



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.4.007>
УДК 616.155.3092.8-036.8:[6-074.575.113.2]



Кушнерова Е.В.✉, Пахомова И.В., Мигас А.А., Белобокова В.Д., Горбач М.А.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Определение минимальной остаточной болезни при остром миелоидном и ювенильном миеломоноцитарном лейкозе с использованием аллель-специфической ПЦР в реальном времени

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Кушнерова Е.В. – дизайн исследования, валидация аллель-специфической ПЦР в реальном времени, анализ экспериментальных результатов, написание текста статьи; Пахомова И.В. – концепция исследования, проведение высокопроизводительного секвенирования, верификация его результатов методом секвенирования по Сенгеру; Мигас А.А. – концепция исследования, постановка секвенирования и аллель-специфической ПЦР для пациентов с диагнозом ЮММЛ, редактирование текста; Белобокова В.Д. – проведение высокопроизводительного секвенирования, верификация его результатов методом секвенирования по Сенгеру; Горбач М.А. – сбор клинических данных.

Подана: 15.09.2022

Принята: 14.11.2022

Контакты: elizaveta.kushnerova@gmail.com

Резюме

Цель. Разработать методологию мониторинга минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе и ювенильном миеломоноцитарном лейкозе с применением методов высокопроизводительного секвенирования и аллель-специфической ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовались образцы костного мозга пациентов с острым миелоидным лейкозом и ювенильным миеломоноцитарным лейкозом, полученные на момент постановки диагноза и на этапах терапии. Поиск клональных генных мутаций опухолевых клеток проводился методом высокопроизводительного таргетного секвенирования и методом секвенирования по Сенгеру. Определение частоты генных мутаций на этапах терапии проводилось методом полуколичественной аллель-специфической ПЦР в реальном времени.

Результаты. У всех пациентов была найдена по крайней мере одна клональная генная мутация опухолевых клеток, позволяющая проводить мониторинг минимальной остаточной болезни. Во всех случаях лимит количественного обнаружения аллель-специфической ПЦР составил 0,05%, чувствительность в 7/8 случаев составила 0,005% мутантных аллелей. Динамика частоты клональных генных мутаций во всех случаях соответствовала клиническому ответу на терапию, а также динамике других маркеров минимальной остаточной болезни, таких как экспрессия AML1/ETO и количество клеток лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа.

Заключение. Представленный методологический подход позволяет проводить определение минимальной остаточной болезни на молекулярно-генетическом уровне в случае отсутствия стандартных маркеров опухолевых клеток, демонстрируя при этом высокую чувствительность и специфичность.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, аллель-специфическая ПЦР, высокопроизводительное секвенирование, минимальная остаточная болезнь

Lizaveta V. Kushniarova✉, Iryna V. Pakhomava, Alexandr A. Migas, Viktoria D. Belobokova, Maryna A. Horbach
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Evaluation of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid and Juvenile Myelomonocytic Leukemia Using Allele-Specific Real-Time PCR

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Lizaveta V. Kushniarova – design of the study, validation of allele-specific real-time PCR, analysis of experimental results, text writing; Iryna V. Pakhomava – concept of the study, performing high-throughput sequencing and verification of its results by Sanger sequencing; Alexandr A. Migas – concept of the study, performing sequencing and allele-specific real-time PCR for JMML patients, text editing; Viktoria D. Belobokova – performing high-throughput sequencing and verification of its results by Sanger sequencing; Maryna A. Horbach – clinical data collection.

Submitted: 15.09.2022

Accepted: 14.11.2022

Contacts: elizaveta.kushnerova@gmail.com

Abstract

Purpose. To develop an approach for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia using next generation sequencing and allele-specific real-time PCR.

Materials and methods. Bone marrow samples from patients with acute myeloid leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia were obtained at diagnosis and therapy stages. The search for clonal gene mutations in tumor cells was carried out using high-throughput targeted sequencing and Sanger sequencing. Evaluation of gene mutations frequency at therapy stages was carried out by semi-quantitative allele-specific real-time PCR.

Results. At least one clonal gene mutation of tumor cells was found in each case. The limit of quantification of allele-specific PCR was 0.05% in all cases and the sensitivity was 0.005% in 7 out of 8 cases. The change in clonal gene mutations frequency in all cases corresponded to the clinical response, as well as to the dynamics of other markers of minimal residual disease, such as AML1/ETO expression and the number of cells with a leukemia-associated immunophenotype.

Conclusion. The presented approach is suitable for determining minimal residual disease at the genetic level in the absence of standard targets of leukemic cells such as chimeric oncogenes, and demonstrates high sensitivity and specificity.

Keywords: acute myeloid leukemia, juvenile myelomonocytic leukemia, allele-specific PCR, next-generation sequencing, minimal residual disease



■ ВВЕДЕНИЕ

Согласно рекомендациям Европейского лейкемического сообщества, мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) следует проводить как на фенотипическом, так и на молекулярно-генетическом уровне с помощью проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени соответственно [1]. Так как оба метода имеют разную чувствительность и разные биологические мишени, которые могут претерпевать изменения в процессе развития опухоли, использование сочетания данных методов позволяет получать более полную и точную информацию о динамике МОБ. Существует стандартизированный молекулярный метод, позволяющий измерять МОБ по экспрессии химерных онкогенов (PML/RARA, AML1/ETO и др.), которые являются продуктами рекуррентных хромосомных реаранжировок. Однако в 40–50% случаев ОМЛ опухолевые клетки характеризуются отсутствием подобных мутаций [2]. Альтернативным методом, который позволяет проводить мониторинг МОБ в таких случаях, является высокопроизводительное секвенирование, имеющее две стратегии применения. Первая стратегия основана на определении мутационного профиля опухолевых клеток на каждом этапе терапии с помощью таргетного секвенирования панели генов, мутации которых ассоциированы с патогенезом ОМЛ. Возможность следить за эволюцией опухолевого клона и приобретением новых мутаций является преимуществом данного подхода, однако увеличение количества анализируемых мишеней приводит к снижению глубины их покрытия. Следствием малого покрытия является низкая чувствительность обнаружения мутаций – от 5% до 0,1% VAF (VAF – англ. variant allele frequency, частота аллельного варианта) [3–5].

Вторая стратегия заключается в поиске клональной мутации с помощью секвенирования панели генов перед началом терапии и использовании данной мутации в качестве маркера остаточных опухолевых клеток. В дальнейшем на каждой точке мониторинга МОБ проводится высокопроизводительное ампликонное секвенирование геномного участка, содержащего данную мутацию, и определение ее частоты. Преимуществом данного подхода является крайне высокая чувствительность (от 0,01% до 0,001% VAF), которая обеспечивается глубоким покрытием исследуемого фрагмента гена (более 20 000 прочтений) [6–9]. Однако данный подход является дорогостоящим, так как требует большого расхода реагентов для каждого пациента на каждой точке мониторинга МОБ. В связи с этим он недоступен для большинства лабораторий, имеющих необходимые условия для проведения высокопроизводительного секвенирования.

В данной статье представлен новый методологический подход, заключающийся в обнаружении клональных мутаций опухолевых клеток с помощью таргетного секвенирования и их дальнейшем использовании в качестве мишеней для мониторинга МОБ методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени (АСО-ПЦР). Метод АСО-ПЦР лежит в основе определения МОБ при остром лимфобластном лейкозе по реаранжировке генов VDJ, специфичной для лейкозного клона [10]. Данный метод адаптирован к использованию для определения частоты соматических генных мутаций в образцах костного мозга пациентов с ОМЛ.

Разработанный методологический подход к исследованию минимальной остаточной болезни актуален в случае отсутствия в генотипе лейкозных клеток рекуррентных хромосомных aberrаций, приводящих к появлению химерных онкогенов,

и при условии обнаружения клональных генных мутаций. Также в статье продемонстрирована возможность применения данного подхода для мониторинга динамики опухолевого клона после трансплантации гемопоэтической стволовой клетки при ювенильном миеломоноцитарном лейкозе (ЮММЛ).

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать методологию мониторинга минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе и ювенильном миеломоноцитарном лейкозе с применением методов высокопроизводительного секвенирования и аллель-специфической ПЦР в реальном времени.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты и образцы

В данном исследовании использовались образцы костного мозга пациентов центра детской онкологии, гематологии и иммунологии с диагнозом ОМЛ и ЮММЛ (табл. 1), полученные на момент постановки диагноза и на этапах терапии, а также образцы периферической крови здоровых доноров. Выделение фракции мононуклеарных клеток проводилось на градиенте плотности Histopaque-1,077 (Sigma-Aldrich, США). Выделение геномной ДНК из мононуклеарных клеток проводилось методом фенол-хлороформной экстракции.

Секвенирование

Поиск мутаций в опухолевых клетках пациентов с диагнозом ОМЛ проводился методом высокопроизводительного секвенирования на таргетной миелоидной панели Qiaseq, включающей 141 ген (Qiagen, Нидерланды), на приборе MiSeq (Illumina, США). Биоинформатический анализ проводился с помощью GeneGlobe Analysis pipeline (Qiagen, Нидерланды). Для дальнейшего анализа отбирались последовательности с покрытием не менее 500 прочтений на нуклеотид. Вызов вариантов

Таблица 1
Клинические характеристики пациентов
Table 1
Clinical characteristics of patients

Пациент	Диагноз	Бласты в костном мозге на момент постановки диагноза, %	Маркер МОБ	ТГСК	Событие/исход
P1	ОМЛ M2	40,00	AML1/ETO	Нет	Жив в ремиссии
P2	ОМЛ M2	69,50	AML1/ETO	Нет	Жив в ремиссии
P3	ОМЛ M2	55,00	Нет	Нет	Жив в ремиссии
P4	ОМЛ M1	68,50	FLT3-ITD	Да	Рецидив / жив в ремиссии
P5	ОМЛ M2	57,75	Нет	Нет	Рецидив/умер
P6	ОМЛ M2	47,75	AML1/ETO	Нет	Жив в ремиссии
P7	ЮММЛ	11,25	Нет	Да	Отторжение трансплантата / умер
P8	ЮММЛ	Нет данных	Нет	Да	Жив в ремиссии

Примечание: ТГСК – трансплантация гемопоэтической стволовой клетки.



осуществлялся при частоте альтернативного варианта не менее 1%. Аннотация вариантов была выполнена с использованием программ Annovar и VariantStudio (Illumina, США). Для дальнейшего исследования отбирали варианты, отвечающие следующим критериям патогенности:

- 1) частота встречаемости в мировой и европейской популяциях менее 1%;
- 2) локализация варианта в экзоне или сайте сплайсинга;
- 3) наличие информации о клинической значимости варианта.

В случае отсутствия данных о патогенности учитывался характер мутации. Варианты, представляющие собой нонсенс-мутации и инделы со сдвигом рамки считывания, считались патогенными. Найденные варианты верифицировались секвенированием по Сенгеру. В случае ЮММЛ поиск мутаций выполнялся методом секвенирования по Сенгеру и был ограничен следующими генами: NRAS (2-й, 3-й экзоны), RUNX1 (3–8-й экзоны), KRAS (2-й, 3-й экзоны), KIT (8, 11, 12 и 17-й экзоны), PTPN11 (3, 5 и 10-й экзоны), SF3B1 (13–16-й экзоны), U2AF1 (2-й и 6-й экзоны). Исключение зародышевых вариантов не проводилось в связи с отсутствием образцов здоровой ткани пациентов.

Получение плазмидных стандартов

Для получения плазмидных стандартов мутантных и диких аллелей соответствующие участки геномной ДНК из образцов костного мозга пациентов были амплифицированы и клонированы по ТА-концам в вектор pTZ57R/T. Трансформация бактериальных клеток проводилась кальций-хладовым методом, нуклеотидная последовательность вставок определялась секвенированием по Сенгеру.

Аллель-специфическая ПЦР в реальном времени

Для каждой мутации подбирались три праймера:

- 1) праймер А, комплементарный мутантной последовательности;
- 2) праймер В, комплементарный последовательности дикого типа;
- 3) праймер С, общий для мутантного и дикого аллеля.

В случае однонуклеотидных замен праймеры А и В различались между собой 3'-концевым нуклеотидом. Для увеличения специфичности отжига в праймеры А и В были внесены одинаковые однонуклеотидные замены в положении 4, 5 или 6 с 3'-конца. Состав реакционной смеси: 7,5 мкл QuantiTect SYBR Green PCR MasterMix (Qiagen, Нидерланды); 0,75 мкл 6 мкМ смеси праймеров (А + С – амплификация мутантного аллеля, В + С – амплификация дикого аллеля); 300 нг ДНК. Программа амплификации: 95 °С – 15 мин., 50 циклов: 95 °С – 10 сек., Та °С – 45 сек. Программа анализа кривых плавления ПЦР-продуктов: подъем с 65 °С до 95 °С с шагом 0,1 °С/сек. Все образцы амплифицировались в триплетах. Определение доли мутантных аллелей от всех аллелей гена в образце проводилось по следующей формуле [11]:

$$VAF \% = \frac{1}{(E_{mut}^{CT_{mut}} / E_{wt}^{CT_{wt}} + 1)} \times 100\%,$$

где E_{mut} – эффективность амплификации мутантного аллеля;

E_{wt} – эффективность амплификации дикого аллеля;

CT_{mut} – пороговый цикл амплификации мутантного аллеля;

CT_{wt} – пороговый цикл амплификации дикого аллеля.

Специфичность мутантных праймеров оценивалась в реакции с ДНК здоровых доноров. Праймеры считались достаточно специфичными в том случае, если разница между пороговыми циклами специфической (праймеры В + С) и неспецифической (праймеры А + С) амплификации составляла более 10 циклов.

Эффективность амплификации аллелей дикого и мутантного типа определялась по результатам АСО-ПЦР с использованием в качестве матрицы 10-кратных серийных разведений плазмидных стандартов мутантных и диких аллелей в воде в диапазоне от 10^6 до 10^0 копий. Стандартные кривые для определения аналитических характеристик АСО-ПЦР строились по результатам амплификации 10-кратных разведений плазмидных стандартов мутантных аллелей в геномной ДНК здоровых доноров: 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , 5×10^0 мутантных копий на 10^5 копий всех аллелей анализируемого гена (50%, 5%, 0,5%, 0,05% и 0,005% мутантных аллелей соответственно).

Для определения лимита количественного обнаружения (LOQ) и чувствительности (S) использовались критерии руководства ESG-MRD-ALL по определению МОБ методом АСО-ПЦР по реаранжировкам Ig/TCR [10].

Статистика

Сравнение стандартных кривых амплификации проводилось методом ковариационного анализа ANCOVA (GraphPad Prism 6, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мутационный профиль опухолевых клеток на момент постановки диагноза

Согласно результатам высокопроизводительного секвенирования, все случаи ОМЛ характеризовались присутствием по крайней мере одной патогенетически значимой мутации в опухолевых клетках на момент постановки диагноза (рис. 1).

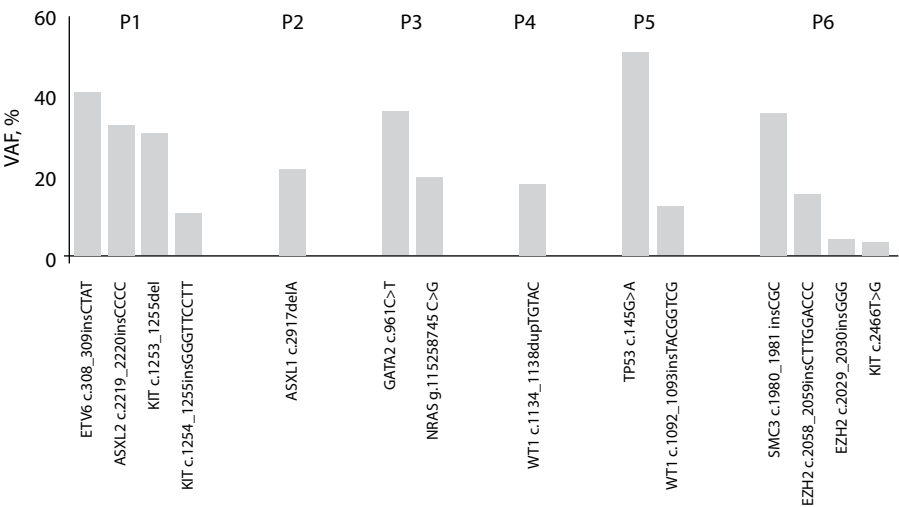


Рис. 1. Частоты мутаций опухолевых клеток у пациентов с ОМЛ на момент постановки диагноза
Fig. 1. Variant allele mutations frequencies in patients with acute myeloid leukemia



У пациентов с ЮММЛ были обнаружены следующие мутации: PTPN11 с.227A>G у пациента P7, RUNX1 с.611G>A у пациента P8.

Таблица 2
Последовательности аллель-специфических праймеров
Table 2
Sequences of allele-specific primers

Пациент/мутация	Праймеры (последовательность 5'-3')
P1/ETV6 c.308_309insCTAT	A:AAAGAGGACTTTCGCTAT CTAT B:ACTTTCGCTATCGATCTCC C: CTCACTGTTGGGATTTCCTG
P1/ASXL2 c.2219_2220insCCCC	A:ACAGGGTAAAAGCTCTCTC GGG B:CCACAGGGTAAAAGCTCTCTC GTA C: CTGCTAGAGGAGGCAGTCCA
P1/KIT c.1253_1255del	A:AAACCAGAAATCCTGACTTACA B:AACCAGAAATCCTGACTTACG C: GGACAAAAATACCAATCTATTGTG
P1/KIT c.1254_1255insGGGTTCTT	A:GAAATCCTGACTTAC GGGTT B:CAGAAATCCTGACTTAC GACA C: TCTCACCTCTGCTCAGTTC
P2/ASXL1 c.2917delA	A:GTCCACCTGTTGACAGTAACG B:GTCCACCTGTTGACAGTA ACT C: GACAGCCTTACTTCACTCTGGAC
P3/GATA2 c.961C>T	A:TGCCCATTCATCTTGTGGTT GAA B:TGCCCATTCATCTTGTGGTT GAG C: CGAGAACTTGCCGGTTAAGCA
P4/WT1 c.1134_1138dupTGATC	A:GTAGCCCCGACTCT TGTA CTGTAC B:GCCCCGACTCT TGTA CTCGGTC C: GCTGTGCATCTGTAAGTGGGAC
P4/TP53 c.145G>A	A:CGGCGGCCCTGCA TCAA B:CGGCGGCCCTGCA TCA G C: AGCCAGACGGAACCGTAG
P5/WT1 c.1092_1093insTACGGTCG	A:ACTCTTGACGGTC TACGGT B:GACTCTTGACGGTC GGCATC C: TGTGCTTCTGCTGTGCAT
P6/SMC3 c.1980_1981insCGC	A:TGACCAAGTCAGCCA ACGC B:ATGACCAAGTCAGCCA ACGG C: GCTTTGCTTCAAGTTCACCTAG
P6/EZH2 c.2058_2059insCTTGACCC	A:CTGATGCCCTGAAGTATCT C B:CTGATGCCCTGAAGTATCT CG C: TGAAGCTAAGGCAGCTGTTTC
P6/EZH2 c.2029_2030insGGG	A:TCCTTCCTGTTGTTCTGAT G B:CTCCTTCCTGTTGTTCTGAT A C: AGGAGGTAGCAGATGTCAAG
P6/KIT c.2466T>G	A:TCACGTTTCCTTTAACCAC TAC B:CTCACGTTTCCTTTAACCAC TAA C: CTCCTTACTCATGGTCGGATCAC
P7/PTPN11 c.227A>G	A:TTCCATGTAATACTGGACGA ACC B:GTTCCATGTAATACTGGACGA ACT C: CGACGTGGAAGATGAGATCTG
P8/RUNX1_ c.611G>A	A:GATGGGCCCCGAGAA ACTCA B:GATGGGCCCCGAGAA ACTCG C: GGAATCTGAGACATGGTCCCTGAG

Примечания: **полужирный** – мутантная последовательность; *курсив* – замена для увеличения специфичности отжига праймера.

Специфичность и эффективность аллель-специфических праймеров
Для каждой мутации были подобраны аллель-специфические праймеры, последовательности которых представлены в табл. 2.

В реакции с ДНК здоровых доноров 14 из 16 подобранных пар праймеров продемонстрировали разницу между пороговыми циклами специфической (праймеры В + С) и неспецифической (праймеры А + С) амплификации более 15 циклов (табл. 3). В случаях, в которых мутация была представлена инсерцией или дупликацией, наблюдалась более высокая специфичность амплификации по сравнению с однонуклеотидными заменами.

Так как образцы здоровой ткани пациентов не были доступны для анализа, для определения происхождения аллельных вариантов, имеющих, согласно данным высокопроизводительного секвенирования, частоту более 40%, была проведена амплификация ДНК костного мозга пациентов, полученного на контрольных точках терапии. Все мутации, кроме мутации гена TP53 у пациента P5, демонстрировали изменение своей частоты более чем в 10 раз и на основании этого были признаны соматическими. Мутация TP53 у пациента P5, вероятно, является зародышевой, так как ее частота оставалась неизменной на всех точках и составляла около 50%.

В случае наличия нескольких вариантов в качестве маркеров МОБ были выбраны варианты с наибольшим значением VAF: мутация гена ASXL2 у пациента P1, GATA2 у пациента P3, SMC3 у пациента P6.

Таблица 3
Пороговые значения амплификации ДНК здоровых доноров с аллель-специфическими праймерами
Table 3
Threshold cycle values for healthy donors DNA amplification with allele-specific primers

Пациент	Мутация	Ct _{В+С} (среднее±SD)	Ct _{А+С} (среднее±SD)	ΔCt
P1	ETV6 c.308_309insCTAT	21,63±0,16	25,09±0,69	3,46
	ASXL2 c.2219_2220insCCCC	19,92±0,35	41,42±1,7	21,5
	KIT c.1253_1255del	20,63±0,89	27,62±1,22	6,99
	KIT c.1254_1255insGGGTTCCTT	23,94±0,41	–	–
P2	ASXL1 c.2917delA	22,32±0,81	38,57±1,61	16,25
P3	GATA2 c.961C>T	18,13±0,22	37,02±1,25	18,89
	NRAS_gDNA115258745_C>C/G	21,09±0,39	38,59±2,43	18,36
P4	WT1 c.1134_1138dupTGAC	22,25±0,41	42,83±2,48	20,58
P5	TP53 c.145G>A	27,93±0,54	47,83±0,74	19,9
	WT1 c.1092_1093insTACGGTCG	23,23±0,60	–	–
P6	SMC3 c.1980_1981insCGC	33,19±0,10	–	–
	EZH2 c.2058_2059insCTTGACCC	25,42±0,32	–	–
	EZH2 c.2029_2030insGGG	23,22±0,20	–	–
	KIT c.2466T>G	28,75±0,35	–	–
P7	PTPN11 c.227A>G	24,6±0,48	41,18±0,56	16,58
P8	RUNX1_ c.611G>A	18,41±0,23	33,94±0,97	15,53

Примечания: Ct – пороговый цикл амплификации; SD – стандартное отклонение.



Таблица 4

Параметры стандартных кривых амплификации 10-кратных разведений (10^6 – 10^0) плазмидных стандартов диких и мутантных аллелей в воде

Table 4

Parameters of standard amplification curves for 10-fold dilutions (10^6 – 10^0) of wild and mutant allele plasmid standards in water

Пациент/ мишень	Амплификация аллеля дикого типа (B + C)				Амплификация аллеля мутантного типа (A + C)				P value
	Slope	R ²	y-int	E	Slope	R ²	y-int	E	
P1/ASXL2	–3,64	0,99	35,49	1,88	–3,53	0,99	43,21	1,92	0,36
P2/ASXL1	–3,31	0,99	32,50	2,00	–3,35	0,99	34,66	1,99	0,77
P3/GATA2	–3,55	0,99	36,93	1,91	–3,46	0,99	36,67	1,95	0,36
P4/WT1	–3,22	0,99	38,55	2,04	–3,20	0,99	36,27	2,06	0,47
P5/WT1	–3,26	0,99	33,91	2,02	–3,00	0,99	29,86	2,15	0,001
P6/SMC3	–3,56	0,99	35,11	1,91	3,60	0,99	35,30	1,89	0,47
P7/PTPN11	–3,54	0,99	35,32	1,93	–3,76	0,99	39,66	1,84	0,14
P8/RUNX1	–4,16	0,99	41,77	1,74	–4,02	0,99	41,52	1,77	0,29

Примечания: Slope – наклон стандартной кривой; R² – коэффициент детерминации; y-int – интерсепт; E – эффективность амплификации.

Так как аллель-специфические праймеры имеют различия в нуклеотидной последовательности, эффективность амплификации дикого и мутантного аллелей также может различаться. В этом случае необходимо учитывать данный параметр при определении доли мутантных аллелей в клиническом образце.

Статистически значимая разница в наклоне стандартных кривых амплификации мутантного и дикого аллеля отсутствовала в 8/9 парах праймеров, что позволяет считать эффективность обеих реакций в данных парах одинаковой (табл. 4).

Разность в эффективности амплификации аллелей гена WT1 у пациента P5 связана, вероятно, с большой разницей в значениях свободной энергии образования димеров у праймера A (–6,7 ккал/моль) и праймера B (–2,0 ккал/моль). Более низкая эффективность амплификации мутантного аллеля является следствием того, что праймер A характеризуется большей вероятностью образования димеров. Для остальных пар праймеров разница свободной энергии образования димеров не превышает –0,5 ккал/моль. При условии одинаковой свободной энергии образования вторичных структур можно допустить, что оба праймера позволяют амплифицировать мишени с равной эффективностью и не учитывать данный параметр при определении частоты мутации в клиническом образце.

Аналитические характеристики аллель-специфической ПЦР

Для каждой мутации была построена калибровочная кривая по 10-кратным серийным разведениям плазмидных стандартов в ДНК здоровых доноров. Реакция с ДНК здорового донора ставилась как контроль неспецифической амплификации (рис. 2).

Чувствительность составила 0,005% VAF во всех случаях, кроме мутации RUNX1 у пациента P8 (0,05%). Лимит количественного определения составил не менее 0,05% VAF во всех случаях (табл. 5).

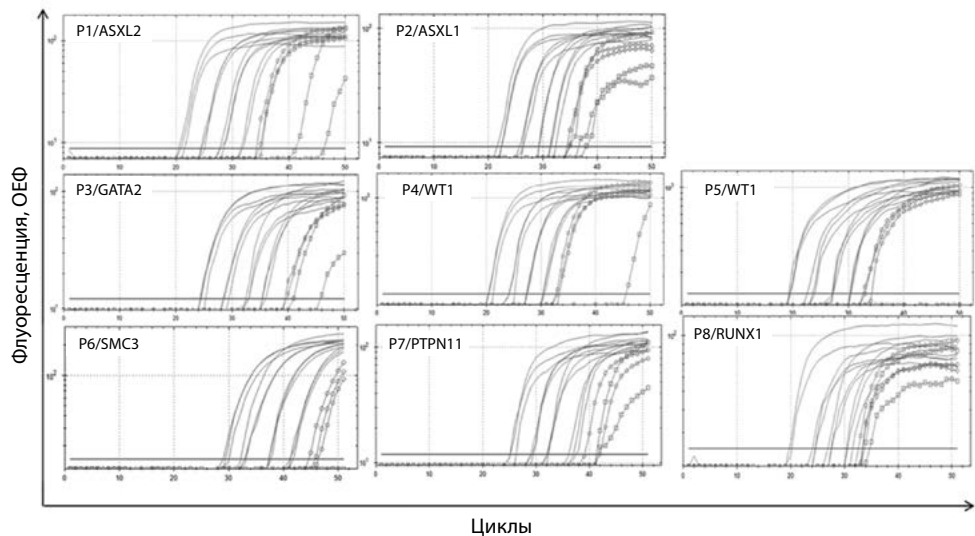


Рис. 2. Кривые амплификации разведений плазмидных стандартов мутантных аллелей в геномной ДНК здоровых доноров

Примечания: круги – кривые амплификации разведения с VAF 0,005%; квадраты – неспецифическая амплификация ДНК здорового донора.

Fig. 2. Amplification of dilutions of mutant allele standards in healthy donors DNA

Notes: circles – amplification of the dilution with VAF 0.005%; squares – non-specific amplification of healthy donor DNA.

Таблица 5
Характеристики стандартных кривых амплификации 10-кратных разведений плазмидных стандартов мутантных аллелей в ДНК здоровых доноров
Table 5
Parameters of standard amplification curves for 10-fold dilutions of mutant allele plasmid standards in healthy donors DNA

Пациент/ мишень	LOQ, % аллели	S, % аллели	Среднее Ct(±SD) LOQ	Наименьшее Ct ампли- фикации ДНК донора	Slope	R ²
P1/ASXL2	0,005	0,005	34,67±0,47	41,13	-3,43	0,99
P2/ASXL1	0,05	0,005	31,82±0,60	36,79	-3,20	0,98
P3/GATA2	0,05	0,05	35,62±0,32	40,97	-3,75	0,99
P4/WT1	0,005	0,005	33,08±0,28	45,69	-3,08	0,99
P5/WT1	0,005	0,005	33,31±0,72	–	-3,47	0,99
P6/SMC3	0,05	0,005	41,46±0,35	–	-3,98	0,99
P7/PTPN11	0,05	0,005	36,86±0,71	41,26	-3,71	0,98
P8/RUNX1	0,05	0,05	30,94±0,63	33,82	-3,56	0,98

Примечания: LOQ – лимит количественного определения; S – чувствительность.

**Использование соматических мутаций опухолевых клеток в качестве маркеров минимальной остаточной болезни у пациентов с ОМЛ и ЮММЛ**

Изменение частоты мутантных аллелей в образцах костного мозга пациентов в ответ на терапию определялось с помощью полуколичественной АСО-ПЦР в реальном времени. Так как в кариотипе опухолевых клеток пациентов P1, P2 и P6 была обнаружена транслокация t(8;21), для них мы сравнили динамику МОБ по частоте клональной генной мутации и по экспрессии химерного онкогена AML1/ETO. Во всех трех случаях паттерны экспрессии AML1/ETO и частоты генной мутации совпадали. У пациентов P1 и P2 (рис. 3) после первого курса консолидации наблюдалась экспрессия AML1/ETO, тогда как генная мутация не детектировалась, что может объясняться более высокой чувствительностью стандартного метода определения экспрессии AML1/ETO по сравнению с АСО-ПЦР (0,001% клеток и 0,01% клеток соответственно, при условии что клональная генная мутация представлена в гетерозиготном состоянии).

У пациента P6 (рис. 3) экспрессия AML1/ETO и мутация SMC3 персистировали на качественном уровне в течение года после окончания терапии, при этом, согласно результатам проточной цитометрии, пациент достиг полной ремиссии с отрицательной МОБ (менее 0,01% опухолевых клеток) после второго курса консолидации (на графике не указано). Персистенция мутации SMC3 и экспрессии AML1/ETO в ремиссии может быть объяснена тем, что данные мутации возникали tandemно в клоне одной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК), потомки которой после приобретения дополнительных мутаций подверглись злокачественной трансформации. Клон данной прелейкемической ГСК оказался устойчивым к терапии и продолжил персистировать в ремиссии. Данное предположение подтверждается многочисленными доказательствами того, что мутации элементов когезинового комплекса, к которому относится белок SMC3, являются наиболее ранними событиями в патогенезе ОМЛ [12–15]. Также известно, что у пациентов в ремиссии с t(8;21)-положительным ОМЛ может наблюдаться экспрессия AML1/ETO в ГСК, зрелых миелодных клетках и В-клетках, что свидетельствует о персистенции прелейкемических ГСК в условиях терапии и сохранении ими способности к нормальной дифференциации [15].

На момент постановки диагноза у пациента P4 (рис. 3) была обнаружена мутация FLT3-ITD и инсерция в гене WT1. Согласно результатам фрагментного анализа, после индукции и на всех последующих контрольных точках FLT3-ITD не детектировалась (чувствительность 1%). После индукции и первого курса консолидации частота мутации WT1 снизилась в 1000 раз относительно начала терапии, но затем продолжила медленный рост вплоть до проведения ТГСК (133–281 день) и детектировалась спустя месяц после трансплантации (день 29). На 468-й день после проведения ТГСК в костном мозге вновь была обнаружена мутация WT1, частота которой на 945-й день достигла 43%. Параллельно с этим был отмечен рост популяции клеток с фенотипом миелобластов ранней стадии дифференцировки (CD45^{low}CD34⁺CD117⁺CD33⁺HLA-DR⁺), однако количество бластов оставалось в пределах 5%. Рецидив был диагностирован спустя 22,5 месяца после обнаружения мутации WT1 в посттрансплантационном периоде (день 1151). Рост мутации WT1 после первой ТГСК был детектирован раньше начала снижения донорского химеризма, прогрессивное падение которого началось на 736-й день после ТГСК. После проведения повторной ТГСК мутация WT1 не детектировалась.

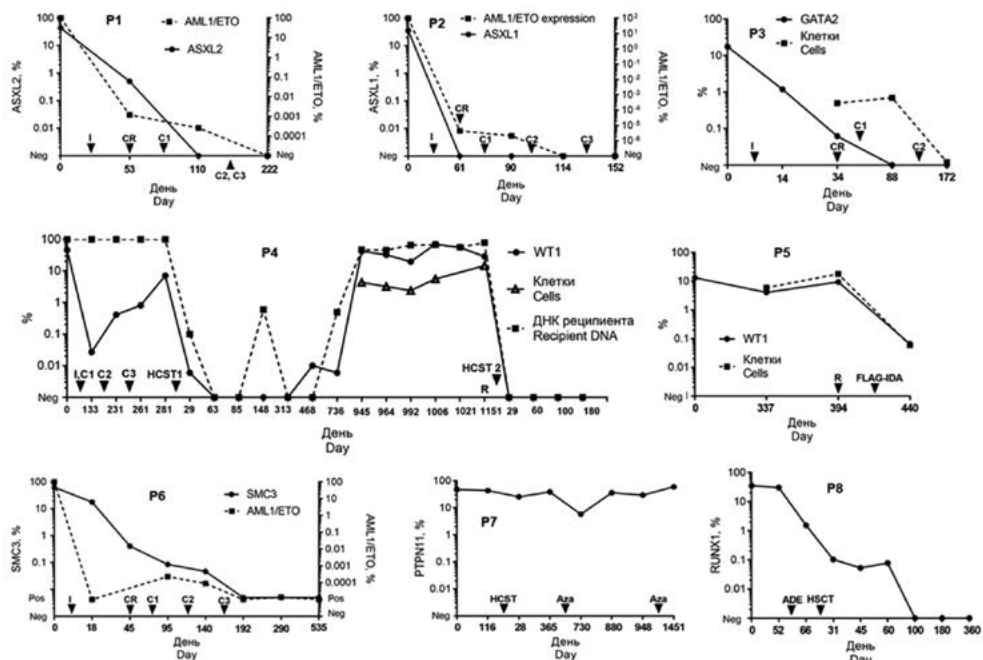


Рис. 3. Динамика частоты соматических мутаций, минимальной остаточной болезни и донорского химеризма у пациентов с ОМЛ и ЮММЛ

Примечания: I – индукция; CR – полная ремиссия; C – консолидация; HCST – трансплантация гемопоэтической стволовой клетки; R – рецидив; FLAG-IDA – противорецидивная химиотерапия; Aza – 5-азациитидин; ADE – цитарабин/даунорубицин/этопозид.

Fig. 3. Dynamics of VAF of gene mutations, minimal residual disease and donor chimerism in patients with AML and JMML

Notes: I – induction; CR – complete remission; C – consolidation; HCST – hematopoietic stem cell transplantation; R – relapse; FLAG-IDA – anti-relapse chemotherapy; Aza – 5-azacitidine; ADE – cytarabine/daunorubicin/etoposide.

Известно, что белок WT1 является компонентом системы эпигенетической регуляции IDH1/2-TET2, обеспечивающим физическое взаимодействие деоксигеназы TET2 с генами-мишенями [15]. Мутации генов TET2 и IDH1/2, как и поломки генов когезинового комплекса, возникают одними из первых в процессе развития ОМЛ [13]. В свою очередь, мутации гена WT1 могут возникать на разных этапах развития опухоли, однако в случае пациента P4 мутация является прелейкемической, так как ее персистенция на уровне 40–50% при нормальном количестве бластов в период от начала отторжения трансплантата до рецидива (736–1151 сут.) свидетельствует о клональном гемопоэзе. Данная мутация, вероятно, подавляет процесс созревания клеток миелоидного ряда, о чем свидетельствует рост популяции клеток с фенотипом миелобластов ранней стадии дифференцировки (945–1151 сут.), однако самой



по себе ее недостаточно для злокачественной трансформации. Так как опухолевый клон при рецидиве не имел мутации FLT3-ITD, можно сделать вывод, что рецидив возник в ходе приобретения новых мутаций потомками прелейкемической ГСК с мутацией WT1, которая дала начало первоначальному опухолевому клону [16, 17].

В случае пациента P3 (рис. 3) после первого курса консолидации (день 88) мутация гена GATA2 не детектировалась, тогда как количество опухолевых клеток по данным проточной цитометрии составило 0,7%. Данное расхождение может объясняться тем, что изменение частоты мутации GATA2 отражает динамику отдельного субклона опухолевых клеток.

У пациента P5 (рис. 3) динамика мутации WT1 совпадает с динамикой количества лейкозных клеток, что дает основания полагать, что данная мутация является клональной и представлена во всех опухолевых клетках.

Пациенту P7 с диагнозом ЮММЛ (рис. 3) была проведена аллогенная неродственная ТГСК, на 28-е сут. после которой наблюдалось снижение частоты мутантного аллеля RTPN11 в 2 раза. В течение года после трансплантации произошло полное отторжение донорского костного мозга, и частота мутации вернулась на прежний уровень. После четырех курсов монотерапии 5-азациитидином наблюдалось снижение VAF RTPN11 в 6 раз по отношению к предыдущей точке (365-е сутки), однако спустя 5 месяцев после завершения последнего блока 5-азоцитидина частота мутации RTPN11 вернулась на прежний уровень (880-е сутки). Далее наблюдалась прогрессия заболевания с увеличением количества бластов в костном мозге с 1% (948-е сутки) до 7,25% (день 1451) и выявлением на последней точке наблюдения популяции клеток (8%) с фенотипом миелобластов с aberrантной экспрессией CD7 и CD64. Динамика частоты мутации RTPN11 также отражает прогрессию, так как количество копий мутантного аллеля увеличилось в 2 раза на последней точке относительно предыдущей. Динамика мутации RUNX1 у пациента P8 (рис. 3) соответствует наблюдавшемуся клиническому ответу на химиотерапию и последующую ТГСК.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в клинической практике принято проводить мониторинг МОБ при ОМЛ одновременно на фенотипическом уровне с использованием проточной цитометрии и на молекулярно-генетическом уровне с использованием ПЦР в режиме реального времени. Так как стандартный метод определения МОБ с помощью ПЦР основан на измерении уровня экспрессии химерных онкогенов, данный анализ возможен только в случае присутствия в опухолевых клетках соответствующих хромосомных aberrаций. В настоящее время высокопроизводительное секвенирование активно внедряется в клиническую практику как молекулярный метод оценки МОБ у пациентов, не имеющих рекуррентных хромосомных реаранжировок. Метод основан на определении частоты клональных мутаций лейкозных клеток на этапах терапии. Так как чувствительность секвенирования зависит от глубины покрытия анализируемого геномного участка, обнаружение остаточных опухолевых клеток данным методом требует большого расхода дорогостоящих реагентов, что ограничивает его распространение.

В данной статье описан новый методологический подход к определению МОБ при ОМЛ и ЮММЛ, сочетающий в себе преимущества методов высокопроизводительного секвенирования и ПЦР в реальном времени. Поиск клональных мутаций

проводится путем высокопроизводительного таргетного секвенирования ДНК костного мозга, полученного перед началом терапии. Следует отметить, что с практической точки зрения подобный скрининг при ОМЛ оправдан не только тем, что он позволяет проводить поиск потенциальных маркеров МОБ, но и тем, что также позволяет определять наличие мишеней таргетной терапии (например, IDH1/2, KIT, NRAS, TP53 ингибиторов) и мутаций, имеющих прогностическое значение [18–20]. Метод АСО-ПЦР в реальном времени позволяет проводить мониторинг МОБ по изменению частот клональных мутаций и демонстрирует при этом высокую чувствительность, сравнимую с чувствительностью секвенирования с глубоким покрытием.

АСО-ПЦР предполагает определение доли копий мутантного аллеля от всех копий данного гена в образце, что требует амплификации как аллеля мутантного типа, так и аллеля дикого типа. Так как аллель-специфические праймеры имеют различия в последовательности, потенциально они могут амплифицировать свои мишени с разной эффективностью, что впоследствии может привести к искажению значения частоты мутации в клиническом образце. В данной работе нами показано, что различие в один нуклеотид не влияет на эффективность амплификации, однако при подборе пары аллель-специфических праймеров следует учитывать разницу в значении свободной энергии образования вторичных структур.

В данной работе оценку аналитических характеристик АСО-ПЦР мы проводили с использованием плазмидных стандартов мутаций. Причиной этого являлось недостаточное количество материала для построения калибровочных кривых по серийным разведениям диагностической ДНК в ДНК здоровых доноров. Тем не менее, наличие достаточного количества диагностической ДНК позволяет определять чувствительность и предел количественного обнаружения без создания плазмидных стандартов, так как частота мутантного аллеля в данном образце ДНК известна по результатам секвенирования. Предлагаемый нами подход является полуколичественным, однако амплификация серийных разведений диагностической ДНК одновременно с анализируемым клиническим образцом позволит определять содержание мутантного аллеля количественно.

Предлагаемый методологический подход имеет ряд ограничений. Во-первых, мутации, имеющие VAF около 50%, требуют подтверждения их соматического происхождения. Во-вторых, при мониторинге МОБ по конкретной мутации необходимо учитывать время ее возникновения в процессе развития опухоли. Мутации, имеющие высокую частоту, могут являться прелейкемическими и иметь различную динамику в период ремиссии. Они могут персистировать на низкой частоте в течение длительного времени, как в случае мутации SMC3 у пациента P4, либо приводить к появлению клонального гемопоэза без или с последующим рецидивом, как в случае мутации WT1 у пациента P6. Что интересно, в исследовании Kim et al. (2021) была выявлена связь между персистенцией какой-либо мутации в течение месяца после ТГСК (как было в случае пациента P4) и повышенным риском развития рецидива [3]. Тем не менее, можно подтвердить прелейкемический характер мутации экспериментально путем секвенирования ДНК дифференцированных клеток миелоидного происхождения.

Помимо МОБ при ОМЛ представленный подход также позволяет оценивать динамику опухолевого клона при ЮММЛ. Так как спектр мутаций при ЮММЛ ограничен небольшой группой генов, их скрининг можно проводить методом секвенирования по Сенгеру, который доступен в большинстве диагностических лабораторий.



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный и представленный в данной статье методологический подход к определению МОБ при ОМЛ и ЮММЛ позволяет проводить мониторинг динамики опухолевого клона с использованием клональных генных мутаций в качестве маркеров методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени. Данный подход актуален в тех случаях, когда анализ МОБ стандартным молекулярно-генетическим методом по экспрессии химерных онкогенов недоступен в связи с отсутствием мишеней. Реализуемая в рамках представленного методологического подхода технология исследования является более доступной с экономической точки зрения альтернативой высокопроизводительного секвенирования с глубоким покрытием, которое также используется для мониторинга МОБ при ОМЛ по изменению частоты клональных мутаций опухолевых клеток.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Heuser M, Freeman S.D., Ossenkoppele G.J. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021;138(26):2753–2767. doi: 10.1182/blood.2021013626
2. Ravandi F, Walter R.B., Freeman S.D. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018;2(11):1356–1366. doi: 10.1182/bloodadvances.2018016378
3. Kim H.-J., Kim Y., Kang D. Prognostic value of measurable residual disease monitoring by next-generation sequencing before and after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2021;11(6). doi: 10.1038/s41408-021-00500-9
4. Press R.D., Eickelberg G., Froman A. Next-generation sequencing-defined minimal residual disease before stem cell transplantation predicts acute myeloid leukemia relapse. *Am J Hematol*. 2019;94(8):902–912. doi: 10.1002/ajh.25514
5. Parkin B., Londoño-Joshi A., Kang Q., Tewari M., Rhim A.D., Malek S.N. Ultrasensitive mutation detection identifies rare residual cells causing acute myelogenous leukemia relapse. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3484–3495. doi: 10.1172/JCI91964
6. Zhou Y., Othus M., Walter R.B., Estey E.H., Wu D., Wood B.L. Deep NPM1 Sequencing Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Improves Risk Assessment in Adults with NPM1-Mutated AML. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(8):1615–1620. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.04.017
7. Heuser M., Heida B., Büttner K. Posttransplantation MRD monitoring in patients with AML by next-generation sequencing using DTA and non-DTA mutations. *Blood Adv*. 2021;5(9):2294–2304. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004367
8. Patkar N., Kakirde C., Shaikh A.F. Clinical impact of panel-based error-corrected next generation sequencing versus flow cytometry to detect measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*. 2021;35(5):1392–1404. doi: 10.1038/s41375-021-01131-6
9. Yoest J.M., Shirai C.L., Duncavage E.J. Sequencing-Based Measurable Residual Disease Testing in Acute Myeloid Leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:1–10. doi: 10.3389/fcell.2020.00249
10. Van der Velden V.H.J., Cazzaniga G., Schrauder A. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604–611. doi: 10.1038/sj.leu.2404586
11. Germer S., Holland M.J., Higuchi R. High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res*. 2000;10(2):258–266. doi: 10.1101/gr.10.2.258
12. Viny A.D., Ott C.J., Spitzer B. Dose-dependent role of the cohesin complex in normal and malignant hematopoiesis. *J Exp Med*. 2015;212(11):1819–1832. doi: 10.1084/jem.20151317
13. Corces-Zimmerman M.R., Hong W.J., Weissman I.L., Medeiros B.C., Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2548–2553. doi: 10.1073/pnas.1324297111
14. Mazumdar C., Shen Y., Xavy S. Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2015;17(6):675–688. doi: 10.1016/j.stem.2015.09.017
15. Mullenders J., Aranda-Orgilles B., Lhoumaud P. Cohesin loss alters adult hematopoietic stem cell homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasms. *J Exp Med*. 2015;212(11):1833–1850. doi: 10.1084/jem.20151323
16. Greif P.A., Hartmann L., Vosberg S. Evolution of cytogenetically normal acute myeloid leukemia during therapy and relapse: An exome sequencing study of 50 patients. *Clin Cancer Res*. 2018;24(7):1716–1726. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2344
17. Vosberg S., Hartmann L., Metzeler K.H. Relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation is associated with gain of WT1 alterations and high mutation load. *Haematologica*. 2018;103(12):e581–e584. doi: 10.3324/haematol.2018.193102
18. Hou H.A., Tien H.F. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):1–13. doi: 10.1186/s12929-020-00674-7
19. Shimada A. Hematological malignancies and molecular targeting therapy. *Eur J Pharmacol*. 2019;862(April):172641. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172641
20. Alonso C.M., Llop M., Sargas C. Clinical Utility of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia Diagnostics. *J Mol Diagnostics*. 2019;21(2):228–240. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.09.009