

## Сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* при миелопролиферативных заболеваниях

Л.А. Кесаева<sup>1</sup>, А.Ю. Буланов<sup>2</sup>, Ю.П. Финашутина<sup>1</sup>, В.В. Тихонова<sup>1</sup>, О.Н. Солопова<sup>1</sup>,  
Е.Н. Мисюрина<sup>2</sup>, Н.Н. Касаткина<sup>1</sup>, Н.А. Лыжко<sup>1</sup>, В.А. Мисюрин<sup>1</sup>, А.А. Турба<sup>3</sup>,  
А.А. Солодовник<sup>1</sup>, И.Н. Солдатова<sup>3</sup>, А.В. Мисюрин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница №52 Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 123182 Москва, Пехотная ул., 3;

<sup>3</sup>ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

**Контакты:** Лаура Артуровна Кесаева [kelar-22@mail.ru](mailto:kelar-22@mail.ru)

Молекулярно-генетические исследования для определения соматических мутаций в гене кальретикулина (*CALR*) включены в клинические рекомендации Всемирной организации здравоохранения в качестве одних из основных диагностических критериев миелолипролиферативных заболеваний. Примерно в 25–35 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза выявлены мутации в гене *CALR*, наличие которых ассоциировано с благоприятным прогнозом течения заболевания. В нашем исследовании выполнено сравнение результатов молекулярно-генетических методов для определения мутаций в гене *CALR*. Проведен анализ образцов периферической крови 379 пациентов с хроническими миелолипролиферативными заболеваниями и 17 образцов крови здоровых доноров. Наличие мутаций в гене *CALR* определяли методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией и количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, методом секвенирования по Сэнгеру и анализом кривых плавления. Мутации в гене *CALR* определены у 97 (25,5 %) пациентов методом анализа кривых плавления. Из них у 87 (23,0 %) пациентов мутации в гене найдены методом секвенирования по Сэнгеру. С помощью полимеразной цепной реакции мутации в гене *CALR* были обнаружены у 84 (22,1 %) пациентов.

**Ключевые слова:** *CALR*, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз

**Для цитирования:** Кесаева Л.А., Буланов А.Ю., Финашутина Ю.П. и др. Сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* при миелолипролиферативных заболеваниях. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(2):48–54.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-48-54

### Comparison of molecular genetic methods of detection of mutations in the *CALR* gene in myeloproliferative disorders

L.A. Kesaeva<sup>1</sup>, A.Yu. Bulanov<sup>2</sup>, Yu.P. Finashutina<sup>1</sup>, V.V. Tikhonova<sup>1</sup>, O.N. Solopova<sup>1</sup>, E.N. Misyurina<sup>2</sup>, N.N. Kasatkina<sup>1</sup>,  
N.A. Lyzhko<sup>1</sup>, V.A. Misyurin<sup>1</sup>, A.A. Turba<sup>3</sup>, A.A. Solodovnik<sup>1</sup>, I.N. Soldatova<sup>3</sup>, A.V. Misyurin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>City Clinical Hospital No 52 of the Moscow Healthcare Department; 3 Pekhotnaya St., Moscow 123182, Russia;

<sup>3</sup>Gene Technology; 104 Profsoyuznaya St., 117485 Moscow, Russia

Molecular genetic detection of *CALR* gene somatic mutations is required for myeloproliferative neoplasms diagnosis and treatment according to the novel WHO clinical recommendations. *CALR* mutations are found in approximately 25–35 % cases of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis and they are associated with benign clinical outcome. In this study we have compared sensitivity and selectivity of several different options of *CALR* mutation molecular genetic detection in blood samples of 379 CMD patients and 17 healthy donors. Among methods compared in our study there have been conventional polymerase chain reaction with electrophoretic detection, real-time quantitative polymerase chain reaction, direct Sanger sequencing of polymerase chain reaction fragments and polymerase chain reaction high resolution melting curve analysis. By means of melting curve analysis *CALR* mutations have been found in 97 (25.5 %) patients, whereas in the cases of Sanger sequencing and polymerase chain reaction there have been 87 (23.0 %) and 84 (22.1 %) *CALR* mutation positive patients respectively.

**Key words:** *CALR*, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis

**For citation:** Kesaeva L.A., Bulanov A.Yu., Finashutina Yu.P. et al. Comparison of molecular genetic methods of detection of mutations in the *CALR* gene in myeloproliferative disorders. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):48–54.

## Введение

Rh-негативные клональные заболевания, возникающие на уровне стволовой кроветворной клетки, составляют группу миелопролиферативных (МПЗ). Хронические МПЗ характеризуются пролиферацией 1 или более клеточной линии миелопоэза в костном мозге, сохраняющей способность дифференцироваться по всем росткам кроветворения [1, 2]. К самым распространенным МПЗ относятся истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). Основным диагностическим маркером данных заболеваний является мутация *JAK2 V617F*, встречающаяся практически в 95 % случаев при истинной полицитемии и в 50–60 % случаев при ЭТ и ПМФ [3]. Мутации в гене *MPL* присутствуют в 5–10 % случаев у пациентов с ЭТ и ПМФ при отсутствии мутации *JAK2*. Тем не менее около 35 % пациентов с ЭТ и ПМФ не имеют мутаций в этих 2 генах, что затрудняет постановку достоверного диагноза. В 2013 г. 2 группы исследователей независимо друг от друга обнаружили соматические мутации в 9-м экзоне гена кальретикулина (*CALR*; идентификационный номер NG\_029662.1) в 67 и 84 % случаев у пациентов с ЭТ, у которых не найдено мутации *JAK2 V617F* и *MPL* [4, 5].

Мутации в гене *CALR* являются вторыми по частоте встречаемости после мутаций *JAK2 V617F*, которые были включены в диагностические критерии МПЗ. Их выявление свидетельствует о клональном характере заболевания и помогает в дифференцировании ЭТ и ПМФ от ряда других миелоидных неоплазий, а также вторичных эритроцитозов и тромбоцитозов. Мутации *CALR* были выявлены всего в 8 % случаев при миелодиспластическом синдроме и в единичных случаях при других миелоидных неоплазиях. Важно, что ни в одном случае заболеваний немиелоидной природы мутации в данном гене не обнаружены [5].

Кальретикулин представляет собой многофункциональный белок, находящийся преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме. Ген расположен на коротком плече хромосомы 19 и состоит из 9 экзонов [6]. Выполняет шаперонную функцию, участвует в регуляции кальциевого гемостаза [7].

В гене *CALR* встречается около 60 типов мутаций, но самые частые из них – мутации 2 типов: 1-й – с.1092\_1143del (p.L367fs\*46), при котором происходит делеция 52 нуклеотидов, и 2-й – с.1154\_1155insTTGTC (p.K385fs\*47), при котором происходит инсерция 5 нуклеотидов. У пациентов, имеющих 1-й тип мутации, при ЭТ происходит более быстрое прогрессирование в ПМФ в отличие от пациентов, имеющих 2-й тип мутации. При ЭТ около 50 % *CALR*-положительных больных имеют мутацию 1-го типа, около 40 % – мутацию 2-го, и оставшиеся 10 % приходятся на другие типы мутаций. При ПМФ у 70 % *CALR*-положительных больных обнаруживается 1-й тип мутаций, у 13 % – мутация 2-го типа, и оставшиеся 17 % приходятся на другие типы мутаций. Пациенты при ЭТ и ПМФ с мутацией гена

*CALR* имели лучшую общую выживаемость по сравнению с теми, у кого не выявлено данной мутации [8].

Мутации в гене *CALR* могут быть идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов диагностики: секвенирования по Сэнгеру, анализа кривых плавления (КП), полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), оригинальной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией. У каждого из этих методов разные чувствительность и эффективность.

**Цель исследования** – сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR*.

## Материалы и методы

В настоящее исследование включены 379 пациентов с хроническим МПЗ, а также взяты 17 образцов крови здоровых доноров. Пробы крови для молекулярно-генетических исследований брали из локтевой вены утром натощак в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Для выделения геномной ДНК использовали набор реагентов «ДНК-экстракт» (Гено-Технология, Россия) согласно инструкции производителя. Для поиска последовательности гена *CALR*, к которой нужно подобрать праймеры, использовали биоинформационную базу данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, США). Для подбора оригинальных праймеров и условий проведения ПЦР с ними использовали программу Vector NTI 10.

**Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени** проводили в амплификаторе DPlite 4IL («ДНК-технология»). Объем реакционной смеси для ПЦР – 25 мкл. Состав: 2 × ПЦР-буфер, 0,25 мМ MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0,25 мМ dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы (Sileks), 200 нМ каждого праймера и зонда. Праймеры и зонды, использованные при ПЦР-РВ, представлены в таблице.

*Последовательности праймеров и зондов, использованных при полимеразной цепной реакции в режиме реального времени*

*Primer and probe sequences used in real-time polymerase chain reaction*

Название Name	5'–3'-последовательность 5'–3'-sequence
prCALR-52bp	R6G-ACGAGGAGCAGTGGACA-AGGAGGATG-BHQ1
CALR-F-del52	AAG GCC CTGAGGTGTGTG CT
CALR-R-del52	CCT CCTTGTCTCTG CTC CTA G
prCALR-TTGTC	R6G-CAGAGGACAATTGTCCGGAG-GATGAT-BHQ1
CALR FITTGTC	CTGCAGGCAGCAGAGAAACAAAT
CALRR1-TTGTC	GGGACATCTTCTCCTCATCTT

Тип флуорофора – R6G (HEX). Реакционная смесь была подвергнута первоначальной денатурации при

температуре 94 °С в течение 5 мин с последующими 40 циклами, состоящими из денатурации при 94 °С в течение 15 с, отжига при 60 °С в течение 60 с.

В реакцию добавляли 20–100 нг геномной ДНК. По окончании ПЦР-амплификации в режиме реального времени по значениям положительных контролей с известной концентрацией строились калибровочные кривые для нормы и для мутации 1-го или 2-го типа. Исходя из значения порогового цикла (Ct) определяли исходное число копий дикого типа гена *CALR* и гена с мутацией в каждом клиническом образце. Для более точного определения числа копий гена каждый клинический образец ставили в 2 повторах, для расчетов использовали среднее значение числа копий ( $Q_{\text{мутация}}$  и  $Q_{\text{норма}}$ ). Определение числа копий гена проводили с помощью компьютерных программ, прилагаемых к ПЦР-амплификатору.

В амплификаторе Терцик («ДНК-технология») выполняли ПЦР с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Объем реакционной смеси для ПЦР – 25 мкл. Состав: 5 × ПЦР-буфер (Promega), 0,25 мМ MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0,25 мМ dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы (Sileks), 200 нМ каждого праймера. В определении мутаций 9-го экзона гена *CALR* использовали праймеры с прилежащими участками интронов (прямой праймер: 5'-ТААСAAAGGTGAG-GCCTGGT-3'; обратный праймер: 5'-GCCTCTCТАСAGCTCGTCCCTT-3'). Реакционная смесь была подвергнута первоначальной денатурации при температуре 94 °С в течение 5 мин с последующими 30 циклами, состоящими из денатурации при 94 °С в течение 20 с, отжига при 67 °С в течение 20 с и элонгации при 72° в течение 90 с. Финальную элонгацию выполняли при температуре 72° в течение 5 мин. Результат амплификации – фрагмент размером 298bp.

Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации осуществляли в 6 % полиакриламидном геле в ТБЭ-буфере (рН 8,3) при 200 В и комнатной температуре. Визуализацию проводили после окраски бромистым этидием в ультрафиолетовом спектре. Специфичность амплификации была подтверждена методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

**Метод прямого секвенирования по Сэнгеру.** При определении мутаций 9-го экзона гена *CALR* с помощью прямого секвенирования ПЦР продуктов по Сэнгеру использовали праймеры с прилежащими участками интронов (прямой праймер *CALR-F*: 5'-ТААСAAAGGTGAGGCTGGT-3', обратный праймер *CALR-R*: 5'-GCC-TCTCTACA-GCTCGTCCCTT-3'). Секвенирование фрагментов ДНК выполняли с использованием генетического анализатора АВ310 (Applied BioSystems, США). Результаты секвенирования предварительно обрабатывали с помощью штатных программ, поставляемых вместе с генетическим анализатором, а затем изучали в пакете программ Vector NTI 11.5.1.

**Анализ КП с высокой разрешающей способностью.** Анализ КП проводили на приборе Light Cycler 96

(Roche, Швейцария). Объем реакционной смеси для теста – 20 мкл. В качестве флуоресцентного красителя использовали 5 × ПЦР-буфер Sybr Green (Evrogen), 1 ед. Taq-полимеразы (Sileks), 200 нМ каждого праймера. В исследовании использовали праймеры, покрывающие 9-й экзон гена *CALR* с прилежащими участками интронов (прямой праймер *CALR-F1*: 5'-CTGCAGGCAGCAGAGAAACAААТ, обратный праймер *CALR-R1*: 5'-GGGACATCTTCCCTCCTCATCTT). Реакционная смесь была подвергнута первоначальной денатурации при температуре 95 °С в течение 10 мин с последующими 45 циклами, состоящими из денатурации при 95 °С в течение 10 с, отжига при 58 °С в течение 20 с. Программа КП включала денатурацию при 95 °С на 1 мин, повторное насыщение при 40 °С в течение 1 мин и плавление от 67 до 95 °С. Тип флуорофора – Sybr Green.

Проводили сравнение КП образцов пациентов с КП образцов здоровых доноров (*CALR* дикого типа), 1 положительный контроль с мутацией 1-го типа и 1 положительный контроль с мутацией 2-го типа были включены в каждый эксперимент.

**Получение рекомбинантной плазмиды.** Кодировующую последовательность гена *CALR* образцов получали с помощью ПЦР с праймерами *CALR-F1* и *CALR-R1* с ДНК, выделенной из гранулоцитов периферической крови. ПЦР-фрагмент был клонирован в плазмиду рGEM-T Easy (Promega) согласно инструкции производителя. Каждый из полученных клонированных образцов проверяли на 6 % акриламидном геле методом электрофореза на наличие мутантной полосы. Затем все выбранные клонированные образцы были секвенированы методом Сэнгера независимо от наличия или отсутствия мутантной полосы.

**Статистический анализ.** Для сравнения разных методов детекции по чувствительности применяли  $\chi^2$ -критерий. Для анализа использовали дискретные данные о количестве случаев выявленных и невыявленных дефектов гена *CALR*. Обнаруженные различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

На рис. 1 представлены результаты определения мутаций 9-го экзона гена *CALR* методами стандартной ПЦР с электрофорезом и ПЦР-РВ, секвенирования по Сэнгеру и КП.

**Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени и ПЦР с электрофоретической детекцией.** На рис. 2 представлены результаты определения мутаций гена *CALR* 1-го и 2-го типа методами ПЦР-РВ и ПЦР с электрофоретической детекцией. Результаты ПЦР-РВ полностью совпали с результатами ПЦР с электрофоретической детекцией. Из 379 клинических образцов было выявлено 84 (22,1 %) случая с мутациями 1-го (31/84) и 2-го (53/84) типа 9-го экзона гена *CALR*.

**Метод прямого секвенирования по Сэнгеру** мутаций 9-го экзона гена *CALR* был выполнен для всех

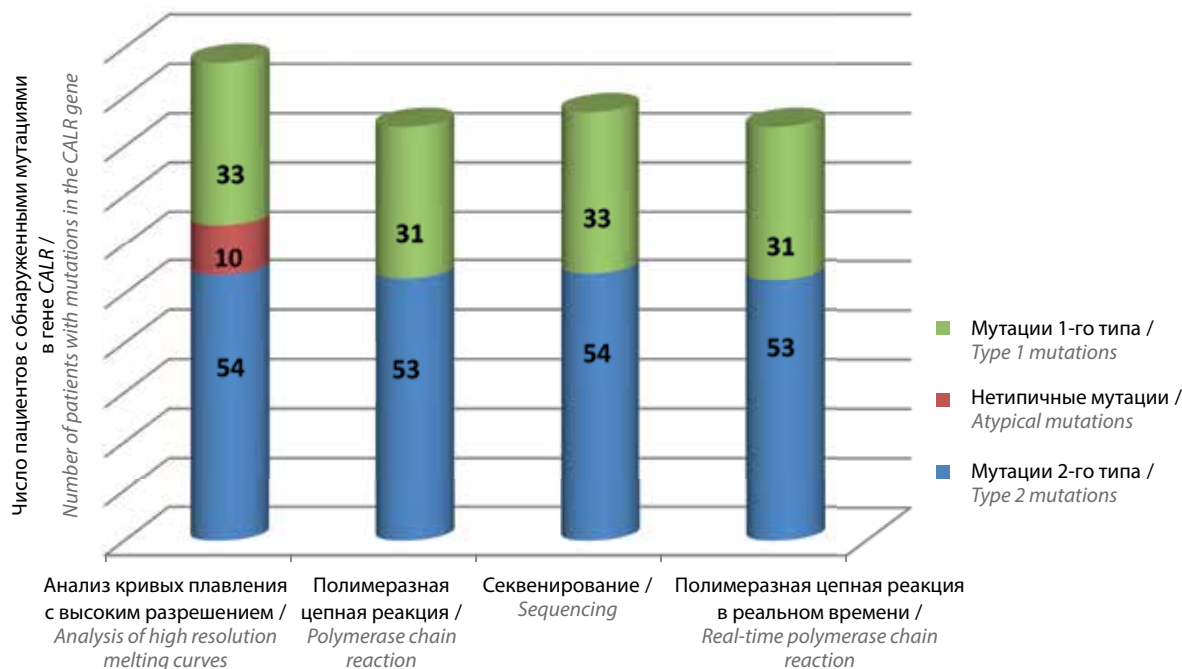


Рис. 1. Детекция мутаций 9-го экзона гена CALR различными методами у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями  
 Fig. 1. Detection of 9<sup>th</sup> exon mutations in the CALR gene using different methods in patients with myeloproliferative disorders

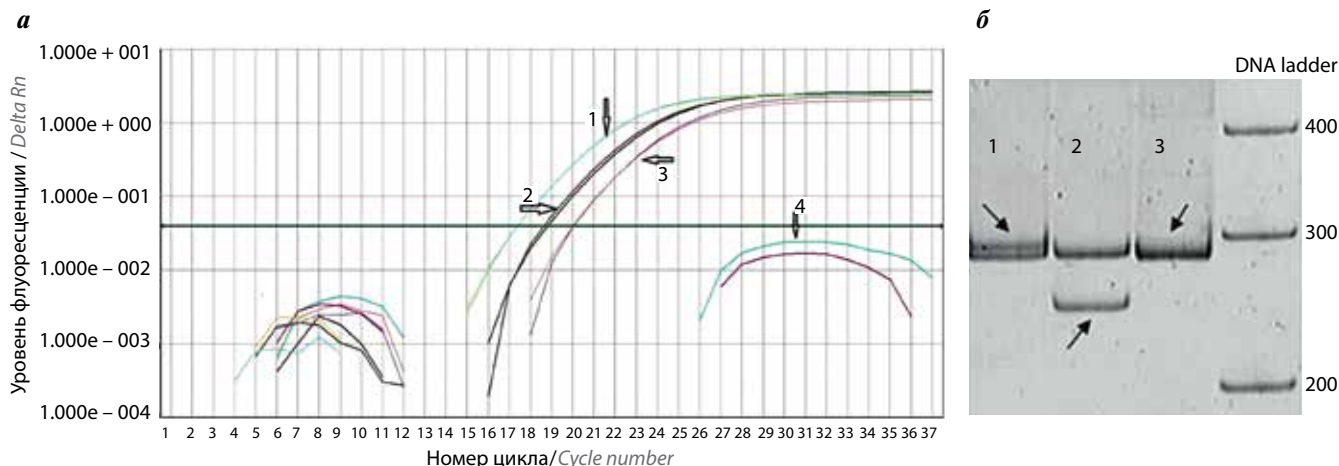
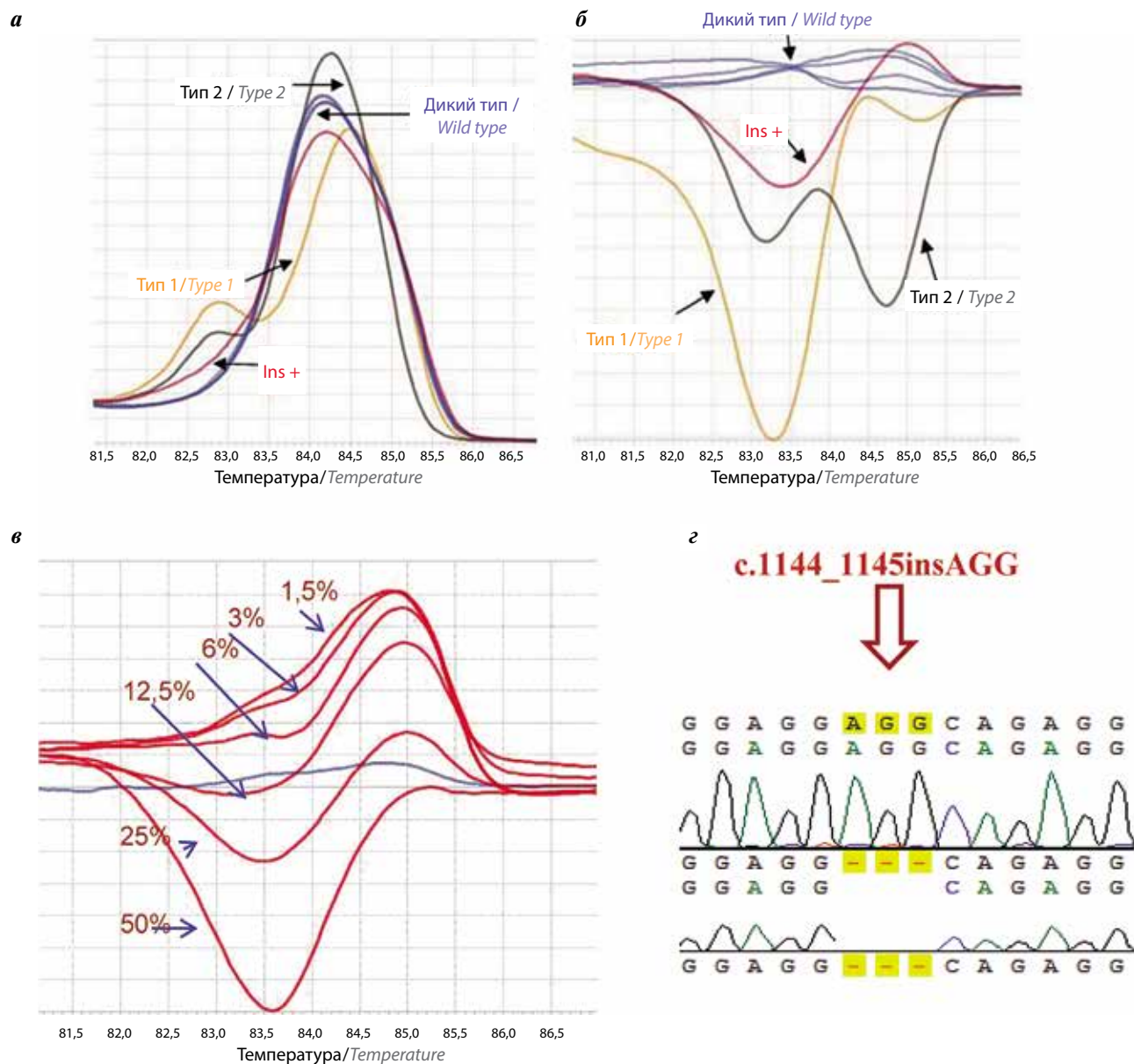


Рис. 2. Примеры результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и электрофореграммы в пробах с разными типами мутаций в гене CALR: а – график накопления флуоресцентного сигнала: 1 – дикий тип гена CALR; 2 – проба с мутацией в гене CALR 1-го типа; 3 – проба с мутацией в гене CALR 2-го типа; 4 – проба без мутации; б – электрофореграмма: 1 – проба с мутацией в гене CALR 2-го типа; 2 – проба с мутацией в гене CALR 1-го типа; 3 – проба без мутации  
 Fig. 2. Examples of results of real-time polymerase chain reaction and electropherogram in samples with different types of mutations in the CALR gene: а – accumulation of fluorescent signal: 1 – wild-type CALR gene; 2 – sample with type 1 mutation in the CALR gene; 3 – sample with type 2 mutation in the CALR gene; 4 – sample without mutations; б – electropherogram: 1 – sample with type 2 mutation in the CALR gene; 2 – sample with type 1 mutation in the CALR gene; 3 – sample without mutations

пациентов. В результате подтверждено наличие мутаций 1-го (33/87) и 2-го (54/87) типа у 87 (23 %) образцов из 379.

**Анализ КП с высокой разрешающей способностью.** В группе из 379 пациентов с МПЗ образцы крови 97 (25,5 %) пациентов четко показали отличие КП от группы дикого типа. При сопоставлении данных, представленных в нормализованных и производных графиках, индивидуальный характер КП мутантных образцов подтвердился (рис. 3а, б).

Из 97 образцов, определенных по данным анализа КП как мутированные, были идентифицированы 87 с мутациями 1-го (33/87) и 2-го (54/87) типа, что полностью коррелировало с результатами секвенирования по Сэнгеру. Однако оставшиеся 10 образцов были определены как отрицательные на мутации в гене CALR по результатам секвенирования и ПЦР. В дальнейшем ПЦР-фрагменты этих образцов были клонированы, и для каждого образца проанализировано не менее 150 клонов методом SSCP-электрофореза. На рис. 3в показан



**Рис. 3.** Детекция мутаций 9-го экзона гена *CALR* в ДНК пациентов методом анализа кривых плавления на приборе Light Cycler 96 (ROCHE): а – нормализованные кривые плавления; б – производные кривых плавления. На рис. а и б изображены: мутации 1-го (с.1092\_1143del (p.L367fs\*46)) и 2-го типа (с.1154\_1155insTTGTC (p.K385fs\*47)) 9-го экзона гена *CALR*, нетипичная мутация *Ins+* (с.1144\_1145insAGG), образец без мутации (дикий тип); в – результат анализа кривой плавления серии разведений плазмиды с фрагментом гена *CALR* с с.1144\_1145insAGG; з – результат анализа секвенирования по Сэнгеру гена *CALR* клонированного образца, несущего с.1144\_1145insAGG

**Fig. 3.** Detection of exon 9 mutations in the *CALR* gene in DNA of patients using analysis of melting curves with the Light Cycler 96 (ROCHE) device: а – normalized melting curves; б – melting curves derivatives. Figures а and б: type 1 (с.1092\_1143del (p.L367fs\*46)) and type 2 (с.1154\_1155insTTGTC (p.K385fs\*47)) mutations of exon 9 in the *CALR* gene, atypical mutation *Ins+* (с.1144\_1145insAGG), sample without mutations (wild type); в – result of melting curve analysis of a series of dilutions of a plasmid with a fragment of the *CALR* gene with с.1144\_1145insAGG; з – result of Sanger sequencing of a cloned sample of the *CALR* gene containing с.1144\_1145insAGG

образец, несущий нетипичную мутацию с.1144\_1145ins-AGG, который был использован в качестве эталона. Серийные разведения начинали с 50 % аллельной нагрузки и в итоге обнаружили до 1,5 % мутантных аллелей методом анализа КП. Положительные клоны были снова проверены методом по Сэнгеру в качестве подтверждающего «золотого стандарта» (рис. 3з). В результате у 2 образцов была подтверждена мутация 2-го типа, у 1 – мутация 1-го типа. Один из образцов

был подтвержден как отрицательный. Остальные 6 несли в себе нетипичные инсерции и делеции в гене *CALR*:

с.1135\_1144 del – 10  
с.1144\_1145 ins + 3  
с.1133\_1151del – 19  
с.1100\_1145 del – 46  
с.1092\_1143 del – 52  
с.1138\_1141del – 4.

В 17 образцах крови доноров мутации гена *CALR* не обнаружены ни одним из методов, включенных в исследование. Таким образом, метод анализа КП выявил мутации гена *CALR* у 25,5 % (97/379) пациентов с ЭТ и ПМФ, что выше по сравнению с секвенированием по Сэнгеру – 23 % (87/379;  $p = 0,0008$ ) и двумя методами ПЦР – 22,1 % (84/379;  $p = 0,0002$ ).

По результатам исследования КП является более чувствительным методом по сравнению с секвенированием по Сэнгеру ( $p = 0,0008$ ), ПЦР-РВ ( $p = 0,0002$ ) и ПЦР с электрофорезом ( $p = 0,0002$ ).

### Обсуждение

Наша работа представляет оценку молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* для использования в диагностике. Наряду с секвенированием по Сэнгеру проводили анализ КП, оценивали ПЦР-РВ, ПЦР с электрофорезом. Однако сопоставление результатов анализа молекулярно-генетических методов показало, что у каждого из них есть достоинства и недостатки. Предел чувствительности метода секвенирования по Сэнгеру – 10–25 %, ПЦР-РВ и ПЦР с электрофоретической детекцией – 5–10 %, в то время как метод анализа КП имеет предел чувствительности до 5 % [9, 10]. Помимо этого, аллель-специфическая ПЦР-РВ позволяет определить лишь те мутации, на которые непосредственно отжигается праймер. Аллель-специфическая ПЦР с последующей электрофоретической детекцией позволяет определить мутации всего гена, но при низкой аллельной нагрузке повышается вероятность ложноотрицательных результатов. Секвенирование по Сэнгеру является достаточно точным методом, но дорогостоящим и требует много времени на подготовку, не говоря уже о последующем трудоемком аналитическом этапе.

В данном исследовании ПЦР-РВ выявила пациентов с мутациями 1-го и 2-го типа 9-го экзона гена *CALR*, что коррелировало с результатами ПЦР с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации, а также с результатами методов прямого секвенирования и КП. Тем не менее 10 образцов, определенные методом КП как отличные от нормы, были идентифицированы другими методами, представленными в этой работе, как отрицательные,

вероятно, из-за низкой аллельной нагрузки мутации в этих образцах.

Анализ КП имеет ряд преимуществ перед существующими аналогами, прежде всего выражающихся в высокой чувствительности/специфичности (до 100 %) и возможности совмещения ПЦР с самим этапом детекции мутаций. Принцип метода основан на дифференциации образцов ДНК, несущих потенциальные мутации, по форме или сдвигу КП [11]. Благодаря чувствительности, низкой стоимости и скорости анализ КП широко представлен в клинической лабораторной диагностике. Протокол анализа КП может быть завершен в течение нескольких часов после выделения ДНК из полученного биологического материала. Более распространенные типы мутаций можно идентифицировать без дополнительных исследований, поскольку любой дефект гена (точечная мутация, делеция, инсерция) имеет свой индивидуальный вид КП. Однако при определении образцов, непохожих на известные КП, необходимо проводить следующий этап исследования по уточнению этого дефекта. При этом образцы, показавшие нормальный результат по анализу КП, могут не исследоваться дальше, так как либо не имеют мутаций вообще, либо доля клеток с изменениями настолько мала, что не может быть детектирована.

Наши результаты показывают, что в обычной лабораторной практике метод анализа КП способен обнаруживать мутации *CALR* при достаточно низкой аллельной нагрузке и может быть использован в качестве 1-й линии скрининга. В случае выявления положительного результата методом анализа КП можно либо дополнительно выполнить ПЦР-РВ для мониторинга конкретных типов мутаций (1-го и 2-го), либо провести секвенирование по Сэнгеру в случае обнаружения нетипичной мутации.

### Заключение

Сравнение молекулярно-генетических методов, представленных в данной работе, показало, что технология анализа КП с высокой степенью разрешения является простым и высокочувствительным методом скрининга мутаций в гене *CALR*, который можно использовать в клинической диагностике.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2009;2(3):211–21. [Misyurin A.V. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative diseases. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2009;2(3):211–21. (In Russ.)].
2. Chi J., Pierides Ch., Mitsidou A. et al. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in myeloproliferative disorders. Euro J Exp Bio 2014;4(5):33–6.
3. Tutaeva V., Misurin A.V., Michiels J.J. et al. 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. Hematology 2007;12(6):473–9. DOI: 10.1080/10245330701384005.

4. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–89. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347.
5. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
6. Michalak M., Corbett E.F., Mesaeri N. et al. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 1999;2:281–92.
7. Zapun A., Darby N.J., Tessier D.C. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* 1998;273(11):6009–12. DOI: 10.1074/jbc.273.11.6009.
8. Ning L., Qui-Mei Y., Gale R.P. et al. Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2(V617F) or MPL mutations. *Leuk Res* 2015;39(5):510–4.
9. Jones A.V., Ward D., Lyon M. et al. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* 2015;39(1):82–7. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.11.019. Available at: [https://www.ljournal.com/article/S0145-2126\(14\)00371-3/abstract](https://www.ljournal.com/article/S0145-2126(14)00371-3/abstract).
10. Luo W., Zhongxin Yu.Z. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem Cell Investig* 2015;2:16. DOI: 10.3978/j.issn.2306-9759.2015.08.01. Available at: <http://sci.amegroups.com/article/view/7264/8051>.
11. Reed G.H., Kent J.O., Witter C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007;8(6):597–608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597.

#### Вклад авторов

Л.А. Кесаева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;  
 А.Ю. Буланов, Е.Н. Мисюрин, Н.Н. Касаткина: обзор публикаций по теме статьи;  
 Ю.П. Финашутина: оптимизация условий реакций;  
 В.В. Тихонова, Н.А. Лыжко, А.А. Турба, А.А. Солодовник: анализ полученных данных;  
 О.Н. Солопова: получение данных для анализа;  
 В.А. Мисюрин: статистическая обработка и обобщение результатов;  
 И.Н. Солдатова: ведение первичной обработки биологического материала пациентов;  
 А.В. Мисюрин: разработка дизайна исследования.

#### Authors' contributions

L.A. Kesaeva: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;  
 A.Yu. Bulanov, E.N. Misyurina, N.N. Kasatkina: reviewing of publications of the article's theme;  
 Yu.P. Finashutina: optimization of reaction conditions;  
 V.V. Tikhonova, N.A. Lyzhko, A.A. Turba, A.A. Solodovnik: analysis of the obtained data;  
 O.N. Solopova: obtaining data for analysis;  
 V.A. Misyurin: statistical analysis and summation of the results;  
 I.N. Soldatova: primary preparation of patients' biological material;  
 A.V. Misyurin: developing the research design.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Л.А. Кесаева/L.A. Kesaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8277-8649>  
 Ю.П. Финашутина/Yu.P. Finashutina: <https://orcid.org/0000-0002-6154-536X>  
 В.В. Тихонова/V.V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>  
 О.Н. Солопова/O.N. Solopova: <https://orcid.org/0000-0002-5465-6094>  
 Н.Н. Касаткина/N.N. Kasatkina: <https://orcid.org/0000-0002-4735-977X>  
 Н.А. Лыжко/N.A. Lyzhko: <https://orcid.org/0000-0003-3834-5816>  
 В.А. Мисюрин/V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>  
 А.А. Солодовник/A.A. Solodovnik: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>  
 А.В. Мисюрин/A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.  
**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.