

## ДЕТЕКЦИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ DNMT3A ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ МЕТОДОМ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г.

Министерство здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург  
Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург

### РЕЗЮМЕ

Цель исследования – определить частоту точечных мутаций гена *DNMT3A* при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) методом прямого автоматического секвенирования.

**Материал и методы.** Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 34 больных ОМЛ в возрасте от 21 до 64 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре (г. Екатеринбург) в период с 2012 по 2014 г., из них с морфологическим вариантом ОМЛ М0 – 3 пациента, М1 – 1, М2 – 12, М3 – 3, М4 – 10, М5 – 2, М6 – 1, М7 – 1 пациент, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль обнаружена у одного больного. Выделение тотальной РНК из лейкозных клеток проводили методом сорбции на силикагелевом носителе либо методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной (силикой) в миницентрифужной колонке с последующей обратной транскрипцией. Участки кДНК, соответствующие экзонам 18–26 гена *DNMT3A*, амплифицировали методом полимеразной цепной реакции. Детекцию мутаций гена *DNMT3A* проводили методом прямого автоматического секвенирования с использованием генетического анализатора ABI Prism 310.

**Результаты.** Функционально значимые точечные мутации гена *DNMT3A* обнаруживались в 5,9% проб, во всех случаях – при ОМЛ, развившихся в исходе миелодиспластического синдрома, и были представлены несинонимичными нуклеотидными заменами. Частота детекции указанных мутаций при морфологических вариантах ОМЛ М2 и М4 без хромосомных aberrаций и точечных мутаций гена *TP53* составляла 14,3%, что сопоставимо с данными многоцентровых международных исследований. Наряду с мутациями гена *DNMT3A* в указанных образцах определялись точечные мутации генов *NPM1*, *KRAS*, *WT1*. Во всех наблюдениях ОМЛ с мутациями гена *DNMT3A* ассоциировались с низкой эффективностью стандартной программной полихимиотерапии цитарабином в сочетании с антрациклиновыми антибиотиками и неблагоприятным прогнозом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** точечная мутация, острый миелоидный лейкоз, ген *DNMT3A*, прямое автоматическое секвенирование.

### Введение

Гены семейства *DNMT3* (*DNMT3A* – район 2p23.3, *DNMT3B* – 20q11.21) кодируют ферменты – ДНК-метилтрансферазы, катализирующие метилирование нуклеотидных остатков ДНК, а именно необратимый перенос метильных групп от S-аденозил-метионина на цитидин, находящийся в специфическом ДНК-контексте (CpG-островки), обуславливая эпигенетическую модификацию экспрессии генов. Нарушение процессов метилирования ДНК при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) было обнаружено достаточно

давно, однако лишь в 2010 г. T.J. Ley et al., используя технологию полногеномного секвенирования ДНК, установили, что мутации гена *DNMT3A* выявляются в 22,1% случаев ОМЛ, при этом более половины выявленных миссенс-мутаций приводили к повреждению остатка аргинина в 883 позиции метилтрансферазного домена белка dnmt3a [1]. Наибольшая частота мутаций *DNMT3A* обнаружена в цитогенетической группе ОМЛ промежуточного риска (диплоидный кариотип blastov), наименьшая – при ОМЛ со специфическими хромосомными транслокациями t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11), а также инверсией inv(16)(p13;q22), ассоциированными с благоприятным прогнозом [2, 3]. В последующих исследованиях было установлено, что

✉ Виноградов Александр Владимирович, тел. 8-343-270-1899;  
e-mail: vinogradov-av@russia.ru

мутации гена *DNMT3A* являются ранним генетическим событием, приводящим к предлейкемической трансформации гемопоэтических клеток-предшественников, что может клинически манифестировать миелодиспластический синдром (МДС) или хроническое миелопролиферативное заболевание (ХМПЗ), сравнительно быстро трансформирующиеся в ОМЛ, и ассоциированы, таким образом, с неблагоприятным прогнозом [3–5]. Однако, несмотря на то что мутации *DNMT3A* оказались достаточно широко распространенными при МДС, ХМПЗ и ОМЛ, их выявление не нашло широкого применения в практической онкогематологии из-за отсутствия доступных коммерческих тест-систем и алгоритмов детекции.

Цель исследования – определить частоту точечных мутаций в гене *DNMT3A* при ОМЛ методом прямого автоматического секвенирования.

## Материал и методы

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 34 больных ОМЛ в возрасте от 21 до 64 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре (г. Екатеринбург) в период с 2012 по 2014 г. Среди них с морфологическим вариантом ОМЛ М0 по классификации ВОЗ [6] наблюдалось 3 пациента, М1 – 1, М2 – 12, М3 – 3, М4 – 10, М5 – 2, М6 – 1, М7 – 1 пациент, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль обнаружена у одного больного.

Всем пациентам выполнено цитогенетическое (G-banding) и (или) молекулярно-генетическое (полимеразная цепная реакция, ПЦР) исследование. Методом прямого автоматического секвенирования исследованы на наличие молекулярных повреждений экзоны 18–26 гена *DNMT3A*. Кроме того, в 32 образцах методом прямого автоматического секвенирования исследованы на наличие мутаций экзоны 7–12, 16–19 гена *KIT* и экзоны 12–15, 19–21 гена *FLT3*, в 31 – экзоны 1–4 гена *NRAS* и экзоны 6–9 гена *WT1*, в 30 – экзоны 4–11 гена *TP53* и экзоны 9–12 гена *NPM1*, в 18 – экзон 13 гена *ASXL1* и экзоны 1–4 гена *KRAS*, в соответствии с ранее описанными методиками [7–9].

Выделение тотальной РНК из лейкозных клеток проводили методом сорбции на силикагелевом носителе либо методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной (силикой) в миницентрифужной колонке с помощью комплекта реагентов QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции с целью получения кДНК проводили с использованием ревертазы М-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов («РЕВЕРТА-Л», ЦНИИ

эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва). Целевые участки исследуемых генов клонировали методом ПЦР в виде одного фрагмента с помощью праймеров, разработанных на основе депонированных в GenBank (NCBI) нуклеотидных последовательностей (NM\_175629, транскрипционный вариант 1 гена *DNMT3A*) и представленных в табл. 1. Анализ продуктов амплификации выполняли методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Таблица 1

Последовательности праймеров для амплификации и секвенирования экзонов 18–26 гена <i>DNMT3A</i>		
Название	Последовательность	Область применения
DNMT-F	5' GCACAAGGGTACCTACGG 3'	Амплификация экзонов 18–26
DNMT-R	5' TTAACCTTTGTGTCGCTACCTCA 3'	
DNMT-S1	5' TTCTTCGCTAATAACCAC 3'	Секвенирование
DNMT-S2	5' CCATGGGCGTTAGTGACA 3'	

Секвенирование кДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 по прямой и обратной последовательностям с использованием праймеров DNMT-S1 и DNMT-S2 согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот осуществляли с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0 [10].

Для проверки статистических гипотез применяли точный критерий Фишера. Доверительные интервалы (ДИ) для средних частот генных и хромосомных мутаций определены с вероятностью 95% на основе биномиального распределения.

## Результаты и обсуждение

Точечные мутации гена *DNMT3A* выявлены в двух пробах (5,9% при 95%-м ДИ от 1,6 до 19,1%) и были представлены в обоих случаях несинонимичными нуклеотидными заменами, приводящими к замене аминокислотного остатка в метилтрансферазном домене белка dnmt3a [11]. Первая проба, полученная от больного ОМЛ М2, который развился в исходе ХМПЗ, содержала точечную мутацию *G2645A* по второй позиции триплета CGC, приводящую к аминокислотной замене R882H (т.е. аргинина на гистидин в позиции 882). Указанная мутация была впервые описана А.М. Jankowska et al. при хроническом миеломоноцитарном лейкозе (ХММЛ) [11]. Позднее в эксперименте J. Xu et al. было показано, что лабораторные животные, трансфицированные вектором, содержащим ген *DNMT3A* с заменой *G2645A*, развивали клинику заболевания, похожего на ХММЛ, что подтверждало роль

указанной мутации в формировании предлейкемического фенотипа кроветворных клеток-предшественниц [12]. Наряду с мутацией в гене *DNMT3A* образец содержал также протяженную делецию кодирующей последовательности гена *WT1* (с 1289 по 1372 нуклеотид, что соответствует экзону 8), наличие которой приводило к укорочению кодируемого белка *Wt1* на 28 аминокислотных остатков. Вторая проба, полученная от больного ОМЛ М4, который развился в исходе ХММЛ, содержала точечную мутацию *C2141G* по второй позиции триплета ТСС, что приводило к аминокислотной замене S714C (т.е. серина на цистеин в позиции 714) в метилтрансферазном домене белка *Dnmt3a*. Наряду с указанной трансверсией в лейкоэмических клетках из этого образца определялась тетрауклеотидная инсерция в экзоне 12 гена *NPM1* (так называемая инсерция типа А [13]), а также две несинонимичные нуклеотидные замены в гене *KRAS* – G88C и A311C, приводящие, соответственно, к аминокислотным заменам D30N и K104T в кодируемом белке. Таким образом, мутации гена *DNMT3A* были выявлены в обоих случаях при ОМЛ, трансформированных из предшествующих МДС и ХМПЗ, и кооперировались на молекулярном уровне с мутациями генов *KRAS*, *NPM1* и *WT1*.

Сравнительно низкая частота выявления функционально значимых мутаций гена *DNMT3A* в исследуемой выборке может быть объяснена ее структурой. По данным литературы [2, 3] известно, что мутации *DNMT3A* ассоциированы с нормальным кариотипом, морфологическими вариантами ОМЛ М4 и М5, а также наличием тетрауклеотидных инсерций в экзоне 12 гена *NPM1*. В исследуемой выборке из 32 пациентов с кодирующей последовательностью экзонов 18–26 гена *DNMT3A* «дикого типа» в 13 случаях (40,6% при 95%-м ДИ от 23,9 до 55,0%) определялись структурные и (или) количественные хромосомные aberrации, в том числе в сочетании с точечными мутациями одного из исследуемых генов – 4 наблюдения, двух – 4, трех – 1 (тандемная дупликация в гене *FLT3*, несинонимичные трансверсии A1621C и C1288T в генах *KIT* и *WT1* соответственно, табл. 2).

В пробах больных ОМЛ без хромосомных aberrаций ( $n = 19$ ) и кодирующей последовательностью экзонов 18–26 гена *DNMT3A* «дикого типа» в семи случаях (21,9% при 95%-м ДИ от 19,1 до 59,0%) также определялись мутации одного из исследованных методом прямого автоматического секвенирования гена (в том

Таблица 2

Результаты детекции точечных мутаций генов <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>NPM1</i> , <i>WT1</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>ASXL1</i> и хромосомных аномалий у больных с кодирующей последовательностью экзонов 18–26 гена <i>DNMT3A</i> «дикого типа» ( $n = 32$ )					
Ген	Количество проб	Частота мутаций, % (абс.)	Кариотип в пробах, содержащих мутации ( $n$ )	Комбинации с мутациями других генов ( $n$ )	Морфологический подтип
<i>FLT3</i>	30	26,7 (8)	Нормальный (3) +8 (1) t(9;17) +8, -14 (1) t(15;17), inv(9) (1) Мало митозов (2)	<i>NPM1</i> (3), <i>KIT</i> (3), <i>WT1</i> (1), <i>ASXL1</i> (1)	M1, M2, M3, M4, M5, M6
<i>KIT</i>	30	23,3 (7)	Нормальный (3) add(2q) (1) t(15;17), inv(9) (1) add(1p), +6, +8 (1) Мало митозов (1)	<i>NPM1</i> (3), <i>FLT3</i> (3), <i>TP53</i> (1), <i>WT1</i> (1)	M1, M2, M3, M4, M6, ПДКО*
<i>NRAS</i>	29	17,2 (5)	Нормальный (2) Комплексные aberrации (1) del(5q), del(15q) (1) t(3;12), dup(1) (1)	<i>ASXL1</i> (2), <i>KRAS</i> (1)	M0, M2, M7
<i>WT1</i>	29	3,5 (1)	t(15;17), inv(9) (1)	<i>FLT3</i> (1), <i>KIT</i> (1)	M3
<i>NPM1</i>	28	21,4 (6)	Нормальный (4) Мало митозов (2)	<i>FLT3</i> (3), <i>KIT</i> (3)	M1, M2, M4, M6
<i>TP53</i>	28	7,1 (2)	Комплексные aberrации (1) Мало митозов (1)	<i>KIT</i> (1)	M2
<i>ASXL1</i>	17	23,5 (4)	+8 (1) del(5q), del(15q) (1) Комплексные aberrации (1) Неизвестен (1)	<i>NRAS</i> (2), <i>FLT3</i> (1)	M0, M2, M4
<i>KRAS</i>	16	6,3 (1)*	t(3;12), dup(1) (1)	<i>NRAS</i> (1)	M0

\* ПДКО – бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль;

\*\* экспрессия гена *NRAS* не определялась, по-видимому, вследствие наличия транслокации t(3;12)(q25;p13).

числе в 2 образцах – тетра nukлеотидные инсерции в экзоне 12 гена *NPM1* при морфологическом варианте ОМЛ М4), в трех (9,4% при 95%-м ДИ от 5,5 до 37,6%) – двух генов (в том числе по одному случаю – *NPM1* в комбинации с *FLT3* либо *KIT* при ОМЛ М2 и М4 соответственно), в двух (6,3% при 95%-м ДИ от 2,9 до 31,4%) – трех генов (в обоих случаях – инсерции в экзоне 12 гена *NPM1* в комбинации с точечными мутациями генов *FLT3* и *KIT* при морфологических вариантах ОМЛ М1 и М6). Не выявлено хромосомных и генных мутаций у семи пациентов (21,9% при 95%-м ДИ от 10,3 до 36,8%), из них трое (9,4% при 95%-м ДИ от 3,0 до 23,0%) – ОМЛ М4 с диплоидным кариотипом, один (3,1% при 95%-м ДИ от 0,5 до 14,9%) – ОМЛ М4 с недостаточным количеством в исследуемом образце метафазных пластинок. Таким образом, частота детекции мутаций гена *DNMT3A* при морфологических вариантах ОМЛ М2 и М4 без хромосомных aberrаций и мутаций гена *TP53* составляла в исследуемой выборке 14,3% (при 95%-м ДИ от 4,7 до 35,8%), т.е. была сопоставимой с данными международных многоцентровых исследований [2–4].

В обоих наблюдениях *DNMT3A*-позитивные больные ОМЛ имели неблагоприятный прогноз. Течение заболевания характеризовалось развитием первичной резистентности к стандартной программной полихимиотерапии цитарабином в сочетании с антрациклиновыми антибиотиками, медиана наблюдения пациентов не превышала 6 мес.

Таким образом, использование метода прямого автоматического секвенирования для детекции точечных мутаций в экзонах 18–26 гена *DNMT3A* в образцах периферической крови и костного мозга может применяться в качестве дополнительной диагностической опции на этапе генодиагностики, стратификации прогноза и назначения таргетной эпигеномной терапии [14] больным ОМЛ.

## Выводы

1. Средняя частота точечных мутаций, определенных в экзонах 18–26 гена *DNMT3A* методом прямого автоматического секвенирования, составляла при ОМЛ 5,9% (при 95%-м ДИ от 1,6 до 19,1%), а в морфологических подгруппах ОМЛ М2 и М4 без хромосомных aberrаций и точечных мутаций гена *TP53* – 14,3% (при 95%-м ДИ от 4,7 до 35,8%).

2. Наряду с мутациями экзонов 18–26 гена *DNMT3A* в исследуемых образцах определялись точечные мутации генов *NPM1*, *KRAS* и *WT1*, что может свидетельствовать о возможности молекулярной коопе-

рации их белковых продуктов в ходе злокачественной трансформации лейкемической клетки-предшественника.

3. Наличие мутаций в экзонах 18–26 гена *DNMT3A* ассоциировалось с низкой эффективностью стандартной программной полихимиотерапии и неблагоприятным прогнозом ОМЛ.

## Литература

1. Ley T.J., Ding L., Walter M.J., McLellan M.D., Lamprecht T., Larson D.E., Kandoth C., Payton J.E., Baty J., Welch J., Harris C.C., Licht C.F., Townsend R.R., Fulton R.S., Dooling D.J., Koboldt D.C., Schmidt H., Zhang Q., Osborne J.R., Lin L., O'Laughlin M., McMichael J.F., Delehaunty K.D., McGrath S.D., Fulton L.A., Magrini V.J., Vickery T.L., Hundal J., Cook L.L., Conyers J.J., Swift G.W., Reed J.P., Alldredge P.A., Wylie T., Walker J., Kalicki J., Watson M.A., Heath S., Shannon W.D., Varghese N., Nagarajan R., Westervelt P., Tomasson M.H., Link D.C., Graubert T.A., DiPersio J.F., Mardis E.R., Wilson R.K. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia // *NEJM*. 2010. V. 363, № 25. P. 2424–2433.
2. Thol F., Damm F., Lüdeking A., Winschel C., Wagner K., Morgan M., Yun H., Göhring G., Schlegelberger B., Hoelzer D., Lübbert M., Kanz L., Fiedler W., Kirchner H., Heil G., Krauter J., Ganser A., Heuser M. Incidence and prognostic influence of *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia // *J. Clin. Oncol.* 2011. V. 29, № 21. P. 2889–2896.
3. Marcucci G., Metzeler K.H., Schwind S., Becker H., Maharry K., Mrózek K., Radmacher M.D., Kohlschmidt J., Nicolet D., Whitman S.P., Wu Y.Z., Powell B.L., Carter T.H., Kolitz J.E., Wetzler M., Carroll A.J., Baer M.R., Moore J.O., Caligiuri M.A., Larson R.A., Bloomfield C.D. Age-related prognostic impact of different types of *DNMT3A* mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia // *J. Clin. Oncol.* 2012. V. 30, № 7. P. 742–750.
4. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia // *NEJM*. 2013. V. 368, № 22. P. 2059–2074.
5. Shlush L.I., Zandi S., Mitchell A., Chen W.C., Brandwein J.M., Gupta V., Kennedy J.A., Schimmer A.D., Schuh A.C., Yee K.W., McLeod J.L., Doedens M., Medeiros J.J., Marke R., Kim H.J., Lee K., McPherson J.D., Hudson T.J., HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, Brown A.M., Yousif F., Trinh Q.M., Stein L.D., Minden M.D., Wang J.C., Dick J.E. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia // *Nature*. 2014. V. 506, № 7488. P. 328–333.
6. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues / Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. Lyon: IARC, 2008. 439 p.
7. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов *CDKN2A/ARF*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TET2*, *TP53*, *WT1* при острых миелоидных лейкозах // *Рос. онколог. журн.* 2013. № 4. С. 34–35.
8. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Ивлева Е.К., Сергеев А.Г. Разработка технологии детекции мутаций гена *ASXL1* при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования // *Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии и биотехнологии»*, 25–27 сентября 2013 г. Уфа: РИЦ БашГУ, 2013. С. 20–23.

9. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция мутаций генов *KRAS* и *NRAS* при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования // Вестн. Башкир. ун-та. 2014. Т. 19, № 3. С. 845–847.
10. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28, № 10. P. 2731–2739.
11. Jankowska A.M., Makishima H., Tiu R.V., Szpurka H., Huang Y., Traina F., Visconte V., Sugimoto Y., Prince C., O'Keefe C., Hsi E.D., List A., Sekeres M.A., Rao A., McDevitt M.A., Maciejewski J.P. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: *UTX*, *EZH2*, and *DNMT3A* // *Blood*. 2011. V. 118, № 14. P. 3932–3941.
12. Xu J., Wang Y.Y., Dai Y.J., Zhang W., Zhang W.N., Xiong S.M., Gu Z.H., Wang K.K., Zeng R., Chen Z., Chen S.J. *DNMT3A* Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression / DNA methylation in hematopoietic cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111, № 7. P. 2620–2625.
13. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.П., Иоценко С.Е., Сергеев А.Г. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена *NPM1* при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода // Вестн. Урал. мед. академ. науки. 2013. № 4. С. 124–127.
14. Subramaniam D., Thombre R., Dhar A., Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy // *Front. Oncol.* 2014. № 1. P. 80.

Поступила в редакцию 24.11.2014 г.

Утверждена к печати 04.02.2015 г.

**Виноградов Александр Владимирович** (✉) – канд. мед. наук, Министерство здравоохранения Свердловской области, отдел организации специализированной медицинской помощи, в том числе высокотехнологичной медицинской помощи; УралГМУ, лаборатория молекулярной диагностики (г. Екатеринбург).

**Резайкин Алексей Васильевич** – канд. мед. наук, Министерство здравоохранения Свердловской области, отдел организации специализированной медицинской помощи, в том числе высокотехнологичной медицинской помощи; УралГМУ, лаборатория молекулярной диагностики (г. Екатеринбург).

**Сергеев Александр Григорьевич** – д-р мед. наук, профессор, Министерство здравоохранения Свердловской области, отдел организации специализированной медицинской помощи, в том числе высокотехнологичной медицинской помощи; УралГМУ, лаборатория молекулярной диагностики (г. Екатеринбург).

✉ Виноградов Александр Владимирович, тел. 8-343-270-1899; e-mail: vinogradov-av@russia.ru

## DNMT3A GENE POINT MUTATIONS DETECTION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS USING SEQUENCING TECHNIQUE

Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Sergeev A.G.

Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russian Federation

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim:** to estimate the frequency of *DNMT3A* gene exons 18–26 point mutations in acute myeloid leukemia (AML) patients (pts) using target automatic sequencing technique.

**Material and Methods.** Bone marrow and peripheral blood samples were obtained from 34 AML pts aged 21 to 64, who were treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre (Ekaterinburg) during the period 2012–2014. Distribution of the pts according to FAB-classification was as follows: AML M0 – 3, M1 – 1, M2 – 12, M3 – 3, M4 – 10, M5 – 2, M6 – 1, M7 – 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm – 1. Total RNA was extracted from leukemic cells and subjected to reverse transcription. *DNMT3A* gene exons 18–26 were amplified by PCR. Detection of mutations in *DNMT3A* gene was performed by direct sequencing. Sequencing was realized using an automatic genetic analyzer ABI Prism 310.

**Results.** The average frequency of functionally significant point mutations in *DNMT3A* gene exons 18–26 among the treated AML pts was 5.9%. They were detected in morphological subgroups M2 and M4

(according to WHO classification). The average frequency of *DNMT3A* gene exons 18–26 point mutations among the AML M2 and M4 pts without chromosomal aberrations and *TP53* gene point mutations was 14.3%. In both cases there were samples in which *DNMT3A* gene mutations were accompanied by molecular lesions of *NPM1*, *KRAS* and *WT1* genes. AML pts with *DNMT3A* gene exons 18–26 point mutations characterized by poor response to standard chemotherapeutic regimens and unfavorable prognosis.

**KEY WORDS:** point mutation, acute myeloid leukemia, *DNMT3A* gene, sequencing.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 18–23

### References

- Ley T.J., Ding L., Walter M.J., McLellan M.D., Lamprecht T., Larson D.E., Kandoth C., Payton J.E., Baty J., Welch J., Harris C.C., Licht C.F., Townsend R.R., Fulton R.S., Dooling D.J., Koboldt D.C., Schmidt H., Zhang Q., Osborne J.R., Lin L., O’Laughlin M., McMichael J.F., Delehaunty K.D., McGrath S.D., Fulton L.A., Magrini V.J., Vickery T.L., Hundal J., Cook L.L., Conyers J.J., Swift G.W., Reed J.P., Alldredge P.A., Wylie T., Walker J., Kalicki J., Watson M.A., Heath S., Shannon W.D., Varghese N., Nagarajan R., Westervelt P., Tomasson M.H., Link D.C., Graubert T.A., DiPersio J.F., Mardis E.R., Wilson R.K. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *NEJM*, 2010, vol. 363, no. 25, pp. 2424–2433.
- Thol F., Damm F., Lüdeking A., Winschel C., Wagner K., Morgan M., Yun H., Göhring G., Schlegelberger B., Hoelzer D., Lübbert M., Kanz L., Fiedler W., Kirchner H., Heil G., Krauter J., Ganser A., Heuser M. Incidence and prognostic influence of *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2011, vol. 29, no. 21, pp. 2889–2896.
- Marcucci G., Metzeler K.H., Schwind S., Becker H., Maharry K., Mrózek K., Radmacher M.D., Kohlschmidt J., Nicolet D., Whitman S.P., Wu Y.Z., Powell B.L., Carter T.H., Kolitz J.E., Wetzler M., Carroll A.J., Baer M.R., Moore J.O., Caligiuri M.A., Larson R.A., Bloomfield C.D. Age-related prognostic impact of different types of *DNMT3A* mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2012, vol. 30, no. 7, pp. 742–750.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *NEJM*, 2013, vol. 368, no. 22, pp. 2059–2074.
- Shlush L.I., Zandi S., Mitchell A., Chen W.C., Brandwein J.M., Gupta V., Kennedy J.A., Schimmer A.D., Schuh A.C., Yee K.W., McLeod J.L., Doedens M., Medeiros J.J., Marke R., Kim H.J., Lee K., McPherson J.D., Hudson T.J., HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, Brown A.M., Yousif F., Trinh Q.M., Stein L.D., Minden M.D., Wang J.C., Dick J.E. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, 2014, vol. 506, no. 7488, pp. 328–333.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC, 2008. 439 p.
- Vinogradov A.V. Technology development of CDKN2A/ARF gene mutations detection, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TET2*, *TP53*, *WT1* during acute myeloid leukemia. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal – Russian Journal of Oncology*, 2013, no. 4, pp. 34–35 (in Russian).
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Ivleva E.C., Sergeev A.G. Development of ASXL1 gene mutations detection technology in acute myeloid leukemia patients using direct sequencing method. *Materials of Russian conference with international participation “Modern topics of biochemistry and biotechnology”*, 25–27 September 2013. Ufa, Bashkir State University Publ., 2013. Pp. 20–23.
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. *Bulletin BSU*, 2014, vol. 19, no. 3, pp. 845–847 (in Russian).
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739.
- Jankowska A.M., Makishima H., Tiu R.V., Szpurka H., Huang Y., Traina F., Visconte V., Sugimoto Y., Prince C., O’Keefe C., Hsi E.D., List A., Sekeres M.A., Rao A., McDevitt M.A., Maciejewski J.P. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: *UTX*, *EZH2*, and *DNMT3A*. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 14, pp. 3932–3941.
- Xu J., Wang Y.Y., Dai Y.J., Zhang W., Zhang W.N., Xiong S.M., Gu Z.H., Wang K.K., Zeng R., Chen Z., Chen S.J. *DNMT3A* Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression. DNA methylation in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, vol. 111, no. 7, pp. 2620–2625.
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R., Ioschenko S.E., Sergeev A.G. Comparative Analysis of *NPM1* gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Bulletin of Ural Medical Academic Science*, 2013, no. 4, pp. 124–127 (in Russian).
- Subramaniam D., Thombre R., Dhar A., Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front. Oncol.*, 2014, no. 1, p. 80.

**Vinogradov Alexander V.** (✉), Sverdlovsk Regional Ministry of Health; Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation.

**Rezaykin Alexey V.**, Sverdlovsk Regional Ministry of Health; Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation.

**Sergeev Alexander G.**, Sverdlovsk Regional Ministry of Health; Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation.

✉ **Vinogradov Alexander V.**, Ph. +7-343-270-1899; e-mail: vinogradov-av@russia.ru