

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.29

ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ
С ИНВЕРСИЕЙ ХРОМОСОМЫ 16

© 2020 г. Л. Г. Гукасян^а, Г. С. Краснов^а, О. В. Муравенко^а, А. Ю. Иконникова^а,
Р. А. Юрасов^а, Л. В. Байдун^б, С. З. Ибрагимов^с, Т. В. Наседкина^{а, д, *}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бРоссийская детская клиническая больница Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 119117 Россия

^сНаучно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, Ташкент, 100185 Узбекистан

^дНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, 119117 Россия

*e-mail: nased@biochip.ru

Поступила в редакцию 25.11.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Определенные подтипы острого миелоидного лейкоза формируются при сочетании нескольких событий, таких как образование слитых генов при хромосомных перестройках, что приводит к нарушению дифференцировки клеток и возникновению мутаций, которые усиливают пролиферацию клеток за счет активации внутриклеточных сигнальных путей. Методы высокопроизводительного секвенирования выявляют спектры мутаций, характерные для лейкозов с различными хромосомными нарушениями, однако вопрос о роли мутационных событий в процессах злокачественной трансформации клеток остается открытым. Нами проведен поиск драйверных мутационных событий в лейкозных клетках, содержащих химерный ген *CBFB-MYH11*, который образуется при инверсии хромосомы 16. С использованием таргетного обогащения исследованы кодирующие участки 84 генов у 12 детей, больных острым миелоидным лейкозом с *inv(16)*. Обнаружены соматические мутации в генах белков внутриклеточных сигнальных каскадов рецепторных тирозинкиназ, таких как *KIT* (41%), *NRAS* (25%), *KRAS* (17%), *FLT3* (8.3%). Роль мутаций в патогенезе заболевания оценивали с помощью сравнительного анализа образцов, взятых в момент диагностики и в период ремиссии. Выявлены ранее не описанные мутации в генах *KDM6A*, *NOTCH1*, *IDH1*, которые могут быть вовлечены в процессы возникновения и развития лейкоза.

Ключевые слова: массовое параллельное секвенирование, острый миелобластный лейкоз, соматические мутации, инверсия 16

DOI: 10.31857/S0026898420030076

Перицентрическая инверсия хромосомы 16 [*inv(16)(p13q22)*], или транслокация *t(16;16)(p13;q22)* – перестройка, характерная для острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей [1, 2]. В результате *inv(16)* образуется слитый ген *CBFB-MYH11* [3–5]. Неперестроенный ген *CBFB* кодирует β -цепь основного связывающего фактора, или CBF (core binding factor) – гетеродимерного фактора транскрипции, регулирующего работу генов, вовлеченных в процессы кроветворения. Механизм развития лейкоза с участием aberrантного белка *CBFB-MYH11* остается неясным. Однако на мышинных моделях показано, что экспрессии только химерного гена недостаточно для развития лейкоза [7, 8].

Так называемый CBF-ОМЛ, к которому кроме лейкозов с *inv(16)(p13q22)* *CBFB-MYH11* относится и группа с транслокацией *t(8;21)(q22;q22)* *RUNX1-RUNX1T1*, считается классическим случаем развития заболевания в результате сочетания ряда событий: нарушения нормальной функции факторов транскрипции (CBF-комплекс), влияющих на дифференцировку гемопоэтических клеток, и возникновения активирующих мутаций, которые усиливают клеточную пролиферацию [11]. Правильность этой модели подтверждается наличием соматических мутаций в генах *KIT*, *FLT3*, *NRAS* и *KRAS*, активирующих внутриклеточные сигнальные пути с участием тирозинкиназ, которые встречаются при обоих вариантах CBF-ОМЛ [11, 12].

Мутации в гене *KIT* относятся к наиболее частым событиям при СВФ-ОМЛ [13–16]. Имеются данные о том, что определенные мутации *KIT* ассоциированы с плохим прогнозом, однако клиническое значение мутаций в гене *KIT* при СВФ-ОМЛ до конца не выяснено [15]. Мутации генов семейства *RAS* (*NRAS*, *KRAS*) также считаются одной из важных характеристик СВФ-ОМЛ, в том числе ОМЛ с *inv(16)*. В других типах опухолей эти мутации относятся к известным онкогенным событиям, обеспечивающим активацию внутриклеточных сигнальных путей *RAS/RAF/MAPK* и *PI3K/AKT*, и, как правило, ассоциированы с плохим прогнозом [16, 17]. У детей с ОМЛ мутации *RAS* часто сочетаются с благоприятными мутациями в гене *NPM1*, при этом не выявлено их влияния на прогноз заболевания при СВФ-ОМЛ [16–18].

Противоречивость данных о клиническом значении мутаций, и тот факт, что у 50% детей с СВФ-ОМЛ мутации в генах *KIT* и *RAS* не обнаружены, стимулируют дальнейший поиск мутаций, ассоциированных с развитием и прогрессией заболевания. Методы высокопроизводительного секвенирования позволяют исследовать множество генов и определять мутационный профиль при различных формах лейкозов [19, 20].

Так, на большой группе пациентов (взрослые и дети) с СВФ-ОМЛ, в том числе 35 детей с *inv16*, показано, что активирующие мутации *KIT*, *NRAS*, *KRAS* и *FLT3* распространены как при *t(8;21)*, так и при *inv(16)* [20]. Напротив, мутации в генах, ответственных за регуляцию конформации хроматина, или в генах, кодирующих белки комплекса когезина, наиболее характерны для ОМЛ с *t(8;21)* — 42 и 18% соответственно, тогда как, например, в группе ОМЛ с *inv(16)* они практически отсутствовали. В то же время, у пациентов с *inv16* описаны дополнительные мутации в генах тирозинкиназного пути, что позволяет предположить синергическую кооперацию этих событий. В целом, СВФ-ОМЛ можно представить как заболевание, вызванное накоплением последовательно происходящих генетических нарушений, однако пути формирования различных подтипов могут существенно различаться.

Следует отметить, что большинство исследований основано на изучении взрослых пациентов [3, 4], однако известно, что генетические профили заболевания могут значительно различаться у взрослых и детей [17, 20]. Более того, несмотря на значительные успехи в методах лечения, ОМЛ у детей все еще связан с высокой частотой рецидивов (до 30%) и выживаемостью менее 75% [6]. Кроме того, если *t(8;21)* является наиболее частой транслокацией при ОМЛ (15–20%), то *inv(16)* встречается реже (до 10%) и составляет менее охарактеризованную с молекулярной точки зрения группу.

Получение новых данных о спектре и частоте мутационных событий позволяет понять молекулярные механизмы развития заболевания, а также стимулирует поиск подходов к молекулярно-направленной терапии. В данной работе проведен анализ мутационного профиля детей с СВФ-ОМЛ с *inv(16)*, направленный на выявление драйверных соматических мутаций и оценку их возможной роли в формировании лейкозного клона.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

С целью анализа мутационного профиля в подгруппе ОМЛ с *inv(16)* была сформирована группа из 12 пациентов (по шесть мальчиков и девочек в возрасте от 1 года до 15 лет). Были доступны образцы костного мозга четырех пациентов в период ремиссии. Первичную диагностику и определение варианта лейкоза проводили, как описано ранее [21]. Иммунофенотип бластных клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием следующих маркеров: CD34, CD13, CD33, CD19, CD41, CD61, CD7, CD14, CD15, CD4, CD56, CD11b, HLA-DR, внутриклеточной миелопероксидазы (МПО). Исследованы также лимфоидные маркеры CD7, CD2, CD3 (в цитоплазме), CD79a, CD22.

Определение хромосомных перестроек методом гибридационного анализа на биочипе. Лейкоциты из образцов костного мозга (после гемолиза в 0.8%-ном растворе хлорида аммония) собирали центрифугированием и промывали фосфатно-солевым буфером. РНК из лейкоцитов выделяли при помощи набора RNeasy MiniKit (“Qiagen”, США). РНК (2 мкг) инкубировали при 70°C в течение 5 мин со смесью специфичных ОТ-праймеров. Реакцию обратной транскрипции проводили при 42°C в течение 90 мин с использованием обратной транскриптазы M-MLV (“Силекс”, Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию останавливали, прогревая смесь при 70°C в течение 10 мин.

Полученную в ходе обратной транскрипции кДНК добавляли в качестве матрицы в смесь для мультиплексной ПЦР. Использовали вариант гнездовой ПЦР, включающий два этапа. Смесь первого этапа (25 мкл) содержала 67 мМ Трис-HCl pH 8.6, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01%-ный Тритон X-100, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTP (“Силекс”), 1.5 ед. акт. Таq-полимеразы (“Силекс”), по 10 пмоль каждого праймера и 2 мкл кДНК. Состав ПЦР-смеси второго этапа аналогичен первому, но концентрация прямого праймера составляет 50 пмоль, а обратного — 10 пмоль (для преимущественной амплификации прямой цепи); в качестве матрицы брали 1 мкл ПЦР-продукта пер-

вого этапа. Второй этап ПЦР проводили в присутствии флуоресцентно меченного Cy5-dUTP.

Флуоресцентно меченный продукт второго этапа ПЦР гибридизовали на биочипе. Использовали ЛК-биочип для анализа 13 транслокаций (“БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Биочипы изготавливали методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля. Гибридизацию флуоресцентно меченного ПЦР-продукта на биочипе проводили в течение 18–20 ч, как описано ранее [22]. Для регистрации флуоресцентных сигналов в ячейках биочипа и анализа изображения использовали программу ImageWare (“БИОЧИП-ИМБ”).

Массовое параллельное секвенирование (NGS, next-generation sequencing). Для направленного отбора нуклеотидных последовательностей применяли метод двойной гибридизации с библиотекой зондов NimbleGen SeqCap EZ согласно инструкции производителя (www.nimblegen.com). Библиотека зондов включала кодирующие участки 84 генов: *ABL1, ASLX1, ASLX2, ASLX3, ATRX, CALR, CBL, CBLB, CDKN2A, CEBPB, CREBBP, CSF3R, CUX1, DNMT3A, EP300, ETV6, EZH2, FBXW7, FLT3, GATA1, GATA2, GATA3, HIPK1, HIPK2, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, IL7R, JAK1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KMT2A, KMT2C, KMT2D, KRAS, MAP4K, MPL, MSH6, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, NT5C2, NUP98, PAX5, PDGFRA, PHF6, POLE, PRKD1, PRPS1, PTEN, PTPN11, RAD21, RREB1, RUNX1, RUNX2, SETBP1, SETD2, SF3B1, SH2B3, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TEK, TERT, TET1, TET2, TP53, TRPM7, TYK2, U2AF1, UBE2D3, WHSC1, WASH3P, WISPI, WT1, ZRSR2, TLX1, TLX3, USP7*, описанных при острых лейкозах и вовлеченных в патогенез заболевания. Приготовленные библиотеки ДНК пациентов секвенировали на приборе MiSeq (“Illumina”, США) путем парноконцевых чтений 2×150 .

Фрагментный анализ. Фрагментный анализ гена *FLT3* проводили методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500/3500xL (“Applied Biosystems”, США) с использованием аналога стандарта длин GeneScan™ 1200 LIZ® (“Синтол”, Россия). Пробо-подготовка включала ПЦР с использованием праймера, меченного флуоресцентным красителем FAM. Меченый ПЦР-продукт очищали путем осаждения этанолом. Анализируемые фрагменты ДНК смешивали с формамидом с добавлением стандарта длин, денатурировали прогреванием в течение 2 мин при 95°C. Результат анализа визуализировали с помощью программы GeneMarker V2.2.0 (“SoftGenetics”, США)

Биоинформатический анализ. Анализ данных секвенирования включал оценку качества прочтений, поиск избыточно представленных последовательностей (FastQC), удаление фрагментов

адаптеров, фильтрацию прочтений, аннотацию вариантов. Первичный и вторичный анализ данных, аннотацию вариантов проводили с помощью программного обеспечения Illumina: MiSeq Reporter Software и Variant Studio Variant Analysis Software v2.2. Среднее покрытие на образец составило около $\times 500$.

Работы по высокопроизводительному секвенированию выполнены с использованием оборудования ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/RUSSIAN_NEW/INSTITUTE/ccu_genome_c.php).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические характеристики 12 пациентов с *inv(16)* представлены в табл. 1. В 10 случаях подтип лейкоза был отнесен к ОМЛ-М4, аномальные эозинофилы определены в семи из них. Популяции бластных клеток экспрессировали маркеры ранних гемопоэтических предшественников и маркеры миелоидной дифференцировки.

Хромосомные перестройки в образцах костного мозга определяли методом гибридизации на биочипе. Во всех случаях выявлен химерный транскрипт *CBFB-MYH11*, при этом экзон 5 гена *CBFB* соединялся с экзоном 12 гена *MYH11*. В период ремиссии данная перестройка в образце костного мозга не обнаруживалась (рис. 1а, б).

Определен спектр и частоты генетических вариантов у 12 пациентов с *inv(16)*. У четырех пациентов исследованы парные образцы: первичный образец в момент постановки диагноза и образец, взятый в период клинико-гематологической ремиссии. При отборе генетических вариантов (SNV, single nucleotide variant) с учетом их потенциальной роли в возникновении и развитии лейкоза в качестве “драйверного” мутационного события использовали следующий алгоритм: 1) мутация аннотирована как патогенная в базах данных, включая каталог соматических мутаций при раке Cosmic Database (cancer.sanger.ac.uk); 2) мутация не описана в базах данных. Во втором случае учитывали следующие критерии: 1) мутация приводит к изменению аминокислотной последовательности белка (замена аминокислоты, сдвиг рамки считывания, стоп-кодон); 2) мутация не была описана ранее как герминальная; 3) мутация локализуется в функционально значимом домене белка; 4) мутации в близлежащих областях описаны при других лимфолифферативных заболеваниях; 5) представленность данной мутации в исследуемом образце более 5% (VAF > 5%) [21, 23]. Результаты высокопроизводительного секвенирования с описанием ряда несинонимических соматических мутаций, выявленных у пациентов с *inv(16)*, представлены в табл. 2.

В исследованных нами генах наиболее часто мутации встречались в генах, кодирующих белки

Таблица 1. Клинико-биологические особенности пациентов с ОМЛ *inv16*

№	Пол	Возраст	FAB-вариант	Данные иммунофенотипирования
1	м	12	M4	Ранние предшественники гемопоэза и маркеры миелоидной дифференцировки
2	ж	13	M4eo	Ранние предшественники гемопоэза и маркеры миелоидной дифференцировки
3	ж	5	M4eo	Ранние предшественники гемопоэза и маркеры миелоидной дифференцировки
4	м	1	M4	Маркеры миелоидной дифференцировки
5	м	11	M4	Маркеры миелоидной дифференцировки
6	ж	4	ОМЛ с eo	Маркеры миелоидной дифференцировки
7	ж	1,5	M4eo	Ранние предшественники гемопоэза и маркеры миелоидной дифференцировки
8	м	5	M4	Маркеры миелоидной дифференцировки
9	м	10	Н.о.	Миеломоноцитарные маркеры
10	ж	2	M4eo	Маркеры миелоидной дифференцировки
11	ж	12	M4eo	Маркеры миелоидной дифференцировки
12	м	8	M4eo	Маркеры миелоидной дифференцировки

внутриклеточных сигнальных путей, в которых участвуют рецепторные тирозинкиназы (ТК-сигнальные пути). В первую очередь, это мутации в гене *KIT* и генах белков семейства *RAS*. Схематичное изображение гена *KIT* и соответствующая доменная организация кодируемого им белка представлены на рис. 2 [24].

В нашей выборке у пяти пациентов с *inv16* обнаружены семь мутаций в гене *KIT*, что составило 41% (5/12) от числа исследованных случаев (образцы 7, 8, 9, 11, 12). Шесть мутаций представлены

небольшими делециями и инсерциями в экзоне 8 (рис. 3). В одном случае выявлена точечная замена в кодоне D816. У двух пациентов (9 и 12) одновременно присутствовали две разные мутации *KIT*. Следует отметить достаточно большой процент клеток с мутациями *KIT* в образцах (VAF от 11 до 43%). Эти результаты хорошо согласуются с представленными ранее данными [17], что позволяет считать мутации *KIT* основными “драйверными” событиями при ОМЛ с *inv(16)*.

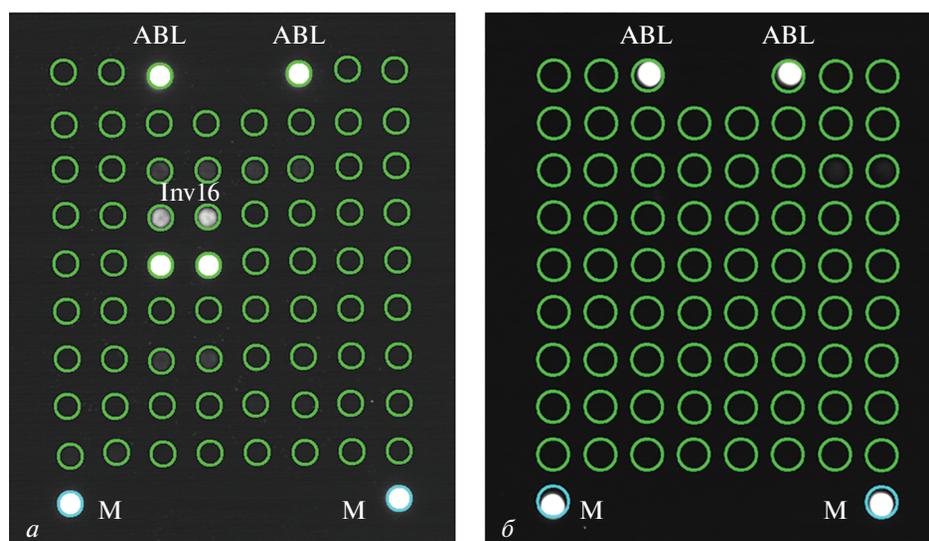


Рис. 1. Картины гибридизации на биочипе образцов одного пациента с инверсией хромосомы 16. *а* – Первичный образец, полученный в начале заболевания; *б* – образец в период ремиссии (ABL, Inv 16 – ячейки, содержащие зонды к последовательности контрольного гена *ABL* или химерного гена *CBFB–MYH11* соответственно; M – маркер).

Таблица 2. Мутации, выявленные в образцах пациентов с инверсией хромосомы 16

Ген	Мутация	Замена аминокислоты по NCBI	SNP ID	ID пациента – VAF
Белки внутриклеточных сигнальных путей, рецепторные тирозинкиназы, протеинкиназы				
<i>KIT</i>	exon8:c.1252_1257del	418_419del	–	8–43%
				12–34%
	exon8:c.1253_1254insCTTCTT	Y418delinsYFF	–	9–22%
				11–33%
	exon8:c.1258_1259insAGT	R420delinsKW	–	12–36%
	exon8:c.1252_1254del	p.418_418del	–	7–25%
	exon17:c.G2446T	D816Y	rs121913506	9–11%
<i>NRAS</i>	exon3:c.A183T	Q61H	rs121913255	2–13%
	exon3:c.A183C			10–34%
				11–5%
<i>KRAS</i>	exon2:c.G35A	G12D	rs121913529	3–9%
				4–5%
<i>FLT3-ITD</i>	exon 14: c.A1706dup49	p.Q569fs	–	2–16%
<i>JAK1</i>	exon16:c.A2185C	S729R	–	4–41%
<i>TYK2</i>	exon13:c.C1885G	P629A	–	3–47%
<i>HIPK1</i>	exon2:c.C260T	T87I	–	8–47%
<i>NOTCH1</i>	exon23:c.A3671C	D1224A	–	5–38%
Модификаторы хроматина				
<i>KDM6A</i>	exon21:c.3093_3094insCGTGT	V1031fs	rs753442927	5–33%
	exon16:c.2466-2A>G	Сплайсинг	–	12–20%
<i>KMT2A</i>	exon3:c.G1474T	A492S	–	7–47%
Транскрипционные факторы				
<i>RREBP1</i>	exon12:c.G4853A	R1618Q	rs116683035	6–47%
<i>IKZF1</i>	exon3:c.G676C	G313R	–	8–48%
Клеточные рецепторы				
<i>IL7R</i>	exon2:c.G139A	E47K	–	3–44%

Выявленные в нашей работе мутации в гене *KIT* чаще локализовались в экзоне 8 (кодоны 417–420) (33%), чем в экзоне 17 (кодон 816) (8.3%). Экзон 8 кодирует внеклеточную часть белка, мутации в нем приводят к конститутивной активации киназы *KIT* без участия внеклеточного лиганда. Предполагается, что мутации именно в области Ig5-домена вызывают конформационные изменения белка, которые делают возможным димеризацию молекул в отсутствие лиганда [25].

Мутации в экзоне 8 гена *KIT*, как показано ранее, представлены инсерциями и делециями нескольких нуклеотидов [26]. Мутации *KIT* могут

быть как одиночными, так и двойными [27]. Следует отметить, что разнообразие сочетаний инсерций и делеций позволяет рассматривать определенную комбинацию мутационных событий как уникальную характеристику данного пациента [28]. Выявленные в нашей выборке мутации, как правило, не представлены в известных базах данных.

В трех образцах (2, 10, 11) найдены мутации в кодоне Q61 гена *NRAS* (25%), в двух (3 и 4) – мутации в кодоне G12 гена *KRAS* (17%). В целом, мутации в онкогенах семейства *RAS* обнаружены нами у 42% пациентов, что соответствует опубликованным данным [29, 30]. Следует отметить бо-

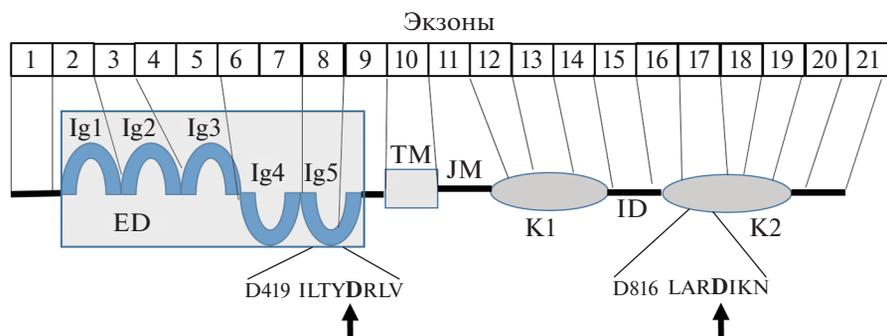


Рис. 2. Структура гена и белка рецепторной тирозинкиназы KIT. Прямоугольниками показаны экзоны от 1 до 21. Внизу – домены белка: внеклеточный домен ED, содержащий иммуноглобулин-подобные участки Ig1–Ig5; TM – трансмембранный домен; JM – домен, прилежащий к мембранному; K1 и K2 – киназные домены; ID – вставочный домен. Экзон 12 содержит АТФ-связывающий сайт (Gly-X-Gly-X-X-Gly). Стрелками отмечены аминокислотные мотивы, наиболее часто мутирующие при CBF-ОМЛ.

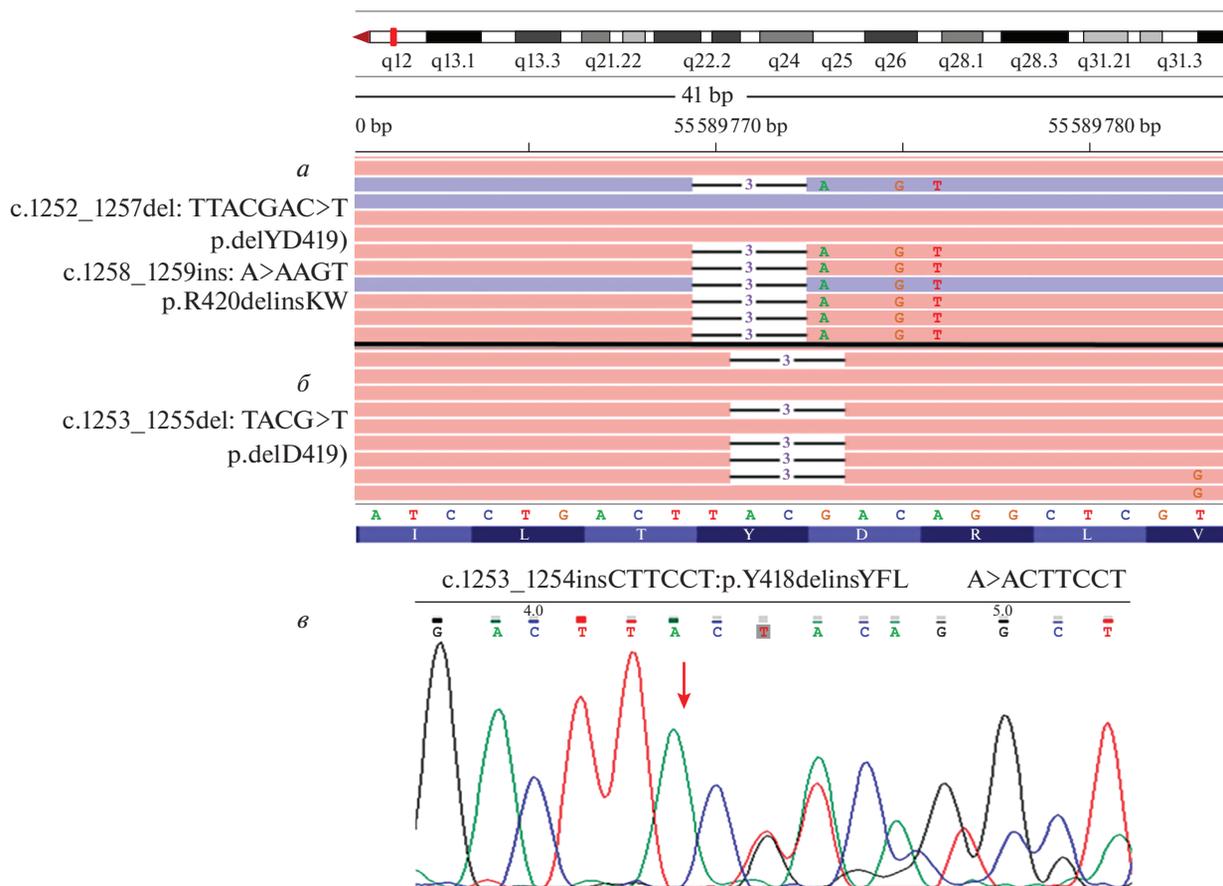


Рис. 3. Визуализация результатов секвенирования экзона 8 гена *KIT* с помощью браузера Integrative Genomics Viewer (IGV) и методом секвенирования по Сэнгеру. В образце (а) выявлена сложная комбинация мутаций, приводящая к множественным изменениям в аминокислотной последовательности; в образце (б) – делеция аспарагиновой кислоты (D) в позиции p.419; (в) – результат секвенирования по Сэнгеру, мутация c.1253_1254insCTTCCT:p.Y418delinsYFL (делеция нуклеотида А и вставка последовательности АСТТСССТ).

более низкую представленность мутаций *RAS* в наших образцах (VAF от 5 до 34%) по сравнению с мутациями *KIT*. Мутации *NRAS* могут сочетаться с мутациями *KIT* (образец 11).

Также в образце 2 выявлена внутритандемная дупликация в гене *FLT3* (*FLT3-ITD*) длиной 69 п.н. Метод NGS не всегда позволяет обнаружить эту перестройку, поэтому все образцы дополнитель-

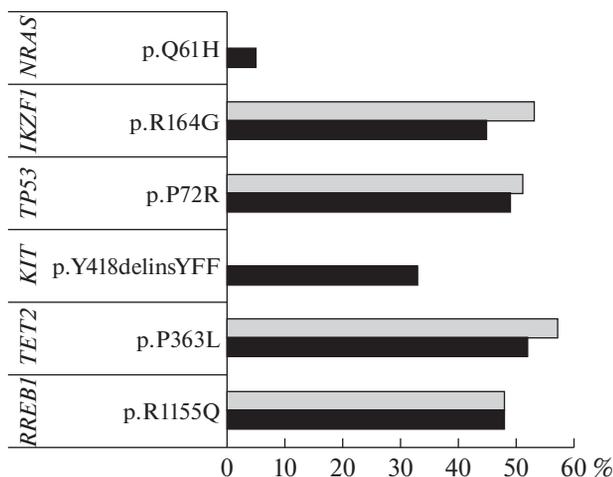


Рис. 4. Спектр генетических вариантов в образцах одного пациента при постановке диагноза (черный цвет) и в период ремиссии (серый цвет).

но анализировали с помощью фрагментного анализа. Фрагментный анализ подтвердил присутствие *FLT3-ITD* в образце 2, в других образцах такая дупликация не выявлена. Этот ген кодирует рецепторную тирозинкиназу – важный участник внутриклеточных сигнальных путей. Мутации *FLT3-ITD* представляют собой дупликацию фрагмента внутри экзонов 14–15, которые кодируют юкстамембранный домен (juxtamembrane domain), и приводят к конститутивной активации тирозинкиназы *FLT3* [31].

Нами обнаружены также редкие мутации в других генах, участвующих в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов, *JAK1*, *TYK2*, *HIPK1*, *NOTCH1*. Мутации в этих генах ранее были описаны при острых лимфобластных лейкозах и В-клеточной лимфоме. В нашей выборке они встречались как вместе с мутациями *KIT* и *RAS*, так и независимо. Активирующие мутации в генах ТК-сигнальных каскадов найдены нами у 9 из 12 (75%) пациентов с CBF-ОМЛ inv(16). Мутации в генах *KDM6A* и *KMT2A*, участвующих в модификации хроматина, выявлены в образцах 7, 5 и 12 совместно с мутациями в ТК-сигнальных каскадах. По-видимому, они могут рассматриваться в качестве дополнительных событий, как и мутация в гене *IDH1*, являющемся эпигенетическим регулятором. Мутации в генах *RREBP1* и *IKZF1*, кодирующих факторы транскрипции, в образцах 6 и 8 представлены с частотой около 50% (совместно с мутациями *KRAS* и *HIPK1*). Мутация E47K в гене *IL7R*, выявленная в образце 3 (совместно с мутациями ТК-каскадов в генах *NRAS* и *TYK2*), описана ранее при меланоме кожи.

Наибольший интерес представляют новые, ранее не представленные в базах данных мутации в гене *KDM6A*, кодирующем деметилазу гистонов.

Есть данные о том, что мутации в этом гене ассоциированы с рефрактерным течением лейкоза и риском развития его рецидива [32].

Метод NGS позволяет оценивать количество клеток, содержащих мутантный аллель, на фоне клеток с аллелем “дикого типа”, исходя из частоты данного аллельного варианта (VAF). Нами проанализированы парные образцы двух пациентов, полученные в начале заболевания и в период ремиссии. Сравнительный анализ спектров генетических вариантов у одного из пациентов представлен на рис. 4. В первичном образце присутствуют две драйверные мутации: делеция/инсерция в экзоне 8 гена *KIT* (VAF = 33%) и миссенс-мутация в кодоне Q61 гена *NRAS* (5%). Исходя из представленности аллельных вариантов в первичном образце 11, можно предположить, что основной драйверной мутацией является мутация в гене *KIT*. Мутация *NRAS*, найденная в 5% клеток, отражает клональную гетерогенность опухоли, причем ее низкая представленность в образце может указывать на эту мутацию как на позднее событие в эволюции опухолевой клетки. Вместе с тем, в результате лечения “уходят” и та, и другая мутация, что подтверждает их участие в процессе развития лейкоза. Таким образом, изучение мутационного профиля у отдельного пациента позволяет построить индивидуальную модель процесса развития лейкоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №18-15-00398).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От родителей пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schoch C., Kern W., Schnittger S., Büchner T., Hiddemann W., Haferlach T. (2004) The influence of age on prognosis of *de novo* acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica*. **89**(9), 108–290.
- Jourdan E., Boissel N., Chevret S., Delabesse E., Renneville A., Cornillet P., Blanchet O., Cayuela J.M., Recher C., Raffoux E., Delaunay J., Pigneux A., Bula-bois C.E., Berthon C., Pautas C., Vey N., Lioure B., Thomas X., Luquet I., Terré C., Guardiola P., Béné M.C., Preudhomme C., Ifrah N., Dombret H., French AML Intergroup. (2013) Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with

- core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. **121**(12), 2213–2223.
3. Le Beau M.M., Larson R.A., Bitter M.A., Vardiman J.W., Golomb H.M., Rowley J.D. (1983) Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic clinicopathological association. *N. Engl. J. Med.* **309**(11), 630–636.
 4. Döhner H., Estey E.H., Amadori S., Appelbaum F.R., Büchner T., Burnett A.K., Dombret H., Fenaux P., Grimwade D., Larson R.A., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G.J., Sanz M.A., Sierra J., Tallman M.S., Löwenberg B., Bloomfield C.D.; European Leukemia Net. (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*. **115**(3), 453–474.
 5. Sander A., Zimmermann M., Dworzak M., Fleischhack G., von Neuhoff C., Reinhardt D., Kaspers G.J., Creutzig U. (2010) Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. *Leukemia*. **24**, 1422–1428.
 6. Renneville A., Roumier C., Biggio V., Nibourel O., Boissel N., Fenaux P., Preudhomme C. (2008) Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. **22**(5), 915–931.
 7. Speck N.A., Gilliland D.G. (2002) Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. **2**(7), 502–513.
 8. Downing J.R. (2003) The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**(1), 48–54.
 9. Miyamoto T., Nagafuji K., Akashi K., Harada M., Kyo T., Akashi T., Takenaka K., Mizuno S., Gondo H., Okamura T., Dohy H., Niho Y. (1996) Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood*. **87**(11), 4789–4796.
 10. Wiemels J.L., Xiao Z., Buffler P.A., Maia A.T., Ma X., Dicks B.M., Smith M.T., Zhang L., Feusner J., Wiencke J., Pritchard-Jones K., Kempfski H., Greaves M. (2002) *In utero* origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. **99**(10), 3801–3805.
 11. Gilliland D.G. (2002) Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin. Hematol.* **39**(4 Suppl. 3), 6–11.
 12. Duployez N., Willekens C., Marceau-Renaut A., Boudry-Labis E., Preudhomme C. (2015) Prognosis and monitoring of core-binding factor acute myeloid leukemia: current and emerging factors. *Expert. Rev. Hematol.* **8**(1), 43–56.
 13. Vliagoftis H., Worobec, A.S., Metcalfe D.D. (1997). The proto-oncogene *c-kit* and *c-kit* ligand in human disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 435–440.
 14. Reilly J.T. (2002) Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br. J. Haematol.* **116**, 744–757.
 15. Paschka P., Marcucci G., Ruppert A.S., Mrózek K., Chen H., Kittles R.A., Mrózek K., Chen H., Kittles R.A., Vukosavljevic T., Perrotti D., Vardiman J.W., Carroll A.J., Kolitz J.E., Larson R.A., Bloomfield C.D.; Cancer and Leukemia Group B. (2006) Adverse prognostic significance of *KIT* mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3904–3911.
 16. Johnson D.B., Smalley K.S., Sosman J.A. (2014) Molecular pathways: targeting *NRAS* in melanoma and acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* **20**(16), 4186–4192.
 17. Renneville A., Roumier C., Biggio V., Nibourel O., Boissel N., Fenaux P., Preudhomme C. (2008) Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. **22**, 915–931.
 18. Sangle N.A., Perkins S.L. (2011) Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**(11), 1504–1509.
 19. Faber Z.J., Chen X., Gedman A.L., Boggs K., Cheng J., Ma J., Radtke I., Chao J.R., Walsh M.P., Song G., Andersson A.K., Dang J., Dong L., Liu Y., Huether R., Cai Z., Mulder H., Wu G., Edmonson M., Rusch M., Qu C., Li Y., Vadodaria B., Wang J., Hedlund E., Cao X., Yergeau D., Nakitandwe J., Pounds S.B., Shurtleff S., Fulton R.S., Fulton L.L., Easton J., Parganas E., Pui C.H., Rubnitz J.E., Ding L., Mardis E.R., Wilson R.K., Gruber T.A., Mullighan C.G., Schlenk R.F., Paschka P., Döhner K., Döhner H., Bullinger L., Zhang J., Kline J.M., Downing J.R. (2016) The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat. Genet.* **48**(12), 1551–1556.
 20. Duployez N., Marceau-Renaut A., Boissel N., Petit A., Bucci M., Geffroy S., Lapillonne H., Renneville A., Ragu C., Figeac M., Celli-Lebras K., Lacombe C., Micol J.B., Abdel-Wahab O., Cornillet P., Ifrah N., Dombret H., Leverger G., Jourdan E., Preudhomme C. (2016) Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. **127**(20), 2451–2459.
 21. Гукасян Л.Г., Краснов Г.С., Муравенко О.В., Байдун Л.В., Ибрагимова С.З., Наседкина Т.В. (2019) Мутационный профиль подтипов острого миелоидного лейкоза у детей при отсутствии известных хромосомных перестроек. *Молекуляр. биология*. **53**, 402–410.
 22. Наседкина Т.В., Иконникова А.Ю., Цаур Г.А., Каратеева А.В., Аммуру Ю.И., Авдоница М.А., Карачунский А.И., Заседателев А.С. (2016) Биологический микрочип для определения структуры химерных транскриптов с участием гена *MLL* у детей, больных острыми лейкозами. *Молекуляр. биология*. **50**(6), 968–977.
 23. Абрамов И.С., Емельянова М.А., Рябая О.О., Краснов Г.С., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. (2019) Соматические мутации, вносящие вклад в метастазирование акральная меланомы. *Молекуляр. биология*. **53**, 648–653.
 24. Vandenberg G.R., deCastro C.M., Taylor H., Dew-Knight S., Kaufman R.E. (1992) Cloning and structural analysis of the human *c-kit* gene. *Oncogene*. **7**, 1259–1266.
 25. Wiesmann C., Muller Y.A., de Vos A.M. (2000) Ligand-binding sites in Ig-like domains of receptor tyrosine kinases. *J. Mol. Med. (Berl.)*. **78**(5), 247–260.

26. Cammenga J., Horn S., Bergholz U., Sommer G., Besmer P., Fiedler W., Stocking C. (2005) Extracellular KIT receptor mutants, commonly found in core binding factor AML, are constitutively active and respond to imatinib mesylate. *Blood*. **106**(12), 3958–3961.
27. Allen C., Hills R.K., Lamb K., Evans C., Tinsley S., Sellar R., O'Brien M., Yin J.L., Burnett A.K., Linch D.C., Gale R.E. (2013) The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT: *FLT3* and *CBL* mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia*. **27**(9), 1891–1901.
28. Shih L.Y., Liang D.C., Huang C.F., Chang Y.T., Lai C.L., Lin T.H., Yang C.P., Hung I.J., Liu H.C., Jaing T.H., Wang L.Y., Yeh T.C. (2008) Cooperating mutations of receptor tyrosine kinases and *Ras* genes in childhood core-binding factor acute myeloid leukemia and a comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia*. **22**, 303–307.
29. Bacher U., Haferlach T., Schoch C., Kern W., Schnittger S. (2006) Implications of *NRAS* mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. **107**(10), 3847–3853.
30. Berman J.N., Gerbing R.B., Alonzo T.A., Ho P.A., Miller K., Hurwitz C., Heerema N.A., Hirsch B., Raimondi S.C., Lange B., Franklin J.L., Gamis A., Meshinchi S. (2011) Prevalence and clinical implications of *NRAS* mutations in childhood AML: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia*. **25**(6), 1039–1042.
31. Kiyoi H., Ohno R., Ueda R., Saito H., Naoe T. (2002) Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. **21**(16), 2555–2563.
32. Stief S.M., Hanneforth A.L., Weser S., Mattes R., Carlet M., Liu W.H., Bartoschek M.D., Domínguez Moreno H., Oettle M., Kempf J., Vick B., Ksienzyk B., Tizazu B., Rothenberg-Thurley M., Quentmeier H., Hiddemann W., Vosberg S., Greif P.A., Metzeler K.H., Schotta G., Bultmann S., Jeremias I., Leonhardt H., Spiekermann K. (2019) Loss of *KDM6A* confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Jun 14. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0497-6>

DRIVER MUTATIONS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH INVERSION OF CHROMOSOME 16

L. G. Ghukasyan¹, G. S. Krasnov¹, O. V. Muravenko¹, A. Y. Ikonnikova¹, R. A. Yurasov¹, L. V. Baidun², S. Z. Ibragimova³, and T. V. Nasedkina^{1,4,*}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, 119117 Russia

³Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Tashkent, 100185 Uzbekistan

⁴Dmitry Rogachev National Medical and Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 119117 Russia

*e-mail: nased@biochip.ru

The formation of certain subtypes of acute myeloid leukemia occurs as a result of the cooperation of several events: the formation of fusion genes as a result of chromosomal rearrangements, which leads to the disruption of cell differentiation, and the emergence of mutations that enhance cellular proliferation by activating intracellular signaling pathways. High-throughput sequencing methods reveal characteristic mutation spectra in leukemia with different chromosomal aberrations, however, the role of mutation events in malignant cell transformation processes remains open. The paper searched for driver mutation events in leukemic cells containing the chimeric *CBFB-MYH11* gene, which results from the inversion on chromosome 16. Using target enrichment, the coding regions of 84 genes in 12 children in acute myeloid leukemia with *inv(16)* were investigated. Somatic mutations have been found in the genes of receptor tyrosine kinase-mediated intracellular signaling cascades such as *KIT* (41%), *NRAS* (25%), *KRAS* (17%), *FLT3* (8.3%). Comparative analysis of samples at the time of diagnosis and during remission was used to assess the role of mutations in the pathogenesis of the disease. Previously not described mutations in *KDM6A* genes, *NOTCH1*, *IDH1*, which may be involved in leukemogenesis processes have been identified.

Keywords: massive parallel sequencing, acute myeloid leukemia, somatic mutations, inversion 16