Что касается МДС, то при данном заболевании *ASXL1* – это второй по частоте мутаций ген после *TET2* (Bejar et al., 2011). В целом, мутации в *ASXL1* часто могут быть найдены совместно с мутациями во многих генах, которые так или иначе связаны с развитием МДС и/или ОМЛ: *EZH2* (Abdel-Wahab et al., 2011), *IDH1/2*, *RUNX1* и *TET2* (Rocquain et al., 2010; Bejar et al., 2011). В России мутации в *ASXL1* с частотой 45 % идентифицированы как признак опухолевой прогрессии при вторичном ОМЛ у детей (Корзик, 2019), при этом исследования взрослых пациентов были проведены на небольших выборках и не позволили достоверно оценить частоту мутаций в *ASXL1* (Виноградов и др., 2013).

Наиболее часто мутации обнаруживаются в 12 экзоне *ASXL1* (рисунок 3), и самой распространенной из них является дупликация гуанина в положении 1934 в гомополимерном 8-Г участке, что приводит к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона, который находится

на 12 кодонов ниже вставки (обозначается как «с.1934dupG; p.Gly646fs»). Эта мутация является наиболее частой в *ASXL1* согласно базе данных COSMIC (Gelsi-Boyer et al, 2012, Montes-Moreno et al., 2018; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=112070981>)

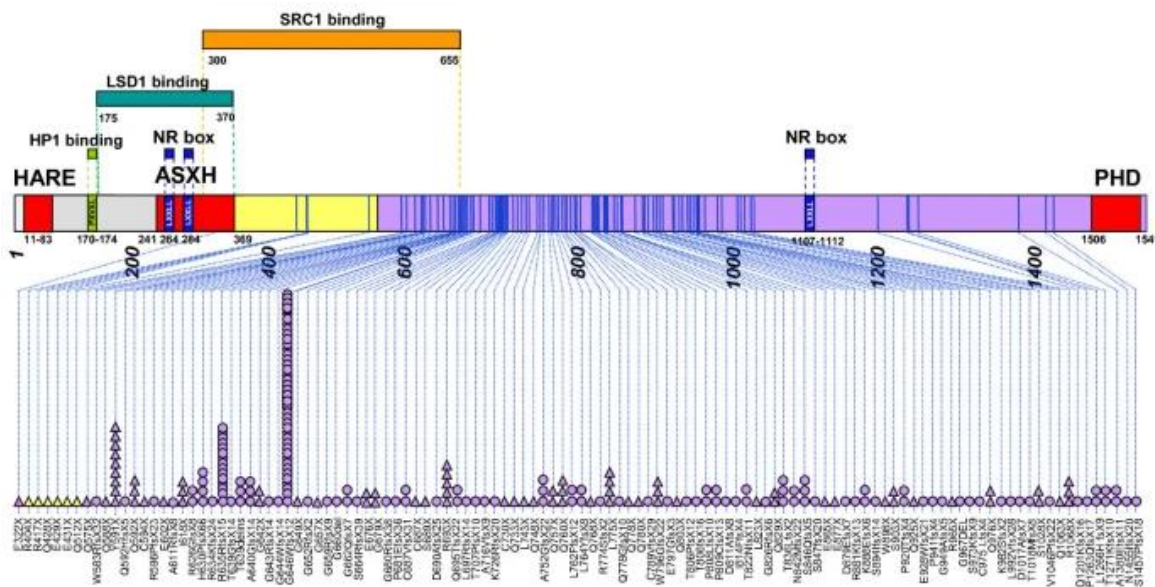


Рисунок 3 - Структура гена *ASXL1* и детектированные мутации (круги – мутации со сдвигом рамки считывания, треугольники – нонсенс-мутации) из (Gelsi-Boyer et al., 2009)

Исследование образцов от 30 пациентов показывает, что *ASXL1* с.1934dupG встречается при гематологических новообразованиях, включая МДС, ОМЛ, миелопролиферативные неоплазии, и часто ассоциируется с соматическими мутациями в *TET2*, *EZH2*, *IDH2*, *RUNX1*, *NRAS* и *DNMT3A*. Характер клональной эволюции даёт возможность предполагать, что эта мутация в *ASXL1* может быть маркером стойкого к терапии или рецидивирующего заболевания (Montes-Moreno et al., 2018).

Данная мутация долгое время считалась артефактом ПЦР или секвенирования из-за трудностей амплификации гомополимерных участков и получения ложноположительных результатов (Abdel-Wahab et al., 2010), а также имело место её определение не как соматической, а как герминальной мутации. При этом последующие работы, выполненные с использованием

секвенирования по Сэнгеру, не подтвердили артефактную природу с.1934dupG, а детектировали её только в костном мозге и крови у больных с миелопролиферативными онкологическими заболеваниями, в отличие от других тканей (Metzeler et al., 2011).

На сегодняшний день подтверждено, что с.1934dupG – это соматическое изменение, которое независимо от изначального мутационного статуса может также возникать как артефакт ПЦР или NGS и устраняется использованием высокоточных полимераз (Phusion high/fidelity) и использованием как дополнительного контроля секвенирования по Сэнгеру полученных после NGS ампликонов. Если мутация выявляется в таких условиях менее чем в 5 % случаев, то можно говорить о её присутствии исключительно в качестве артефакта, если же частота обнаружения больше 10 % - в качестве соматического изменения, промежуток между 5 % и 10 % является спорным и требует дополнительной проверки образцов (Montes-Moreno et al., 2018).

Одним из методов идентификации с.1934dupG, который также заслуживает внимания, является оценка эффективности амплификации с помощью ПЦР в реальном времени (rt-PCR) с использованием 9G- и 8G-праймеров, расчёта $\Delta\Delta C_t$ и сравнения с эталонными показателями для ДНК клеточной линии Kasumi-1, гетерозиготной по мутации (Yannakou et al., 2017).

Таким образом, проведенный анализ литературы показал, что миелодиспластический синдром и острый миелоидный лейкоз – онкогематологические заболевания, которые делят общий мутационный ландшафт, а в случае вторичного ОМЛ новые генетические нарушения накладываются на уже существующие мутации в геноме опухоли, приобретенные во время развития заболевания как МДС. *ASXL1* и *DNMT3A* являются одними из наиболее часто мутирующих и хорошо изученных генов как при МДС, так и при ОМЛ, при этом на данный момент в России отсутствуют подробные данные по частоте мутаций R882H в *DNMT3A* и с.1934dupG в *ASXL1*.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал для исследования

Исследование частот мутаций проводили с использованием образцов периферической крови, полученных в период с сентября 2019 по декабрь 2020 от пациентов, которым поставили диагноз в клинике Ростовского государственного медицинского университета и городской больнице №7 г. Ростова-на-Дону. Все протоколы исследований соответствуют последней редакции Хельсинской декларации от 2013 года.

Основные гематологические характеристики и параметры, характеризующие выборку пациентов, приведены в Таблице 3. Для количественных показателей приведено среднее и его стандартная ошибка. Гематологические показатели были получены с использованием полуавтоматического гематологического анализатора (Thermo Fisher Scientific, США), число бластов в периферической крови и костном мозге было получено методом прямого подсчёта.

ДНК клеточной линии Kasumi-1 для анализа мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* была предоставлена лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН». Данная клеточная линия используется как модель острого миелоидного лейкоза, её отличительные особенности – транслокация 8;21 и наличие гетерозиготной мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* (Larizza et al., 2005).

Таблица 3 - Параметры выборки пациентов

Параметр	МДС	ОМЛ
Медиана возраста, лет (в скобках – минимальный и максимальный возраст)	62.5 (18, 82)	49 (19, 72)
Распределение по полу, абс. (ж; м)	11; 20	14; 17
Номинативные показатели		
Общее число пациентов (чел.)	31	31
ОМЛ de novo	-	28
Вторичный ОМЛ (чел.)	10	3
Смертность (чел.)	8	9
Ремиссия (чел.)	1	12
Бласты в периферической крови (ПК), чел.	Не включалось в анализ	25
Количественные показатели		
Лейкоциты (WBC), *10 ⁹ /л	4.78±0.75	5.02±1.42
Эритроциты (RBC), *10 ¹² /л	2.46±0.14	2.80±0.99
Тромбоциты (PLT), *10 ⁹ /л	134.5±26.17	99.28±11.98
Бласты в костном мозге (КМ), %	9.69±1.76	33.53±3.38

2.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «ДНК-ЭКСТРАН-1» (Синтол, Россия).

Протокол выделения ДНК:

1. Внесение образца

1.1 Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5 или 2 мл в соответствии с количеством анализируемых проб и дополнительной пробиркой для отрицательного контроля выделения «ОКО-В». Во все пробирки (кроме «ОКО-В») внести по 300 мкл цельной крови.

2. Лизис эритроцитов

2.1 В каждую пробирку внести 900 мкл Лизирующего раствора 1 (№1). Перемешать содержимое переворачиванием (8-10 раз). Смесь инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин, периодически переворачивая пробирки.

2.2 Центрифугировать смесь 2 мин при 13000 об/мин.

2.3 Удалить супернатант над видимым осадком лейкоцитов, оставляя 20 мкл надосадочной жидкости. Ресуспендировать клетки в надосадочной жидкости на вортексе.

3. Лизис ядер клеток

3.1 Добавить в пробирки по 300 мкл Лизирующего раствора 2 (№2) и перемешать пипетированием или на вортексе.

3.2 Смесь инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин для лизиса клеток. В случае лизиса крови, содержащей сгустки, рекомендуется добавить 10 мкл раствора Протеиназы К (10 мг/мл) и прогреть смесь при 60 °С 15-20 мин. Остудить пробирки во льду 1 мин.

4. Осаждение ДНК

4.1 К лизату добавить 100 мкл Осаждающего раствора 1 (№3). Перемешать содержимое пробирок на вортексе до появления хлопьев. Если не происходит активного помутнения и образования хлопьев, остудить пробирки во льду 1 мин.

4.2 Центрифугировать смесь при 13000 об/мин в течение 2 мин.

4.3 Супернатант, содержащий ДНК, перенести в полном объеме в чистую 1,5 мл пробирку. Добавить 300 мкл Осаждающего раствора 2 (№4) и перемешать переворачиванием (10-12 раз) до появления видимого осадка ДНК.

4.4 Центрифугировать смесь при 13000 об/мин 2 мин. Осторожно удалить супернатант.

5. Промывка и растворение ДНК

5.1 Добавить 400 мкл Промывочного раствора (№5) и перемешать несколько раз переворачиванием, промывая ДНК.

5.2 Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин. Осторожно удалить супернатант.

5.3 Открытые пробирки сушить на воздухе или при 37 °С до полного высыхания.

5.4 Добавить к осадку 100 мкл Элюирующего раствора (№6). Перемешать и прогреть при 65 °С 5 мин до растворения ДНК.

5.5 Полученный раствор ДНК хранить при -20 °С. Допустимо кратковременное хранение раствора ДНК при +4 °С.

2.3 Полимеразная цепная реакция для амплификации целевого участка гена *DNMT3A*

Исходный протокол

Первоначально был использован протокол ПЦР из статьи Berenstein et al. (2014) «Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia».

Последовательности праймеров:

F: 5'-GTGATCTGAGTGCCGGGTTG-3' (T_m 61.02)

R: 5'-TCTCTCCATCCTCATGTTCTTG-3' (T_m 57.25)

Для проведения ПЦР:

1) Отобрали необходимое количество пробирок на 0,5 мл и одну пробирку для смешивания реагентов для ПЦР.

2) Внесли в пробирку для смешивания реагенты в следующих пропорциях из расчёта на одну пробу (таблица 4):

Таблица 4 - Пропорции реагентов на одну пробу для ПЦР гена *DNMT3A*

Реагент	Объем на 1 пробу, мкл
Мастер-микс БиоМастер LR HS-ПЦР (2х) для амплификации длинных (до 30 кб) и сложных фрагментов ДНК	12.5
Деионизированная стерильная вода	7.5
Прямой праймер	1
Обратный праймер	1

После внесения всех реагентов смесь осадили.

3) Внесли в каждую пробирку для проведения ПЦР по 22 мкл смеси и 3 мкл ДНК, а также 50 мкл минерального масла («Синтол», Россия) над смесью.

4) ПЦР проводили в программируемом амплификаторе «Терцик» с программой амплификации для 35 циклов (таблица 5).

Таблица 5 - Программа амплификации для ПЦР (исходная) гена *DNMT3A*

Этап	Температура	Длительность	Число циклов
Плавление	95 °С	10 минут	1
Денатурация	94 °С	30 секунд	35
Отжиг праймеров	60 °С	30 секунд	
Элонгация	72 °С	30 секунд	
Конечная элонгация	72 °С	10 минут	1

После использования протокола ПЦР из работы Berenstein et al. (2014) параллельно с целевым продуктом (444 п.о.) был получен неспецифический продукт длиной примерно 315 п.о. Была последовательно исключена возможность загрязнения и/или димеризации праймера, поэтому следующим

шагом стала оптимизация температуры связывания праймера и матрицы в диапазоне температур 58,5-62 °С с помощью амплификатора C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием исходной программы амплификации (за исключением вставки градиента температур на этапе отжига праймеров), но это также не привело к амплификации только целевого продукта (см. рисунок 4).

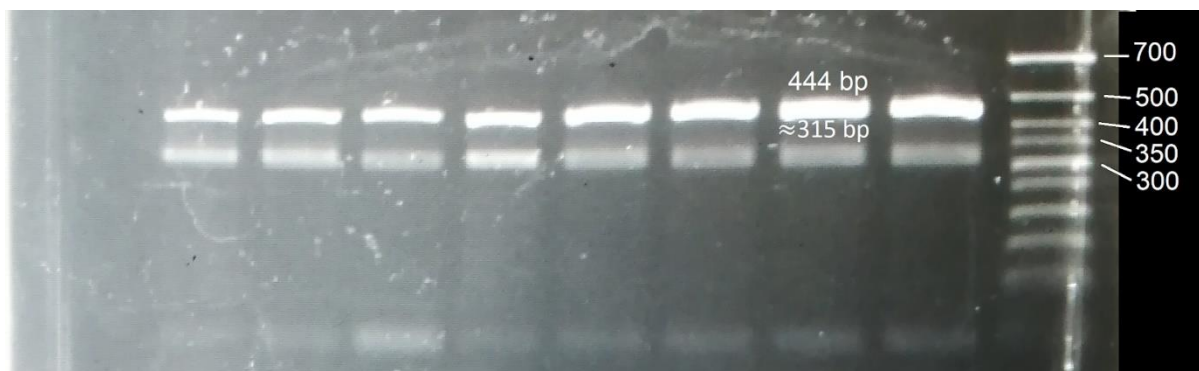


Рисунок 4 - Результаты ПЦР, выполненной в соответствии с протоколом, описанным в работе Berenstein et al. (2014). Маркер длин – 50+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия)

В связи с невозможностью использования продуктов ПЦР в дальнейшем анализе протокол из работы Berenstein et al. был оптимизирован: были разработаны новые праймеры, а также скорректирована программа амплификации.

Оптимизированный протокол

Аmplифицируемый участок в геноме находится в позициях 25234274-25234503 на хромосоме 2. Праймеры для оптимизированного протокола были разработаны с помощью программы Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) и синтезированы компанией «Евроген» (Россия).

F: 5'-GGTCCTGCTGTGTGGTTAGA-3' (T_m 59.31 °C)

R: 5'-GTCCСТТАСАСАСАСGСААА-3' (T_m 58.70 °C)

Для проведения ПЦР использовали реагенты в тех же пропорциях, что и для исходного протокола. Программа амплификации была изменена с учетом оптимальной температуры для отжига разработанных праймеров (таблица 6).

Таблица 6 - Программа амплификации для ПЦР (оптимизированная) для гена *DNMT3A*

Этап	Температура	Длительность	Число циклов
Плавление	95 °С	10 минут	1
Денатурация	94 °С	30 секунд	35
Отжиг праймеров	59,2 °С	30 секунд	
Элонгация	72 °С	30 секунд	
Конечная элонгация	72 °С	10 минут	1

Специфичный амплифицированный фрагмент имеет длину 230 п.о. и содержит участок, где локализуется искомая мутация R882H (рисунок 5).

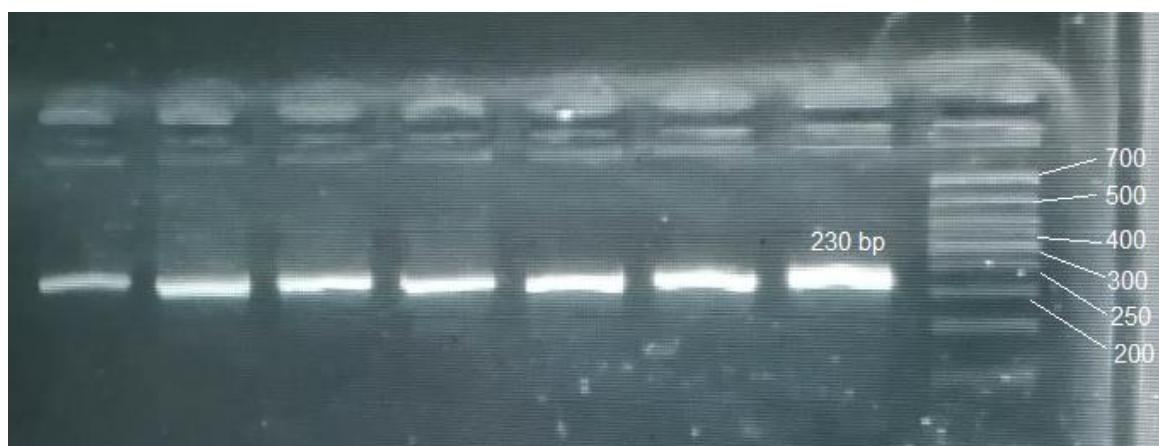


Рисунок 5 - Результаты ПЦР, выполненной в соответствии с оптимизированным протоколом. Маркер длин – 50+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия)

2.4 Рестрикционный анализ для детекции мутации R882H в DNMT3A

Для идентификации мутации R882H с помощью рестрикционного анализа была выбрана рестриктаза Fsp4HI (СибЭнзим, Россия), которая гидролизует ДНК по следующим сайтам:



В гене *DNMT3A* амплифицированный участок содержит два сайта рестрикции для рестриктазы Fsp4HI (красным выделены сайты рестрикции, желтым – нуклеотид, замена которого приводит к мутации R882H):

GGTCCTGCTGTGTGGTTAGACGGCTTCCGGG**GCAGC**CTGGTCTGGCCAGC
ACTCACCTGCCCTCTCTGCCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCA
GTCCAТATACTGACGTCTCCAACATGAG**CCG**CTTGGCGAGGCAGAGA
CTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTGCCAGTCATCCGCCACCTCTTCGCTC
CGCTGAAGGAGTATTTTGC GTGTGTGTAAGGGAC

Принцип идентификации мутации R882H основан на том, что при замене G на A в позиции 113218 гена *DNMT3A* происходит потеря одного сайта узнавания Fsp4HI, что ведёт к образованию более длинного фрагмента после рестрикции. После проведения предварительной рестрикции амплифицированного участка *in silico* с помощью программы GenomeCompiler были получены следующие результаты (таблица 7)

Таблица 7 - Результаты рестрикции *in silico* и ожидаемые длины фрагментов

Образец	Число фрагментов	Длины фрагментов, п.о.
Норма	3	101, 97, 32
R882H-позитивный образец	2	198, 32

Для проведения рестрикции:

- 1) Отобрали необходимое количество пробирок на 0,5 мл.
- 2) Внесли в пробирку для смешивания реагенты в следующих пропорциях из расчёта на одну пробу (таблица 8)

Таблица 8 - Пропорции реагентов на одну пробу для рестрикции

Реагент	Объем на 1 пробу, мкл
Аmplифицированная ДНК	8.5
Рестриктаза	2
Буфер Y для рестриктазы	2
Вода деионизированная	16

3) Рестриксию проводили в программируемом амплификаторе «Терцик».

Таблица 9- Программа для рестрикции.

Этап	Температура	Длительность
Рестрикция	37 °C	5 часов
Термическая инактивация рестриктазы	65 °C	30 минут

2.5 Электрофорез продуктов рестрикции

Горизонтальный электрофорез продуктов рестрикции проводили в 2,5 % агарозном геле в камере для электрофореза SE-2 (Helicon, Россия) с использованием источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология», Россия) в течение 30 минут. После электрофореза его результат визуализировали в геле-документирующей системе ChemiDoc MP (BioRad, США) и оценивали результаты рестрикции на предмет качественного обнаружения мутантного продукта.

2.6 Анализ эффективности амплификации для обнаружения мутации c.1934dupG в гене *ASXL1*: подготовка контролей

Для обнаружения соматической мутации c.1934dupG использовали ПЦР с двумя парами праймеров, как описано в работе Yannakou (Yannakou et al., 2017). Суть анализа состоит в параллельной амплификации матрицы в различных пробирках с двумя парами праймеров – 8G-, с помощью которых эффективнее амплифицируется нормальная матрица, и 9G-, с помощью которых эффективнее амплифицируется матрица с мутацией.

Для проведения данного анализа необходимо провести предварительные расчёты эффективности амплификации, основанные на измерении порогового цикла амплификации (Ct) для проб с нормальной матрицей и проб, в которых содержание матрицы с c.1934dupG составляет 3 % (экспериментально полученный предел обнаружения из статьи Yannakou et al., 2017).

Данные пробы получают, используя в качестве «донора» мутантной матрицы ДНК клеточной линии ОМЛ Kasumi-1, растворяя 1 часть ДНК линии с концентрацией 10 нг/мкл в 7,56 частях раствора нормальной ДНК аналогичной концентрации, так как стандартная клеточная линия Kasumi-1 содержит мутацию c.1934dupG только в одном аллеле *ASXL1* (50 % матриц).

Для подготовки контролей используют 6 повторностей с матрицей дикого типа, матрицей Kasumi-1 и 3 % c.1934dupG, для которых находят Ct и кратность изменения амплификации (fold change, FC). Полученные значения усредняют, находят стандартное отклонение (SD) и 95 %-ный доверительный интервал для среднего FC. Данные стандартные значения затем используют для установления факта наличия мутации при её содержании в пробе более 3 % (в этом случае значение FC должно превышать верхнюю границу 95 %-ного доверительного интервала по FC, и если FC (WT - образец) превышает FC (WT-3 %) для соответствующего образца.

2.7 Полимеразная цепная реакция в реальном времени для обнаружения мутации *ASXL1* с.1934dupG

Оценку эффективности амплификации матрицы образцов с помощью 8G- и 9G-праймеров производили с использованием ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Праймеры для анализа были аналогичны праймерам из статьи Yannakou et al. (2017) и синтезированы компанией «Евроген» (Россия).

8G-праймеры:

F: 5'-ATCGGAGGGGGGGGGT-3' (61,1 °C)

R: 5'-AGCTCTGGACATGGCAGTTC-3' (60,4 °C)

9G-праймеры:

F: 5'-ATCGGAGGGGGGGGGT-3' (61,4 °C)

R: 5'-AGCTCTGGACATGGCAGTTC-3' (60,4 °C)

Для проведения ПЦР:

1) Отобрали необходимое количество пробирок на 0,25 мл и две пробирки для смешивания реагентов для ПЦР на 0,5 мл.

2) Внесли в пробирки для смешивания реагенты в следующих пропорциях из расчёта на одну пробу (таблица 10)

Таблица 10 - Пропорции реагентов на одну пробу для ПЦР в реальном времени

Реагент	Объем на 1 пробу, мкл
Мастер-микс БиоМастер LR HS-ПЦР (2х) для амплификации длинных (до 30 кб) и сложных фрагментов ДНК	12.5
Деионизированная стерильная вода	7
Прямой праймер	1
Обратный праймер	1
Флуоресцентный краситель SybrGreen I (Евроген, Россия)	0.5

3) Внесли в каждую пробирку для проведения ПЦР по 22 мкл смеси и 1 мкл ДНК.

4) ПЦР в реальном времени проводили в программируемом амплификаторе Applied Biosystems Quant Studio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) с программой амплификации для 45 циклов (таблица 11).

Таблица 11 - Программа амплификации гена *ASXL1* в реальном времени

Этап	Температура	Длительность	Число циклов
Плавление	95 °C	5 минут	1
Денатурация	94 °C	30 секунд	45
Отжиг праймеров	60 °C	45 секунд	
Элонгация	72 °C	45 секунд	

Мутация *ASXL1* с.1934dupG (при бремени мутаций 3 % или более) считается обнаруженной, если FC между образцом дикого типа и интересующей пробой превышает 95 %-ный доверительный интервал для среднего FC контролей, и если FC (WT - образец) превышает FC (WT-3 %) в соответствующем эксперименте.

Пример данных для расчёта FC представлен в таблице 12. Красным выделены значения для образцов, в которых содержание мутантного транскрипта выше 3 %, зеленым – для образцов, в которых содержание мутантного транскрипта меньше 2 % или мутация как таковая отсутствует.

Таблица 12 - Данные для расчёта FC для идентификации мутации с.1934dupG
в гене *ASXL1*

Референс в текущем эксперименте					
Образец	9G Ct	8G Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$ (wt- образец)	FC (wt - образец)
wt	42	34.412	7.588	0	1
3 %	30.451	26.697	3.754	-3.834	14.26
Значения, полученные для образцов					
4	31.738	28.194	3.544	-4.044	16.49
6	31.866	27.241	4.625	-2.963	7.79
12	33.206	28.273	4.933	-2.655	6.29
13	26.815	23.546	3.269	-4.319	19.95

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Детекция мутации R882H в гене *DNMT3A*

Несмотря на ожидаемую частоту в 7-20 %, полученную в исследованиях, проводившихся на небольших выборках пациентов с МДС и/или ОМЛ (Sun et al., 2017, Виноградов и др., 2018), нами не было обнаружено мутации R882H ни у одного из пациентов из исследуемых групп (контрольная группа, МДС, ОМЛ). Возможными причинами, повлекшими подобный результат, могут быть недостаточный объем и/или популяционные особенности выборки. Данная замена не является SNP; по современной номенклатуре она относится к патогенному варианту. В этой связи вероятность обнаружения мутации R882H в гене *DNMT3A* в общепопуляционных выборках крайне низка, чем объясняется отсутствие данных литературы о популяционной частоте исследуемого патогенного варианта. В тоже время исследование больших выборок пациентов с онкогематологическими заболеваниями (например, проект PCAWG (Pan-cancer analysis of whole genomes) показало, что частота мутации среди данной категории лиц составила 1,85 % (The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium, 2020),

3.2 Дополнительные результаты рестрикционного анализа *DNMT3A*

В результате анализа электрофореграмм пациентов с МДС, ОМЛ и другими гематологическими новообразованиями (дополнительные данные исследования, не вошедшие в работу) было обнаружено несколько образцов с нестандартным ДНК-фрагментом длиной 133-138 п.н. (см. рисунок б). Данный фрагмент наблюдался у одного пациента с МДС и у одного пациента с ОМЛ.

Было высказано предположение, что данный фрагмент образуется в результате мутации во втором (нецелевом) сайте рестрикции (2:25234469-2:25234473) в амплифицируемом фрагменте.

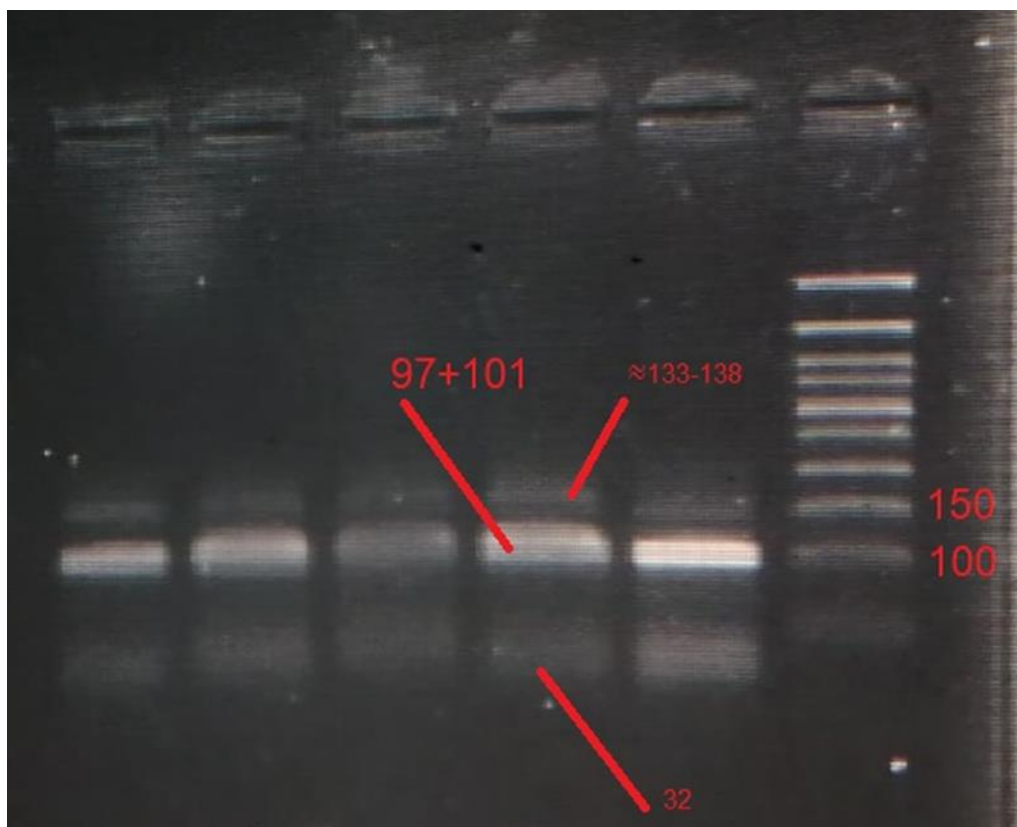


Рисунок 6 - Электрофорез результатов рестрикции образцов ДНК от 5 пациентов. Показан нетипичный фрагмент длиной 133-138 п.н. Маркер длин – 50+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия)

Затем все ПЦР-фрагменты, которые после рестрикции продемонстрировали нетипичный фрагмент, секвенировали по Сэнгеру. В результате ни в одном из ПЦР-фрагментов не обнаружилось мутации в регионе нецелевого сайта рестрикции, которая бы объясняла появление нетипичного фрагмента; технический вывод этих дополнительных данных – невозможность однозначной идентификации новых мутаций только лишь по результатам рестрикции без верификации секвенированием.

Полученные хроматограммы секвенирования также были проанализированы с целью идентификации низкокопийных мутаций с помощью программного обеспечения Mutation Surveyor (https://softgenetics.com/mutationSurveyor_4.php). У пациента с нетипичным фрагментом и МДС не обнаружилось низкокопийных мутаций, у пациента с ОМЛ было обнаружено 5 различных низкокопийных мутаций (таблицу 13).

Таблица 13 - Низкокопийные мутации, идентифицированные с помощью Mutation Surveyor

Позиция в гене	Мутация	Копийность, F-сиквенс, %	Копийность, R-сиквенс, %
108709	A > G	6,20	16,04
108710	C > T	8,55	4,25
108744	C > A	5,33	10,56
108608	C > G; C > T	12,10	6,77
108669	A > G	8,59	5,31

По результатам поиска в базах данных COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=170349301>) и подразделах NCBI (таких, как dbSNP b154 v2, Clinical variants и Cited variants, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_029465.2?report=graph&rid=9DEX87AF016\[NG_029465.2\]&tracks=\[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annot:Sequence>ShowLabel:true\]\[key:gene_model_track,CDSProductFeats:false\]\[key:alignment_track,name:other%20alignments,annot:NG%20Alignments|Refseq%20Alignments|Gnomon%20Alignments|Unnamed,shown:false\]&v=113077:113328&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_029465.2?report=graph&rid=9DEX87AF016[NG_029465.2]&tracks=[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annot:Sequence>ShowLabel:true][key:gene_model_track,CDSProductFeats:false][key:alignment_track,name:other%20alignments,annot:NG%20Alignments|Refseq%20Alignments|Gnomon%20Alignments|Unnamed,shown:false]&v=113077:113328&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP)) данные низкокопийные замены отмечены не были, более того, все они находятся в интроне, расположенном между 23 и 24 экзонами (у конца интрона около экзона 23), и установить напрямую их влияние на функцию DNMT3A пока не представляется возможным.

3.3 Детекция мутации c.1934dupG в гене *ASXL1*

Для установления мутационного статуса образцов была проведена подготовка контролей (wt – ДНК с отсутствием мутации c.1934dupG; 50 % - ДНК линии Kasumi-1, гетерозиготной по мутации; 3 % - ДНК линии Kasumi-1

с добавлением ДНК с отсутствием мутации до конечного уровня мутации 3 %).

Результаты анализа кратности изменения амплификации (FC) и расчёта среднего значения этого показателя представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Средний показатель кратности изменения амплификации (FC)

Средний FC	8.435
Стандартное отклонение (SD)	5.392
-95 %-ный доверительный интервал (CI)	0.435

Затем, исходя из рассчитанного среднего FC и доверительного интервала (с учётом показателей FC, получаемых при каждом отдельном запуске амплификатора с пробами), для каждого образца последовательно рассчитывали ΔC_t (где C_t – пороговый цикл), $\Delta\Delta C_t$, и FC. Все расчёты производились в программе Microsoft Excel.

Были получены частоты мутаций для пациентов с миелодиспластическим синдромом, острым миелоидным лейкозом, а также для участников контрольной группы (в данной группе частота составила 0). Для получения информации о том, различны ли частоты мутации c.1934dupG у пациентов с МДС и ОМЛ, использовали критерий Хи-квадрат (анализ был выполнен в GraphPad Prism v.8.4.2). Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Частоты мутации c.1934dupG

Группа	Число пациентов с мутацией c.1934dupG	p-value
Пациенты с МДС (n = 31)	18 (58,06 %)	0,054
Пациенты с ОМЛ (n = 31)	25 (80,65 %)	

Таким образом, частоты мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* статистически значимо не различаются у пациентов с диагностированными ОМЛ и МДС, и можно говорить лишь о различиях на уровне тенденции преобладания данной мутации у пациентов с ОМЛ. Полученные частоты несколько превышают оценки, даваемые в литературе (до 50 %), что может быть связано с различной чувствительностью методов идентификации с.1934dupG, описанных выше.

3.4 Влияние мутации с.1934dupG в *ASXL1* у пациентов с миелодиспластическим синдромом на выживаемость и клинически значимые показатели

Диагностирование форм МДС и оценка групп риска проводились с использованием классификации Всемирной организации здравоохранения (Глузман, 2010). В таблице 16 приведено число пациентов с мутацией с.1934dupG и без неё для каждой из определенных форм МДС, а также группа риска трансформации в ОМЛ для данной формы.

Из анализа таблицы 16 можно установить, что с.1934dupG чаще (83,3 %; 61,5 %) встречается у пациентов с промежуточным риском трансформации МДС в ОМЛ (РАКС в данном случае ввиду его низкой представленности в выборке не учитывался), при этом частота пациентов с мутацией при МДС с низким риском ниже (60 %), в связи с чем можно предположить, что данная мутация может характеризовать формы МДС, имеющие больший риск трансформироваться в ОМЛ. При этом у пациентов с высоким риском трансформации мутация чаще отсутствует (что может быть связано с небольшим числом исследованных пациентов с данной формой МДС). В целом, взаимосвязь с.1934dupG с риском трансформации МДС – ОМЛ тяготеет к связи с промежуточным риском данного события.

Таблица 16 - Формы МДС по группе риска и частоты встречаемости мутации с.1934dupG

Форма МДС	Группа риска	Число пациентов		
		С мутацией	Без мутации	Всего
Рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией (РЦОД)	Низкий	2	4	6
Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД)	Промежуточный	8	5	13
Рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)	Низкий	0	1	1
МДС, ассоциированный с изолированной del(5q)	Низкий	0	1	1
Рефрактерная анемия с избытком бластов-1 (РАИБ-1)	Промежуточный	5	1	6
Рефрактерная анемия с избытком бластов-2 (РАИБ-2)	Высокий	1	3	4

Дополнительно пациенты были стратифицированы по шкале риска трансформации в ОМЛ WPSS (MDS WHO Classification-based Prognostic Scoring System, <https://www.lls.org/disease-information/myelodysplastic-syndromes/diagnosis/the-international-prognostic-scoring-system>), которая

присваивает группу риска согласно подтипу МДС, типам цитогенетических аномалий и наличию серьезной анемии (рисунок 7).

Prognostic Factors Scored	Risk Groups Based on Total Risk Score
MDS subtype <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> MDS-SLD, MDS-RS, MDS with isolated del(5q) = 0 points <input type="radio"/> MDS-MLD = 1 point <input type="radio"/> MDS-EB1 = 2 points <input type="radio"/> MDS-EB2 = 3 points 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> 0 points = Very Low <input type="radio"/> 1 point = Low <input type="radio"/> 2 points = Intermediate <input type="radio"/> 3 to 4 points = High <input type="radio"/> 5 to 6 points = Very High
Cytogenetics (chromosome changes) <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Good: normal, -Y alone, del(5q) alone, del(20q) alone = 0 points <input type="radio"/> Intermediate: other abnormalities = 1 point <input type="radio"/> Poor: 3 or more abnormalities, chromosome 7 abnormalities = 2 points 	
Presence of severe anemia (hemoglobin less than 9 g/dL in men or less than 8 g/dL in women) <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Absent = 0 points <input type="radio"/> Present = 1 point 	

Key. WPSS, WHO Classification-based Prognostic Scoring System, ANC, absolute neutrophil count; del, deletion; g/dL, gram/deciliter; MDS, myelodysplastic syndrome; MDS-EB, MDS with excess blasts; MDS-MLD, MDS with multilineage dysplasia; MDS-RS, MDS with ring sideroblasts.

Рисунок 7 - Шкала риска WPSS для стратификации пациентов с МДС
<https://www.ils.org/disease-information/myelodysplastic-syndromes/diagnosis/the-international-prognostic-scoring-system>

В результате пациенты были стратифицированы согласно WPSS на 5 групп, обозначенных в таблице 17.

Таблица 17 - Распределение пациентов по группам риска WPSS и частоте встречаемости мутации *ASXL1* с.1934dupG

Группа риска по WPSS	Число пациентов с мутацией	Число пациентов без мутации	Всего пациентов
Очень низкий	1	0	1
Низкий	4	2	6
Промежуточный	7	4	11
Высокий	4	6	10
Очень высокий	0	2	2

После стратификации по данной шкале также можно заметить, что мутация с.1934dupG чаще встречается у пациентов с низким и промежуточным риском трансформации в ОМЛ.

Анализ выживаемости пациентов проводили с помощью процедуры Каплана-Майера с цензурированием; оценивали промежуток в 12 месяцев с момента постановки диагноза. Анализ проводили в программном обеспечении GraphPad Prizm 8.4.2. Результаты в виде кривых выживаемости для пациентов с мутацией с.1934dupG в гене *ASXL1* и без данной мутации представлены на рисунке 8. В конце периода наблюдения выживаемость пациентов с мутацией составила 80 %, тогда как для пациентов без мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* выживаемость составила 30 %.

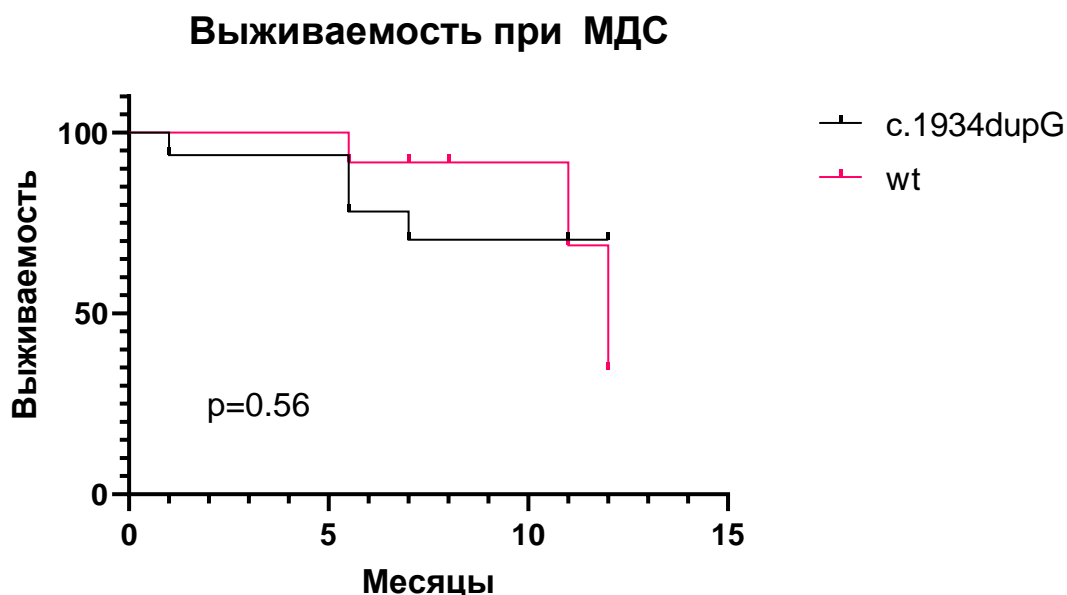


Рисунок 8 - Анализ выживаемости пациентов с миелодиспластическим синдромом в зависимости от наличия мутации с.1934dupG в гене *ASXL1*

В результате анализа кривых выживаемости с помощью теста Мантела-Кокса (logrank test) статистически значимых различий в выживаемости у пациентов с МДС при наличии или отсутствии мутации с.1934dupG не было выявлено ($p = 0.56$).

Также было проанализировано влияние мутации с.1934dupG на такие показатели общего анализа крови (ОАК), как содержание лейкоцитов (WBC), эритроцитов (RBC), тромбоцитов (PLT), а также на содержание бластов в костном мозге (КМ). Для сравнения средних использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, т.к. используемые данные не подчинялись нормальному распределению по результатам проверки с помощью критерия Шапиро-Уилка. Расчёты также проводили в программном обеспечении GraphPad Prizm 8.4.2. Результаты сравнения показателей ОАК представлены в таблице 18. В результате не было выявлено значимого влияния мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* на показатели ОАК и содержание бластов в КМ у пациентов с МДС.

Таблица 18 - Сравнение клинически значимых показателей у пациентов с МДС в зависимости от наличия или отсутствия мутации с.1934dupG

Параметр	Отсутствие мутации	с.1934dupG	p-value
Лейкоциты (WBC), *10 ⁹ /л	4.58±0.97	4.94±1.14	0.8825
Эритроциты (RBC), *10 ¹² /л	2.28±0.16	2.60±0.21	0.0962
Тромбоциты (PLT), *10 ⁹ /л	138.30±43.39	131.30±33.06	0.8374
Бласты в КМ, %	10.34±3.03	7.94±1.86	0.8572

Обобщая, можно сказать, что мутация с.1934dupG в гене *ASXL1* статистически значимо не влияет на выживаемость и клинически значимые показатели у пациентов с МДС.

3.5 Мутация с.1934dupG в *ASXL1* у пациентов с острым миелоидным лейкозом и её влияние на выживаемость, ремиссию и клинически значимые показатели

Диагностирование форм ОМЛ проводилось согласно Франко-Американо-Британской классификации (<https://www.medscape.com/answers/2006750-182477/what-is-the-fab-classification-of-acute-myeloid-leukemia>). В таблице 19 приведено число пациентов с мутацией с.1934dupG и без неё для каждой из определенных форм ОМЛ.

Таблица 19 - Формы ОМЛ и частота встречаемости мутации с.1934dupG

Форма ОМЛ	Число пациентов с мутацией	Число пациентов без мутации	Всего пациентов
М0 – минимально-дифференцированный острый миелобластный лейкоз	3	2	5
М1 – острый миелобластный лейкоз без признаков созревания	6	3	9
М2 – острый миелобластный лейкоз с признаками созревания	6	2	8
М3 – промиелоцитарный лейкоз	1	1	2
М4 – острый миеломоноцитарный лейкоз	5	0	5
Острый лейкоз смешанного фенотипа	2	0	2

Исходя из Таблицы 19, можно отметить, что с.1934dupG чаще наблюдается у пациентов с диагнозами М1, М2 и М4, что не позволяет отнести её к одной форме ОМЛ (или нескольким близким формам) по степени дифференцировки бластных клеток.

Результаты анализа влияния с.1934dupG в гене *ASXL1* на выживаемость представлены на рисунке 9. Несмотря на то, что выживаемость у пациентов без мутации не падает, следует указать, что большое число пациентов в этой группе не отслеживалось на протяжении всего периода исследования (подверглось цензурированию), что могло повлиять на конечные результаты анализа. При этом у группы пациентов с мутацией выживаемость падает до 52 % к концу периода наблюдения.

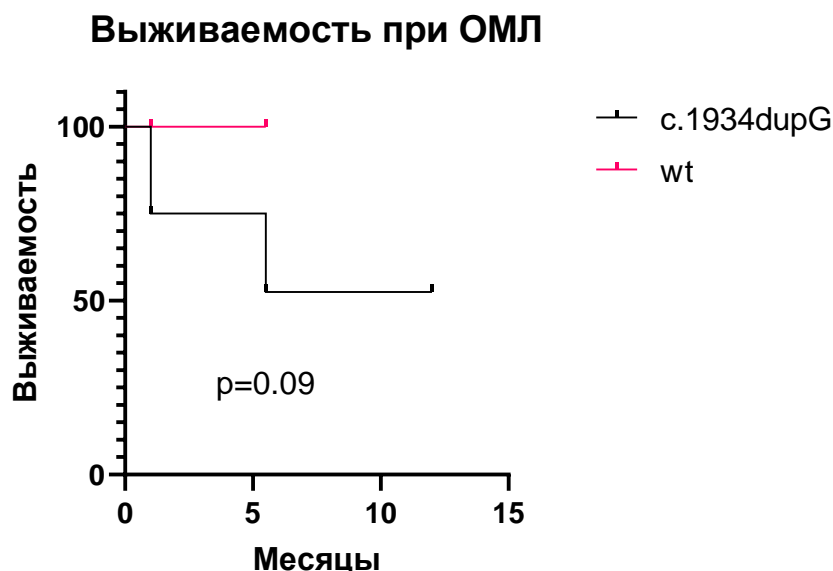


Рисунок 9 - Анализ выживаемости пациентов с острым миелоидным лейкозом в зависимости от наличия мутации с.1934dupG в гене *ASXL1*

В результате анализа кривых выживаемости с помощью теста Мантела-Кокса (logrank test) различий в выживаемости у пациентов с ОМЛ при наличии или отсутствии мутации с.1934dupG не обнаружено. Была выявлена лишь тенденция к снижению выживаемости ($p = 0.09$), не являющаяся статистически значимой.

Также были проанализированы показатели ОАК и содержание бластов в КМ и ПК. Результаты анализа представлены в таблице 19.

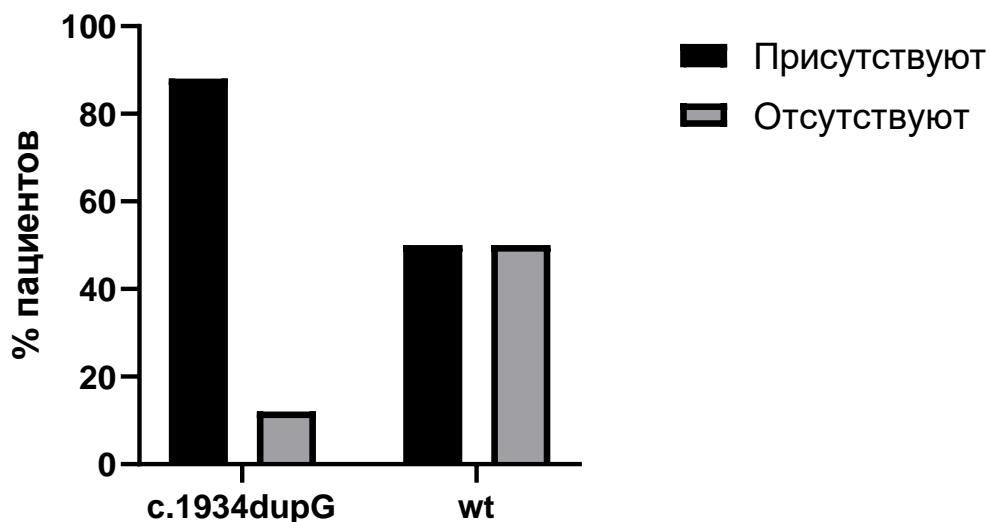
Таблица 20 - Сравнение клинически значимых показателей у пациентов с ОМЛ в зависимости от наличия или отсутствия мутации с.1934dupG

Параметр	Отсутствие мутации	с.1934dupG	p-value
Лейкоциты (WBC), *10 ⁹ /л	3.74±2.29	5.02±1.42	0.4996
Эритроциты (RBC), *10 ¹² /л	2.24±0.44	2.80±0.19	0.2775
Тромбоциты (PLT), *10 ⁹ /л	90.70±38.99	99.28±11.98	0.9946
Бласты в КМ, %	29±8.65	33.53±3.83	0.7327

В результате не было выявлено влияния мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* на показатели ОАК и содержание бластов в КМ у пациентов с ОМЛ.

Дополнительно было проанализировано содержание бластов в периферической крови (ПК) как номинативный показатель с помощью критерия Хи-квадрат. Результаты анализа представлены на рисунке 10. Среди пациентов с мутацией у 88 % присутствуют бласты в периферической крови, у пациентов без мутации бласты наблюдаются в 50 % случаев.

Бласты в ПК



p-value	0.034
Отношение шансов (ОШ)	7.33 (1.16-41.00)

Рисунок 10 - Анализ содержания бластов в периферической крови у пациентов с ОМЛ в зависимости от наличия мутации с.1934dupG

Можно заключить, что мутация с.1934dupG в гене *ASXL1* ассоциирована с повышенным риском наличия бластов в периферической крови у пациентов с острым миелоидным лейкозом. Стоит отметить, что, согласно клиническим рекомендациям, диагностика ОМЛ базируется на оценке морфологических особенностей клеток костного мозга и периферической крови и диагноз устанавливают лишь при обнаружении в них бластов (в частности, более 20 % в костном мозге), и в целом, наличие бластов в периферической крови может быть связано с более тяжелым течением заболевания (Савченко и др., 2018).

ВЫВОДЫ

1. В исследуемой выборке пациентов не было установлено мутации R882H в гене *DNMT3A*.

2. В результате анализа электрофореграмм пациентов в процессе идентификации мутации в *DNMT3A* было обнаружено несколько образцов с нестандартным ДНК-фрагментом, но гипотеза о происхождении данного фрагмента вследствие мутации во втором сайте рестрикции была опровергнута результатами секвенирования по Сэнгеру.

3. Частоты мутации с.1934dupG в гене *ASXL1* у пациентов с диагностированным ОМЛ и МДС различаются на уровне тенденции (80,65 %; 58,06 %; $p = 0.054$).

4. Мутация с.1934dupG в гене *ASXL1* ассоциирована с повышенным риском наличия бластов в периферической крови у пациентов с острым миелоидным лейкозом (отношение шансов 7.33 (1.16-41.00), $p = 0.03$).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор хочет выразить благодарность Липилкину Павлу Викторовичу, аспиранту 1 года обучения кафедры гематологии и общей трансфузиологии Ростовского государственного медицинского университета за предоставление образцов периферической крови и финансовую помощь в проведении исследования, Прассолову Владимиру Сергеевичу, и.о. заведующего лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН за любезное предоставление образца ДНК клеточной линии Kasumi-1, а также Корниенко Игорю Валерьевичу, профессору кафедры биохимии Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета за предоставленную возможность провести секвенирование по Сэнгеру.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов Dnmt3a, FLT3, Kit, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15-45 лет // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13, №. 3. – С. 70-74.
2. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Ивлева Е.К., Сергеев А.Г. Разработка технологии детекции мутаций гена ASXL1 при острых лейкозах методом прямого автоматического секвенирования // Всероссийская конференция «Современные проблемы биохимии и биотехнологии» / Башкирский государственный университет. – Уфа, 2013. – С. 20-23.
3. Глузман Д.Ф., Надгорная В.А., Скляренко Л.М., Ивановская Т.С. Новая классификация миелодиспластических (предлейкемических) синдромов // Онкология. – 2010. - Т. 12, №. 3. – С.276-281.
4. Корзик А.В. Роль мутаций генов ASXL1 и TET2 в опухолевой прогрессии и развитии вторичного острого миелоидного лейкоза у детей: аннотация к дипломной работе. - Белорусский государственный университет, 2019. - 4 с.
5. Савченко В.Г., Паровичникова Е.А., Афанасьев Б.В., Троицкая В.В., Гаврилина О.А., Соколов А.Н., Кузьмина Л.А., Клясова Г.А., Бондаренко С.Н., Капланов К.Д., Самойлова О.С., Капорская Т.С., Константинова Т.С., Зинина Елена Евгеньевна, Лапин Валерий Альбертович, Гальцева И.В., Обухова Т.Н., Судариков А.Б. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых (редакция 2018 г.) // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63 – С. 5-52.
6. Abdel-Wahab O., Adli M., Saunders L., Gao J., Shih A.H., P. Suveg, Jaffe J., Zhao X., Perna F., Carroll M., Melnick A., Nimer S.D., Aifantis I., Bernstein B., Levine R.L. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through inhibition of PRC2-mediated gene repression. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through inhibition of PRC2-mediated gene repression // Blood. – 2011. – V.188., №21. – P.405. - a

7. Abdel-Wahab O., Pardanani A., J Patel, Wadleigh M., Lasho T., Heguy A., Beran M., Gilliland D.G., Levine R.L., Tefferi A. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms // *Leukemia*. – 2011. – V. 25, №. 7. – P. 1200-1202. - b
8. Abdel-Wahab O., Kilpivaara O., Patel J., Busque L., Levine R.L. The most commonly reported variant in ASXL1 (c. 1934dupG; p. Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration // *Leukemia*. – 2010. – V. 24, №. 9. – P. 1656-1657.
9. Anteneh H., Fang J., Song J. Structural basis for impairment of DNA methylation by the DNMT3A R882H mutation // *Nature communications*. – 2020. – V. 11, №. 1. – P. 1-12.
10. Bejar R., Stevenson K., Abdel-Wahab O., Galili N., Nilsson B., Garcia-Manero G., Kantarjian H., Raza A., Levine R.L., Neuberg D., Ebert B.L. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – V. 364, №. 26. – P. 2496-2506.
11. Bejar R., Stevenson K., Caughey B.A., Abdel-Wahab O., Steensma D.P., Galili N., Raza A., Kantarjian H., Levine R.L., Neuberg D., Garcia-Manero G., Ebert B.L.. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes // *Journal of clinical oncology*. – 2012. – V. 30, №. 27. – P. 3376–3382.
12. Berenstein R., Blau I.W., Kar A., Cay R., Sindram A., Seide C., Blau O. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2014. – V. 33, №. 1. – P. 1-12.
13. Berenstein R., Blau I.W., Suckert N., Baldus C., Pezzutto A., Dorken B., Blau O. Quantitative detection of DNMT3A R882H mutation in acute myeloid leukemia // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2015. – V. 34, №. 1. – P. 55.

14. Caponetti G. C., Bagg A. Mutations in myelodysplastic syndromes: Core abnormalities and CHIPping away at the edges // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2020. – V. 42, №. 6. – P. 671-684.
15. De Kouchkovsky I., Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update // *Blood cancer journal*. – 2016. – V. 6, №. 7. – P. 441.
16. Emperle M., Adam S., Kunert S., Dukatz M., Baude A., Plass C., Rathert P., Bashtrykov P., Jeltsch A. Mutations of R882 change flanking sequence preferences of the DNA methyltransferase DNMT3A and cellular methylation patterns // *Nucleic acids research*. – 2019. – V. 47, №. 21. – P. 11355-11367.
17. Emperle M., Rajavelu A., Kunert S., Arimondo P.B., Reinhardt R., Jurkowska R.Z., Jeltsch A. The DNMT3A R882H mutant displays altered flanking sequence preferences // *Nucleic acids research*. – 2018. – V. 46, №. 6. – P. 3130-3139. - a
18. Emperle M., Dukatz M., Kunert S., Holzer K., Rajavelu A., Jurkowska R.Z., Jeltsch A. The DNMT3A R882H mutation does not cause dominant negative effects in purified mixed DNMT3A/R882H complexes // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8, №. 1. – P. 1-9. - b
19. Estey E. H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management // *American Journal of Hematology*. – 2018. – V. 93, №. 10. – P. 1267-1291.
20. Gelsi-Boyer V., Brecqueville M., Devillier R., Murati A., Mozziconacci M.J., Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases // *Journal of hematology & oncology*. – 2012. – V. 5, №. 1. – P. 1-6.
21. Gelsi-Boyer V., Trouplin V., Adélaïde J., Bonansea J., Cervera N., Carbuccia N., Lagarde A., Prebet T., Nezri M., Sainty D., Olschwang S., Xerri L., Chaffanet M., Mozziconacci M., Vey N., Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia // *British journal of haematology*. – 2009. – V. 145, №. 6. – P. 788-800.

22. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes // *Annals of hematology*. – 2008. – V. 87, №. 7. – P. 515-526.
23. Hamid G. A., Al-Nehmi A. W., Shukry S. Diagnosis and Classification of Myelodysplastic Syndrome // *Recent Developments in Myelodysplastic Syndromes*. – London, 2019. – P. 13.
24. Horne G. A., Kinstrie R., Copland M. Novel drug therapies in myeloid leukemia: a patent review // *Pharmaceutical patent analyst*. – 2015. – V. 4, №. 3. – P. 187-205.
25. Hou H. A., Tien H. F. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies // *Journal of Biomedical Science*. – 2020. – V. 27, №. 1. – P. 1-13.
26. Jurkowska R. Z., Rajavelu A., Anspach N., Urbanke C., Jankevicius G., Ragozin S., Nellen W., Jeltsch A. Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules heterochromatic localization and role of Dnmt3L // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286, №. 27. – P. 24200-24207.
27. Larizza L., Magnani I., Beghini A. The Kasumi-1 cell line: at (8; 21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia // *Leukemia & lymphoma*. – 2005. – V. 46, №. 2. – P. 247-255.
28. Le Beau M. M., Espinosa R., Davis E.M., Eisenbart J.D., Larson R.A., Green E.D. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases // *Blood*. – 1996. – V. 88, №. 6. – P. 1930-1935.
29. Lin M. E., Hou H.A., Tsai C.H., Wu S.J., Kuo Y.Y., Tseng M.H., Liu M.C., Liu C.W., Chou W.C., Chen C.Y., Tang J.L., Yao M., Li C.C., Huang S.Y., Ko B.S., Hsu S.C., Lin C.T., Tien H.F. Dynamics of DNMT3A mutation and prognostic relevance in patients with primary myelodysplastic syndrome // *Clinical epigenetics*. – 2018. – V. 10, №. 1. – P. 42.
30. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes // *The American journal of medicine*. – 2012. – V. 125, №. 7. – P. 2-5.

31. Mancini M., Hasan S.K., Ottone T., Lavorgna S., Ciardi C., Angelini D.F., Agostini F., Venditti A., Lo-Coco F. Two novel methods for rapid detection and quantification of DNMT3A R882 mutations in acute myeloid leukemia // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2015. – V 17, №. 2. – P. 179-184.
32. Martín I., Such E., Navarro B., Villamón E., Vicente A., Mora E., Pedrola L., Ibáñez M., López-Pavía M., Tormo M., Serrano A., Sanz M.A., Cervera J., Sanz G. Prognostic impact of gene mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts // *Blood cancer journal*. – 2017. – V. 7, №. 12. – P. 1-4.
33. Menssen A. J., Walter M. J. Genetics of Progression from MDS to Secondary Leukemia // *Blood*. – 2020. – V.136, №1. – P.50-60.
34. Metzeler K. H., Becker H., Maharry K., Radmacher M.D., Kohlschmidt J., Mrózek K., Nicolet D., Whitman S.P., Wu Y.Z., Schwind S., Powell B.L., Carter T.H., Wetzler M., Moore J.O., Kolitz J.E., Baer M.R., Carroll A.J., Larson R.A., Caligiuri M.A., Marcucci G., Bloomfield C.D. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – V. 118., №. 26. – P. 6920-6929.
35. Mohammad A. A. Myelodysplastic syndrome from theoretical review to clinical application view // *Oncology Reviews*. – 2018. – V. 12, №. 2. – P.397
36. Montes-Moreno S., Routbort M.J., Lohman E.J., Barkoh B.A., Kanagal-Shamanna R., Bueso-Ramos C.E., Singh R.R., Medeiros L.J., Luthra R., Patel K.P.. Clinical molecular testing for ASXL1 c. 1934dupG p. Gly646fs mutation in hematologic neoplasms in the NGS era // *PloS one*. – 2018. – V. 13, №. 9. – P.18-24.
37. Nguyen T.V., Shihua S., Wang Y., Rolfe A., Selvaraj A., Darman R., Ke J., Warmuth M., Smith P.G., Larsen N.A., Yu L., Zhu P., Fekkes P., Vaillancourt F.H., Bolduc D.M. The R882H DNMT3A hot spot mutation stabilizes the formation of large DNMT3A oligomers with low DNA methyltransferase activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – V. 294., №. 45. – P. 16966-16977.

38. Papaemmanuil E., Gerstung M., Malcovati L., Tauro S., Gundem G., Van Loo P., Yoon C.J., Ellis P., Wedge D.C., Pellagatti A., Shlien A., Groves M.J., Forbes S.A., Raine K., Hinton J., Mudie L.J., McLaren S., Hardy C., Latimer C., Della Porta M.G., O'Meara S., Ambaglio I., Galli A., Butler A.P., Walldin G., Teague J.W., Quek L., Sternberg A., Gambacorti-Passerini C., Cross N.C.P., Green A.R., Boulton J., Vyas P., Hellstrom-Lindberg E., Bowen D., Cazzola M., Stratton M.R., Campbell P.J. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes // *Blood*. – 2013. – V. 122, №. 22. – P. 3616-3627.

39. Rajavelu A., Jurkowska R.Z., Fritz J., Jeltsch A. et al. Function and disruption of DNA methyltransferase 3a cooperative DNA binding and nucleoprotein filament formation // *Nucleic acids research*. – 2012. – V. 40, №. 2. – P. 569-580.

40. Rocquain J., Carbuccia N., Trouplin V., Raynaud S., Murati A., Nezri M., Tadriz Z., Olschwang S., Vey N., Birnbaum D., Gelsi-Boyer V., Mozziconacci M.J.. Combined mutations of *asx11*, *cbl*, *flt3*, *idh1*, *idh2*, *jak2*, *kras*, *npm1*, *nras*, *runx1*, *tet2* and *wt1* genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias // *BMC cancer*. – 2010. – V. 10, №. 1. –P. 1-7.

41. Roller A., Grossmann V., Bacher U., Poetzinger F., Weissmann S., Nadarajah N., Boeck L., Kern W., Haferlach C., Schnittger S., Haferlach T., Kohlmann A. Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies // *Leukemia*. – 2013. – V. 27, №. 7. – P. 1573-1578.

42. Saez B., Walter M. J., Graubert T. A. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2017. – V. 129, №. 10. – P. 1260-1269.

43. Saultz J. N., Garzon R. Acute myeloid leukemia: a concise review // *Journal of clinical medicine*. – 2016. – V. 5, №. 3. – P. 33.

44. Scheuermann J.C., de Ayala Alonso A.G., Oktaba K., Ly-Hartig N., McGinty R.K., Fraterman S., Wilm M., Muir T.W., Müller J. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB // *Nature*. – 2010. – V. 465, №. 7295. – P. 243-247.

45. Shivarov V., Gueorguieva R., Stoimenov A., Tiud R. DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients // *Leukemia research*. – 2013. – V. 37, №. 11. – P. 1445-1450.
46. Sperling A. S., Gibson C. J., Ebert B. L. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia // *Nature Reviews Cancer*. – 2017. – V. 17, №. 1. – P. 5.
47. Sun X. J., Chen Z., Chen S. J. Mutations in DNA Methyltransferases and Demethylases. – Amsterdam, 2017. – P.10
48. ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes // *Nature*. – 2020. – V. 578, №. 7793. – P. 82.
49. Thol F., Winschel C., Yun A.L.H., Friesen I., Damm F., Wagner K., Krauter J., Heuser M., Ganser A. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes // *Haematologica*. – 2011. – V. 96, №. 12. – P. 1870-1873.
50. van Spronsen M. F., Westers T.M., Lissenberg-Witte B.I., Ossenkoppele G.J., van de Loosdrecht A.A. The non-erythroid myeloblast count rule in myelodysplastic syndromes: fruitful or futile? // *Haematologica*. – 2019. – V. 104, №. 12. – P. 547.
51. Venugopal K., Feng Y., Shabashvili D., Guryanova O. A. Alterations to DNMT3A in Hematologic Malignancies // *Cancer Research*. – 2021. – V. 81, №. 2. – P 254-263.
52. Walter M. J., Shen D., Shao J., Ding L., White B.S., Kandoth C., Miller C.A., Niu B., McLellan M.D., Dees N.D., Fulton R., Elliot K., Heath S., Grillo M., Westervelt P., Link D.C., DiPersio J.F., Mardis E., Ley T.J., Wilson R.K., Graubert T.A. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes // *Leukemia*. – 2013. – V 27, №. 6. – P. 1275-1282.
53. Walter M.J., Ding L., Shen D., Shao J., Grillo M., McLellan M., Fulton R., Schmidt H., Kalicki-Veizer J., O'Laughlin M., Kandoth C., Baty J., Westervelt P., DiPersio J.F., Mardis E.R., Wilson R.K., Ley T.J., Graubert T.A. Recurrent

DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes // *Leukemia*. – 2011. – V. 25, №. 7. – P. 1153-1158.

54. Yang L., Rau R., Goodell M. A. DNMT3A in haematological malignancies // *Nature Reviews Cancer*. – 2015. – V. 15, №. 3. – P. 152-165.

55. Yannakou C.K., Jones K., McBean M., Thompson E.R., Ryland G.L., Doig K., Markham J., Westerman D., Blombery P. ASXL1 c. 1934dup; p. Gly646Trpfs* 12—a true somatic alteration requiring a new approach // *Blood cancer journal*. – 2017. – V. 7, № 12. – P. 1-4.

56. Zhang Z.M., Lu R., Wang P., Yu Y., Chen D., Gao L., Liu S., Ji D., Rothbart S.B., Wang Y., Wang G.G., Song J. Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation // *Nature*. – 2018. – V. 554, №. 7692. – P. 387-391.

57. Overview of ASXL1 c.1934dupG mutation in Catalogue of Somatic Mutation in Cancer (COSMIC). – URL: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=112070981>

58. Overview of DNMT3A c.2644C>T mutation in Catalogue of Somatic Mutation in Cancer (COSMIC). – URL: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=170349301>

59. Primer3 web version 4.1.0. – URL: <https://primer3.ut.ee/>

60. Low-frequency DNA Variant discovery from Sanger Sequencing Traces. SoftGenetics. – URL: https://softgenetics.com/mutationSurveyor_4.php

61. Key Statistics for Acute Myeloid Leukemia (AML). American Cancer Society. – URL: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html#:~:text=AML%20is%20slightly%20more%20common,Rates%20for%20Acute%20Myeloid%20Leukemia.>

62. Cancer Facts & Figures 2020. American Cancer Society. – URL: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html>

63. The International Prognostic Scoring System. Leukemia & Lymphoma Society. – URL: <https://www.lls.org/disease-information/myelodysplastic-syndromes/diagnosis/the-international-prognostic-scoring-system>

64. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndromes Risk Assessment Calculator. MDS Foundation. – URL: <https://www.mds-foundation.org/ipss-r-calculator/>

65. What is the FAB classification of acute myeloid leukemia? Medscape Oncology. – URL: <https://www.medscape.com/answers/2006750-182477/what-is-the-fab-classification-of-acute-myeloid-leukemia>

66. DNA methyltransferase 3 alpha [Homo sapiens (human)]. National Center for Biotechnology Information. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1788>

67. Homo sapiens DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A), RefSeqGene (LRG_459) on chromosome 2. National Center for Biotechnology Information. – URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_029465.2?report=graph&rid=9DEX87AF016\[NG_029465.2\]&tracks=\[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true\]\[key:gene_model_track,CDSProductFeats:false\]\[key:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments|Refseq%20Alignments|Gnomon%20Alignments|Unnamed,shown:false\]&v=113077:113328&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_029465.2?report=graph&rid=9DEX87AF016[NG_029465.2]&tracks=[key:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true][key:gene_model_track,CDSProductFeats:false][key:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments|Refseq%20Alignments|Gnomon%20Alignments|Unnamed,shown:false]&v=113077:113328&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP)