

Гидрогелевые ДНК-биочипы оправданы при обнаружении точечных мутаций генов, что было подтверждено проведением полногеномного секвенирования.

Литература

1. А.С. Разумов / Медицина XXI века: биочипы // Медицина в Кузбассе. 2009. №2, с. 3-5
2. Jaskowiak Pablo A., Campello Ricardo J.G.B., Costa Ivan G. / Proximity Measures for Clustering Gene Expression Microarray Data: A Validation Methodology and a Comparative Analysis // IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics. V. 10 (4). P. 845-857
3. Hoek KS, Schlegel NC, Eichhoff OM et al. / Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy // Pigment Cell Melanoma Res. 2009. V. 21 (6). P. 665-676

УДК 616-006.446.8

Д.В. Изотов, А.В. Виноградов
МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКА В
ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ
ПРИ ОМЛ

ГБУЗ СО Свердловская областная клиническая больница №1
Екатеринбург, Россия

D.V. Izotov, A.V. Vinogradov
MATHEMATICAL MODELING OF PROTEIN STRUCTURE IN THE
STUDY OF MECHANISMS OF RESISTANCE TO CHEMOTHERAPY IN
AML

Sverdlovsk Regional Clinical Hospital №1
Ekaterinburg, Russia

E-mail: phoenus@yandex.ru

Аннотация. В статье рассмотрен метод математического моделирования третичной структуры белка в аспекте его применения для изучения механизмов аутоактивации белка Flt3 и формирования резистентности к таргетным химиопрепаратам.

Annotation. The article describes the method of mathematical modeling of tertiary protein structure in the aspect of it's use for the study of Flt3 autoactivation mechanisms and the development of resistance to targeted chemotherapy drugs.

Ключевые слова: FLT3; ОМЛ; селективные ингибиторы тирозинкиназы; резистентность.

Keywords: FLT3; AML; tyrosine kinase inhibitor; resistance.

Мутации рецепторной тирозинкиназы Flt3, ведущие к лиганд-независимой активации каталитического центра и неконтролируемой экспрессии пролиферативных генов, играют определяющую роль в патогенезе 30% случаев острых миелоидных лейкозов (ОМЛ).

Активация рецептора, индуцируемая взаимодействием внеклеточного домена и лиганда, представляет собой каскадный процесс, в котором принимают участие активационная петля, юкстамембранный домен, состоящий из трех топологических компонентов JM-B («binding»), JM-S («switching») и JM-Z («zipper»), ключевые остатки тирозина (Tyr589 и Tyr591) и каталитические тирозинкиназные N- и C-домены. В отсутствие лиганда рецептор удерживается в аутоингибированном состоянии за счет нековалентных взаимодействий между его структурными компонентами. Несинонимичные мутации кодирующей последовательности приводят к изменению силы этих взаимодействий и пространственной структуры белка, запуская процесс аутоактивации [3].

Перспективным направлением в терапии ОМЛ является применение таргетных препаратов – селективных ингибиторов тирозинкиназы (ИТК). Однако уже первые клинические исследования данной химиотерапевтической группы продемонстрировали их неодинаковую эффективность для разных пациентов (табл. 1). Возникновение случаев резистентности объясняется отличиями в механизмах активации и взаимодействия белок-ингибитор при различных генетических абберациях и, как следствие, снижением эффективности определенного препарата.

Таблица 1

Мутации, ассоциированные с резистентностью к ИТК

Домен	Мутация	Резистентность к ИТК I (РКС412)	Резистентность к ИТК II (сорафениб)
TK1	N676D	ВЫСОКАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	N676I	ВЫСОКАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	N676S	ВЫСОКАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	N676K	ВЫСОКАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	F691I	ВЫСОКАЯ	ВЫСОКАЯ
	F691L	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	ВЫСОКАЯ
TK2	C828S	УМЕРЕННАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	D835E	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	D835Y	УМЕРЕННАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	D839G	УМЕРЕННАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	D839H	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	S841C	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ
	Y842D	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	УМЕРЕННАЯ

	Y842H	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	УМЕРЕННАЯ
	Y842N	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	ВЫСОКАЯ
	Y842S	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ	УМЕРЕННАЯ
	M855T	УМЕРЕННАЯ	НИЗКАЯ/ОТСУТСТВУЕТ

Цель исследования – определение связи структурных изменений молекулы Flt3 при различных типах мутаций с формированием механизмов резистентности к химиотерапии при ОМЛ.

Материалы и методы исследования

Исследованы пробы костного мозга и периферической крови 89 больных ОМЛ в возрасте от 20 до 80 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре за период с 2008 по 2014 гг.

Выделение тотальной РНК из опухолевых клеток, обратную транскрипцию для получения кДНК, клонирование экзонов 12-15 и 19-21 гена FLT3 методом ПЦР с последующим секвенированием на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 осуществляли в соответствии с ранее описанной методикой [2, 4].

Моделирование третичной структуры проводили с использованием распределенной сети предсказания структуры белка Protein Homology/AnalogY Recognition Engine (Phyre) версия 2.0 в режиме «Normal» [1]. В качестве референтной использована полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,10 Å модель 1RJB из Protein Data Bank (PDB 1RJB). Структуры измененных вариантов белка Flt3 моделировали на основе полученных при секвенировании нуклеотидных последовательностей индивидуально для каждой положительной пробы. Для визуализации и анализа использовали программное обеспечение PyMol версия 1.3r1.

Результаты исследования и их обсуждение

В 11,2% случаев выявлены внутренние тандемные дубликации (ITD) в юкстамембранном домене, в 3,4% – точечные мутации в тирозинкиназных доменах (трансверсии A2522T/N841I и A2479T/I827F), в одном случае – трансверсия во внеклеточном домене D₅ (G1471T/V491L).

Влияние тандемных дубликаций проявлялось в виде смещения ключевых остатков тирозина за пределы области между С-доменом и мотивом JM-S (рис. 1, А), нарушения комплементарности N-домена и мотива JM-Z (рис. 1, В) либо транспозиции мотива JM-B за пределы каталитического центра (рис. 1, С). Во всех случаях это приводило к нарушению комплементарного взаимодействия структурных элементов, сохраняющих белок в аутоингибированном состоянии. При этом Flt3 переходит в активированную конформацию (*DFG-in*, связана с «открытой» конформацией активационной петли), что позволяет применять в отношении данных пациентов таргетную терапию селективными ингибиторами тирозинкиназы I типа (РКС412 – мидостаурин и CEP701 – лестауртиниб).

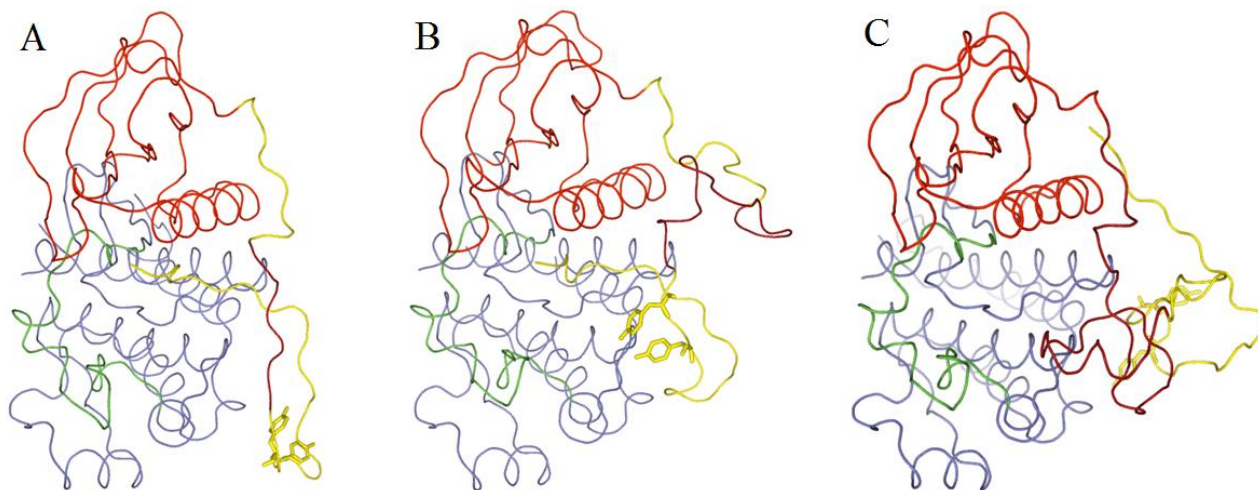


Рис. 1. Варианты влияния ITD на структуру Flt3

Точечные мутации активационной петли (D835, N841, Y842 и другие) нарушают систему водородных связей, стабилизирующих петлю в характерной для аутоингибированного состояния «закрытой» конформации (*DFG-out*), делая ее энергетически менее выгодной, что также приводит к формированию конформации *DFG-in* и активации тирозинкиназы (здесь и далее рис. 2). Вероятно, мутации N841 в меньшей степени дестабилизируют активационную петлю и поэтому чувствительность к сорафенибу сохраняется.

Мутации собственно киназных доменов (N676 и другие) не затрагивают активационную петлю, но устраняют препятствие для свободного поворота N-домена относительно С-домена и последующей аутоактивации тирозинкиназы. Интактность петли в данном случае обуславливает наличие резистентности к ИТК I типа при сохраненной чувствительности к ингибиторам II типа (сорафениб, AC220 – квизартиниб, MLN518 – тандутиниб).

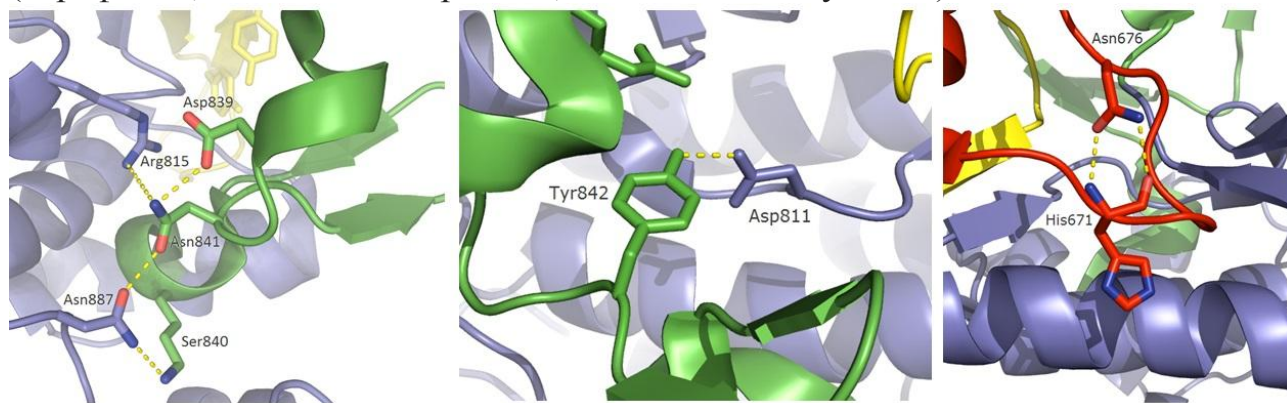


Рис. 2. Стабилизирующие связи активационной петли и киназных доменов

Резистентность F691 объясняется наличием специфического взаимодействия структуры (так называемый «gatekeeper») белка с активными группами молекулы сорафениба, однако это не объясняет различие в чувствительности к PCK412 при мутациях F691I и F691L.

Выводы

1. Моделирование структуры с использованием распределенной сети предсказания структуры белка Phyre 2.0 и системы молекулярной визуализации

PyMol v1.3r1 позволяет эффективно проводить сравнительный анализ белковых молекул.

2. Наличие отличий в механизме аутоактивации белка Flt3 при разных типах аберраций, обуславливающих резистентность к ИТК I/II типа, позволяет обосновать необходимость детекции точечных мутаций тирозинкиназных доменов в качестве этапа молекулярно-генетической стратификации больных ОМЛ для таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ.

3. По данным актуальных исследований, обнаруженные точечные мутации не вызывают резистентности к селективными ингибиторам I и II типов, что позволяет рекомендовать обе группы препаратов для включения в схему химиотерапии данных больных. При этом, в случае N841I рационально использовать в качестве препаратов первой линии ИТК I типа.

Литература

1. Kelley L.A., Sternberg M.J.E. / Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server // Nature Protocols. V. 4. P. 363-371

2. А.В. Виноградов / Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах // Российский онкологический журнал. 2013. №4. с. 34-35

3. Д.В. Изотов, А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев / Влияние внутренних tandemных дупликаций и точечных мутаций на функциональные свойства белка Flt3 при острых миелоидных лейкозах // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск, 2015. с. 323

4. Д.В. Изотов, А.В. Резайкин / ПЦР в реальном времени как метод детекции внутренних tandemных дупликаций юкстамембранного домена гена STK1 // 70 Всероссийская конференция НОМУС «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». Екатеринбург, 2015. с. 957-959

УДК 378.147.31

Н.Д. Мисюкевич, Л.И. Ратникова, С.А. Шип
ИННОВАЦИОННЫЕ ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
ОБУЧЕНИЯ КАК СРЕДСТВО ФОРМИРОВАНИЯ
ПРОФЕССИОНАЛИЗМА ВРАЧА

Кафедра инфекционных болезней
Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет
Челябинск, Россия

N.D. Misyukevich, L.I. Ratnikova, S.A. Ship
INNOVATIVE INFORMATION TECHNOLOGIES OF TRAINING
AS MEANS OF FORMATION OF
PROFESSIONALISM OF THE DOCTOR
Department of infectious diseases