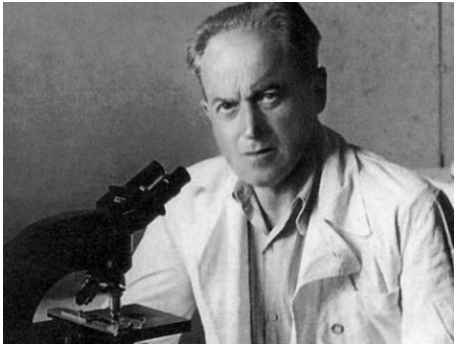


Молекулярная диагностика гемобластозов

Мисюрин Андрей Витальевич

11.05.2013

Открытие трансформирующего фактора



Лев Зильбер (1894-1966)

1923 год:

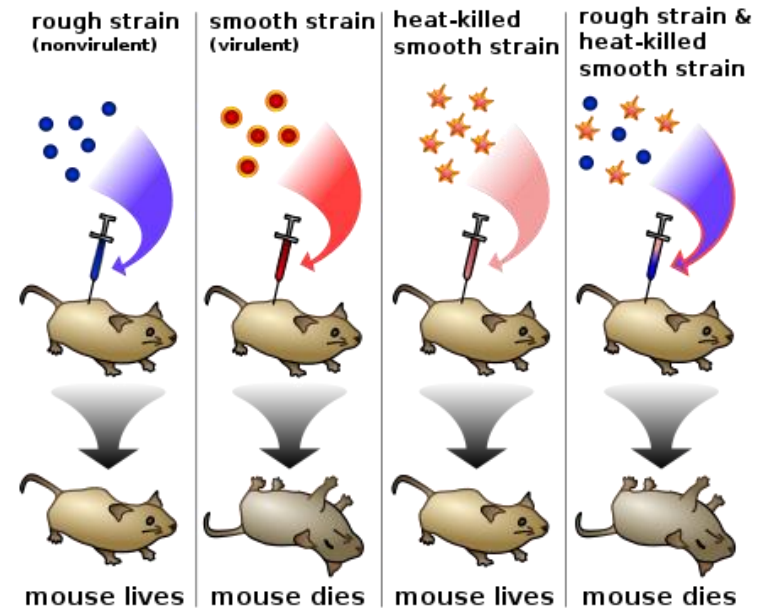
Превращение вульгарного протей в сыпнотифозный в результате культивирования **в организме** зараженной сыпным тифом **мыши**



Frederick Griffith (1879–1941)

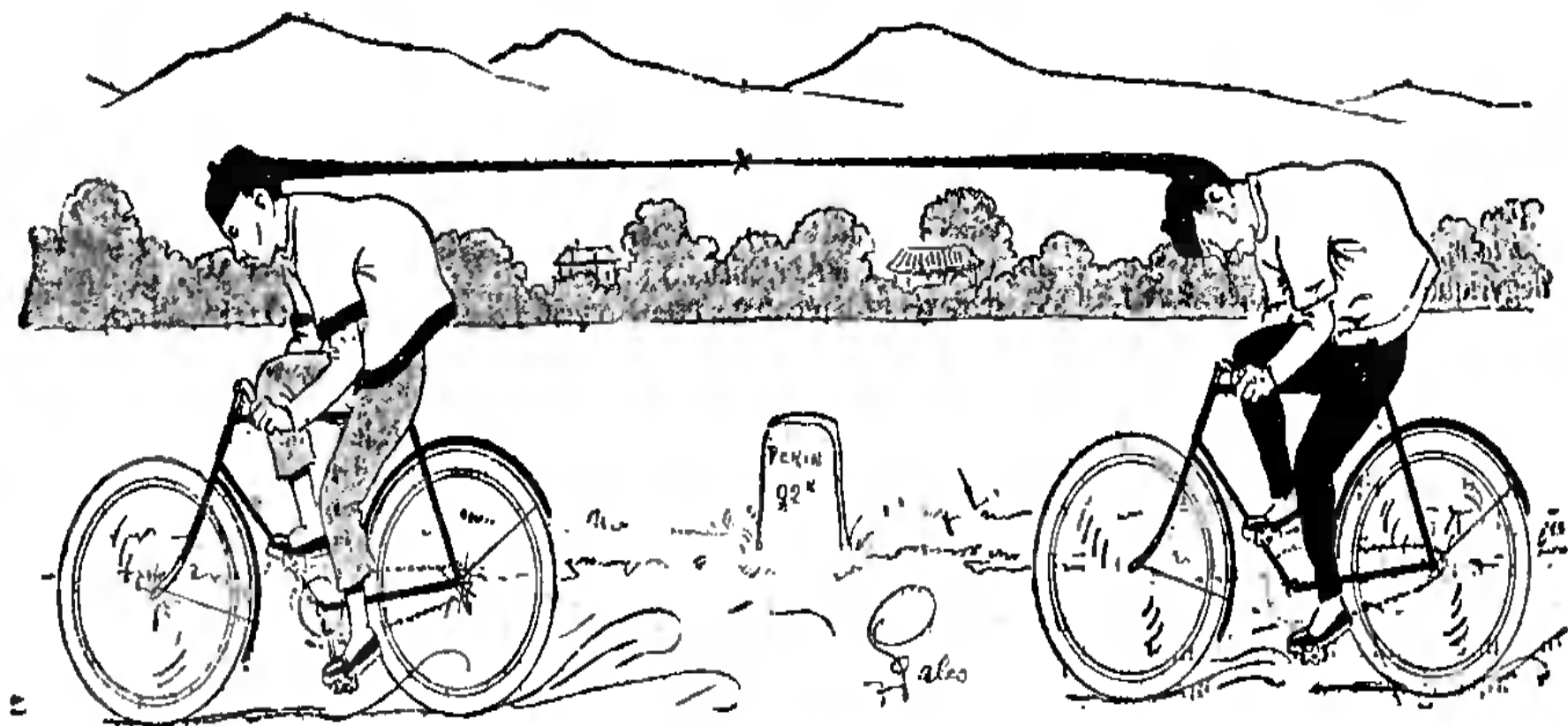
1928 год:

Превращение неvirulentного пневмококка в virulentный **в организме** **мыши**

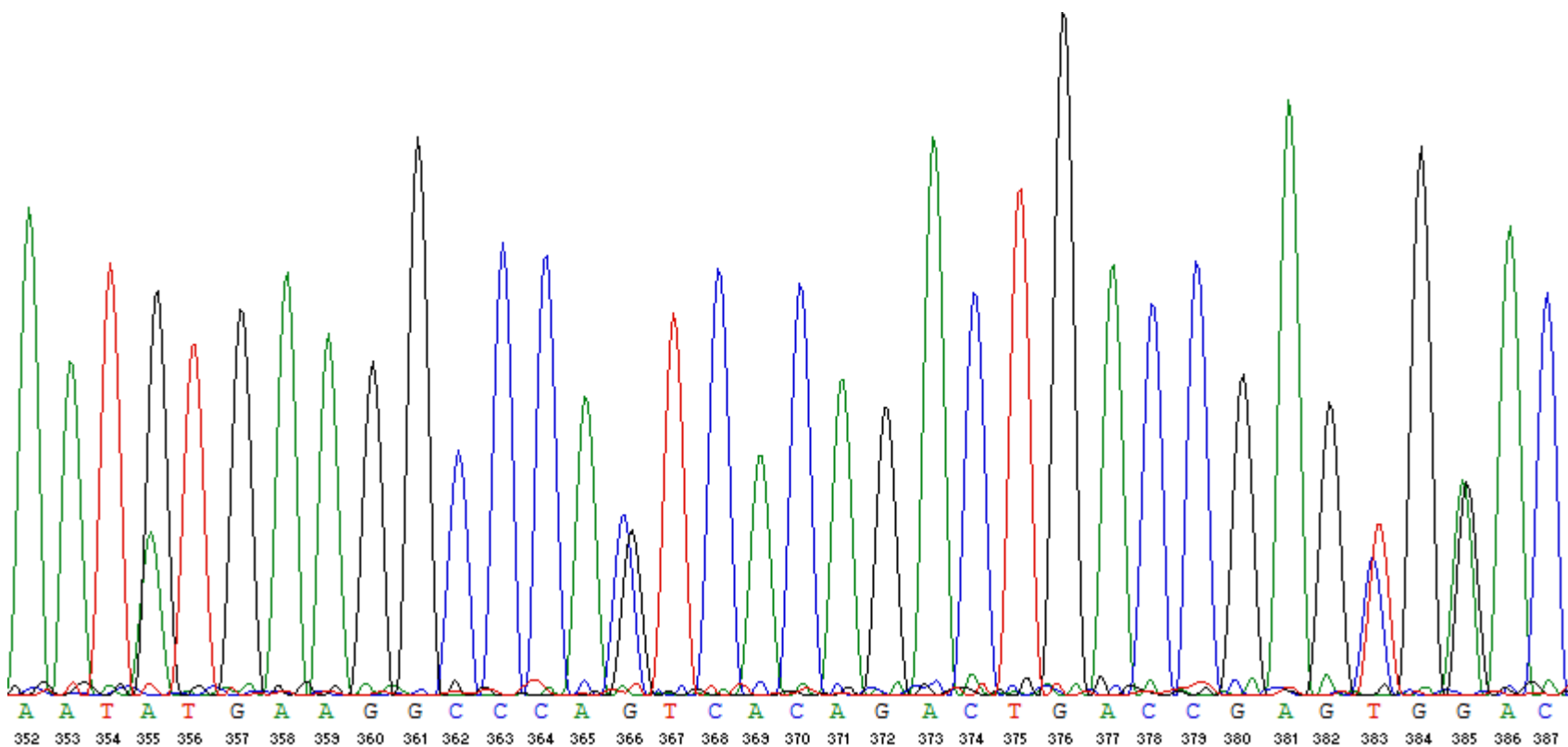


Распознавание макромолекул

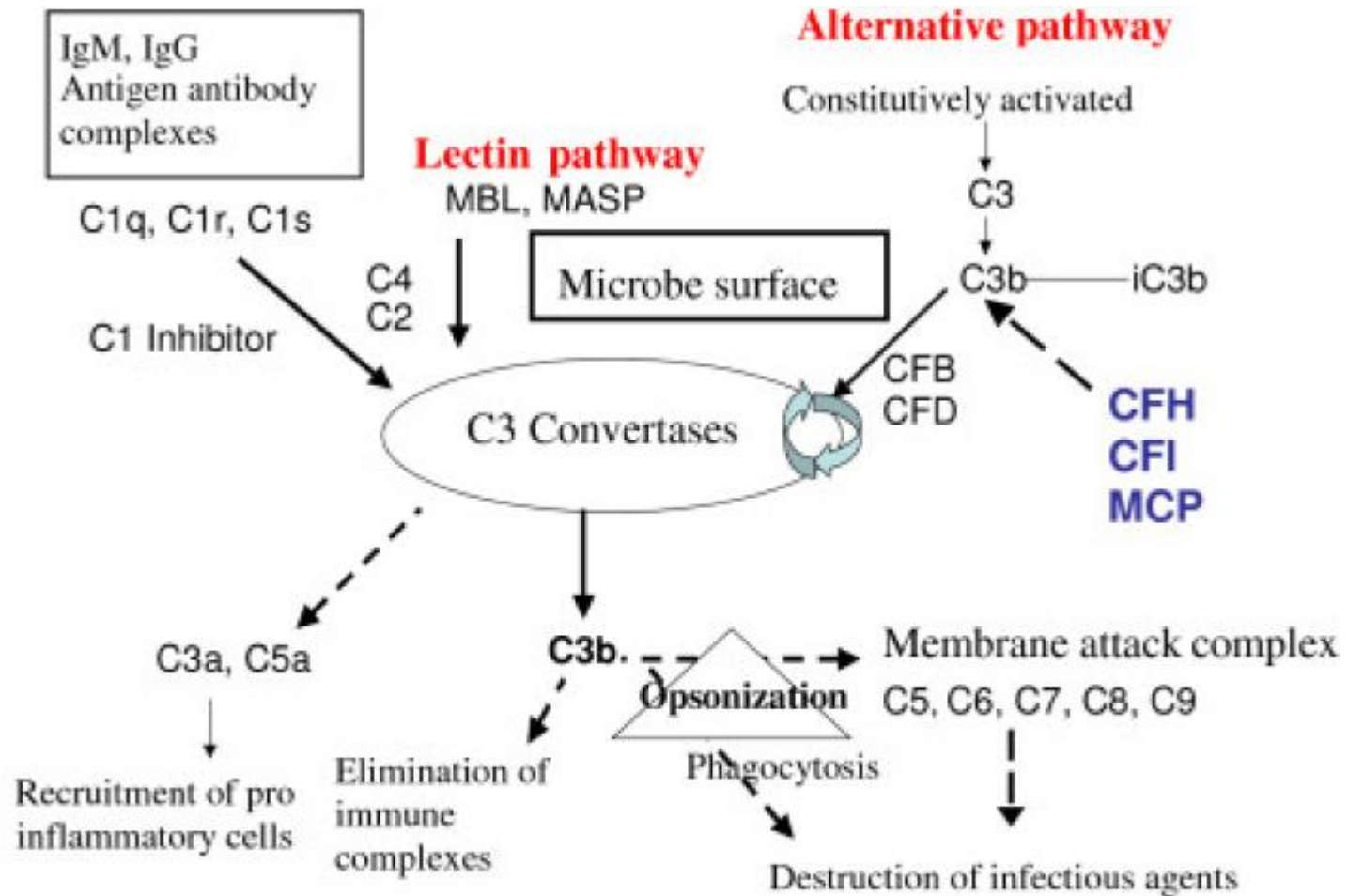
Какъ «тренируютъ» китайцевъ.



SBT-анализ гаплотипов HLA-A: гетерозигота A*01:17/A*03:08



Регуляция системы комплемента



Classical pathway

Молекулярная диагностика аГУС: разбиение на фрагменты для секвенирования

<i>CFI</i>	<i>13 экзонов</i>	<i>13 фрагментов</i>
<i>CFH</i>	<i>23 экзона</i>	<i>23 фрагмента</i>
<i>MCP</i>	<i>16 экзонов</i>	<i>13 фрагментов</i>
<i>CFB</i>	<i>18 экзонов</i>	<i>14 фрагментов</i>
<i>THBD</i>	<i>нет интронов</i>	<i>8 фрагментов</i>
<i>CFHR1,3</i>	<i>делеция 94 пн</i>	<i>2 фрагмента</i>
<i>C4BP</i>	<i>мутация p.Arg240His</i>	<i>1 фрагмент</i>

Complement regulatory factor H (CFH)

Синонимы:

FH; HF; HF1; HF2; HUS; FHL1; AHUS1; AMBP1; ARMD4; ARMS1; CFHL3

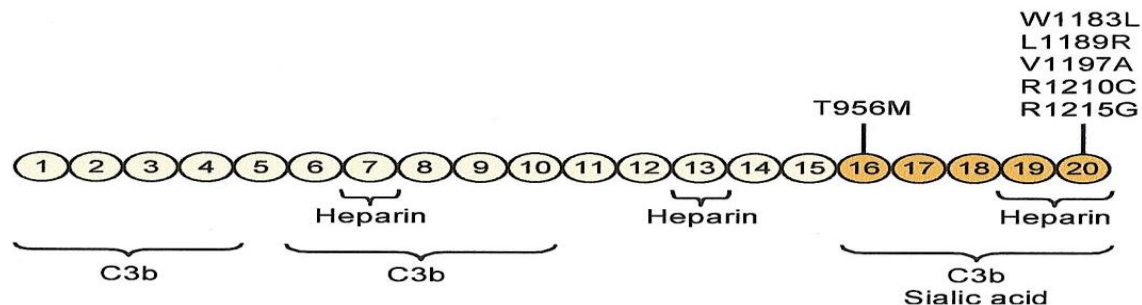
Ген CHF принадлежит кластеру генов-регуляторов комплемента (RCA)

Белок CHF

- секретируется в русло крови
- сдерживает реакцию комплемента

Мутации CHF вызывают гемолитико-уремический синдром

Описано 113 мутаций (<http://www.fh-hus.org>)

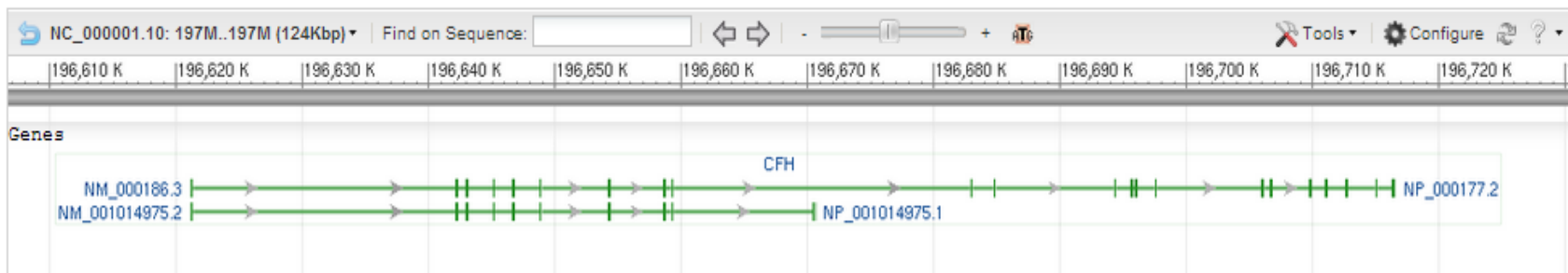


Complement regulatory factor H (CFH)

Genomic Sequence

[Go to reference sequence details](#)

[Go to nucleotide](#) [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



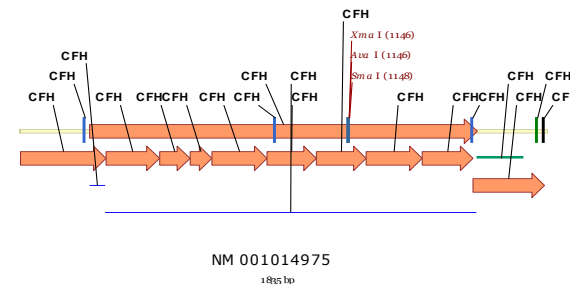
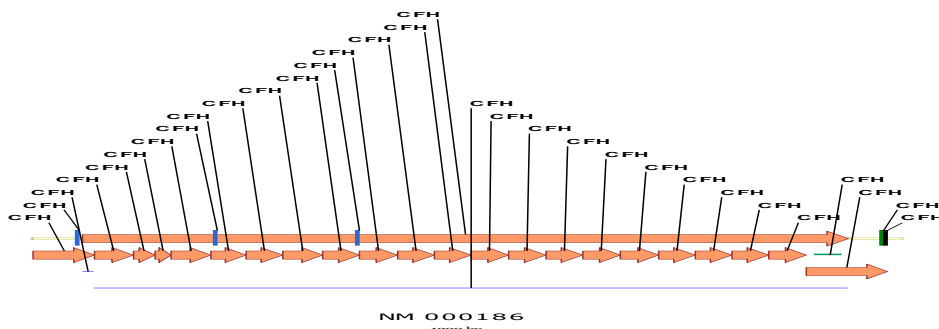
Расположен в 1q32 (локус RCA)

Размер гена – 89801 пн

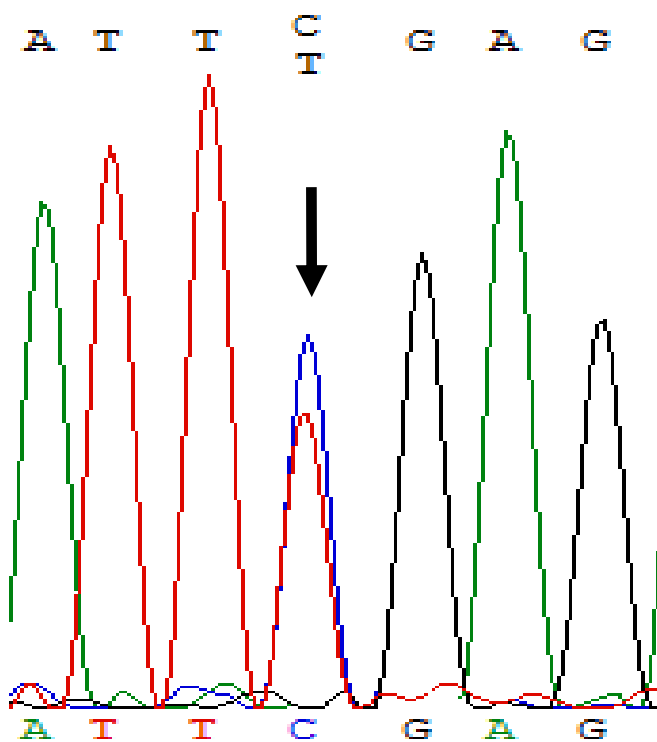
22 экзона

2 мРНК: v1 CDS – 3937 пн

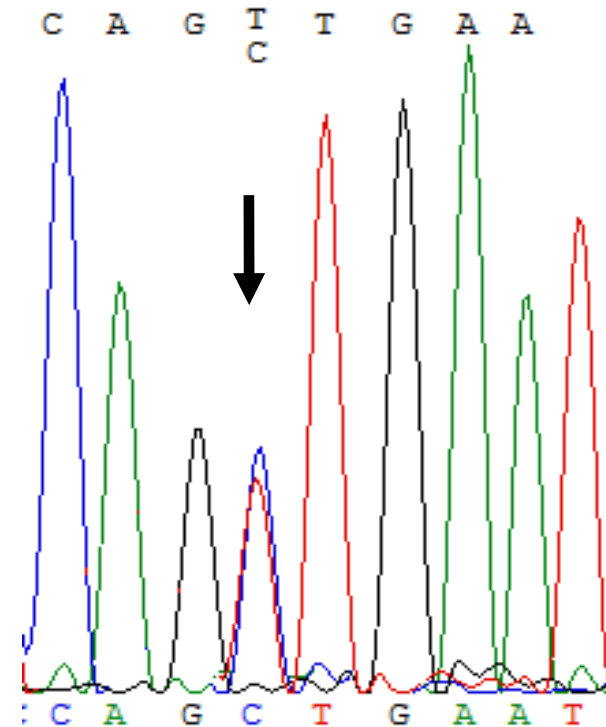
v2 CDS - 1350 пн



Молекулярная диагностика аГУС: компаунд по 2 мутациям в гене CFH

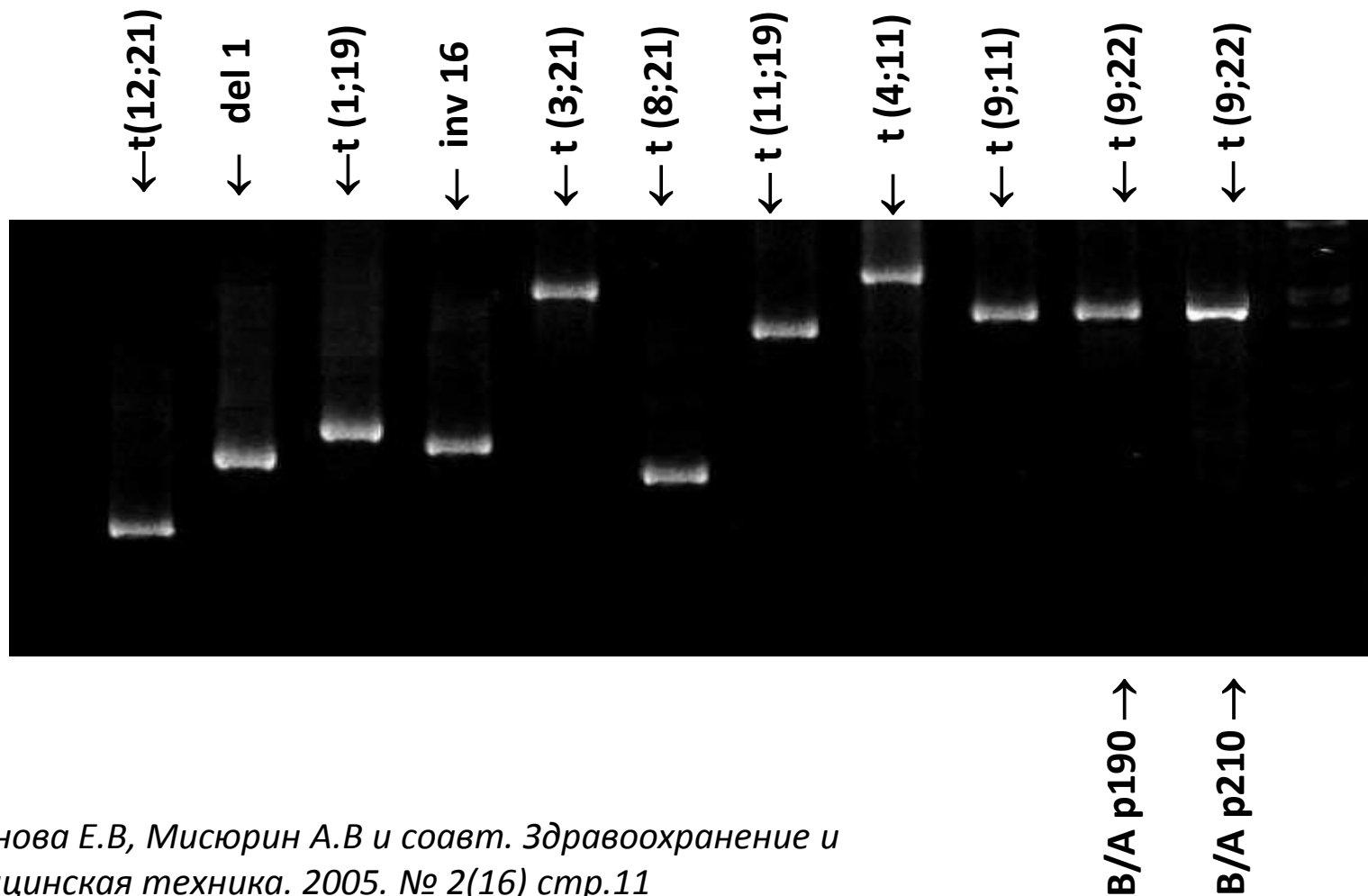


3572C>T (1191Ser>Leu)

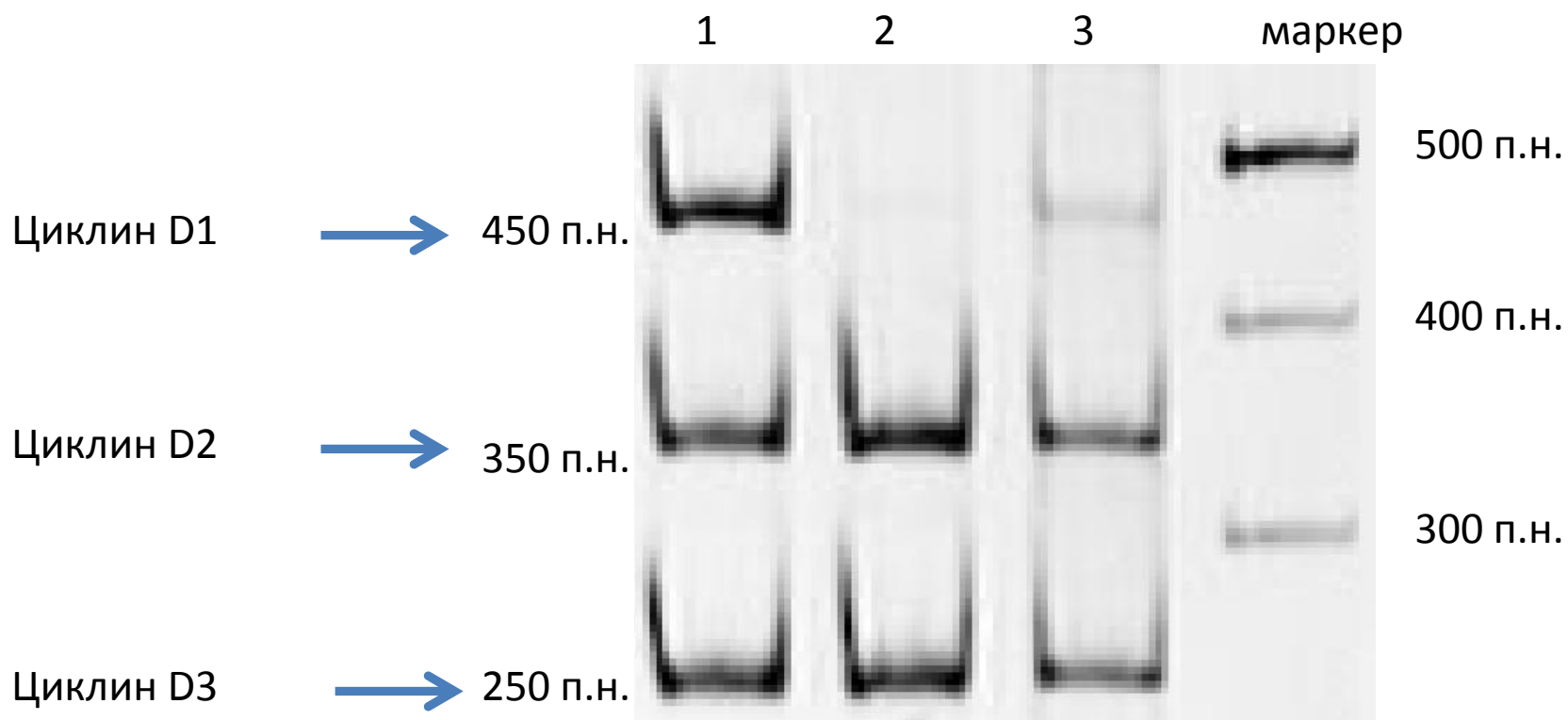


3590T>C (1197Val>Ala)

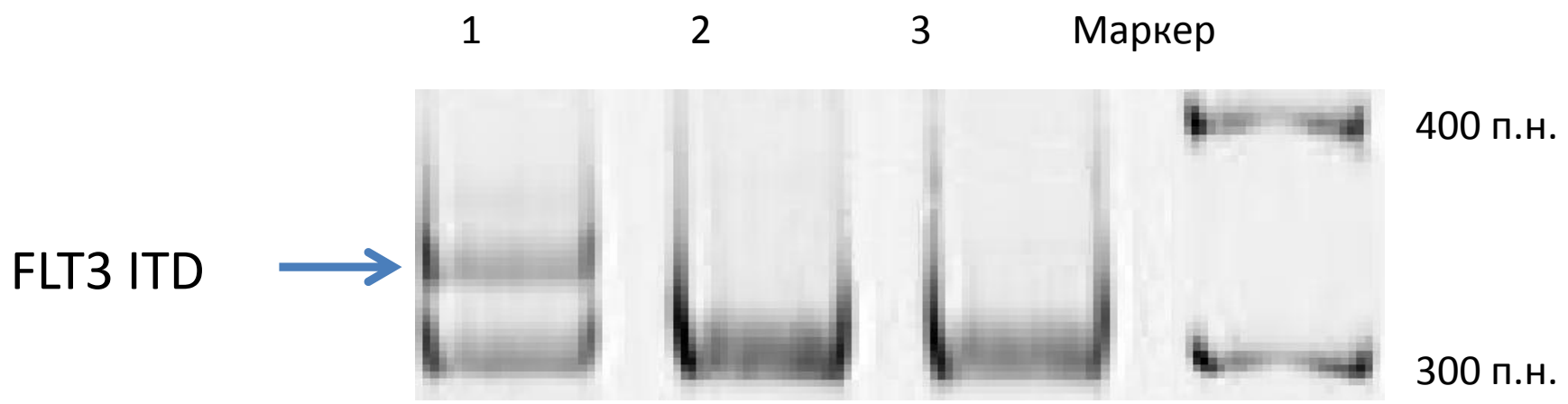
Качественный анализ: ОТ ПЦР-диагностика химерных онкогенов



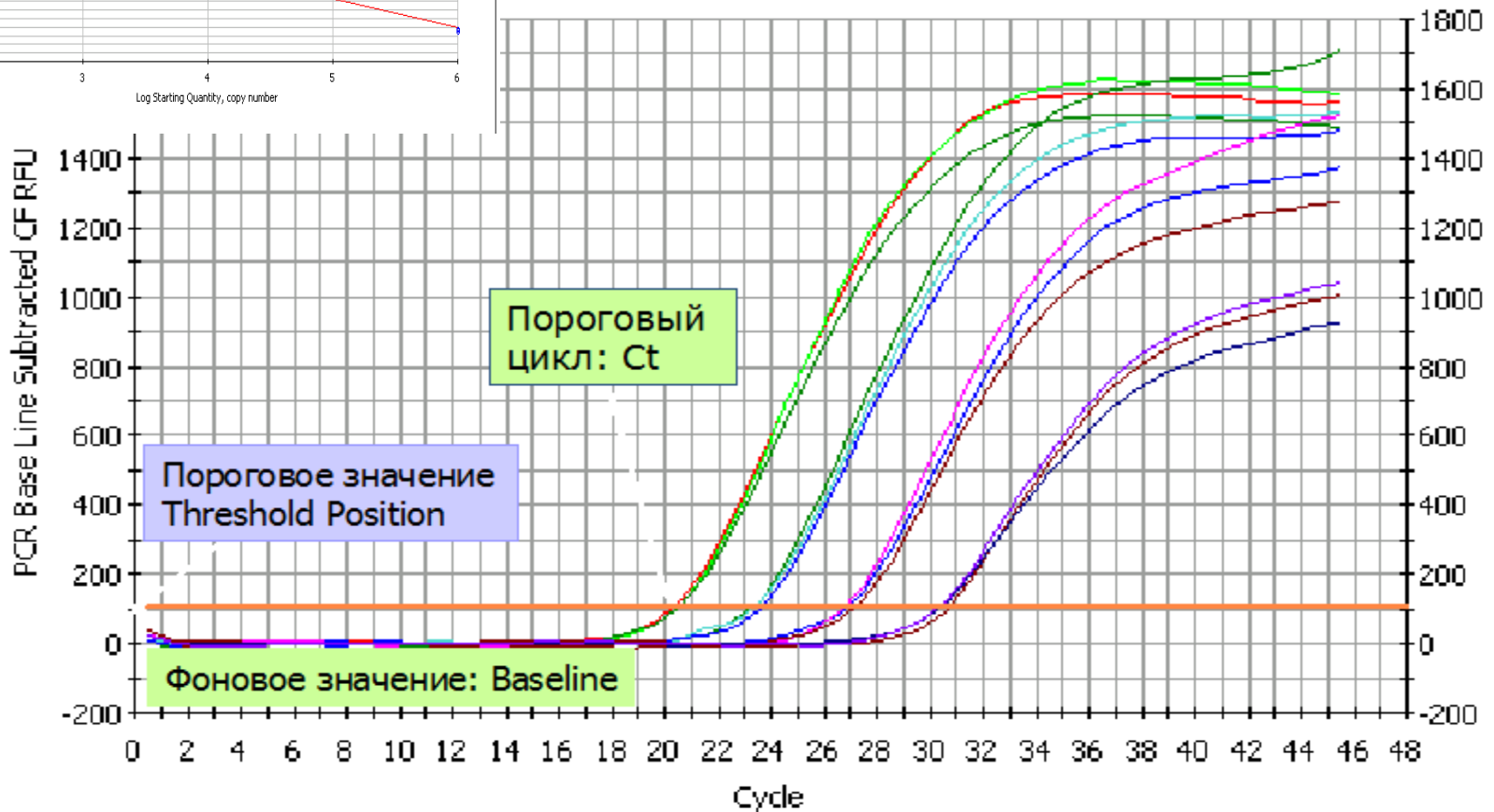
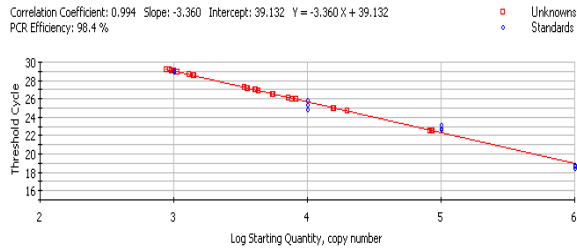
ПЦР анализ гиперэкспрессии циклина D1



Мониторинг мутации FLT3-ITD при ОМЛ

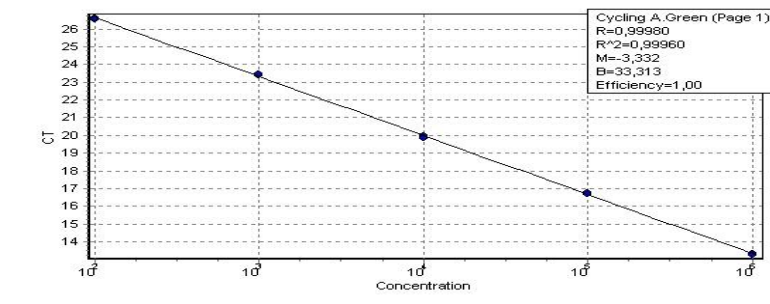
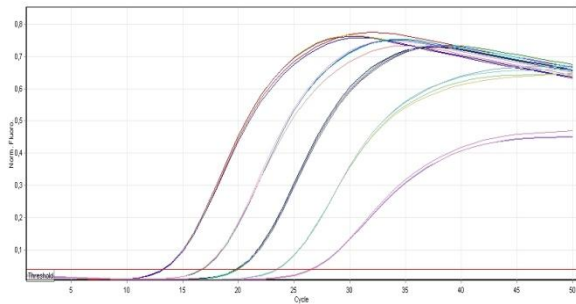


Количественный анализ: ПЦР в реальном времени

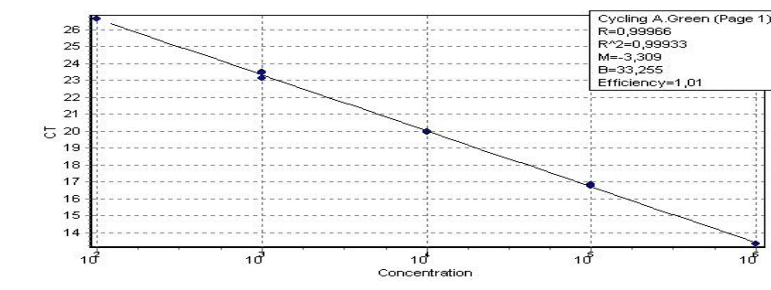
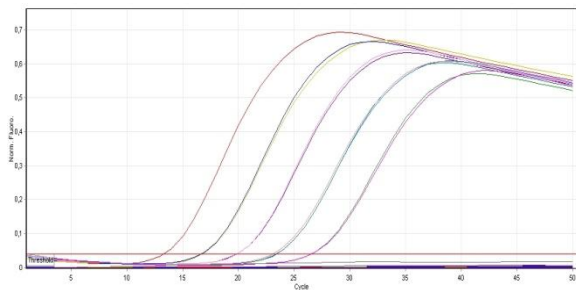


Стабильность контрольных плазмид BCR/ABL+ABL (Онкоскрин™, ООО «ГеноТехнология» (Москва, Россия))

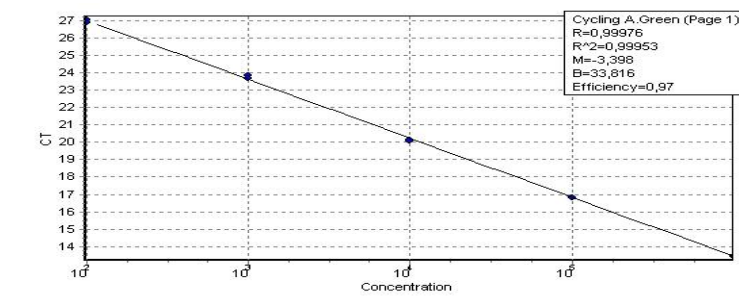
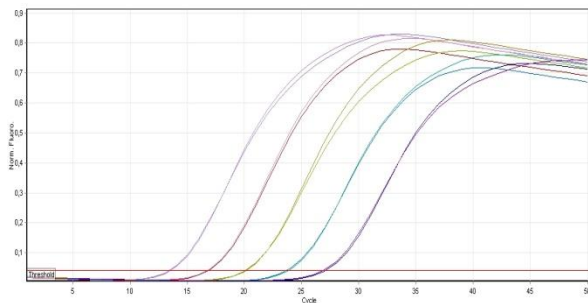
27.03.2008



18.09.2008

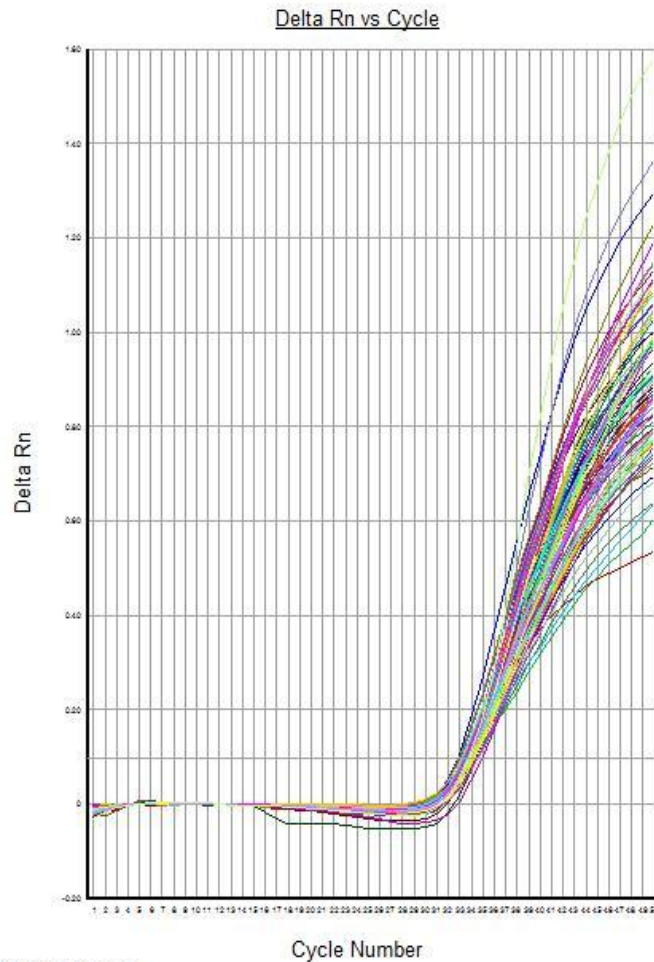


23.03.2009



Воспроизводимая чувствительность тест-системы для количественного анализа экспрессии BCR/ABL

(Онкоскрин™, ООО «ГеноТехнология» (Москва, Россия)



Selected Detector: All
Well(s): A1-H12
Document: 30.03.10_ba_10_cop_mkl (Absolute Quantification)

Плазида BCR/ABL+ABL 10
копий/1 μ l

96 повторов

(прибор AB 7500)

Ст Mean = 33,95

Ст SD = 0,63

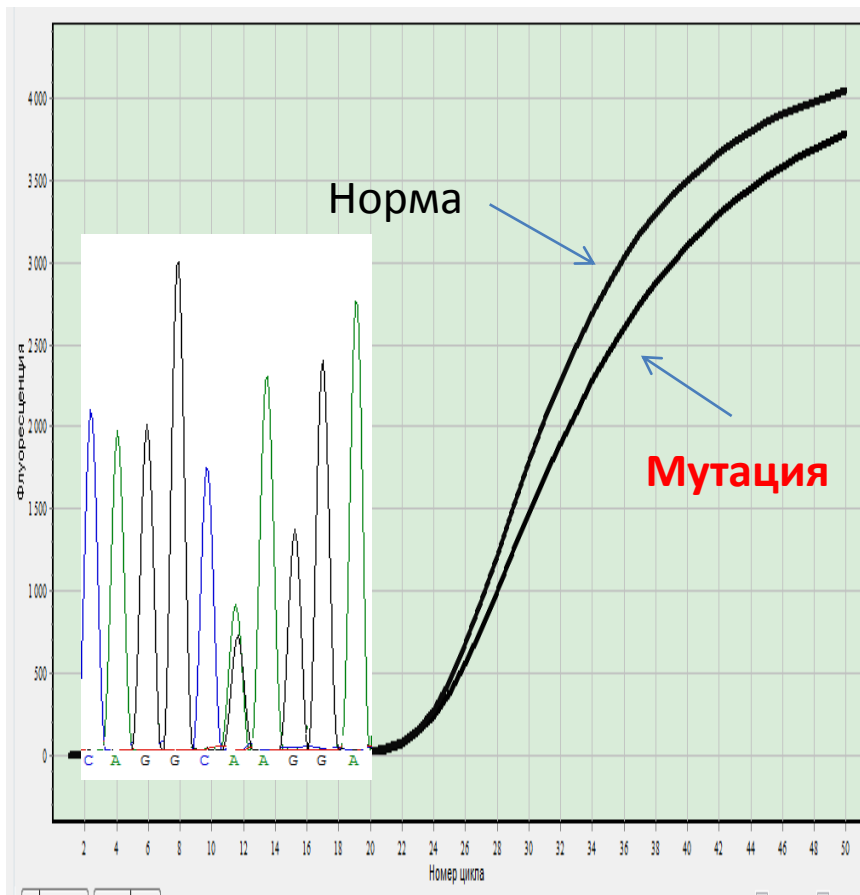
CV % = 1,86

(Рекомендации EAC:

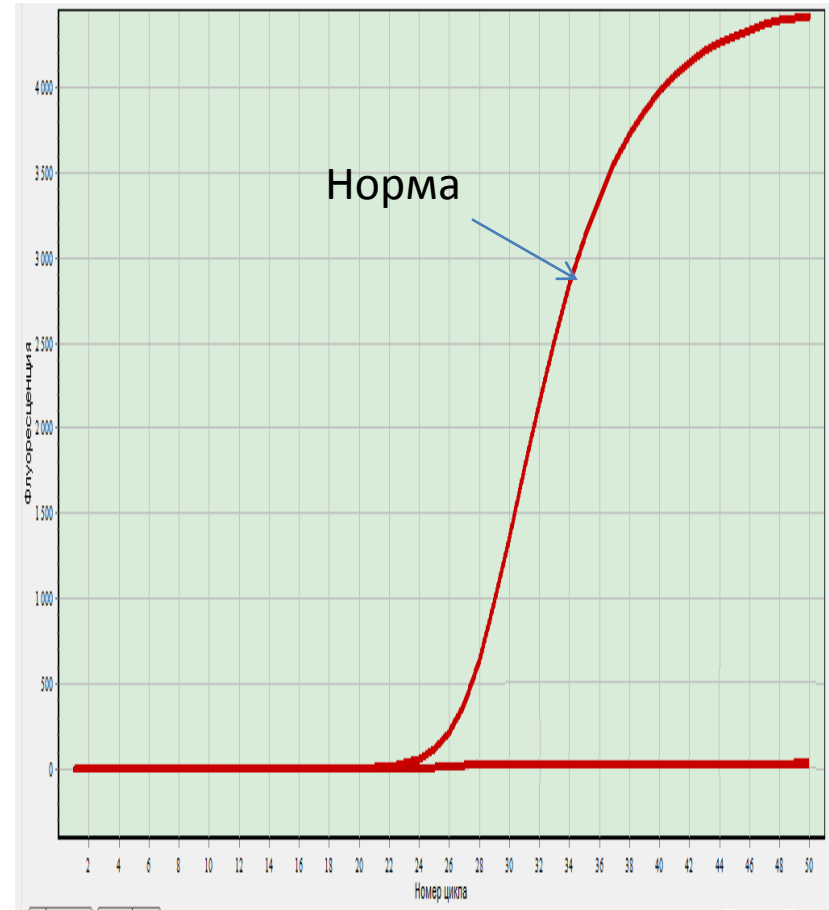
CV % < 5%)

1,86 % < 5 %

Определение Лейденской мутации методом ПЦР в реальном времени

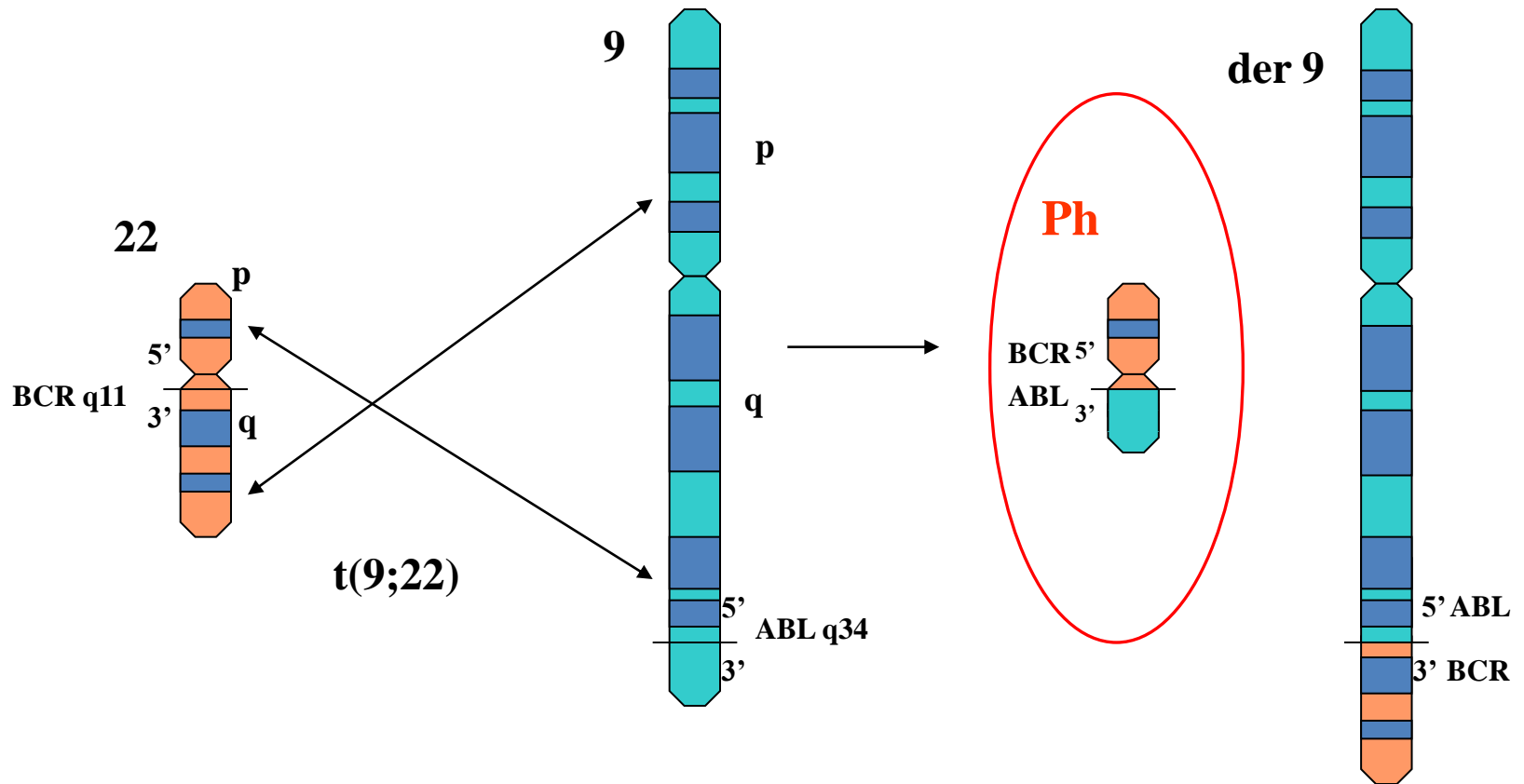


Норма/**Мутация**



Норма/Норма

Транслокация t(9;22)





1960 год: Ph-хромосома

A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia

P.C. Nowell, D.A. Hungerford

University of Pennsylvania,
Philadelphia

A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia

In seven cases thus far investigated (five males, two females), a minute chromosome has been observed replacing one of the four smallest autosomes in the chromosome complement of cells of chronic granulocytic leukemia cultured from peripheral blood. No abnormality was observed in the cells of four cases of acute granulocytic leukemia in adults or of six cases of acute leukemia in children. There have been several recent reports of chromosome abnormalities in a number of cases of human leukemia [including two of the seven cases reported here: Nowell and Hungerford, *J. Natl. Cancer Inst.*, **25**, 85 (1960)], but no series has appeared in which there was a consistent change typical of a particular type of leukemia.

Cells of the five new cases were obtained from peripheral blood (and bone marrow in one instance), grown in culture for 24–72 hours, and processed for cytological examination by a recently developed air-drying technique (Moorhead, *et al.*, *Exptl. Cell Research*, in press). The patients varied from asymptomatic untreated cases to extensively treated

cases of several years duration in terminal myeloblastic crisis. All seven individuals showed a similar minute chromosome, and none showed any other frequent or regular chromosome change. In most of the cases, cells with normal chromosomes were also observed. Thus, the minute is not a part of the normal chromosome constitution of such individuals.

The findings suggest a causal relationship between the chromosome abnormality observed and chronic granulocytic leukemia.

PETER C. NOWELL

*School of Medicine,
University of Pennsylvania*

DAVID A. HUNGERFORD

Institute for Cancer Research

Nowell & Hungerford, 1960 Science 132.1497

1973: translocation of chromosomal material



National Medal of Science

Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243, 290-293, 1973

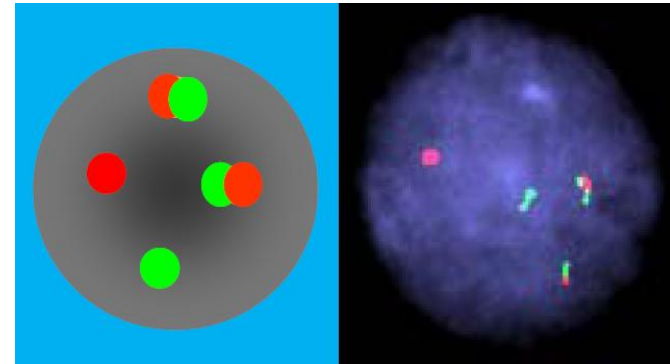
...suggesting that there may be a hitherto undetected translocation between the long arm of **22** and the long arm of **9**, producing the 9q+ chromosome...

Цитогенетический анализ при ХМЛ

Стандартный



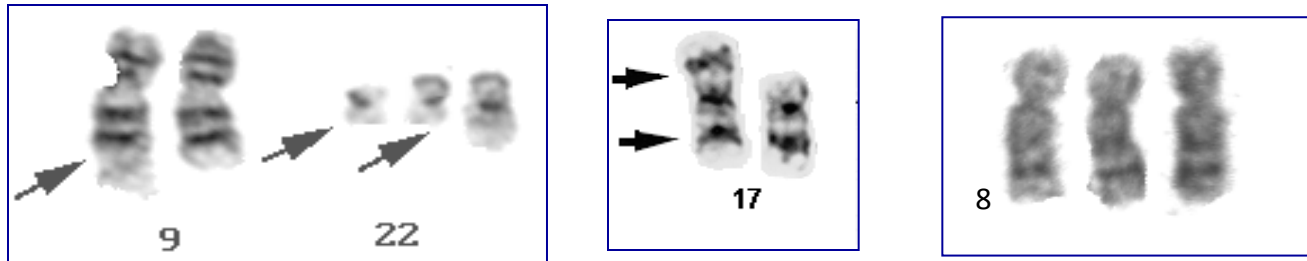
FISH



- Обязателен при первичной диагностике
- Низкая чувствительность (до 5%)
- Возможность обнаружить дополнительные хромосомные аномалии

- Высокая чувствительность

Клональная эволюция



- 75% вторичных аномалий при ХМЛ
- Встречаются реже: **+19, +21, -7, +17**
- При бластом кризе – у 80% больных
- В фазе акселерации - у 10% больных

Виды молекулярных маркеров

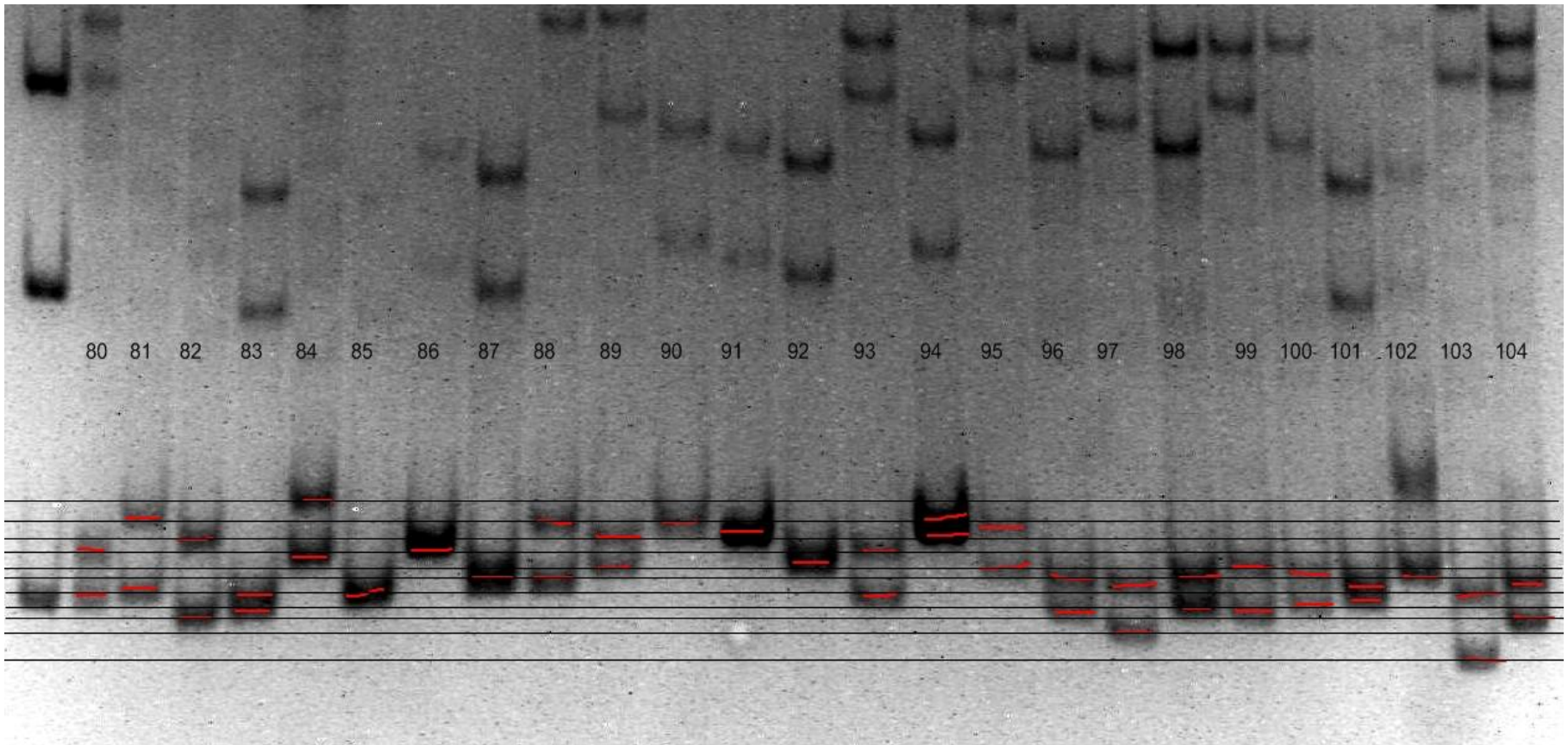
1. Прямые и косвенные маркеры
2. Специфические и широко распространённые
3. Качественные и количественные
4. Диагностические и прогностические

Прямые и косвенные маркеры

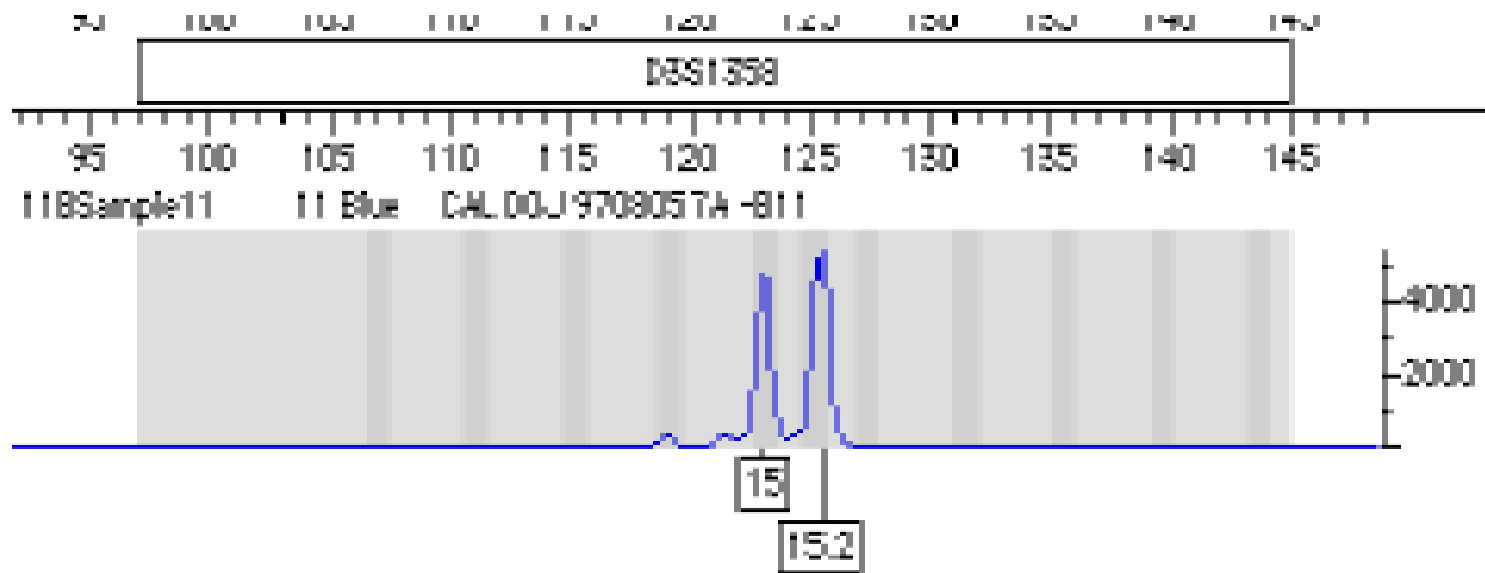
Заболевание	Прямые маркеры	Косвенные маркеры
Болезнь фон Виллебранда (Тип IIA)	Мутации домена A2: G1505E/R, S1506L, M1528V, R1569del, R1597W, V1607D, G1609R, I1628T, G1629E, G1631D, E1638K	STR-полиморфизмы 40 интрона гена фактора фон Виллебранда (только семейный анализ!)
Наследственный гемохроматоз	Мутации 2 и 4 экзонов гена HFE: C282Y, H63D, S65C	HLA-A3 (A3-B7, A3-B14, A3-B56)
Гемофилия А	Инверсии между int22h-1 и внегенными int22h-2 и int22h-3; Инверсия int1h-1/int1h-2 гена FVIII	STR-полиморфизмы 13 и 22 интронов; SNP, распознаваемые рестриктазами Bcl-1 (int18), HindIII (int19), XbaI и Msp-1 (int22), Bgl-1 (int25)

STR Fibra

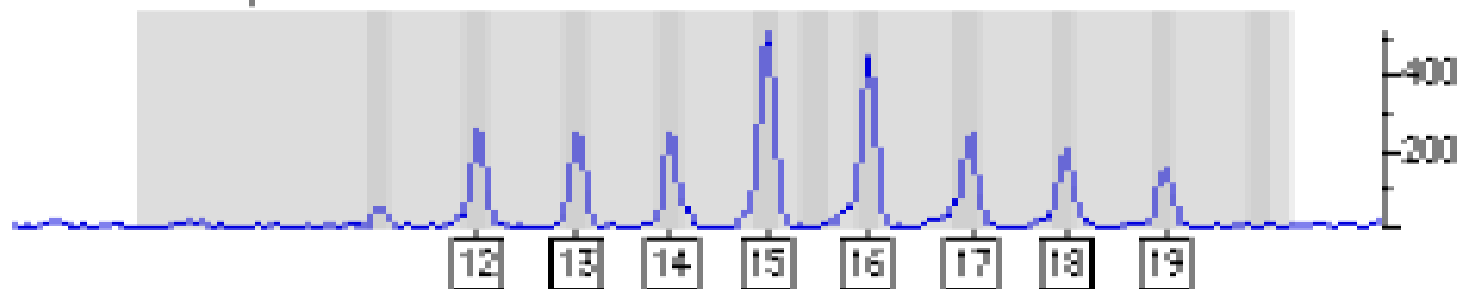
- [TTTC]3TTTTTTCT[CTTT]**n**CTCC[TTCC]2



Анализ STR при помощи капиллярного электрофореза



COFILER ..RSample18 18 Blue COfiler LADDER:



Специфические и инвариантные маркеры гемобластозов

- **Специфические онкомаркеры:**

Гемобластозы:	Транслокации:	Онкогены:
ХМЛ	t(9;22)	BCR/ABL p210 BCR/ABL p190
ОПЛ	t(15;17)	PML/RAR α
ОМЛ	t(8;21) inv(16)	AML1/ETO CBFB/MYH11
ОЛЛ	t(9;22) t(9;11) t(4;11)	BCR/ABL p190 MLL/AF4 MLL-AF4

- **Неспецифические (инвариантные) онкомаркеры:**

PRAME, WT1, FLT3

Диагностические и прогностические маркеры гемобластозов

• Диагностические онкомаркеры:

Онкоген:

Диагноз:

BCR/ABL p210

Хронический миелолейкоз (ХМЛ)

PML/RARa

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ)

NPM1/ALK

T-клеточная ALK+ лимфома

• Прогностические онкомаркеры:

Заболевание	Благоприятный прогноз	Неблагоприятный прогноз
ОМЛ	AML1/ETO CBFB/MYH11	
ОЛЛ		BCR/ABL p190 MLL/AF4
ОПЛ		FLT3/ITD FLT3-D835Y/V/H/E

Факторы благоприятного прогноза ОМЛ

Химерные онкогены, продукты хромосомных аномалий:

AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1)

t(8;21)

CBFB/MYH11

inv(16), t(16;16)

Мутации генов:

NPM1

CEBPA

RAS (высокие дозы цитарабина)

Факторы неблагоприятного прогноза ОМЛ

Химерные онкогены, продукты хромосомных аномалий:

BCR/ABL t(9;22)

Мутации генов:

FLT3-ITD, FLT3-D835, WT1, MLL-PTD, c-KIT, TP53, RUNX1(AML1)

совместно NPM1 и FLT3-ITD/D835, TET2 и NPM1

IDH1, IDH2, ASXL1, CBL, JAK2, JAK3, GATA-1

Гиперэкспрессия генов:

ERG, MN1, BAALC, MECOM (EVI1), ID1, CDX2, XIAP, AF-1, BRE, VENTX

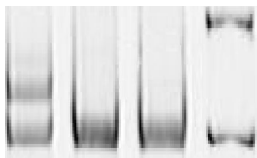
Минимальный набор маркеров ОМЛ

Химерные онкогены/аномалии хромосом:

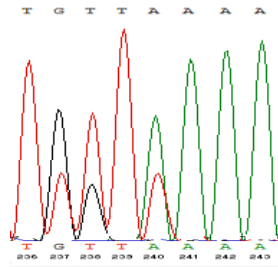
BCR/ABL t(9;22), AML1/ETO t(8;21), CBFB/MYH11 inv(16), t(16;16)

Мутации генов:

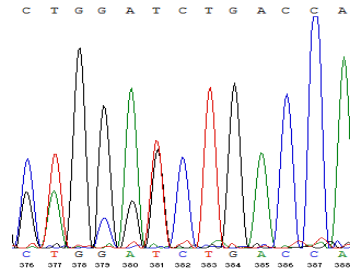
FLT3



NPM1



CEBPA



MLL-PTD



Экспрессия генов:

Уровень PRAME и WT1 в дебюте и на разных сроках терапии

Вероятность развития гематологического рецидива ОПЛ



Регулярный мониторинг МРБ при гемобластозах

- Количественно оценивает уровень опухолевого клона
- Обнаруживает минимальную остаточную популяцию опухолевых клеток у индивидуального больного
- Определяет эффективности тактики терапии
- Позволяет обнаруживать молекулярный рецидив существенно раньше, чем развивается рецидив гематологический
- Является надежным критерием для разработки оптимальных дифференцированных программ лечения

Молекулярные маркеры ОЛЛ

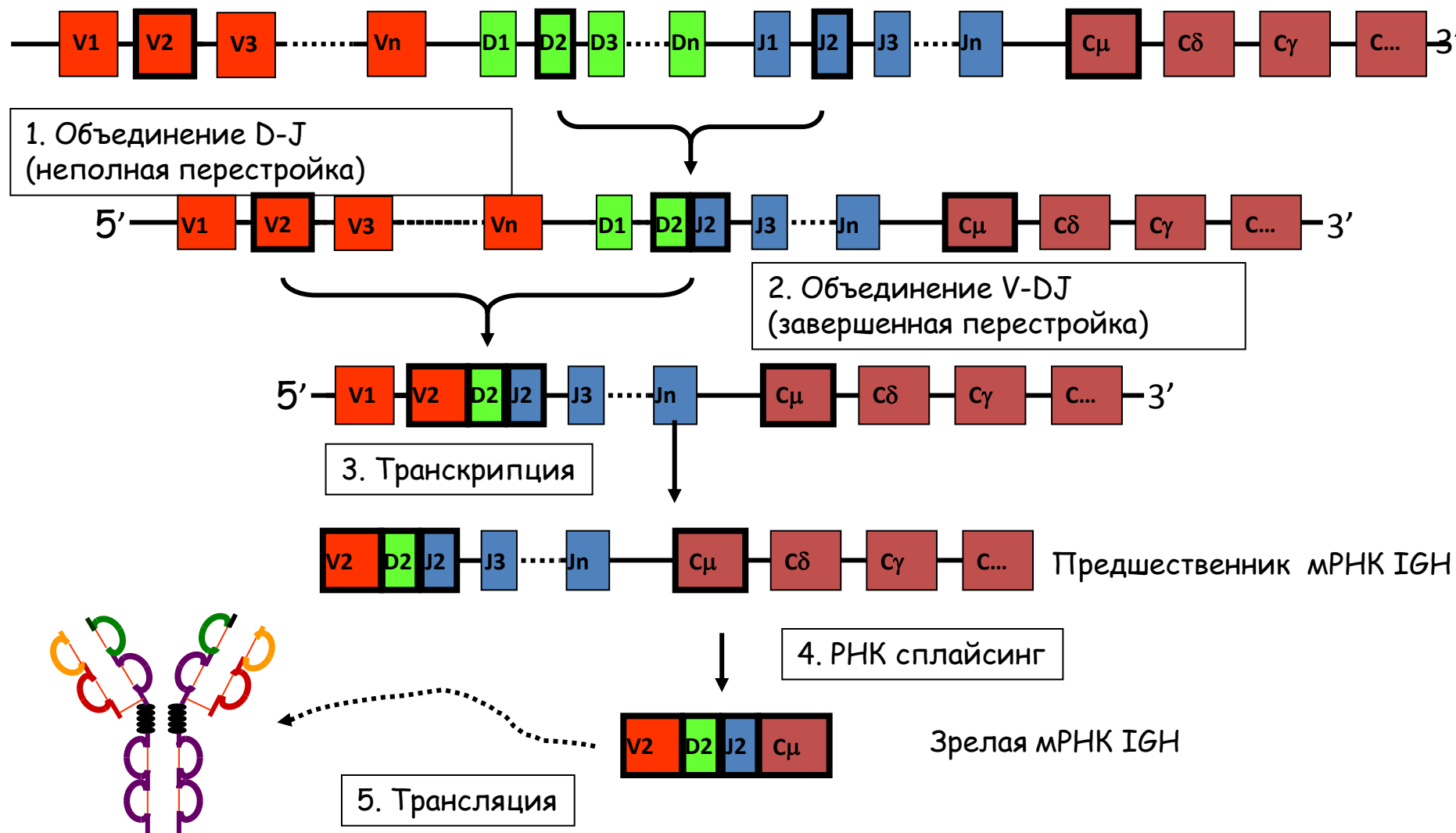
В-ОЛЛ

BCR-ABL / t(9;22)(q34;q11)
MLL-AF4 / t(4;11)(q21;q23)
TEL-AML1 / t(12;21)(p13;q22)
E2A-PBx 1/ t(1;19)(q23;p13)
E2A-HLF / t(17;19)(q22,p13)
MLL-v / t(11;v)(q23;v)
c-MYC-IgH / t(8;14)(q24;q32)
IL3-IgH / t(5;14)(q31;q32)

Т-ОЛЛ:

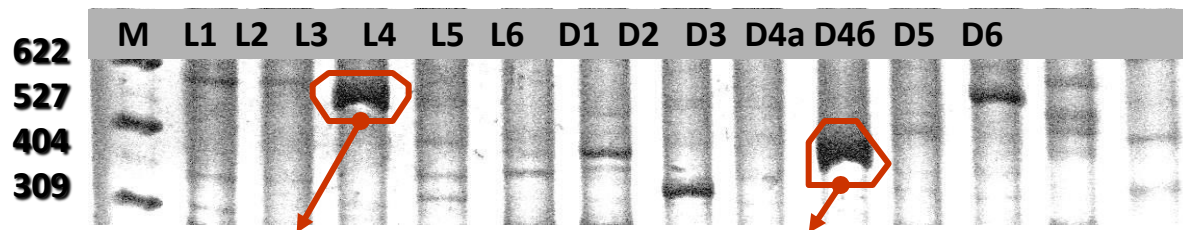
SIL-TAL1 / TAL1 deletion
C-MYC-TCR α / δ / t(8;14)(q24;q11)
HOX11-TCR α / δ / t(10;11)(q24;q11)
LMO1-TCR α / δ / t(11;14)(p15;q11)
LMO2-TCR α / δ / t(11;14)(p13;q11)
TAL1- TCR α / δ / t(1;14)(p32;q11)
TCL1- TCR α / δ / inv(14)(q11q32)

V(D)J рекомбинация генов тяжелых цепей иммуноглобулинов



Клональная перестройка IgH при MM, В-клеточных лимфомах, В-ХЛЛ, В-ОЛЛ

1. ОТ-ПЦР с семейств-специфичными праймерами

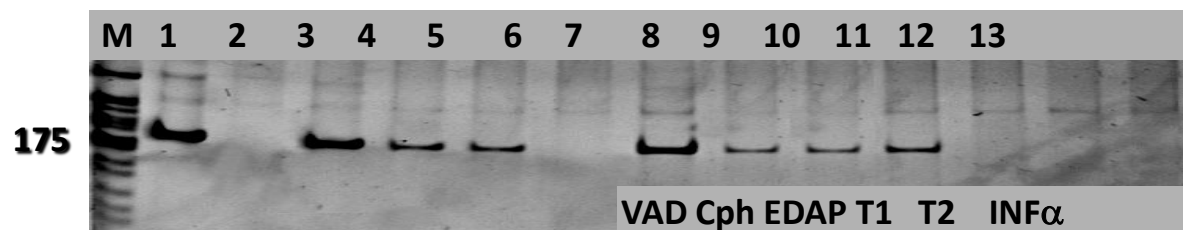
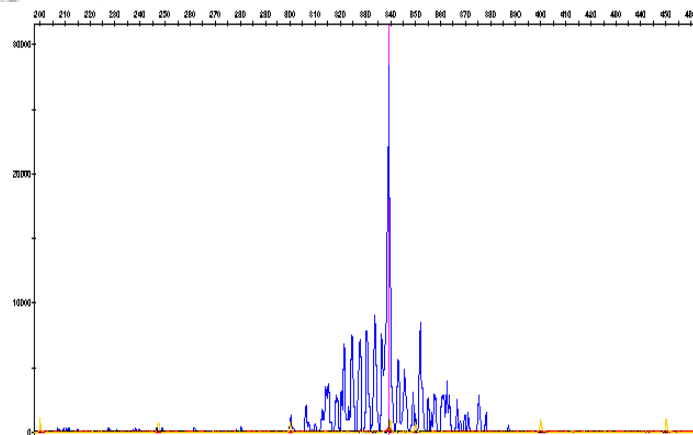


2. Секвенирование ПЦР-фрагментов

3. Синтез пациент-специфичных праймеров и зондов

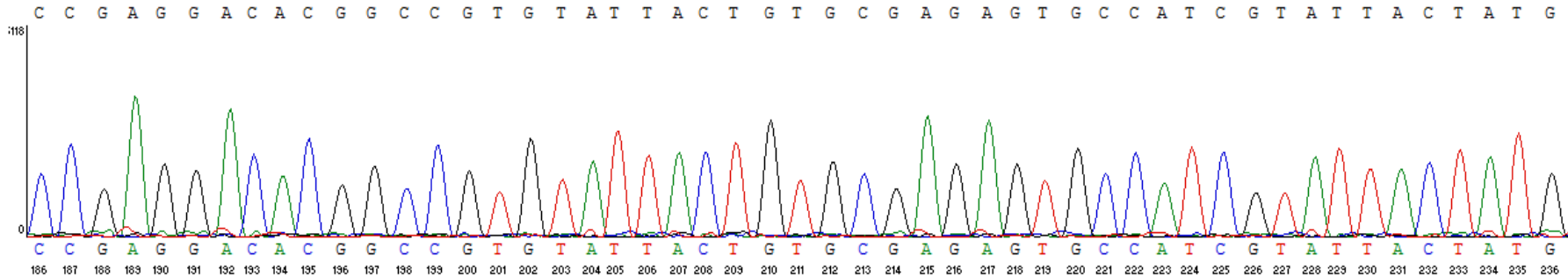
зондов

4. ПЦР в реальном времени с использованием с пациент-специфичными праймеров и зондов



Анализ первичной последовательности IgH клона

Query_1
V 100.0% (207/207) [IGHV3-11*01](#)



Fragment
D5013_D3
_VHD3.ab
1

NCBI **IgBLAST**



PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

NCBI Home Page

- Introduction
- FAQs
- Stand-alone IgBLAST
- Ig Germline Genes
- Previous version of IgBLAST
- Other Resources

Enter sequence(s)

```
TGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTC
TGTAAGGGCCGATTCCACATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGT
ATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGTGCCATCGTATTACTATGATAGTAGTGGTTATATTGACTGGGG
CCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCSTCAGGTA
```

or load local sequence file

Show amino acid translation

Program

Min required consecutive D gene matches

Ig domain system

Organism for query sequence

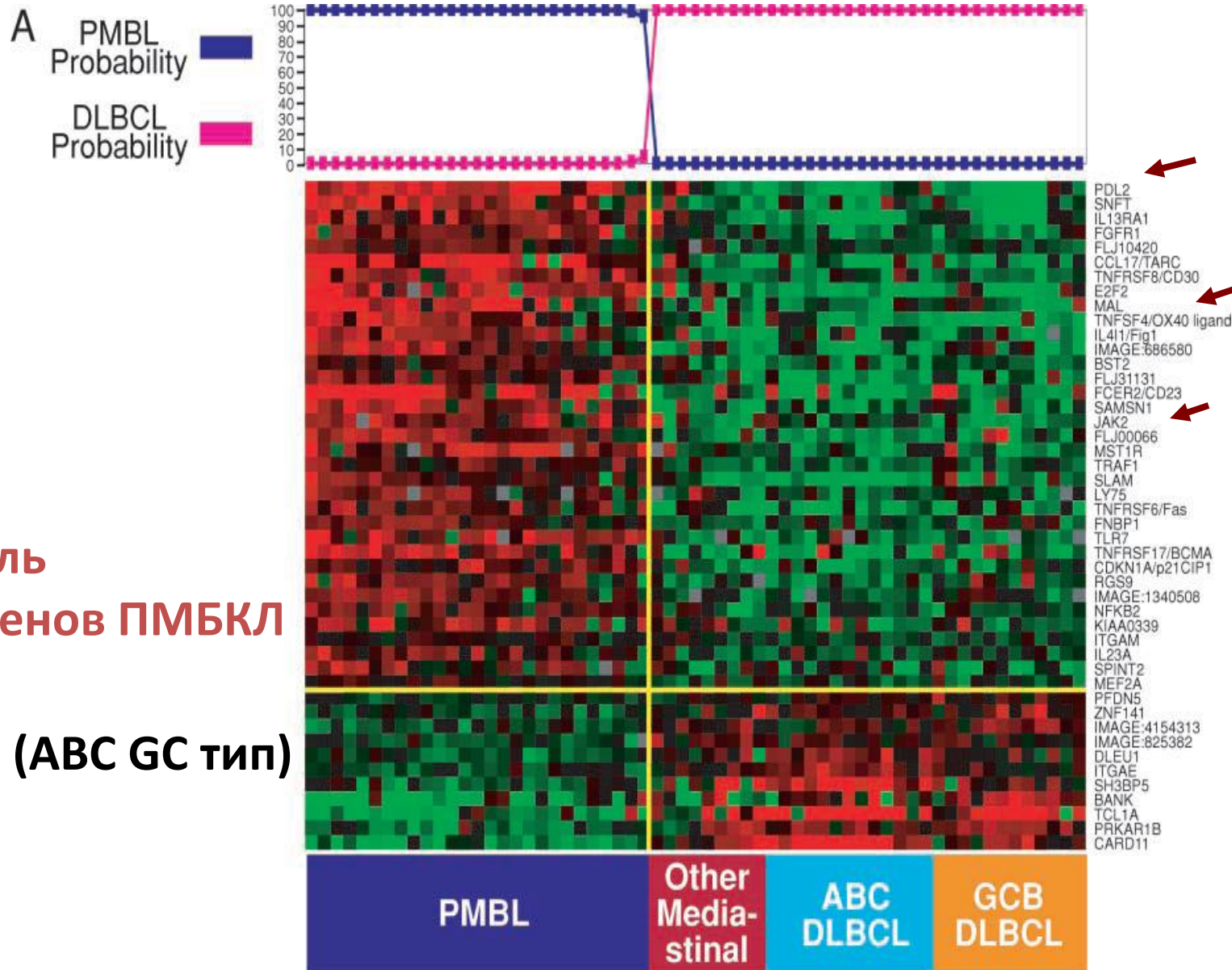
Germline V gene Database

Germline D gene database

Alignments

Score	Query_1	Subject	Identical	Positives	Query Start	Query End	Subject Start	Subject End
V 100.0% (207/207)	Query_1 1	IGHV3-11*01 89	89	89	1	89	1	89
V 99.5% (206/207)	Query_1 89	IGHV3-11*04 89	89	89	89	89	89	89
V 97.1% (201/207)	Query_1 89	IGHV3-11*05 89	89	89	89	89	89	89
V 100.0% (207/207)	Query_1 91	IGHV3-11*01 179	179	179	91	179	91	179
V 99.5% (206/207)	Query_1 179	IGHV3-11*04 179	179	179	179	179	179	179
V 97.1% (201/207)	Query_1 179	IGHV3-11*05 179	179	179	179	179	179	179
V 100.0% (207/207)	Query_1 181	IGHV3-11*01 269	269	269	181	269	181	269
V 99.5% (206/207)	Query_1 269	IGHV3-11*04 269	269	269	269	269	269	269
V 97.1% (201/207)	Query_1 269	IGHV3-11*05 269	269	269	269	269	269	269
D 100.0% (25/25)	D 1	IGHD3-22*01 1	1	1	1	1	1	1
D 100.0% (11/11)	D 1	IGHD3-10*02 1	1	1	1	1	1	1
D 100.0% (11/11)	D 1	IGHD3-10*01 1	1	1	1	1	1	1
J 100.0% (36/36)	J 13	IGHJ4*02 13	13	13	13	13	13	13
J 100.0% (35/35)	J 17	IGHJ5*02 17	17	17	17	17	17	17
J 97.2% (35/36)	J 13	IGHJ4*01 13	13	13	13	13	13	13
J 100.0% (36/36)	Query_1 271	IGHJ4*02 40	40	48	271	40	271	40
J 100.0% (35/35)	Query_1 40	IGHJ5*02 43	43	51	40	43	40	43
J 97.2% (35/36)	Query_1 40	IGHJ4*01 40	40	48	40	40	40	40

Профиль экспрессии генов (274 биопсии)



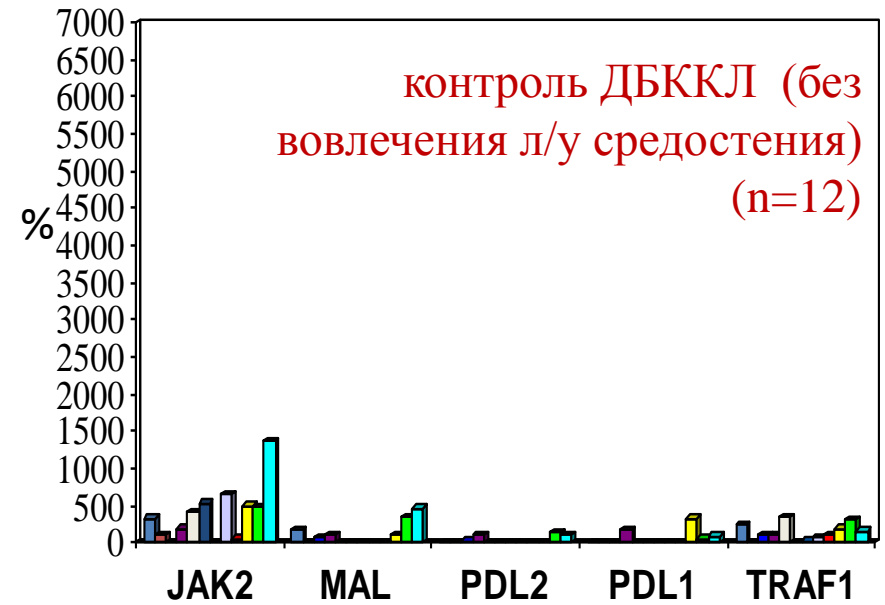
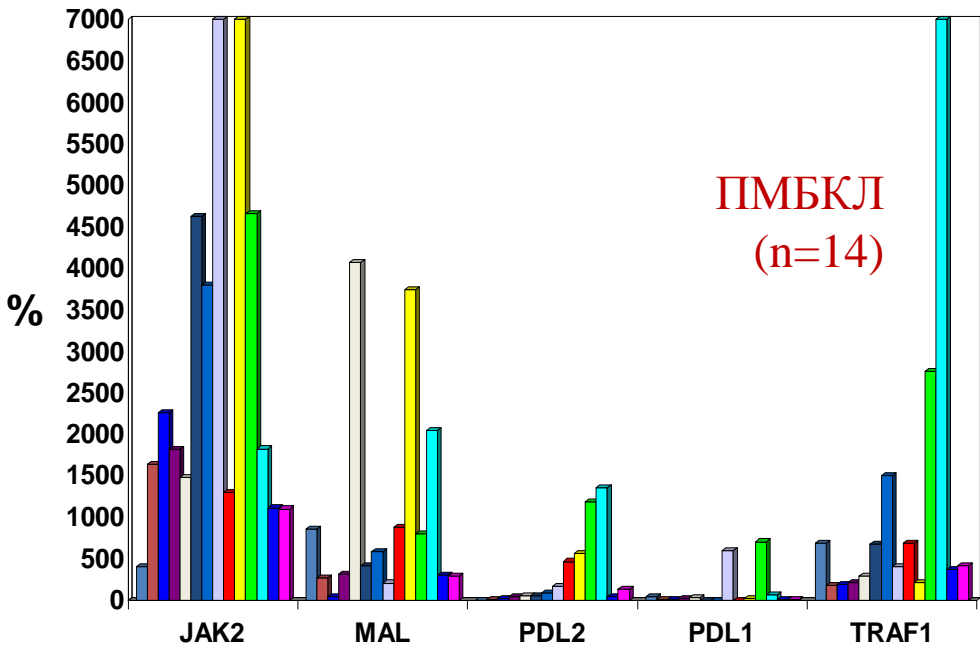
65% - профиль экспрессии генов ПМБКЛ

35% - ДБККЛ (ABC GC тип)

Относительный уровень экспрессии генов (ПЦР в реальном времени) (n=37)

Вывод:

Гены JAK2, MAL, PDL2, TRAF1 являются специфическими и чувствительными маркерами в дифференциальной диагностики ДБККЛ с первичным вовлечением л/у средостения и ПМБКЛ



J Mangasarova, A Misyurin, A Magomedova. EHA 2011. Abstract 1385.

Я.К.Мангасарова, А.В.Мисюрин, А.У.Магомедова, С.К.Кравченко, А.М.Кременецкая, А.И.Воробьев. Клиническая онкогематология. 2011; 2, с.142-145.

Детекция МДБ при АККЛ

- Молекулярное исследование выполнено у 21 больного (64 биологических образца);
- В дебюте заболевания образцы исследовались на обнаружение химерных транскриптов: *NPM-ALK*, *AT1C-ALK*, *TPM4-ALK*, *TPM3-ALK*, *CTCL-ALK*, *SEC31A-ALK*, *MUN9-ALK*, *MSN-ALK*, *ALO17-ALK*;
- При детекции МДБ производился мониторинг минимальной резидуальной болезни по этапам терапии:
 - после 2 и 6 курсов ХТ
 - после окончания лечения – каждые 3 мес в течение 1 года
 - каждые 6 мес в течение 2 года наблюдения

Л.Г. Горенкова, С.К. Кравченко, А.В. Мисюрин и др. 2012 Гематология и трансфузиология, №3, стр. 43. Материалы Конгресса гематологов России 2-4 июля 2012 г., Москва

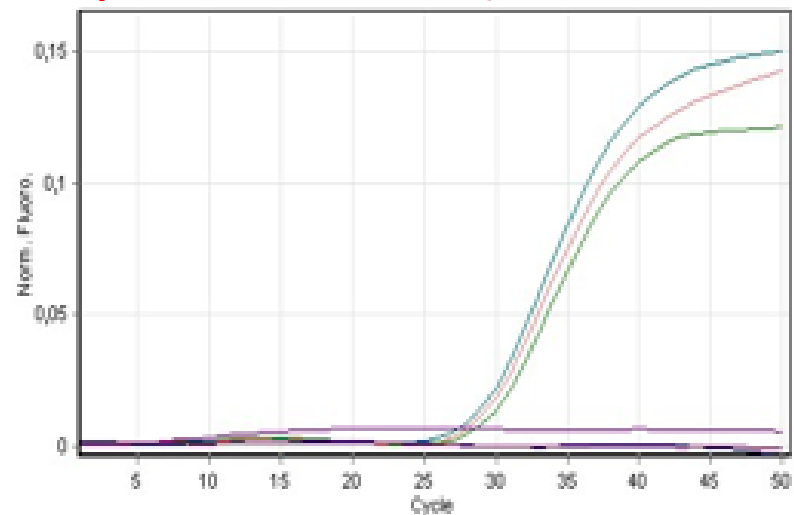
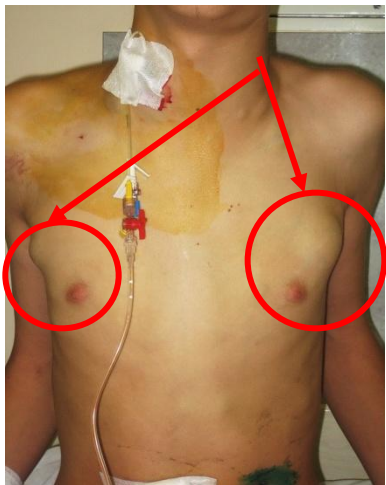
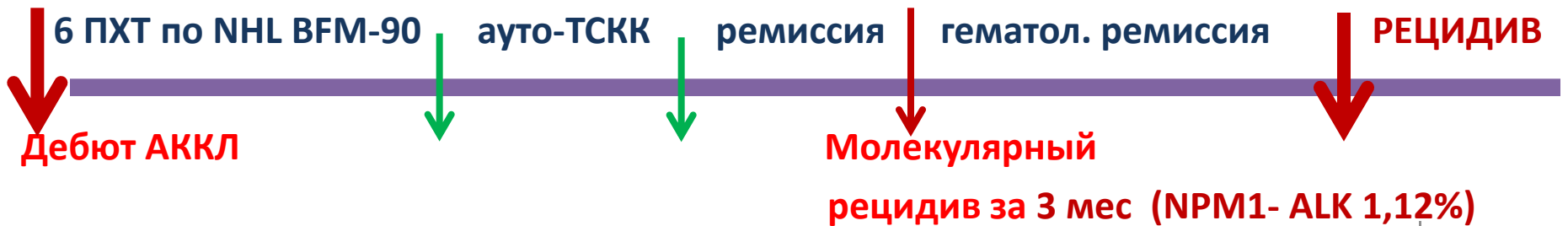
Liliya Gorenkova, Sergey K Kravchenko, MD, Yulia Vinogradova, Ekaterina Ilyushkina, Andrey Misurin and Valeryi G Savchenko. #1622, ASH 2011

АККЛ: анализ рецидива

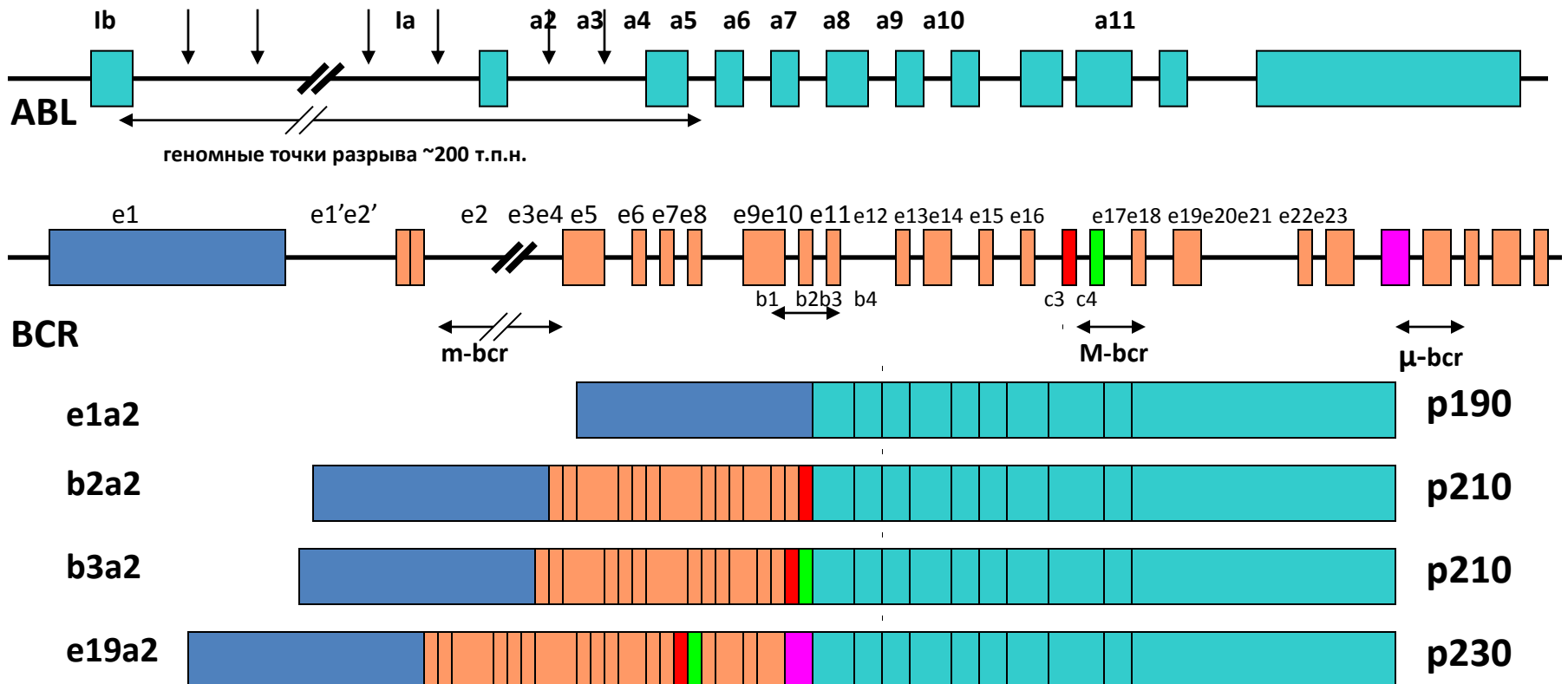
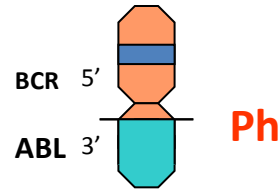
Пациент N, 17 лет.

Объем поражения - гепатоспленомегалия, периферическая, абдоминальная лимфоаденопатия, множественные подкожные образования

При гистологическом и ИГХ исследовании поражение к/м не выявлено

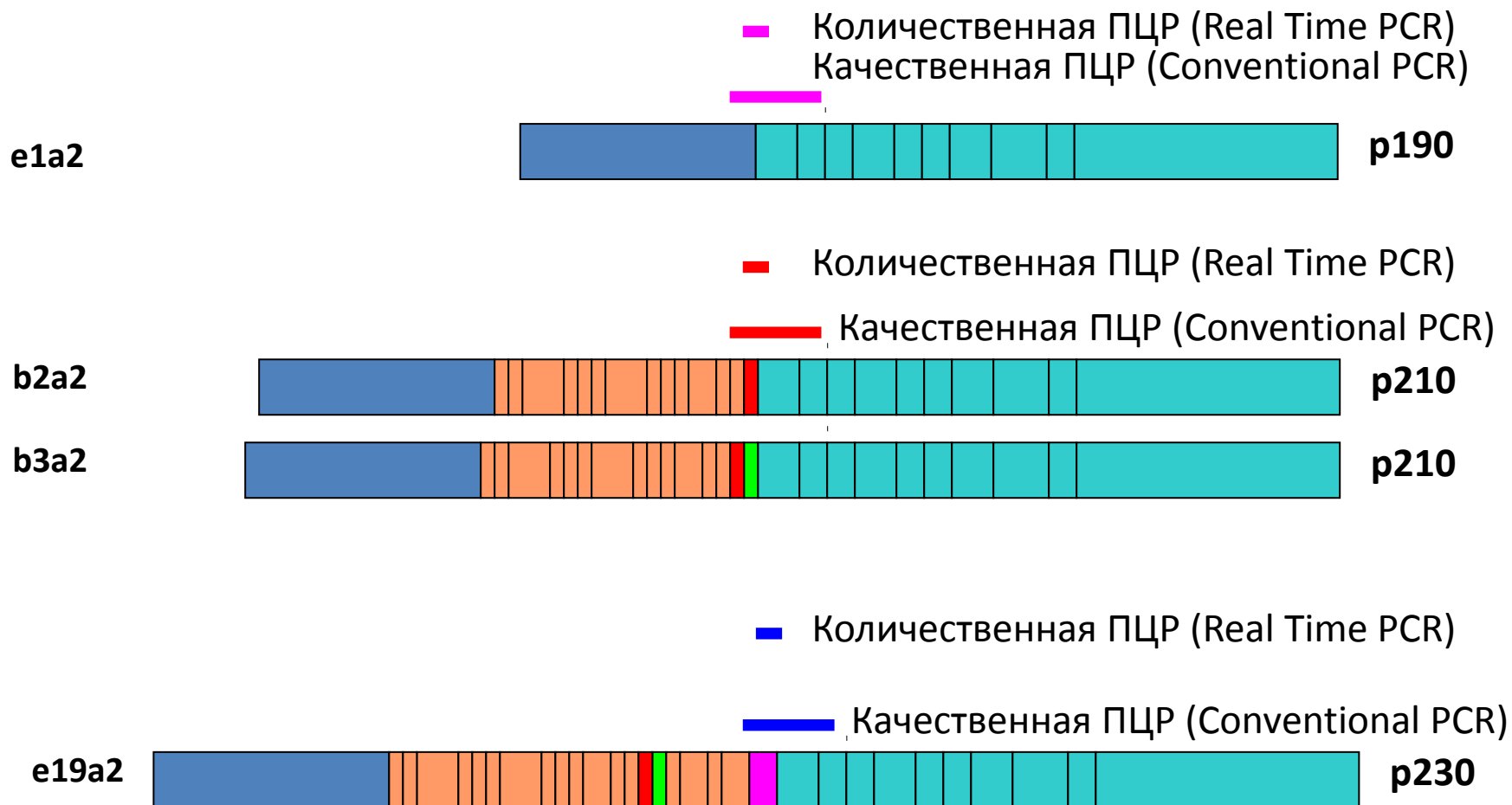


Варианты химерного онкогена BCR/ABL

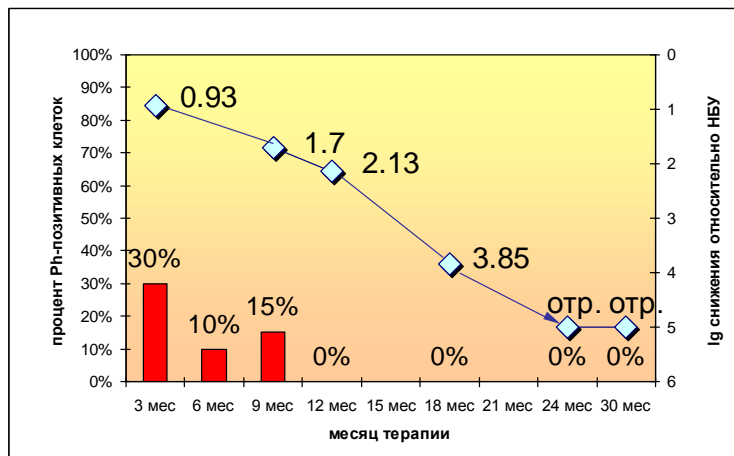


Качественная и количественная ПЦР при анализе экспрессии гена BCR/ABL:

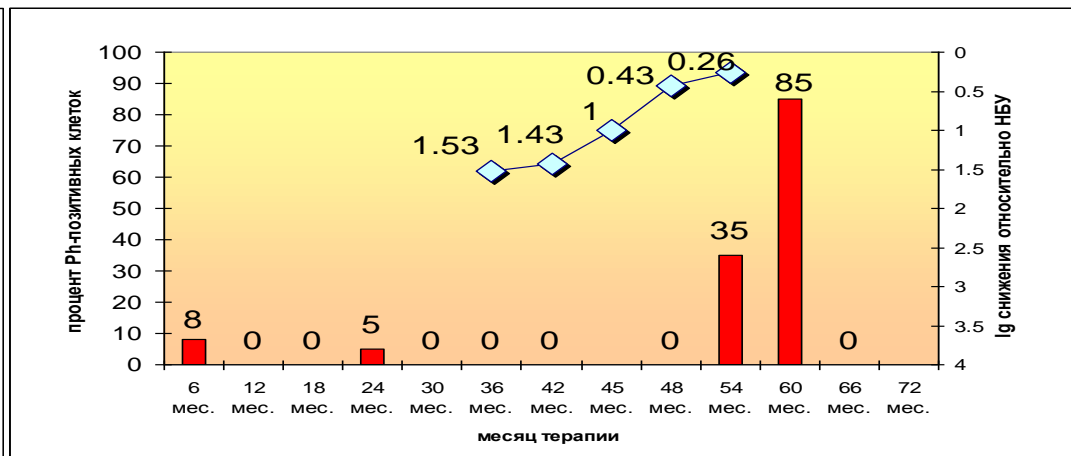
разница в длине фрагментов и охвате экзонов



Количественный анализ: молекулярный мониторинг ХМЛ

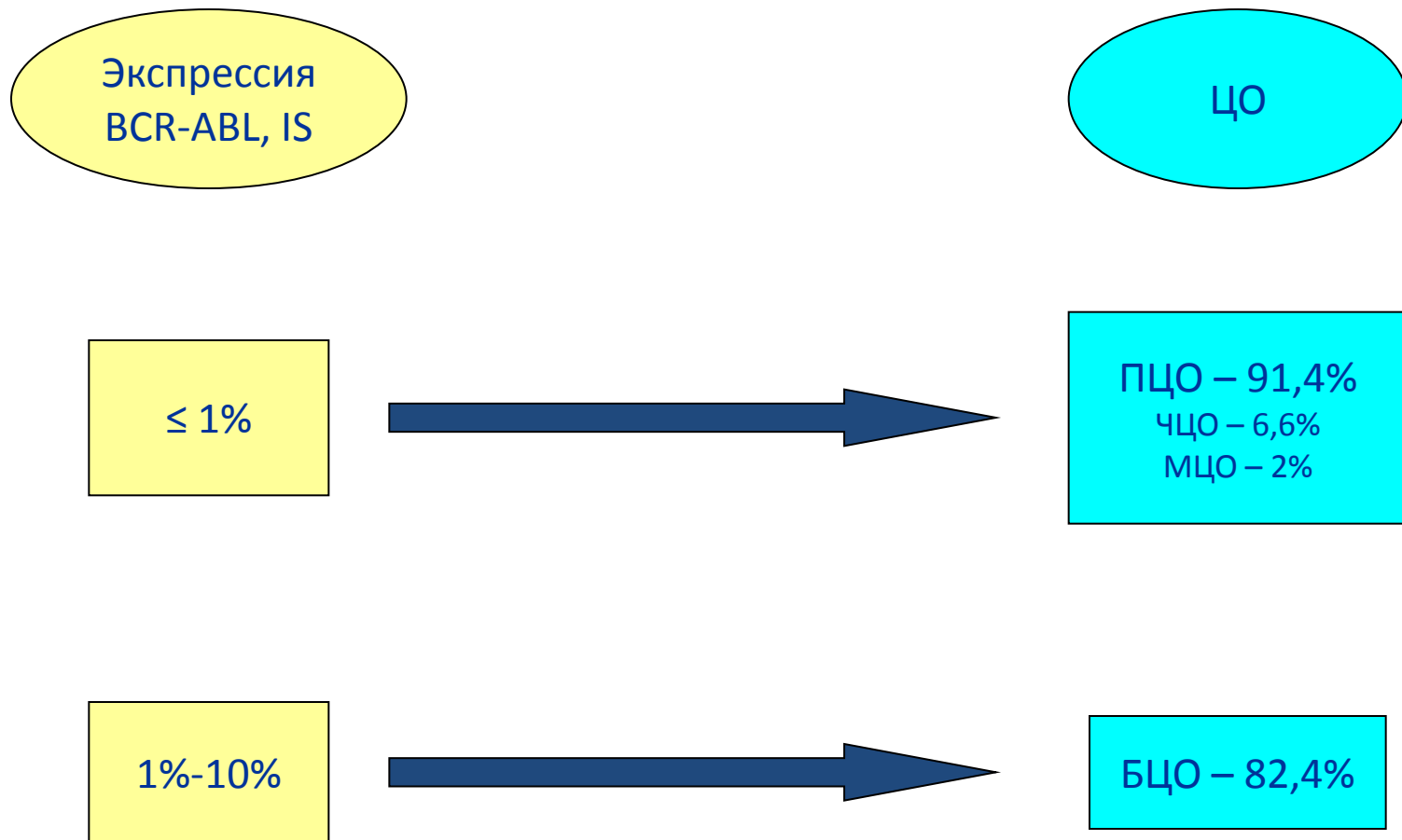


Успешное лечение

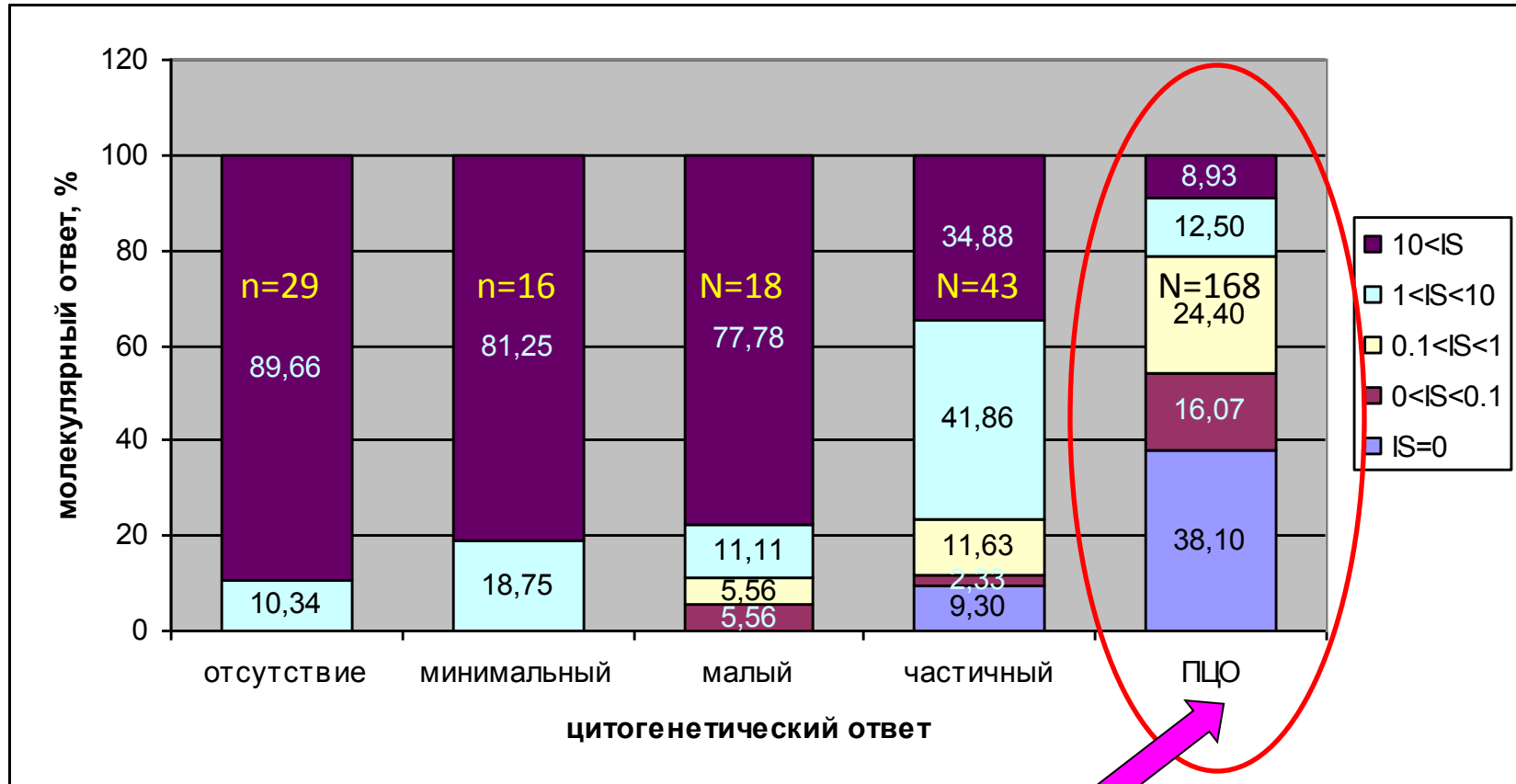


Рецидив

Сопоставление экспрессии BCR-ABL и цитогенетического ответа при ХМЛ

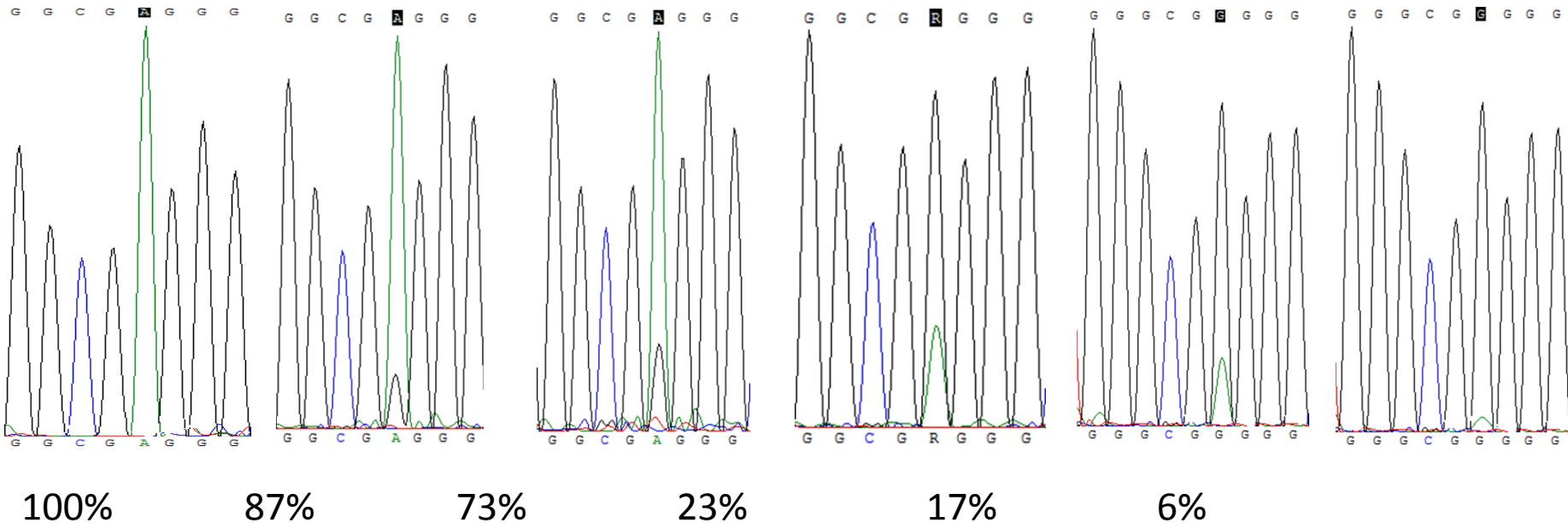


Сопоставление ЦО и МО



Группа пациентов с ПЦО неоднородна по уровню экспрессии BCR-ABL

Соматическая мутация G749A гена BCR/ABL при смене терапии ХМЛ





Вильям Дамешек предложил объединить ИП, ЭТ и ИМФ вместе с хроническим миелолейкозом в одну группу благодаря сходству клинических и морфологических свойств, а также на основании предположения об общей патогенетической природе этих заболеваний

ent, but that they are closely interrelated. It is possible that these various conditions—"myeloproliferative disorders"—are all somewhat variable manifestations of proliferative activity of the bone marrow cells, perhaps due to a hitherto undiscovered stimulus. This may affect the marrow cells diffusely or irregularly with the result that various syndromes, either clear-cut or transitional, result. Among them are the following: chronic granulocytic leukemia, polycythemia vera, idiopathic or "agnogenic" myeloid metaplasia of the spleen (and liver), thrombocythemia, megakaryocytic leukemia and erythroleukemia (diGuglielmo's syndrome.) These more or less different types of cellular proliferation of the marrow are listed in table 1.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood 1951; 6:372-5.

Молекулярные маркеры Pn-негативных хМПЗ

Гиперэкспрессия гена PRV-1

(Temerrinac S, Klippel S, Strunck E, et al. Blood. 2000; 95:2569-2576)

Точечная мутация V617F гена Jak2-киназы

(James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. Nature. 2005; 434:1144-1148)

Истинная полицитемия - 90-95%

Эссенциальная тромбоцитемия –50-70%

Идиопатический миелофиброз - 40-50%

Редкие мутации при хМПЗ

Кластер мутаций гена *JAK2* в 12 экзоне
(микроделеции точечные мутации, затрагивающие
аминокислотные остатки в положении 537-542 белка *Jak2*)

LM Scott, W Tong, et al. N Engl J Med. 2007. Feb 1;356(5):459-68

Мутация *MPL*^{W515L}

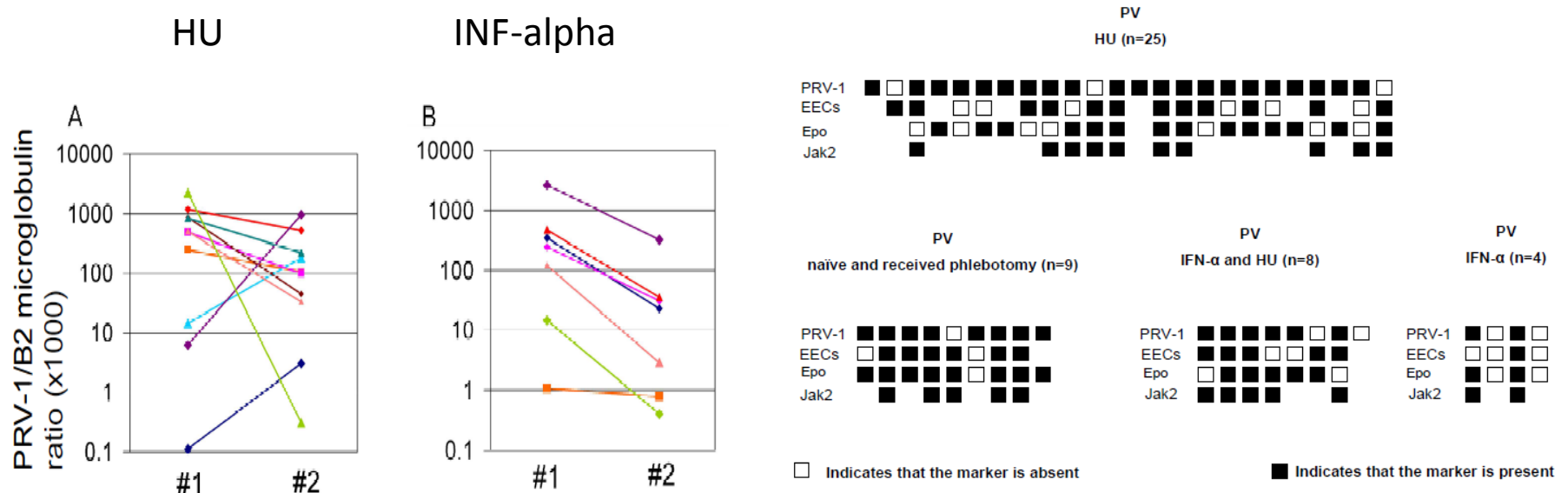
Y Pikman, BH Lee, et al. PLoS Med. 2006. 3(7): e270, 1140-51

Application of PRV-1 mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea

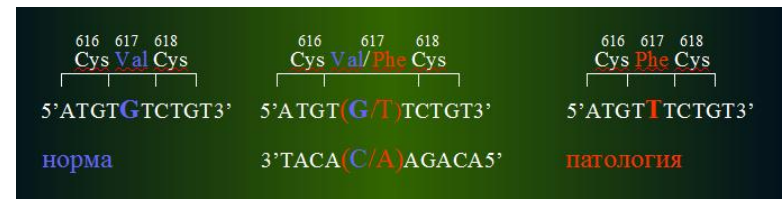
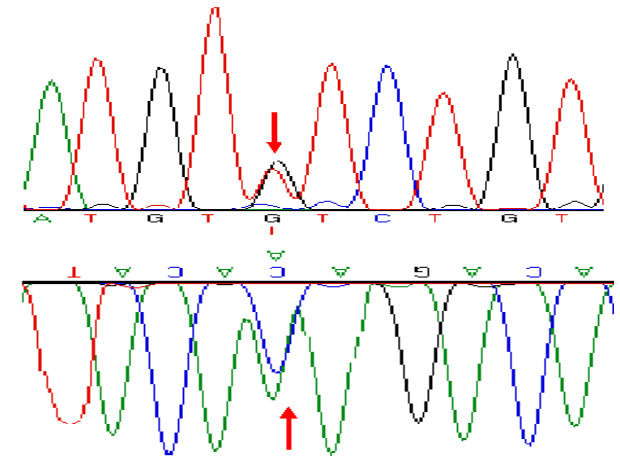
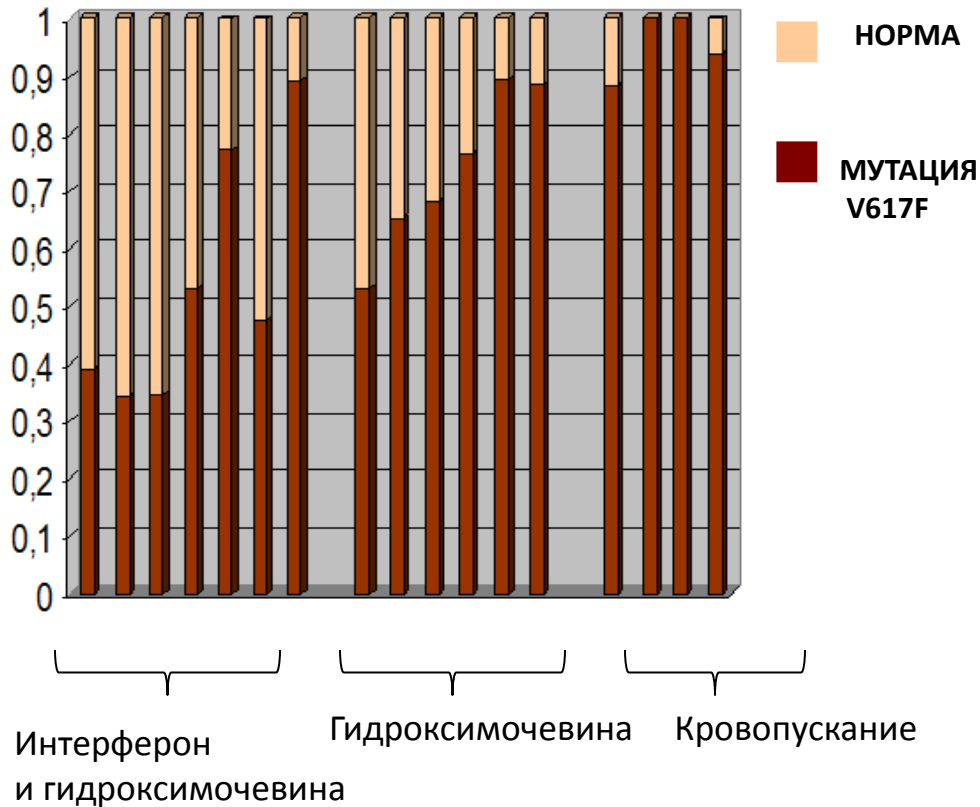
V. TUTAEVA¹, A. V. MISURIN¹, J. J. MICHIELS², J. M. ROZENBERG¹, M. A. SOKOLOVA¹, V. L. IVANOVA³, T. I. KOLOSHEINOVA¹, T. E. MANAKOVA¹, A. A. LEVINA¹, E. A. SEMENOVA¹, & N. D. KHOROSHKO¹

¹National Hematology Research Centre, Novui Zulkovskii pr 4A 125167 Moscow, Russia, ²Goodheart Institute and Foundation Hematology, Hemostasis and Thrombosis Science Center, Rotterdam, The Netherlands, and ³S.P. Botkin Hospital, 2-i Botkinskii pr d5 Moscow, Russia

(Received 14 February 2007)



Аллельная нагрузка Jak2 V617V



Случаи обнаружения гена BCR/ABL при хМПЗ

с 1964 г по 2005 г:

В более ранних публикациях , предшествовавших эре Jak2V617F, неоднократно упоминались случаи хМПЗ, при исследовании которых выявляли экспрессию гена BCR/ABL.

*Kemp NH, Stafford JL, Tanner T. Br Med J. 1964;5389:1010–14;
Hoppin EC, Lewis JP. Ann Intern Med. 1975;83:820–823;
Saviola A, et al. Eur J Haematol. 2005;75:264–266.*

В 2007 г:

Описаны два случая ИП, которые в дебюте были BCR/ABL-негативными, однако в результате прогрессии заболевания приобрели черты классического ХМЛ с экспрессией BCR/ABL и выявляемой при проведении цитогенетического исследования Филадельфийской хромосомой.

I Mirza, Arch Pathol Lab Med 2007 Nov; 131: 1719-24

Опубликовано наблюдение за больным Ph+ ХМЛ, у которого одновременно выявлялась мутация Jak2 V617F

Krämer A., et al. The Lancet Onc., v8, i7, 658-660

Два клона или один? Дискуссия продолжается.

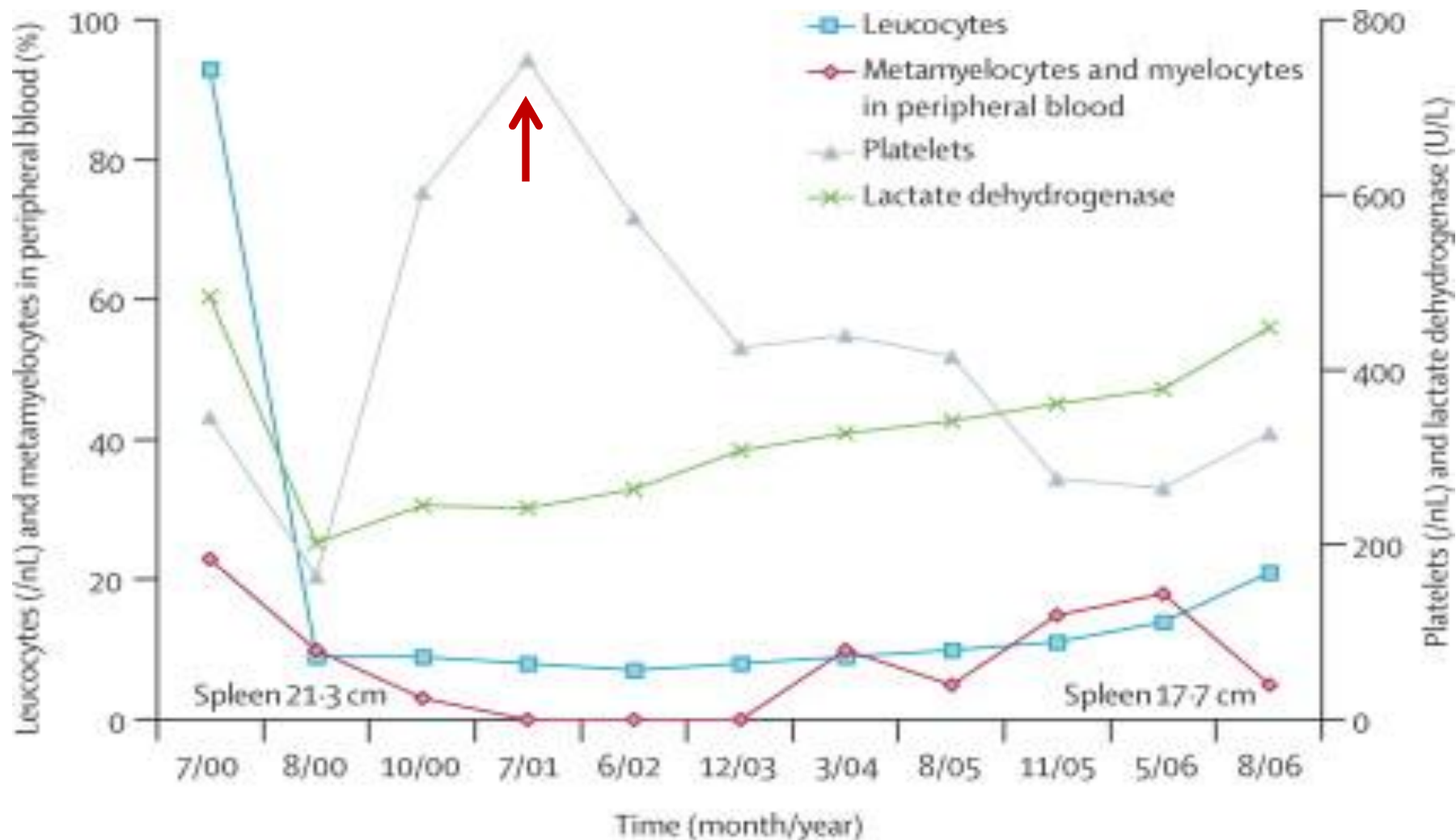
2008:

Monica Bocchia и Alessandro M. Vannucchi наблюдали присутствие экспрессии гена BCR/ABL и наличие мутации Jak2 V617F в индивидуальных эритроидных и гранулоцитарных колониях, выращенных с использованием метилцеллюлозы.

Небольшое количество колоний были только Jak2 V617F-положительными и не экспрессировали BCR/ABL.

Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, et al. Insights into JAK2–V617F mutation in CML. Lancet Oncol. 2007;8:864–6.

Показатели крови при терапии иматинибом больного МФ ВСR/ABL+, Jak2V617F+



Тромбоцитоз у BCR-ABL+ / Jak2 V617F+ больных при терапии иматинибом

На терапии иматинибом вслед за нормализацией лейкоцитов у BCR-ABL+ / Jak2 V617F+ больных следует резкое повышение числа тромбоцитов (до 1000×10^9).

Для снижения тромбоцитоза использовали гидроксимочевину.

Krämer A., et al. The Lancet Oncol. 2007; 8:658-660

Conchon M.R.M., et al. Int J Hematol. 2008; 88: 243-245

Jallades L., et al. Leukemia Res. 2008; 32: 1608-1610

Случаи обнаружения гена BCR/ABL при хМПЗ

В 2009 году опубликовано сообщение о больном миелофиброзом, у которого наблюдали 2 независимых клона. Один из клонов опухолевых клеток был носителем del(13)(q12;q21) и ассоциировался с миелофиброзом, а другой клон был типичным для ХМЛ и имел t(9;22)(q34;q11). Уровень экспрессии гена BCR/ABL составил 3,4%, мутации гена Jak2 отсутствовали.

Laib S., et al. Leukemia Res. 2009; 33: 1133-1136

В 2010 году сочетание экспрессии BCR/ABL и мутации Jak2V617F описано у беременной женщины (Иран, Тегеран)

G Toogeh, et al. Med Oncol. 2010 May 25

В 2010 году описано сочетания BCR/ABL-положительного ХМЛ и Jak2V617F-положительной эритремии у 60-летнего мужчины из Малайзии. Оказалось, что эти маркеры существовали в разных опухолевых клонах, каждый из которых был причиной одной из болезней у этого пациента.

Bee PC, et al. Int J Hematol. 2010 Jan;91(1):136-9

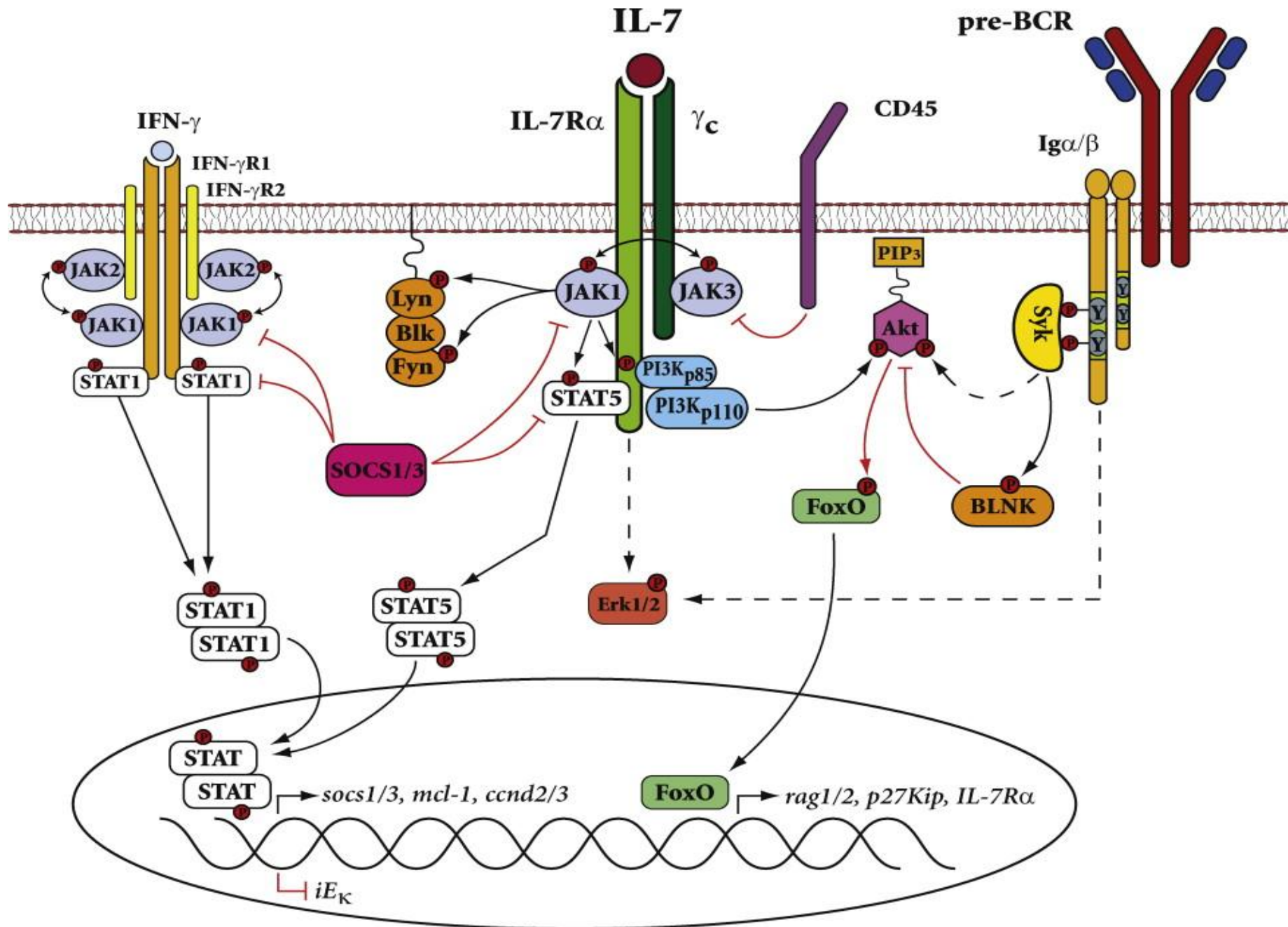
Результаты

Онкомаркер	% встречаемости	
Экспрессия BCR/ABL		
P190	1%	(2 из 151)
P210	28%	(41 из 151)
P230	-	-
Всего:	29%	(43 из 151)
Мутации:		
Jak2V617F	78%	(117/151)
Jak2-ex12	1%	(2/151)
MPLW515L/K	-	-
Всего:	79%	(119/151)

Результаты

Показатели крови				
Статус	Гемоглобин	Тромбоциты	Эритроциты	Лейкоциты
BCR/ABL	Hb медиана	Tr медиана	Er медиана	L медиана
BCR/ABL- положительные	133гp/л (62-218)	485 *10 ⁹ /л (93-5970)	4,9*10 ¹² /л (2,4-7,3)	45*10 ⁹ /л (2,1-32,4)
BCR/ABL- отрицательные	138гp/л (72-205)	439 *10 ⁹ /л (4,26-2000)	4,3*10 ¹² /л (2,49-9,3)	9,4*10 ⁹ /л (2,5-280)

p=0,017





УДК 577.215.037

НОВЫЕ ТОЧКИ РАЗРЫВА ТРАНСЛОКАЦИИ t(9;22) ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

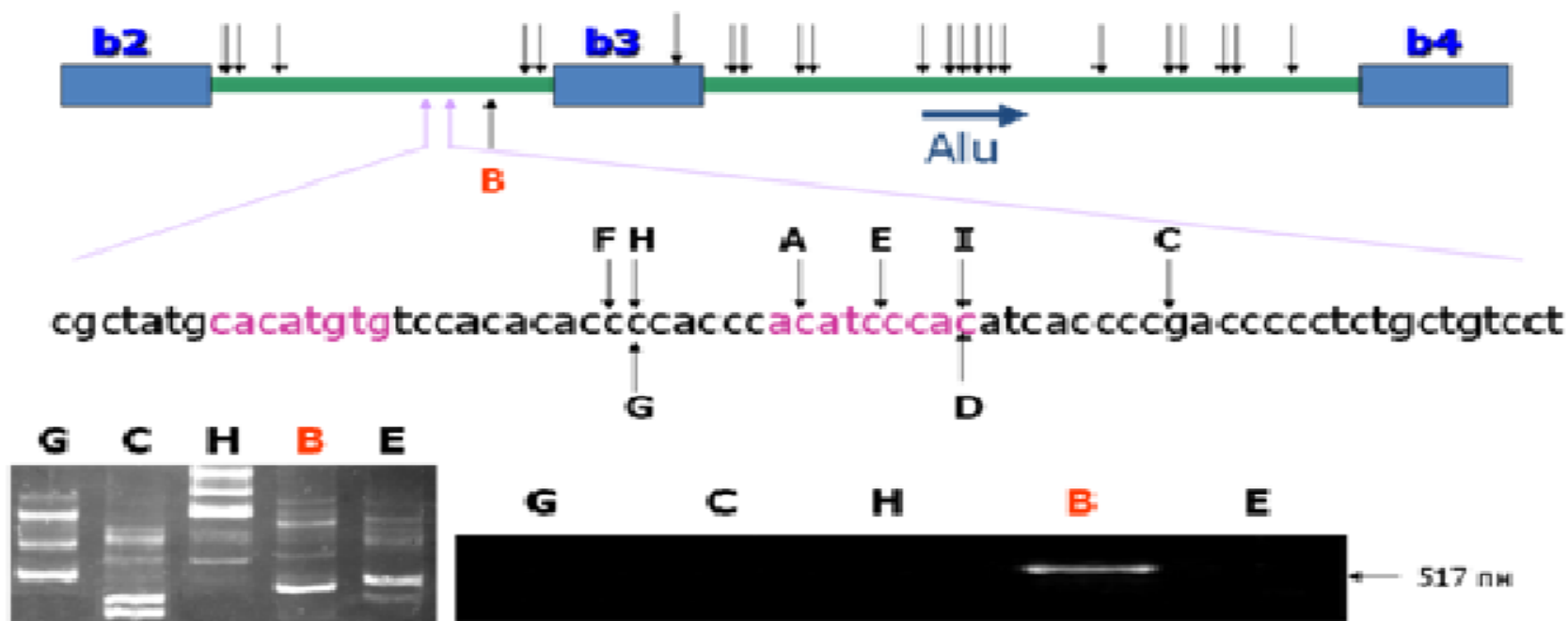
© 1999 г. А. В. Мисюрин[#], В. Л. Сурин, А. Ф. Тагиев

Гематологический научный центр РАМН,
125167, Москва, Новозыковский пр., 4а

Поступило в редакцию 18.03.98 г. Принято к печати 05.10.98 г.

Изучено 9 новых точек разрыва (участков слияния) генов *BCR* и *ABL* в составе химерного онкогена *BCR/ABL* при транслокации t(9;22) у больных хроническим миелолейкозом. Впервые обнаружены совпадающие точки разрыва у разных больных в генах *BCR* и *ABL*. Фрагменты ДНК, содержавшие точки разрыва *BCR/ABL*, были амплифицированы при помощи ПЦР-прогулки на основе модификации метода ПЦР со случайным отжигом праймеров, названной обратной праймерной прогулкой.

Ключевые слова: t(9;22); точки разрыва; хронический миелолейкоз; ПЦР-прогулка.



ORIGINAL ARTICLE

Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR–ABL indicate distinct mechanisms of formation

J Score¹, MJ Calasanz², O Ottman³, F Pane^{4,5}, RF Yeh⁶, MA Sobrinho-Simões⁷, S Kreil¹, D Ward¹, C Hidalgo-Curtis¹, JV Melo⁷, J Wiemels⁶, B Nadel⁸, NCP Cross^{1,9} and FH Grand^{1,9}

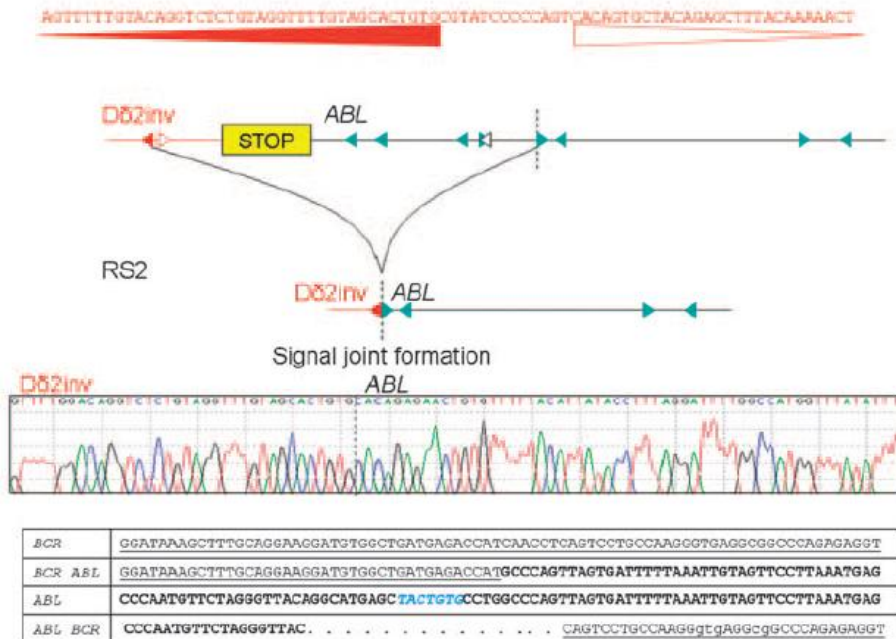
¹Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury and Human Genetics Division, University of Southampton School of Medicine, Southampton, UK; ²Department of Genetics, School of Science, University of Navarra, Pamplona, Spain; ³Department of Hematology and Oncology, Goethe University, Frankfurt, Germany; ⁴Division of Hematology, University of Naples Federico II, Naples, Italy; ⁵CEINGE—Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy; ⁶Department of Epidemiology and Biostatistics, University of California-San Francisco, San Francisco, CA, USA; ⁷Department of Haematology, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, Imperial College, London, UK and ⁸Centre d’Immunologie de Marseilles, France

We sought to understand the genesis of the t(9;22) by characterizing genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia (CML) and BCR–ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). BCR–ABL breakpoints were identified in p190 ALL (n=25), p210 ALL (n=25) and p210 CML (n=32); reciprocal breakpoints were identified in 54 cases. No evidence for significant clustering and no association with sequence motifs was found except for a breakpoint deficit in repeat regions within BCR for p210 cases. Comparison of reciprocal breakpoints, however, showed differences in the patterns of deletion/insertions between p190 and p210. To explore the possibility that recombinase-activating gene (RAG) activity might be involved in ALL, we performed extra-chromosomal recombination assays for cases with breakpoints close to potential cryptic recombination signal sequence (cRSS) sites. Of 13 ALL cases tested, 1/10 with p190 and 1/3 with p210 precisely recapitulated the forward BCR–ABL breakpoint and 1/10 with p190 precisely recapitulated the reciprocal breakpoint. In contrast, neither of the p210 CMLs tested showed functional cRSSs. Thus, although the t(9;22) does not arise from aberrant variable (V), joining (J) and diversity (D) (V(D)J) recombination, our data suggest that in a subset of ALL cases RAG might create one of the initiating double-strand breaks.

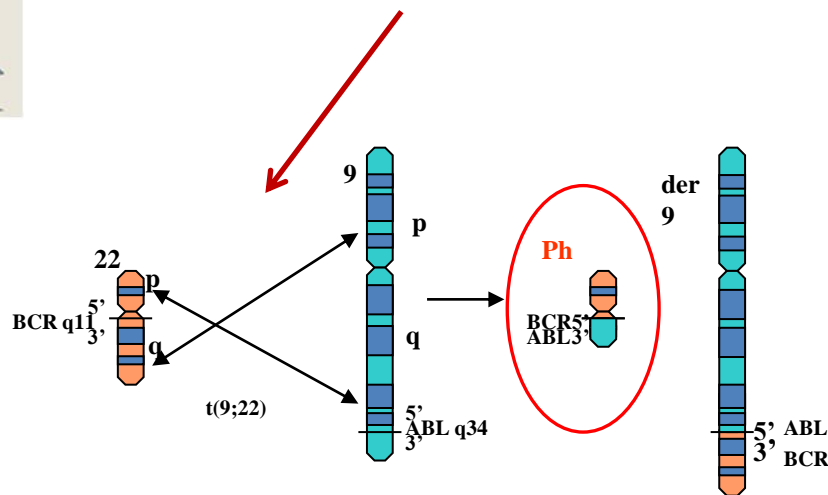
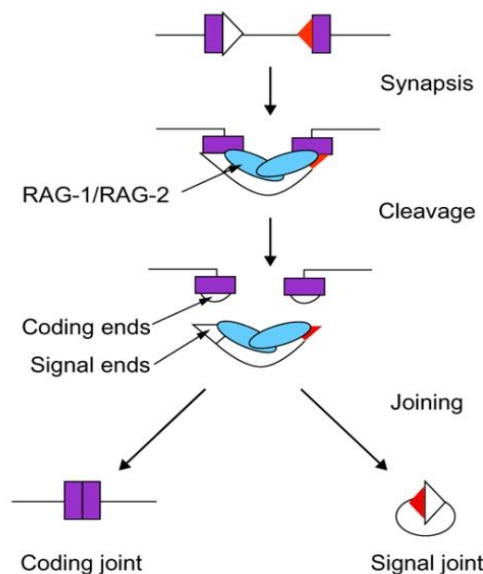
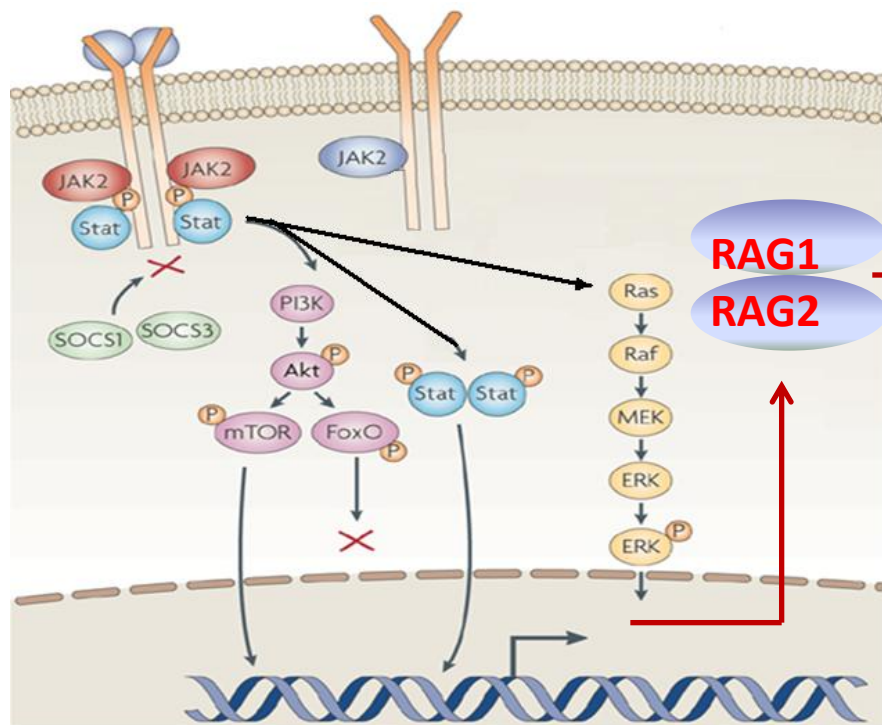
Leukemia (2010) 24, 1742–1750; doi:10.1038/leu.2010.174; published online 12 August 2010

Keywords: BCR–ABL; breakpoints; RAG

BCR	TTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCGCTTGAGCTCAGGAGTTGGAGACCAGCCGACCAACATGGTGAACCCCTGTGTCT
BCR ABL	TTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCGCTCGAGCTCAGGAGCACAGAGAACTGTGTTTTTACATCATACCTTTAGGATTT
ABL	TCTGTTAGGAATCTGGAGCAAATCCTATTCTTTTGAAGCACAGAGAACTGTGTTTTTACATTATACCTTTAGGATTT
ABL BCR	MLPA failed

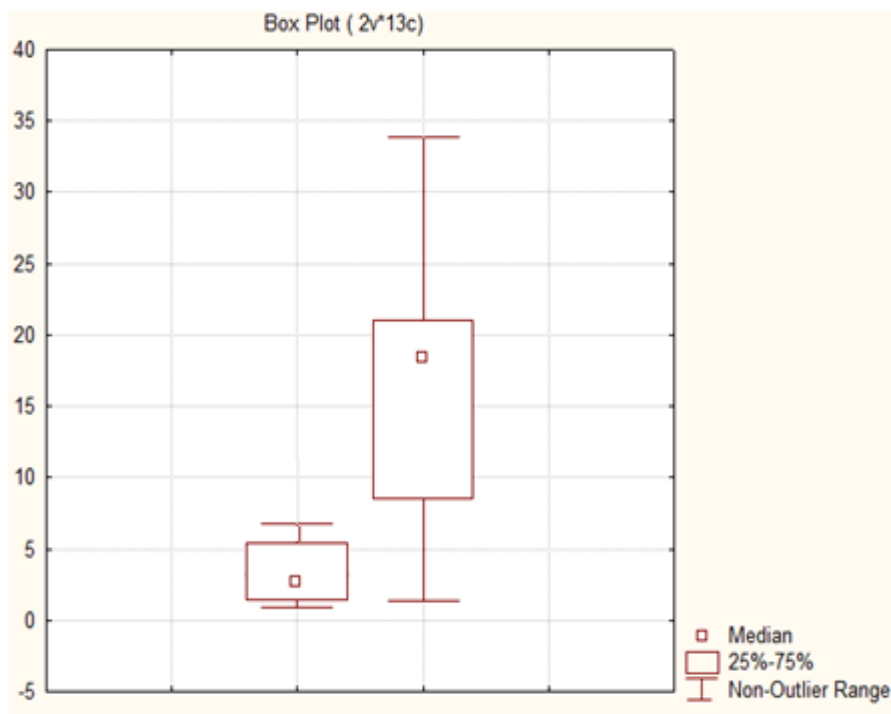


Молекулярный механизм высокой частоты транслокации t(9;22) у больных хМПЗ



Экспрессия генов RAG1 и RAG2

в гранулоцитах здоровых доноров (N=24) и больных Jak2-V617F-положительных хМПЗ (N=56)

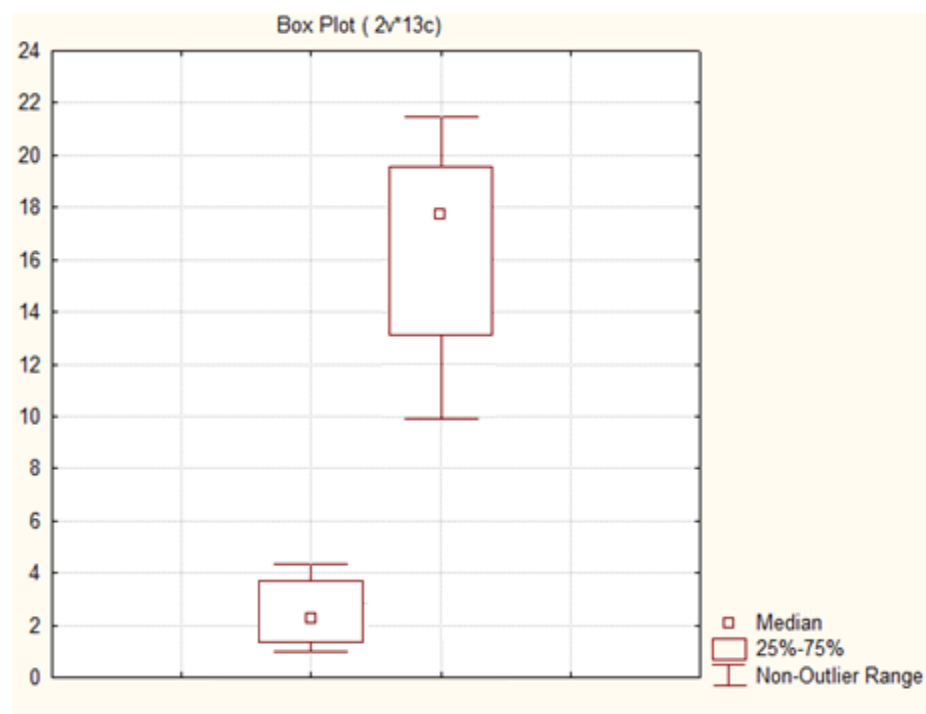


RAG1 (xMПЗ) > RAG1 (норма)

Медиана RAG1 (xMПЗ) = 18,97%

Медиана RAG1 (норма) = 2,63%

$p = 0,0021$



RAG2 (xMПЗ) > p21 (bcr1)

Медиана RAG2 (xMПЗ) = 18,20%

Медиана RAG2 (норма) = 2,41%

$p = 0,0037$

Экспрессия генов E2A, FOXO1 и FOXP1 в гранулоцитах здоровых доноров (N=24) и больных Jak2-V617F-положительных хМПЗ (N=56)

Ген	Норма (N=24)	Jak2 V617F + (N=56)	Статистическая значимость
E2A	0,35%	4,71%	P=0,011
FOXO1	0,95%	5,32%	P=0,017
FOXP1	4,51%	8,84%	P=0,043
RAG1	2,63%	18,97%	P=0,0021
RAG2	2,41%	18,20%	P=0,0037

Мисюрин Андрей Витальевич

and@genetechnology.ru

+7 499 530 01 95