

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБКЛОНАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ ОПУХОЛИ ПО ДАННЫМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ И АКРАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

© 2021 г. Г. С. Краснов^а, Л. Г. Гукасян^а, И. С. Абрамов^а, Т. В. Наседкина^а, *

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

*e-mail: nased@biochip.ru

Поступила в редакцию 10.11.2020 г.

После доработки 15.12.2020 г.

Принята к публикации 15.12.2020 г.

Внутриопухолевая гетерогенность и клональная изменчивость опухоли, приводящие к развитию устойчивости к терапии, появлению рецидивов и метастазов, представляют собой одну из центральных проблем клинической онкологии. Высокопроизводительное секвенирование экзона позволяет анализировать субклональную организацию опухоли. Проведен сравнительный анализ данных секвенирования таргетной панели, клинического экзона и полного экзона в опухолях с различной мутационной нагрузкой (острый миелоидный лейкоз у детей и акральная меланома). Таргетное секвенирование образцов, полученных от пациентов с острым миелоидным лейкозом, выявляет более одной потенциальной драйверной мутации в генах сигнальных путей *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *FLT3* у одного пациента, что отражает сложную клональную структуру субстрата опухоли. Анализ результатов секвенирования экзона позволяет выделить кластеры мутантных аллелей, соответствующих различным популяциям лейкозных клеток в образце. Сравнение мутационного профиля первичного образца острого миелоидного лейкоза, образца на стадии ремиссии и при рецидиве позволяет проследить динамику изменения клонального состава опухоли. На примере акральной меланомы исследована субклональная структура опухоли. С применением средств SciClone и ClonEvol проведена кластеризация мутантных аллелей, встречающихся в образцах с близкой частотой. На основе этих данных выполнено предсказание внутриопухолевого клонального состава, предложена модель клональной эволюции — изменения клонального состава опухоли при метастазировании, включающие появление новых мутаций, которые могут быть связаны с дальнейшей прогрессией заболевания. Примененный подход позволяет выявлять мутации, обуславливающие формирование новых опухолевых клонов, обладающих пролиферативным преимуществом, в том числе, в условиях противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, акральная меланома, острый миелоидный лейкоз, соматические мутации, частота вариантного аллеля

DOI: 10.31857/S0026898421050050

Процесс развития опухоли неразрывно связан с приобретением и накоплением генетических и эпигенетических изменений в опухолевой клетке [1]. Некоторые из этих мутаций обеспечивают клетку пролиферативным преимуществом перед другими опухолевыми клетками (драйверные мутации), тогда как другие имеют нейтральный эффект (пассажирские мутации) [2]. Опухолевая клетка, обладающая селективным преимуществом, лучше взаимодействует с локальным микроокружением и может размножаться быстрее, чем другие клетки и генерировать большее количество дочерних клеток. Этот процесс получил название “клональная экспансия” [3, 4].

Эволюционную историю опухоли можно проследить с использованием методов высокопроизводительного секвенирования. Мутации, которые произошли в клетке-предшественнике опухолевых клеток, будут присутствовать во всех ее потомках (кроме случаев делеции мутантного аллеля) и могут служить маркерами клональной популяции [5]. По мере своего развития опухоль может приобретать как дополнительные драйверные, так и пассажирские мутации и образовывать субпопуляции клеток, несущих мутации, отсутствующие в других клетках данной опухоли.

Долю клеток, несущих определенную мутацию, можно определить по частоте вариантного аллеля с этой мутацией (variant allele frequency, VAF). Ины-

ми словами, в случае секвенирования генома или экзома VAF — это доля прочтений, картированных на данное положение и содержащих такую нуклеотидную замену. На величину VAF безусловно влияет то, что опухолевый образец может содержать и неопухолевые клетки (стромальные и иммунные клетки, фибробласты), которые не имеют общих соматических мутаций с клонами опухоли. Также VAF зависит от количества копий хромосомы или данного региона хромосомы, поэтому в алгоритмах расчета должен учитываться такой параметр, как копияность участка (CNV, copy number variation) [6]. Считается, что обилие соматических мутаций и перестроек, выявляемых уже на момент постановки диагноза, в значительной степени может увеличивать эволюционный потенциал злокачественного новообразования, способствовать развитию устойчивости к лечению и обуславливать плохой исход в случае солидных опухолей [7].

Применение методов высокопроизводительного секвенирования (NGS) позволяет с высокой чувствительностью оценить клональность в отдельных образцах. Точное определение частоты встречаемости различных вариантов аллелей (VAF) и статистический анализ могут предсказывать клональный состав опухоли исходя из результатов кластерного анализа мутаций, по значениям VAF [8–10]. Прогрессирование злокачественного фенотипа можно оценить путем сравнения образцов, полученных при первичной диагностике и при рецидиве в случае заболеваний кроветворной системы, или первичной опухоли и метастатических участков при солидных опухолях [11, 12].

Один из примеров использования этого подхода — изучение мутаций при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у взрослых, позволившее выявить высокую гетерогенность популяции лейкозных клеток одного пациента и пути формирования клонов, имеющих различные мутационные профили в процессе развития заболевания [13–16]. В то же время, проявление внутриопухолевой гетерогенности при ОМЛ у детей имеет свои особенности [17]. Опухоли у детей обладают гораздо меньшей мутационной нагрузкой по сравнению с опухолями у взрослых [18]. Наибольший интерес для изучения субклональной организации злокачественных опухолей кроветворной системы представляет анализ мутационного профиля при СВФ (core binding factor)—ОМЛ у детей [19, 20]. Для лейкозов этой группы характерны хромосомные перестройки t(8;21) (химерный ген *RUNX1—RUNX1T1*) и inv(16)/t(16;16) (химерный ген *CBFB/MYH11*), вовлекающие субъединицы фактора транскрипции СВФ. Первое событие лейкомогенеза — слияние генов, кодирующих белок СВФ. При этом предполагается, что для дальнейшего перехода в ОМЛ требуются вторичные события — мутации в генах, вовлеченных в процессы пролиферации и дифференцировки.

Внутриопухолевая гетерогенность считается одной из основных причин неэффективности иммунной и таргетной терапии при метастатической меланоме [21–23]. Глубокое секвенирование генома первичной опухоли и метастатических очагов различной локализации позволило выявить клональную структуру образцов меланомы, определить иницилирующую роль мутаций *BRAF* и *NRAS* при меланоме, обнаружить генетические изменения, ответственные за устойчивость к таргетной терапии вемурафенибом [12]. Акральная меланнома — один из подтипов меланомы кожи, отличающийся локализацией на участках, не подверженных инсоляции (ладони, стопы, подногтевое пространство), характеризуется отличным от других подтипов меланомы кожи мутационным профилем, в частности, пониженной частотой драйверных мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* [24]. Поэтому представляет интерес определение клональной структуры меланомы этого подтипа с целью изучения вероятных механизмов опухолевой прогрессии.

В настоящей работе с использованием различных алгоритмов исследована внутриопухолевая гетерогенность и субклональная организация опухоли при ОМЛ у детей и при акральной меланоме у взрослых. Полученные данные позволяют проследить клональную эволюцию опухоли, выявить значимые мутационные события и генетические маркеры, отвечающие за прогрессию заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. В исследование включены парные архивные образцы костного мозга 11 пациентов с ОМЛ (первичный образец—ремиссия или первичный образец—ремиссия—рецидив) и серия образцов норма—опухоль—метастаз, полученных от пациента с акральной меланомой [25]. Образцы хранили при -80°C до момента использования. Описание образцов, полученных от пациентов с ОМЛ, и клинические характеристики представлены в табл. 1.

Все пациенты получали химиотерапию по протоколам лечения ОМЛ AML-BFM-93/98 или ОМЛ-ММ-2000, включающую следующие этапы: индукция (7–10 дней), консолидация (до 50–60 дней) и поддерживающая терапия (до 2 лет с начала заболевания). Таким образом, образцы в ремиссии были отобраны на этапе поддерживающей терапии у всех пациентов, кроме пациента 6, который закончил лечение. В первичных образцах костного мозга при диагностическом обследовании выявляли от 50 до 80% бластных клеток, в образцах ремиссии — 0% бластов. Транслокации t(8;21) и inv(16) в образцах костного мозга определяли с использованием набора ЛК-БИОЧИП (“БИОЧИП-ИМБ”, Россия), как описано ранее

[26]. Метод ПЦР в реальном времени использовали для определения минимальной остаточной болезни в период ремиссии [27].

Использовали также результаты исследования образца меланомы, полученного от мужчины 77 лет. Первичная опухоль представляла собой меланому кожи правой пяточной области (акральная меланома) толщиной 12 мм, стадия IIIb, уровень инвазии по Кларку 4. Проведено хирургическое удаление опухоли и прилегающей области кожи и клетчатки. В двух из трех лимфоузлов клетчатки обнаружены метастазы. Гистологически опухоль представляла собой изъязвляющуюся беспигментную эпителиоидноклеточную и веретенчатую меланому. Через 6 мес. был удален пахово-подвздошный лимфоузел, полностью замещенный метастазом беспигментной меланомы веретенчатого и эпителиоидноклеточного строения с очагами некроза. Исследовали свежезамороженную ткань первичной

опухоли и ткань метастаза в паховом лимфоузле, полученную при хирургическом лечении [25]. После удаления метастаза пациенту назначена терапия препаратом Роферон-А (интерферон альфа-2а), данные об эффективности лечения отсутствуют.

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из образцов замороженной ткани/костного мозга и крови с использованием набора QIAamp DNA MiniKit (“Qiagen”, Германия). Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2 (“Invitrogen”, США), набора реагентов Qubit® dsDNAHS (“Invitrogen”). Чистоту ДНК оценивали с помощью микроспектрофотометра NanoDrop™ 3300 (“Thermo Scientific”, США), степень фрагментации определяли с помощью гель-электрофореза.

Высокопроизводительное секвенирование. Целевые последовательности ДНК отбирали с ис-

Таблица 1. Клинико-биологические характеристики пациентов с острым миелоидным лейкозом

ID	Пол	Возраст, год	Диагноз	Транслокация	Тип образца
ОМЛ-1	ж	6	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 19 мес.
ОМЛ-2	ж	3	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 12 мес.
ОМЛ-3	ж	6	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 12 мес.
ОМЛ-4	м	5	ОМЛ, М4	inv(16)	О Рем 6 мес.
ОМЛ-5	м	15	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 6 мес.
ОМЛ-6	м	12	ОМЛ, М4	inv(16)	О Рем 34 мес.
ОМЛ-7	м	13	ОМЛ, М4	inv(16)	О Рем 12 мес.
ОМЛ-8	ж	17	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 7 мес.
ОМЛ-9	м	9	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 12 мес.
ОМЛ-10	м	11	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 8 мес.
ОМЛ-11	м	12	ОМЛ, М2	t(8;21)	О Рем 6 мес. Рец 10 мес.

Примечание. О – образец опухоли при первичной диагностике, Рем – образец костного мозга, взятый в период ремиссии, Рец – образец костного мозга в рецидиве.

пользованием панели жидких зондов NimbleGen (“Roche”, Швейцария). В случае пациентов с ОМЛ использовали таргетную панель, включающую 84 гена, ассоциированных с лейкозами. Подготовку образцов проводили согласно [25, 26] по стандартному протоколу для приготовления библиотек KAPA Library Preparation Kit (“Roche”). Подготовку библиотек для полноэкзомного секвенирования образцов ОМЛ проводили с использованием набора Nextera Exome (“Illumina”, США), согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 (“Illumina”). Секвенирование образца акральной меланомы выполнено ранее с использованием панели зондов, комплементарных кодирующей части 4100 генов (“медицинский экзом”) [25]. При таргетном секвенировании среднее покрытие составило не менее $\times 500$, при полноэкзомном секвенировании не менее $\times 100$, при секвенировании медицинского экзома — не менее $\times 300$.

Работы по секвенированию выполнены в Центре высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН с использованием оборудования ЦКП “Геном” (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

Результаты секвенирования у пациентов с ОМЛ подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру (при VAF $> 20\%$). Визуализацию прочтений, в том числе при VAF $< 5\%$, проводили с использованием Java-приложения IGV (Integrative Genomics Viewer) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv>).

Внутреннюю tandemную дубликацию гена *FLT3* (*FLT3-ITD*) определяли с помощью фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500/3500xL (“Applied Biosystems”, США) с использованием аналога стандарта длин GeneScan™ 1200 LIZ® (“Синтол”, Россия), как описано ранее [26].

Анализ результатов секвенирования. После первичного контроля качества (FastQC 0.11.9, fastp 0.20.0), провели обрезку 5'-концов, фильтрацию прочтений по длине и методом плавающего окна; также были удалены остатки адаптеров (Trimomatic 0.38) [28]. После этого оценивали бактериальное загрязнение пула прочтений. Прочтения картировали на референсный геном человека GRCh37 (Ensembl release 75; hg19) при помощи bowtie2 2.3.5.1. Проводили сортировку BAM-файлов (samtools 1.10), маркировку групп прочтений, переупорядочение прочтений (AddOrReplaceReadGroups, ReorderSam, FixMateInformation из набора picard-tools 2.21.3) и далее маркировку дублицированных прочтений, наиболее вероятно произошедших от одного фрагмента ДНК (ПЦР- и оптических дубликатов) при помощи инструмента

MarkDuplicatesWithMateCigar из пакета picard-tools 2.21.3. После этого проводили процедуру перекалибровки качества прочтения за счет сравнения пулов известных ранее (т.е. аннотированных dbSNP, версия 2018-07) и новых замен. С этой целью использовали инструменты BaseRecalibrator и ApplyBQSR из пакета GATK (версия 4.0.8.1) [29]. Соматические мутации (точечные замены и инсерции/делеции, далее индели) идентифицировали с использованием Mutect2 также из пакета GATK 4.0.8.1 [30].

Перед непосредственным поиском соматических мутаций создавали так называемую “панель норм” (panel of norms, PoN) — каталог вариаций, наблюдаемых в образцах с нормальной тканью (или образцах в ремиссии в случае лейкозов), вошедших в анализ. Для этого запускали алгоритм Mutect2 в режиме “tumor only” на всех образцах ДНК из нормальной ткани (ремиссии) и формировали VCF-файл со всеми выявленными отличиями от референсного генома. Затем проводили поиск соматических мутаций в опухоли с использованием Mutect2 в режиме сравнения с соответствующей нормой (ремиссией), дополнительно с подключением каталога PoN и данных о герминальных вариантах gnomAD 2.0.1. Полученные VCF-файлы фильтровали с помощью GATK FilterMutectCalls. Список мутаций, прошедших фильтрацию, аннотировали с помощью Annotvar, PMID 20601685. Использовали базы данных о популяционных частотах аллелей (gnomAD, 1000 Genomes Project, Kaviar, ESP 6500, ExAC), а также dbSNP, ClinVar, COSMIC, локализацию в домене белка (Interpro), информацию о консервативности геномной области (phastCons, phyloP). Кроме того, для оценки патогенности мутации использовали SIFT [31], PolyPhen2 [32], Mutation Taster [33], LRT [34], PROVEAN, M-CAP, DANN, VEST3, MetaSVM и MetaLR. На основе полученных предсказаний оценивали так называемый “скор патогенности” (pathogenicity score). Чем большее число алгоритмов оценивает замену как патогенную, чем ниже ее частота в популяции и выше степень консервативности геномного локуса, содержащего данную замену, тем выше значение “скора патогенности”.

Варианты с популяционной частотой более 1% из анализа исключали. Стоит отметить, что количество таких вариантов не превышало 5% от всех соматических вариантов, локализованных в кодирующих областях, и 10% всех соматических вариантов, которые прошли FilterMutectCalls, включая интронные и межгенные. Дополнительно список соматических вариантов был отфильтрован в соответствии с минимальным порогом покрытия прочтениями (минимум 20 прочтений для нормального образца и минимум 10 для образца опухоли). Из анализа исключали также мутации, локализованные в polyN-мотивах (в частности GGGTG >

GGGGG, CCCCCG > CCCCC и др.) и имеющие низкое покрытие, VAF менее 1%.

Для дальнейшего выделения кластеров мутаций у пациентов с ОМЛ использовали данные полноэкзомного секвенирования (пациенты 1, 2 и 3). Копийность участков генома CNV (copy number variation) определяли с использованием алгоритмов CNVkit [PMID: 27100738], cn.MOPS [35], Control-FREEC [36], основанных на сравнительном анализе покрытия геномных областей, включенных в таргетную панель. При этом падение покрытия свидетельствует о делеции определенных локусов, увеличение покрытия – о наличии дупликаций или амплификаций соответствующих участков генома. Однако этот подход часто оказывается неприменимым при анализе данных экзомного секвенирования, где присутствует этап обогащения таргетных участков с использованием метода гибридизации. В этом случае наблюдаемое покрытие может быть чувствительным к присутствию делеций/амплификаций только лишь в том случае, если гибридизационные зонды на обоих этапах обогащения берутся в избытке по сравнению с геномной ДНК. Исключение здесь составляют гомозиготные делеции, присутствующие в подавляющем большинстве клеток образца.

По этой причине мы также использовали сравнительный анализ частот бета-аллелей (beta allele frequency, BAF) в парных образцах норма–опухоль [9, 37]. Несмотря на то, что средства Control-FREEC и CNVkit предлагают проведение BAF-анализа, мы не сочли его удовлетворительным: скорее он может использоваться как источник информации, дополняющей данные по анализу покрытия. В связи с этим мы реализовали собственный алгоритм поиска событий CNV. С этой целью использовали VCF-файл с герминальными мутациями в паре образцов норма–опухоль, полученный freeBayes, GATK HaplotypeCaller, VarScan или другими средствами. На первом этапе отбирали все герминальные гетерозиготные варианты с $40\% < \text{VAF} < 60\%$ в норме и покрытием не менее 30 как в норме, так и в опухоли. Исключали варианты, не аннотированные в dbSNP. Случаи вероятного CNV регистрировали при выходе значений VAF в опухоли за пределы 40–60% и отличиями в VAF между нормой и опухолью более 25%, а также значением p -value по тесту Фишера < 0.05 для количества прочтений (ридов), соответствующего референсному (дикий тип) и альтернативному (мутантный) аллелям в норме и опухоли. Далее значения ΔVAF интерполировали на весь геном за счет усреднения несколькими плавающими окнами. По анализу BAF достаточно легко выявлять локусы с аномалиями, но не всегда можно определить характер изменения в локусе (гетерозиготная делеция, двукратная амплификация и др.), поэтому в большинстве случаев локусы с подозрением на наличие CNV ис-

ключали перед кластеризацией вариантов в образцах ОМЛ.

В образце акральной меланомы идентифицированы кластеры соматических мутаций с использованием SciClone, пакета для среды R 25102416 [38]. В идеале каждый кластер должен содержать соматические мутации с близкими значениями VAF. Каждый такой кластер содержит одну или несколько драйверных мутаций, возникновение которых дает клону пролиферативное преимущество. Это ведет к росту его дочерней субпопуляции и, соответственно, увеличению VAF как для всех этих драйверных мутаций, так и всех “пассажирских”, которые клон уже содержал на момент появления новых драйверных мутаций. Для точности при оценке VAF выбирали только мутации, расположенные в участках с покрытием не менее 30 ридов. Из анализа исключали мутации, локализованные в областях с измененной копийностью. Оценивали возможные модели клональной эволюции, используя пакет программ ClonEvol 28950321 [39]. Диаграммы клональной эволюции построены с использованием пакета Fishplot PMID 27821060.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ спектра мутаций в первичном образце и в период ремиссии у 11 пациентов с СВФ–ОМЛ, проведенный при помощи алгоритма Mutect2, выявил мутации, представленные только в опухолевых клетках. Использованы результаты секвенирования таргетной панели, включающей кодирующие участки 84 генов, ассоциированных с развитием лейкозов. У всех пациентов в первичном образце (или в рецидиве) выявлена транслокация $t(8;21)$ или $inv(16)$. В образцах, взятых в период ремиссии, транслокации не обнаруживали, что указывало на крайне низкий уровень (или отсутствие) опухолевых клеток в образцах костного мозга в момент взятия биоматериала и позволило при поиске соматических мутаций использовать данный образец как норму.

Клинически значимые соматические варианты, выявленные у пациентов с ОМЛ при таргетном секвенировании, представлены в табл. 2.

Мутации в генах сигнальных путей с участием рецепторных тирозинкиназ (РТК) (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *CBL* и *KIT*) обнаружены у семи пациентов из 11, при этом одновременное присутствие двух мутаций в этих генах выявлено у четырех пациентов (36%). Прогностическая роль мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* при СВФ–ОМЛ до конца не выяснена [40, 41]. Мутация *FLT3-ITD*, как правило, ассоциирована с плохим прогнозом, отмечено также неблагоприятное влияние определенных мутаций в гене *KIT* на течение заболевания [42, 43]. Мутация в гене *ETV6* (пациент 5) по своей значимости сопоставима с мутациями в сигналь-

ных путях [44]. У трех пациентов, помимо мутаций в РТК-сигнальных путях, найдены мутации в генах *ASLX1*, *ASLX2* (модификаторы хроматина), *SMC3* и *RAD21*. Мутации в этих генах характерны для пациентов с t(8;21), прогностическая значимость их различна [45]. Так, на мышинных моделях показано, что мутации в гене *ASLX1*, приводящие к потере функции белка, вызывают миелоидную трансформацию гемопоэтических клеток [46]. Также мутации в этом гене ассоциированы с плохим прогнозом при ОМЛ у детей и взрослых [47]. Мутации в гене *ASLX2* ассоциированы скорее с благоприятным прогнозом [48]. Обращает на себя внимание значительная вариабельность профилей VAF в образцах опухоли с различными соматическими мутациями – от 2–5 до 86%.

Ранее обнаружили, что мутации в генах белков сигнальных путей, в которых участвуют РТК, характерны для 60–70% пациентов с t(8;21) и почти 90% пациентов с inv(16). При этом у части пациентов один образец содержит одновременно более одной мутации [45, 49, 50]. Серия экспериментов по генотипированию индивидуальных колоний лейкозных клеток позволила выявить

иерархические связи между различными мутациями у одного пациента [51–53]. Полученные данные дают основания полагать, что мутации в генах сигнальных путей (“сигнальные” мутации, signal mutations) присутствуют в независимых клонах. Существование клонов, имеющих общее предшественника и несущих независимые генетические изменения, затрагивающие один и тот же путь, соответствует феномену “клональной интерференции” (или параллельной эволюции) и описано при различных видах рака [54], в том числе ОМЛ [55]. В этом случае каждая сигнальная мутация, т.е. мутация в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CBL*, *PTPN11* и *KIT*, служит маркером отдельного клона, а количество таких мутаций в образце может определять количество независимых клонов [50, 53]. Явление клональной интерференции, по-видимому, не распространяется на мутации в генах эпигенетической регуляции/модификации хроматина (*ASLX1*, *ASLX2*, *TET1*, *TET2*, *BCOR*, *BCORL1*, *EZH2*, *KDM6A*) и когезинового комплекса (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) [50], хотя в ряде исследований эти мутации и описывают как взаимоис-

Таблица 2. Клинически значимые соматические варианты (мутации), выявленные в образцах опухоли пациентов с ОМЛ (VAF в ремиссии составил 0% для всех мутаций) при таргетном секвенировании кодирующих участков 84 генов

ID, транслокация	Ген	Мутация	Аминокислота	Функция	VAF опухоли, %
ОМЛ-1, t(8;21)	<i>CBL</i>	c.1227+1->AATT	Сплайсинг	Протоонкоген	86
	<i>SMC3</i>	c.2999_3000insGAAAGG	L1000delinsLKG	Белок когезинового комплекса	42
	<i>ASLX1</i>	c.1768_1769insCTTAGC	p.T590delinsTX	Модификатор хроматина	40
ОМЛ-2, t(8;21)	<i>ASLX2</i>	c.1834C>T	p.Gln612Ter	Модификатор хроматина	44
	<i>KRAS</i>	c.38G>A	p.Gly13Asp	РТК-путь	30
	<i>KRAS</i>	c.35G>A	p.Gly12Asp	РТК-путь	8
ОМЛ-4, inv(16)	<i>NRAS</i>	c.A182G	p.Q61R	РТК-путь	39
	<i>KIT</i>	c.A2447T	p.D816V	РТК-путь	5
ОМЛ-5, t(8;21)	<i>ETV6</i>	c.C1195T	p.R399C	Фактор транскрипции	41
	<i>RAD21</i>	c.C1816T	p.Q606X	Белок когезинового комплекса	33
ОМЛ-6, inv(16)	<i>KIT</i>	c.1253_1254insCTTCTT	p.Y418delinsYFF	РТК-путь	33
	<i>NRAS</i>	c.A182G	p.Q61H	РТК-путь	5
ОМЛ-8, t(8;21)	<i>NRAS</i>	c.G38A	p.G13D	РТК-путь	38
ОМЛ-10, t(8;21)	<i>FLT3</i>	ITD 110 п.о.	Сдвиг рамки	РТК	32
ОМЛ-11, t(8;21)	<i>KIT</i>	c.T2454G	p.N818K	РТК-путь	21 (O) 32 (Rec)
	<i>KRAS</i>	c.G38A	p.G13D	РТК-путь	4 (O)
	<i>CSF3R</i>	c.175_176insTC-CCAGTCTC	p.P59fs	Рецептор фактора роста	2 (Rec)

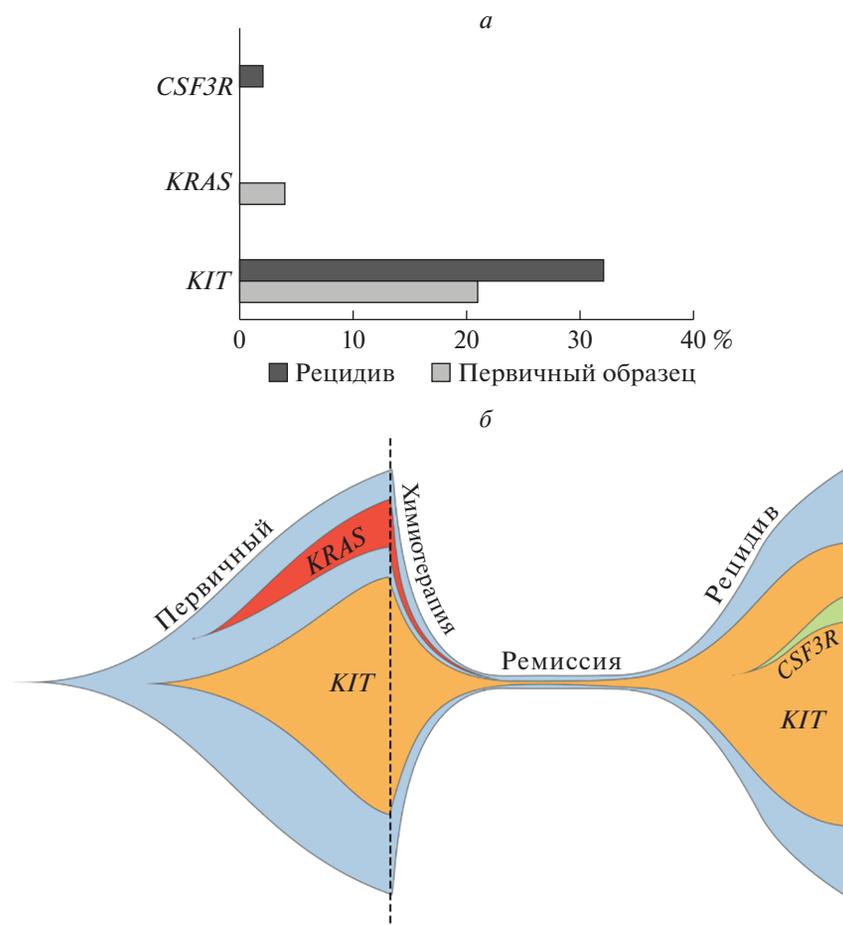


Рис. 1. Динамика клональной структуры образцов на различных этапах лечения (пациент 11). *a* – Профиль соматических мутаций с различным значением VAF; *б* – графическое представление клональной эволюции. В рецидиве заболевания исчезает мутантный клон с мутацией *KRAS* и появляется новая минорная мутация в гене *CSF3R*.

ключающие [42]. Показано, что клональная интерференция при СВФ–ОМЛ считается независимым фактором плохого прогноза [50].

Сравнительный анализ мутационного профиля первичных образцов и образцов в рецидиве заболевания дает более точное представление о клональной структуре опухоли (рис. 1). У пациента ОМЛ-11 с t(8;21) в первичном образце выявлены две мутации в генах *KIT* и *KRAS*, имеющие значения VAF 21 и 4% соответственно. Согласно опубликованным данным, появление двух мутаций в РТК-сигнальном пути (*KIT* и *KRAS*) одновременно в одних и тех же клетках крайне маловероятно [50]. По этой причине можно предположить, что уже на начальных стадиях заболевания присутствовали два клона: основной – с мутацией *KIT*, и минорный – с мутацией *KRAS*. В период ремиссии ни одна из этих мутаций методом NGS не выявляется. Наиболее вероятно, что в период ремиссии сохранилось некоторое количество клеток исходного клона и их активное деление привело в дальнейшем к развитию рецидива. При

этом в рецидиве заболевания выявляется только мутация *KIT* с VAF 32%, в то время как второй клон с мутацией *KRAS* был элиминирован в ходе химиотерапии (рис. 1). Однако возникает и новая потенциально драйверная мутация в гене *CSF3R* (VAF около 5%). Ген *CSF3R* вовлечен в патогенез ОМЛ [20].

В целом, исследование мутационного профиля первичного образца и образца в рецидиве позволяет проследить многоступенчатый процесс эволюции лейкозных клеток и выявить возможные факторы устойчивости к терапии [56–58].

ОМЛ у детей относится к опухолям с низкой мутационной нагрузкой [56]. В нашем исследовании таргетное секвенирование выявило относительно небольшое число значимых соматических мутаций в одном образце. С целью более детального анализа структуры субстрата опухоли при ОМЛ проведено полноэкзомное секвенирование образцов ОМЛ-1, ОМЛ-2, ОМЛ-4. Для корректной оценки значений VAF определена копия-

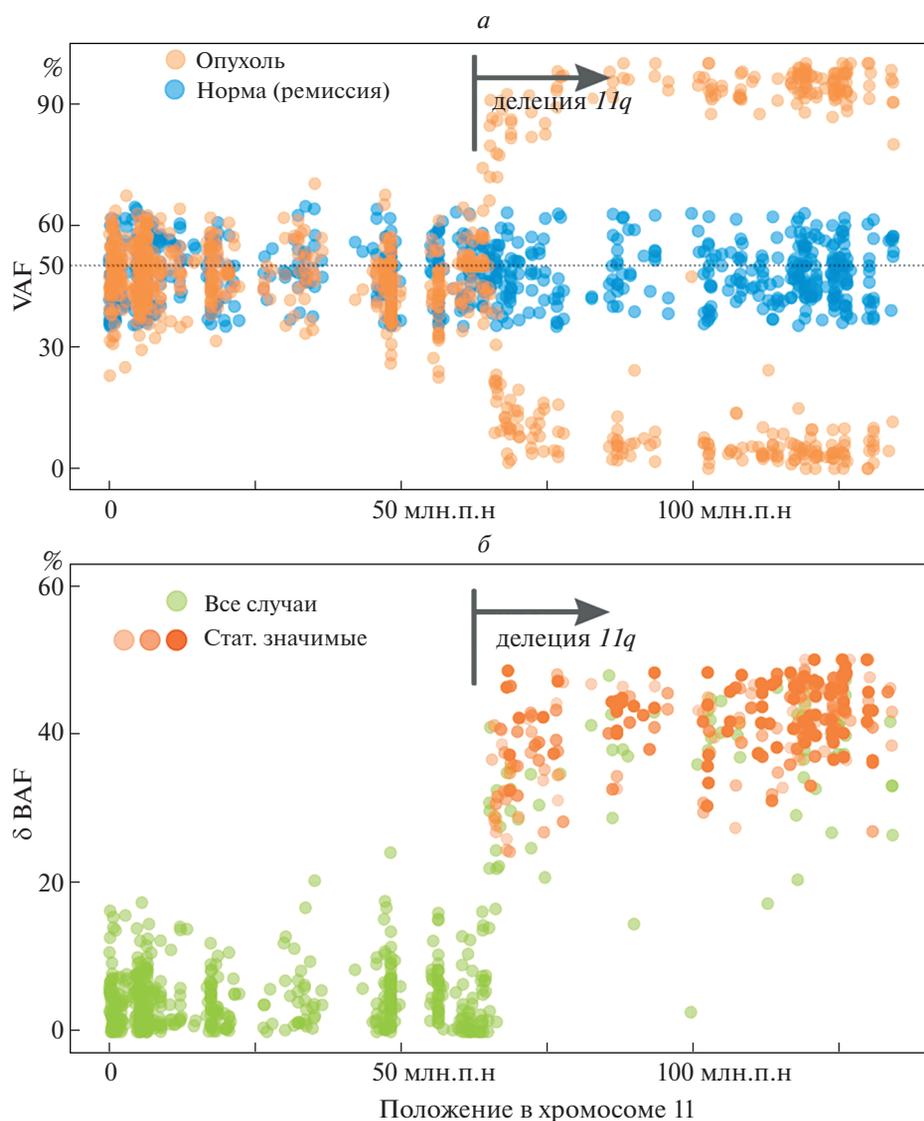


Рис. 2. Результаты VAF-анализа хромосомы 11 в образце ОМЛ-1. *a* – Профили VAF для гетерозиготных герминальных мутаций в норме и опухоли. В области 11q видна явная потеря гетерозиготности всеми мутациями, VAF которых в норме колебался в области 50%. *б* – Разница между VAF гетерозиготных герминальных мутаций между нормой и опухолью. Для области 11q различия статистически значимы ($p < 0.05$). Всего в анализ вошли 824 гетерозиготных герминальных мутации на хромосоме 11.

ность участков генома, содержащих выявленные соматические мутации.

При проведении VAF-анализа выбирали гетерозиготные герминальные варианты (с VAF от 40 до 60%) и смотрели изменение их значений VAF по отдельным хромосомам. Например, в случае делеции участка генома в клетках опухоли гетерозиготный герминальный мутантный аллель или выпадает, или переходит в гомозиготное состояние. Таким способом мы выявили делецию половины хромосомы 11 в образце ОМЛ-1 (рис. 2).

Применение алгоритмов *cn.MOPS*, *CNVkit* и *Control-FREES*, основанных на анализе покры-

тия, таких четких результатов не дало. Наиболее вероятно, это связано с тем, что при подготовке библиотек для секвенирования отбор последовательностей проводят с использованием панели зондов. При этом гибридизационные зонды, как правило, не находятся в избытке по сравнению с ДНК образца. Алгоритм VAF-анализа, предложенный в данной работе, оказался более универсальным, его можно применять для анализа CNV при различных вариантах таргетного секвенирования (в том числе полноэкзомного). Дальнейший анализ (кластеризацию) проводили с учетом копийности участков генома, в которых были локализованы соматические варианты.

При анализе распределения значений VAF можно отметить, что ни в одном из образцов ОМЛ-1, ОМЛ-2, ОМЛ-4 эти значения не были сконцентрированы в одной области (т.е. распределение имеет более одного пика), а соматические варианты формируют группы (кластеры) в зависимости от значения VAF (рис. 3). В образце ОМЛ-1 выявлено в общей сложности 29 соматических вариантов, явно формирующих два кластера с пиками плотности VAF 5–20% (кластер 1) и 35–65% (кластер 2). Необходимо отметить, что в случае мутации в гене *CBL* значение VAF составляло изначально 86% (см. также табл. 1), однако по данным VAF-анализа ген *CBL* находится в области протяженной гетерозиготной делеции всего длинного плеча 11q, поэтому значение VAF было скорректировано. В целом, среднее значение VAF по кластеру 2 находится в области 47%, что говорит о высоком содержании бластных клеток (более 90%) в исходном образце. У некоторых генов (*ASXL1*, *FZD9* и др.) значения VAF превышают 50% (при отсутствии делеций/амплификаций в соответствующих областях). Небольшая доля таких случаев вполне ожидаема; это объясняется случайной природой оцениваемых величин (пуассоновское распределение при оценке числа ридов). Таким образом, можно предположить, что образец ОМЛ-1 содержит, как минимум, два клона лейкозных клеток – основного (включает мутации из кластера 2) и “нового”, произошедшего от основного клона и включающего, помимо мутаций из кластера 2, еще и мутации из кластера 1. В дальнейшем возможен отбор клеток, получивших дополнительное пролиферативное преимущество в результате новых соматических мутаций, и вытеснение основного клона за счет “нового”. В

каждом кластере присутствуют мутации в генах, которые могут быть связаны с развитием лейкозов: кластер 2 – гены *ASXL1*, *CBL*, *SMC3* и др.; кластер 1 – *MTIF2*, *STAB1* и др. (рис. 3а, табл. 3).

В образце ОМЛ-2 картина распределения соматических вариантов по VAF также характеризуется бимодальностью. Основное отличие от образца ОМЛ-1 состоит в том, что каждый из кластеров содержит различные драйверные мутации в гене *KRAS*: первый кластер – мутацию G12D, второй – G13D. Каждая из этих мутаций приводит к конститутивной активности белка *KRAS* и передаче сигналов в пути ERK. Согласно опубликованным данным, эти две мутации (G12D и G13D) практически не встречаются одновременно, так как появление второй мутации уже не дает клетке пролиферативного преимущества [50, 51]. Таким образом, опираясь на эту информацию, можно утверждать, что опухоль представлена двумя основными типами клонов, каждый из которых содержит мутацию в гене *KRAS*, при этом оба клона независимо произошли от общего предка, не имеющего *KRAS*-мутаций. Основной опухолевый клон, содержит мутации не только в *KRAS* (G13D), но и в генах *ASXL2*, *SPI1*, *SLC22A10* (значения VAF от 30 до 50%) (рис. 3б, табл. 3). Минорный опухолевый клон содержит мутацию *KRAS* (G12D) с VAF порядка 10% и целый ряд синонимичных “пассажирских” мутаций с VAF от 5 до 20%, которые тоже допустимо отнести к минорному клону вследствие неточности оценки VAF.

Весьма своеобразна картина распределения VAF в образце ОМЛ-4 (рис. 3в). Мы видим также бимодальное распределение – два кластера соматических вариантов. В кластере 2 с VAF порядка 35% представлена драйверная мутация в гене *KIT*,

Таблица 3. Соматические варианты, выявленные в образцах ОМЛ-1, ОМЛ-2 и ОМЛ-4 при полноэкзомном секвенировании

ID	Ген	Мутация	Аминокислота	Функция белка	VAF, %
ОМЛ-1	<i>FZD9</i>	c.C307T	p.Q103X	Рецептор Wnt-сигнального пути	58
	<i>CACNB4</i>	c.712_713insA	p.S238fs	Белок кальциевых каналов	43
	<i>CSNK1G3</i>	c.C569T	p.P190L	Серин/треониновая протеинкиназа	43
	<i>MTIF2</i>	c.A1364C	p.K455T	Митохондриальный фактор инициации трансляции	6
	<i>STAB1</i>	c.C6547T	p.R2183C	Трансмембранный рецептор, участвует в ангиогенезе, клеточной адгезии, хоминге лимфоцитов	6
ОМЛ-2	<i>SLC22A10</i>	c.C1088A	p.P363H	Транспортер органических анионов	50
	<i>SPI1</i>	c.C676A	p.Q226K	Протоонкоген, участвует в дифференцировке миелоидных клеток	42
ОМЛ-4	<i>CHD8</i>	c.G2269A	p.D757N	Участвует в организации хроматина	39
	<i>FNDC1</i>	c.3535_3537del	p.I179_1179del	Активатор сигнализации G-белка	8

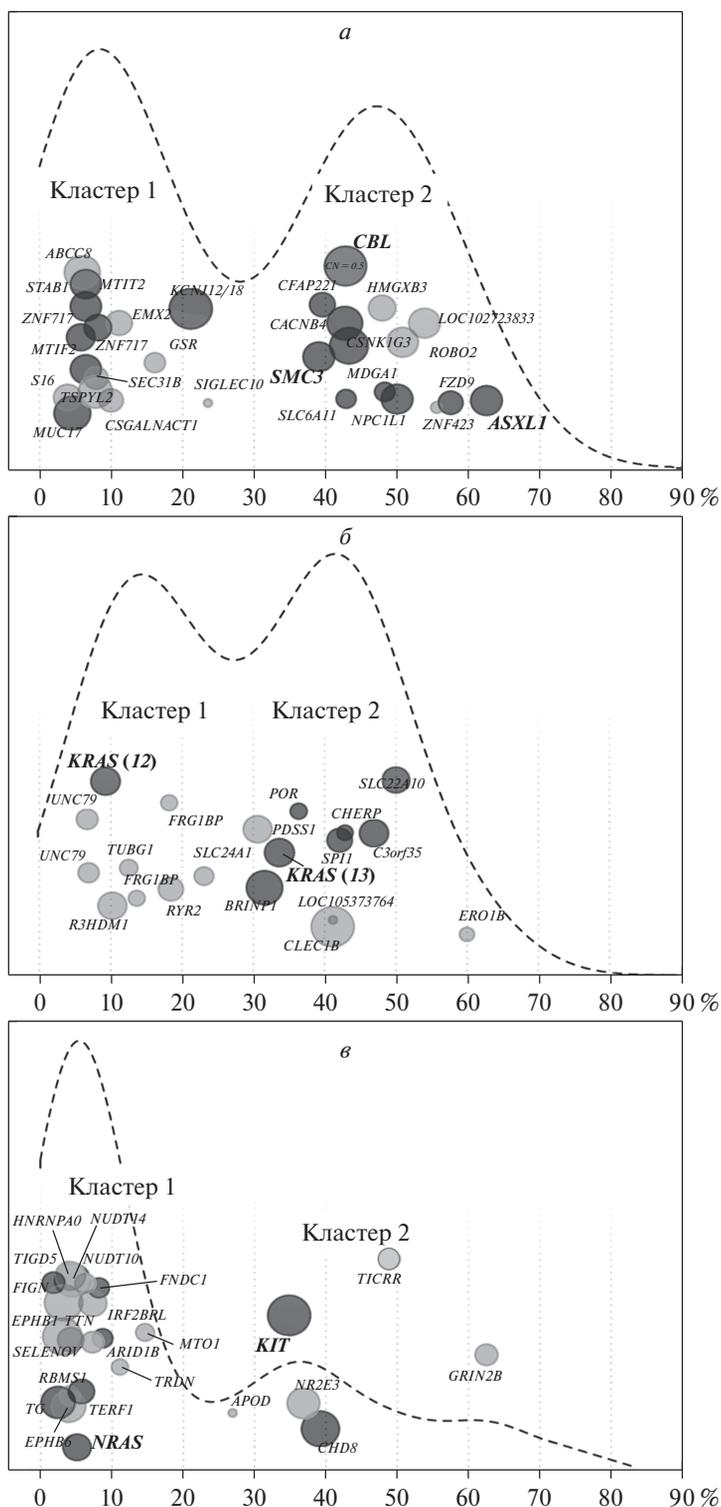


Рис. 3. Распределение соматических вариантов, полученных при полноэкзомном секвенировании, в зависимости от значения VAF. У всех трех пациентов отмечено бимодальное распределение соматических мутаций по значению VAF, что говорит о неоднородной внутриопухолевой клональной структуре. Каждый кружок соответствует одному соматическому варианту (точечная замена или инсерция/делеция). Размер кружка пропорционален глубине покрытия (минимально 25, максимально 100 прочтений). Пунктирная линия отражает плотность распределения соматических вариантов по значениям VAF. *а* – Образец ОМЛ-1; *б* – ОМЛ-2; *в* – ОМЛ-4. **Крупным шрифтом** отмечены мутации, выявленные при таргетном секвенировании. **Темным цветом** отмечены несинонимичные варианты (инсерции/делеции, точечные замены, сайты сплайсинга, появление и утрата стоп-кодона); **светлым** – молчащие мутации (синонимичные, интронные и межгенные варианты).

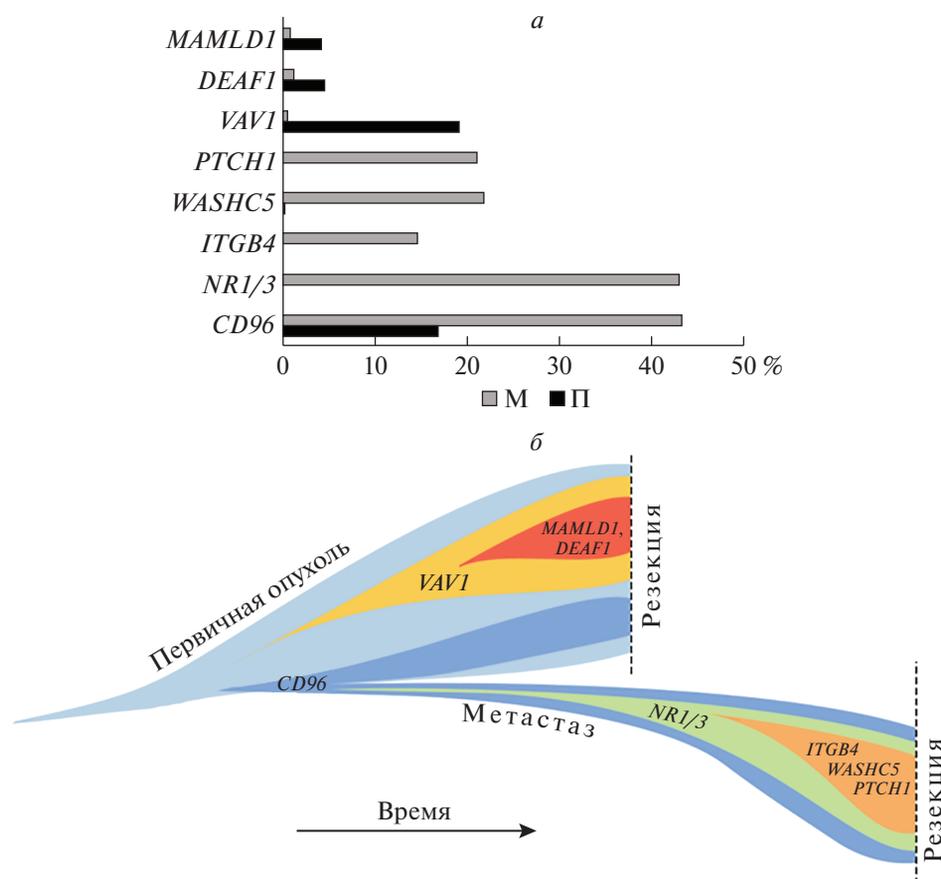


Рис. 4. Модель клональной эволюции опухоли у пациента с акральной меланомой (П – первичная опухоль, М – метастаз). *а* – Частоты вариантных аллелей в первичной опухоли и метастазе (по оси *x* – значения VAF (%), по оси *y* – названия генов). *б* – Диаграмма динамической смены мутаций при переходе от опухоли к метастазу (адаптация рисунка, полученного ClonEvol). Клоны опухолевых клеток содержат различные мутации, описанные преимущественно как драйверные.

в кластере 1 – с VAF порядка 5% – драйверная мутация в гене *NRAS*. Это позволяет, как минимум, говорить о двух клонах – основном (с долей порядка 70–80%) и минорном (с долей порядка 10%), накопившим, помимо *NRAS*, несколько других мутаций, часть которых может влиять на пролиферацию лейкозных клеток (*NUDT14*, *FNDC1*), а часть явно относится к пассажирским (синонимичные замены) (табл. 3). Минорный клон с мутацией *NRAS*, скорее всего, представляет собой самостоятельную популяцию клеток, независимую от основного клона с мутацией в гене *KIT* [50, 51].

Таким образом, анализ распределения частот альтернативных аллелей (VAF) в опухолевых клетках позволяет предположить множественные события клональной эволюции при развитии ОМЛ. Более высокие значения VAF могут соответствовать мутациям, которые произошли на ранних стадиях развития. Клетки основного клона приобретают дополнительные мутации, давая начало новым субпопуляциям, которые могут вносить вклад в ускоренную прогрессию заболевания [50].

Внутриопухолевую гетерогенность и клональную структуру солидных опухолей изучают с использованием сравнительного анализа мутационного профиля исходной опухоли и метастаза. Рассмотрим модель клональной эволюции опухоли на примере пациента с метастатической формой акральной меланомы после проведенного хирургического лечения (рис. 4).

В первичной опухоли обнаружены две потенциально значимые (согласно оценке патогенности при помощи PolyPhen2, SIFT и другим алгоритмам) мутации в генах *VAV1* (E556Q) и *CD96* (M11). В метастазе выявлены три клинически значимые мутации в генах *CD96* (M11), *ITGB4* (I1285F), *WASHC5* (Q78H) (рис. 4а). Лишь одна мутация, локализованная в гене *CD96*, встречается и в первичной опухоли (17%), и в метастазе (43%). Ген *CD96* кодирует белок семейства иммуноглобулинов, – важный негативный регулятор иммунного ответа, который рассматривается в настоящее время как возможная мишень иммунотерапии, наряду с PD-1 и CTLA-4 [59]. Мутация M11 (заме-

на метионина на изолейцин) приводит к утрате стартового кодона при синтезе белка; ее роль в опухолевом процессе не ясна, однако, в данном случае эта мутация служит маркером опухолевых клеток меланомы. В первичной опухоли представляет интерес также мутация E556Q в гене *VAV1*. Белок *VAV1* участвует в активации сигнальных путей, связанных с перестройками цитоскелета. Ген *VAV1* в настоящее время рассматривают в качестве онкогена, вовлеченного в развитие целого ряда злокачественных новообразований [60].

Как можно предположить, миграция опухолевых клеток, несущих мутацию *M11 CD96*, в паховый лимфоузел произошла на раннем этапе развития меланомы; какое-то время клетки находились в состоянии относительного покоя, так как на момент удаления первичного очага отдаленные метастазы не были выявлены. Прогрессия заболевания и формирование отдаленного метастаза могли быть связаны с появлением новых мутаций, в том числе, мутации I1285F в гене *ITGB4*. Белковый продукт данного гена участвует в клеточной адгезии, запускает механизмы клеточной пролиферации, он описан как один из ключевых факторов инвазии опухоли [61]. Мутации в генах *NR1I3* и *WASCH5* в метастазах меланомы кожи обнаруживали ранее и другие авторы [62].

Акральная меланома относится к редкому подтипу меланом кожи, составляя всего лишь 2–3% от всех случаев меланом кожи, и отличается особенностями молекулярно-генетического профиля [63]. Характерные для меланомы кожи мутации в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT* встречаются реже. Около 38% случаев акральной меланомы относятся к так называемому “тройному дикому типу” (triple WT), в то время как при других подтипах меланом кожи такие случаи составляют около 11%. Полногеномное секвенирование образцов акральной меланомы указывает на существенный вклад структурных перестроек генома в развитие опухоли [64]. Нами исследована акральная меланома, относящаяся к “тройному дикому типу”. Сравнительный анализ первичной опухоли и метастаза выявил новые генетические маркеры, которые могут быть ассоциированы с развитием заболевания или представлять собой молекулярные мишени для таргетной терапии.

При исследовании мутационного профиля солидных опухолей всегда следует иметь в виду локальную гетерогенность, при которой различные участки опухоли могут различаться как морфологически, так и по совокупности генетических изменений [54]. В качестве примера мы выбрали опухоль небольшого размера (менее 25 мм). Для выделения ДНК использовали максимально большой объем исходного материала, чтобы по возможности получить суммарные препараты (bulk tumor)

ДНК опухоли и ДНК метастаза, сбалансированно отражающие разнородный клональный состав.

Таким образом, анализ данных высокопроизводительного секвенирования позволяет изучать пути эволюции опухолевых клеток на основе анализа субклональной архитектуры опухоли, выявлять роль молекулярных маркеров в формировании опухолевого клона, а также определять маркеры прогрессии заболевания и устойчивости к терапии. Полноэкзомное секвенирование позволяет анализировать больше молекулярных маркеров, что наиболее важно в случае опухолей с низкой мутационной нагрузкой; однако на сегодняшний день это достаточно дорогостоящее исследование. Использование таргетных панелей позволяет проводить глубокое секвенирование отдельных участков генома с меньшими финансовыми затратами; в ряде случаев это дает возможность выявлять минорные клоны, которые могут играть ведущую роль в дальнейшем развитии заболевания и, что немаловажно, в устойчивости к терапии [65, 66]. Оценка клонального разнообразия исходного образца при ОМЛ и выявление доминирующих клонов, представленных с высокой частотой, имеет значение для прогноза заболевания и оценки риска развития рецидива [41, 50, 67]. В целом, стратегии оценки клонального разнообразия и отслеживания траекторий развития опухолевых клеток на основе высокопроизводительного секвенирования суммарного образца опухоли с последующим определением частот вариантных аллелей находят все более широкое применение, в том числе, и в практической онкологии [50, 67, 68], несмотря на целый ряд ограничений этого подхода [69].

Наиболее точный анализ внутриопухолевой гетерогенности (или же всей экосистемы опухоли, тесно взаимодействующей с микроокружением) с реконструкцией цепи событий опухолевой микроэволюции обеспечивает лишь секвенирование ДНК единичных опухолевых клеток [55, 69, 70]. Однако анализ полных экзомов или геномов единичных клеток не только останется чрезвычайно дорогим в ближайшем будущем, но также, по-видимому, сохранит и другие ограничения, в том числе, слабую репрезентативность выборки из-за малого количества анализируемых клеток и отсутствия метода амплификации всего генома, обеспечивающего оптимальный охват и однородность покрытия [69].

Также следует иметь в виду, что свой вклад во внутриопухолевую гетерогенность, особенно в наблюдаемую на транскриптомном уровне (при анализе единичных клеток), вносят такие факторы, как эпигенетическая регуляция, стадия клеточной дифференцировки клонообразующей опухолевой клетки, разные стадии клеточного цикла, стохастичность генной экспрессии, влияние опухолево-

го микроокружения и клеточная трофика, прямо зависящая от геометрического расположения клетки в образце. Именно сочетание генетических и негенетических факторов определяет, в конечном счете, фенотип опухолевой клетки и ее ответ на терапию [69, 71, 72]. Дальнейшее развитие технологий анализа единичных клеток, в том числе прослеживание судьбы единичной клетки в нескольких поколениях [73] и определение профиля экспрессии генов единичных опухолевых клеток [74, 75] позволит более точно предсказывать пути эволюции раковых клеток и разрабатывать новые подходы к лечению онкологических заболеваний.

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 всех участников исследования получено информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R., Chang E.H. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*. **300**, 143–149.
2. Garraway L.A., Lander E.S. (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell*. **153**, 17–37.
3. Greaves M., Maley C.C. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature*. **481**, 306–313.
4. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz Jr. L.A., Kinzler K.W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*. **339**, 1546–1558.
5. Campbell P.J., Pleasance E.D., Stephens P.J., Dicks E., Rance R., Goodhead I., Follows G.A., Green A.R., Futreal P.A., Stratton M.R. (2008) Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 13081–13086.
6. Beerenwinkel N., Schwarz R.F., Gerstung M., Markowitz F. (2015) Cancer evolution: mathematical models and computational inference. *Syst. Biol.* **64**, e1–e25.
7. Burrell R.A., McGranahan N., Bartek J., Swanton C. (2013) The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. **501**(7467), 338–345.
8. Zare H., Wang J., Hu A., Weber K., Smith J., Nickerson D., Song C., Witten D., Blau C.A., Noble W.S. (2014) Inferring clonal composition from multiple sections of a breast cancer. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003665.
9. Drento S., Wedge D.C., Loo P.V. (2017) Principles of reconstructing the subclonal architecture of cancers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**(8), a026625.
10. Xiao Y., Wang X., Zhang H., Ulintz P.J., Li H., Guan Y. (2020) FastClone is a probabilistic tool for deconvoluting tumor heterogeneity in bulk-sequencing samples. *Nat. Commun.* **11**(1), 4469.
11. Grove C.S., Vassiliou G.S. (2014) Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis. Model Mech.* **7**(8), 941–951.
12. Ding L., Kim M., Kanchi K.L., Dees N.D., Lu C., Griffith M., Fenstermacher D., Sung H., Miller C.A., Goetz B., Wendl M.C., Griffith O., Cornelius L.A., Linette G.P., McMichael J.F., Sondak V.K., Fields R.C., Ley T.J., Mulé J.J., Wilson R.K., Weber J.S. (2014) Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS One*. **9**(11), e111153.
13. Cancer Genome Atlas Research N. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059–2074.
14. Welch J.S., Ley T.J., Link D.C., Miller C.A., Larson D.E., Koboldt D.C., Wartman L.D., Lamphrecht T.L., Liu F., Xia J., Kandoth C., Fulton R.S., McLellan M.D., Dooling D.J., Wallis J.W., Chen K., Harris C.C., Schmidt H.K., Kalicki-Veizer J.M., Lu C., Zhang Q., Lin L., O’Laughlin M.D., McMichael J.F., Delehaunty K.D., Fulton L.A., Magrini V.J., McGrath S.D., Demeter R.T., Vickery T.L., Hundal J., Cook L.L., Swift G.W., Reed J.P., Alldredge P.A., Wylie T.N., Walker J.R., Watson M.A., Heath S.E., Shannon W.D., Varghese N., Nagarajan R., Payton J.E., Baty J.D., Kulkarni S., Klco J.M., Tomasson M.H., Westervelt P., Walter M.J., Graubert T.A., DiPersio J.F., Ding L., Mardis E.R., Wilson R.K. (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. **150**(2), 264–278.
15. Kim T., Yoshida K., Kim Y.K., Tyndel M.S., Park H.J., Choi S.H., Ahn J.S., Jung S.H., Yang D.H., Lee J.J., Kim H.J., Kong G., Ogawa S., Zhang Z., Kim H.J., Kim D.D. (2016) Clonal dynamics in a single AML case tracked for 9 years reveals the complexity of leukemia progression. *Leukemia*. **30**(2), 295–302.
16. Shlush L.I., Mitchell A. (2015) AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **28**(2–3), 81–89.
17. Masetti R., Castelli I., Astolfi A., Bertuccio S.N., Indio V., Togni M., Belotti T., Serravalle S., Tarantino G., Zecca M., Pigazzi M., Basso G., Pession A., Locatelli F. (2016) Genomic complexity and dynamics of clonal evolution in childhood acute myeloid leukemia studied with whole-exome sequencing. *Oncotarget*. **7**(35), 56746–56757.
18. Rahal Z., Abdulhai F., Kadara H., Saab R. (2018) Genomics of adult and pediatric solid tumors. *Am. J. Cancer Res.* **8**(8), 1356–1386. eCollection 2018.
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., Klco J.M., Downing J.R. (2016) The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat. Genet.* **48**(12), 1551–1556.
20. Christen F., Hoyer K., Yoshida K., Hou H.A., Waldhueter N., Heuser M., Hills R.K., Chan W., Hablesreiter R., Blau O., Ochi Y., Klement P., Chou W.C., Blau I.W., Tang J.L., Zemojtel T., Shiraishi Y., Shiozawa Y., Thol F., Ganser A., Löwenberg B., Linch D.C., Bullinger L., Valk P.J.M., Tien H.F., Gale R.E., Ogawa S., Damm F. (2019) Genomic landscape and clonal evolution of acute myeloid leukemia with t(8;21): an international study on 331 patients. *Blood.* **133**(10), 1140–1151.
21. Grzywa T.M., Paskal W., Włodarski P.K. (2017) Intratumor and intertumor heterogeneity in melanoma. *Transl. Oncol.* **10**(6), 956–975.
22. Reuben A., Spencer C.N., Prieto P.A., Gopalakrishnan V., Reddy S.M., Miller J.P., Mao X., De Macedo M.P., Chen J., Song X., Jiang H., Chen P.-L., Beird H.C., Garder H.R., Roh W., Wani K., Chen E., Haymaker C., Forget M.-A., Little L.D., Gumbs C., Thornton R.L., Hudgens C.W., Chen W.-S., Austin-Breneman J., Szczepaniak R., Nezi L., Codbill A.P., Bernatchez C., Roszik J., Hwu P., Woodman S.E., Chin L., Tawbi H., Davies M.A., Gershenwald J.E., Amaria R.N., Glitza I.C., Diab A., Patel S.P., Hu L., Lee J.E., Grimm E.A., Tetzlaff M.T., Lazar A.J., Wistuba I.I., Clise-Dwyer K., Carter B.W., Zhang J., Futreal P.A., Sharma P., Allison J.P., Cooper Z.A., Wargo J.A. (2017) Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *NPJ Genom. Med.* **2**, 10.
23. Kemper K., Krijgsman O., Cornelissen-Steijger P., Shahrabi A., Weeber F., Song J.Y., Kuilman T., Vis D.J., Wessels L.F., Voest E.E., Schumacher T.N., Blank C.U., Adams D.J., Haanen J.B., Peepers D.S. (2015) Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. *EMBO Mol. Med.* **7**(9), 1104–1118.
24. Yeh I., Jorgenson E., Shen L., Xu M., North J.P., Shain A.H., Reuss D., Wu H., Robinson W.A., Olshen A., von Deimling A., Kwok P.Y., Bastian B.C., Asgari M.M. (2019) Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **111**(10), 1068–1077.
25. 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 акральной меланомы. *Молекуляр. биология.* **53**(4), 648–653.
26. Гукасян Л.Г., Краснов Г.С., Муравенко О.В., Иконникова А.Ю., Юрасов Р.А., Байдун Л.В., Ибрагимова С.З., Наседкина Т.В. (2020) Драйверные мутации при остром миелоидном лейкозе с инверсией хромосомы 16. *Молекуляр. биология.* **54**(3), 389–397.
27. Zhang L., Cao Z., Ruan M., Zeng Q., Zhao L., Li Q., Zou Y., Wang J., Zhu X. (2014) Monitoring the AML1/ETO fusion transcript to predict outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr. Blood Cancer.* **61**(10), 1761–1766.
28. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* **30**(15), 2114–2120.
29. McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytzky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**(9), 1297–1303.
30. Cibulskis K., Lawrence M.S., Carter S.L., Sivachenko A., Jaffe D., Sougnez C., Gabriel S., Meyerson M., Lander E.S., Getz G. (2013) Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol.* **31**(3), 213–219.
31. Vaser R., Adusumalli S., Leng S.N., Sikic M., Ng P.C. (2016) SIFT missense predictions for genomes. *Nat. Protoc.* **11**(1), 1–9.
32. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods.* **7**(4), 248–249.
33. Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., Seelow D. (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods.* **11**(4), 361–362.
34. Chun S., Fay J.C. (2009) Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* **19**(9), 1553–1561.
35. Povysil G., Tzika A., Vogt J., Haunschmid V., Messiaen L., Zschocke J., Klambauer G., Hochreiter S., Wimmer K. (2017) panelcn.MOPS: copy number detection in targeted NGS panel data for clinical diagnostics. *Hum. Mutat.* **38**, 889–897.
36. Boeva V., Popova T., Bleakley K., Chiche P., Cappo J., Schleiermacher G., Janoueix-Lerosey I., Delattre O., Barillot E. (2012) Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* **28**(3), 423–425.
37. Carter S.L., Cibulskis K., Helman E., McKenna A., Shen H., Zack T., Laird P.W., Onofrio R.C., Winckler W., Weir B.A., Beroukheim R., Pellman D., Levine D.A., Lander E.S., Meyerson M., Getz G. (2012) Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat. Biotechnol.* **30**, 413–421.
38. Miller C.A., White B.S., Dees N.D., Griffith M., Welch J.S., Griffith O.L., Vij R., Tomasson M.H., Graubert T.A., Walter M.J., Ellis M.J., Schierding W., DiPersio J.F., Ley T.J., Mardis E.R., Wilson R.K., Ding L. (2014) SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput. Biol.* **10**(8), e1003665.
39. Dang H.X., White B.S., Foltz S.M., Miller C.A., Luo J., Fields R.C., Maher C.A. (2017) ClonEvol: clonal ordering and visualization in cancer sequencing. *Ann. Oncol.* **28**(12), 3076–3082.
40. Klein K., Kaspers G., Harrison C.J., Beverloo H.B., Reedijk A., Bongers M., Cloos J., Pession A., Reinhardt D., Zimmerman M., Creutzig U., Dworzak M., Alonzo T., Johnston D., Hirsch B., Zapotocky M., de Moerloose B., Fynn A., Lee V., Taga T., Tawa A., Auwrigon A., Zeller B., Forestier E., Salgado C., Balwierz W., Popa A., Rubnitz J., Raimondi S., Gibson B. (2015) Clinical impact of additional cytogenetic aberrations

- tions, cKIT and RAS mutations, and treatment elements in pediatric t(8;21)-AML: results from an international retrospective study by the International Berlin–Frankfurt–Munster Study Group. *J. Clin. Oncol.* **33**(36), 4247–4258.
41. 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.
 42. 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.
 43. Allen C., Hills R.K., Lamb K., Evans C., Tinsley S., Sellar R., Brien M.O., 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.
 44. Farrar J.E., Schuback H.L., Ries R.E., Wai D., Hampton O.A., Trevino L.R., Alonzo T.A., Guidry Auvil J.M., Davidsen T.M., Gesuwan P., Hermida L., Muzny D.M., Dewal N., Rustagi N., Lewis L.R., Gamis A.S., Wheeler D.A., Smith M.A., Gerhard D.S., Meshinchi S. (2016) Genomic profiling of pediatric acute myeloid leukemia reveals a changing mutational landscape from disease diagnosis to relapse. *Cancer Res.* **76**(8), 2197–2205.
 45. Панферова А.В., Гаськова М.В., Зеркаленкова Е.А., Апрелова Е.В., Казакова А.Н., Тимофеева Н.М., Солдаткина О.И., Никитин Е.Н., Чекменева Ю.Ю., Калинин И.И., Плясунова С.А., Ольшанская Ю.В., Новичкова Г.А., Масчан М.А., Масчан А.А. (2018) Молекулярно-генетическая характеристика ОМЛ с t(8;21) у детей. *Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* **17**(1), 9–15.
 46. Yang H., Kurtenbach S., Guo Y., Lohse I., Durante M.A., Li J., Li Z., Al-Ali H., Li L., Chen Z., Field M.G., Zhang P., Chen S., Yamamoto S., Zhuo Li., Zhuo Y., Nimer S.D., Harbour J.W., Wahlestedt C., Xu M., Yang F.-C. (2018) Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood.* **131**(3), 328.
 47. Schnittger S., Eder C., Jeromin S., Alpermann T., Fasan A., Grossmann V., Kohlmann A., Tllig T., Klopp N., Wichmann H.-E., Kreuzer K.-A., Schmid C., Staib P., Peceny R., Schmitz N., Kern W., Haferlach C., Haferlach T. (2013) ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia.* **27**(1), 82.
 48. Yamato G., Shiba N., Yoshida K., Shiraishi Y., Hara Y., Ohki K., Okubo J., Okuno H., Chiba K., Tanaka H., Kinoshita A., Moritake H., Kiyokawa N., Tomizawa D., Park M.J., Sotomatsu M., Taga T., Adachi S., Tawa A., Horibe K., Arakawa H., Miyano S., Ogawa S., Hayashi Y. (2017) ASXL2 mutations are frequently found in pediatric AML patients with t(8;21)/ RUNX1-RUNX1T1 and associated with a better prognosis. *Genes Chromosomes Cancer.* **56**(5), 382–393.
 49. Krauth M.T., Eder C., Alpermann T., Bacher U., Nadarajah N., Kern W., Haferlach C., Haferlach T., Schnittger S. (2014) High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome. *Leukemia.* **28**(7), 1449–1458.
 50. Itzykson R., Duployez N., Fasan A., Decool G., Marceau-Renaut A., Meggendorfer M., Jourdan E., Petit A., Lapillonne H., Micol J.B., Cornillet-Lefebvre P., Ifrah N., Leverger G., Dombret H., Boissel N., Haferlach T., Preudhomme C. (2018) Clonal interference of signaling mutations worsens prognosis in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* **132**(2), 187–196.
 51. Bashey A., Gill R., Levi S., Farr C.J., Clutterbuck R., Millar J.L., Pragnell I.B., Marshall C.J. (1992) Mutational activation of the *N-ras* oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-ras mutation in AML pathogenesis. *Blood.* **79**(4), 981–989.
 52. Hirsch P., Zhang Y., Tang R., Joulin V., Boutroux H., Pronier E., Moatti H., Flandrin P., Marzac C., Bories D., Fava F., Mokrani H., Betems A., Lorre F., Favier R., Féger F., Mohty M., Douay L., Legrand O., Bilhou-Nabera C., Louache F., Delhommeau F. (2016) Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun.* **7**, 12475.
 53. Itzykson R., Kosmider O., Renneville A., Morabito M., Preudhomme C., Berthon C., Adès L., Fenaux P., Platzbecker U., Gagey O., Rameau P., Meurice G., Oréar C., Delhommeau F., Bernard O.A., Fontenay M., Vainchenker W., Droin N., Solary E. (2013) Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood.* **121**(12), 2186–2198.
 54. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Math M., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N.Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C.R., Nohadani M., Eklund A.C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P.A., Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**(10), 883–892.
 55. Paguirigan A.L., Smith J., Meshinchi S., Carroll M., Maley C., Radich J.P. (2015) Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* **7**(281), 281re282.
 56. Masetti R., Castelli I., Astolfi A., Bertuccio S.N., Indio V., Togni M., Belotti T., Serravalle S., Tarantino G., Zecca M., Pigazzi M., Basso G., Pession A., Locatelli F. (2016) Genomic complexity and dynamics of clonal evolution in childhood acute myeloid leukemia studied with whole-exome sequencing. *Oncotarget.* **7**(35), 56746–56757.
 57. Shiba N., Yoshida K., Shiraishi Y., Okuno Y., Yamato G., Hara Y., Nagata Y., Chiba K., Tanaka H., Terui K., Kato M., Park M.J., Ohki K., Shimada A., Takita J., Tomizawa D., Kudo K., Arakawa H., Adachi S., Taga T., Tawa A., Ito E., Horibe K., Sanada M., Miyano S.,

- Ogawa S., Hayashi Y. (2016) Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **175**(3), 476–489.
58. Sood R., Hansen N.F., Donovan F.X., Carrington B., Bucci D., Maskeri B., Young A., Trivedi N.S., Kohlschmidt J., Stone R.M., Caligiuri M.A., Chandrasekharappa S.C., Marcucci G., Mullikin J.C., Bloomfield C.D., Liu P. (2016) Somatic mutational landscape of AML with inv(16) or t(8;21) identifies patterns of clonal evolution in relapse leukemia. *Leukemia*. **30**(2), 501–504.
 59. Liu F., Huang J., He F., Ma X., Fan F., Meng M., Zhuo Y., Zhang L. (2020) CD96, a new immune checkpoint, correlates with immune profile and clinical outcome of glioma. *Sci. Rep.* **10**(1), 10768.
 60. Shalom B., Farago M., Pikarsky E., Katzav S. (2018) *Vav1* mutations identified in human cancers give rise to different oncogenic phenotypes. *Oncogenesis*. **7**(10), 80. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0091-1>
 61. Bieri B., Pierce S.E., Kroeger C., Stover D.G., Pattabiraman D.R., Thiru P., Donaher J.L., Reinhardt F., Chaffer C.L., Keckesova Z., Weinberg R.A. (2017) Integrin- $\beta 4$ identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(12), E2337–E2346.
 62. Wilmott J.S., Johansson P.A., Newell F., Waddell N., Ferguson P., Quek C., Patch A.M., Nones K., Shang P., Pritchard A.L., Kazakoff S., Holmes O., Leonard C., Wood S., Xu Q., Saw R.P.M., Spillane A.J., Stretch J.R., Shannon K.F., Kefford R.F., Menzies A.M., Long G.V., Thompson J.F., Pearson J.V., Mann G.J., Hayward N.K., Scolyer R.A. (2019) Whole genome sequencing of melanomas in adolescent and young adults reveals distinct mutation landscapes and the potential role of germline variants in disease susceptibility. *Int. J. Cancer*. **144**(5), 1049–1060.
 63. Yeh I., Jorgenson E., Shen L., Xu M., North J.P., Shain A.H., Reuss D., Wu H., Robinson W.A., Olshen A., von Deimling A., Kwok P.Y., Bastian B.C., Asgari M.M. (2019) Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **111**(10), 1068–1077.
 64. Newell F., Wilmott J.S., Johansson P.A., Nones K., Addala V., Mukhopadhyay P., Broit N., Amato C.M., Van Gulick R., Kazakoff S.H., Patch A.M., Koufariotis L.T., Lakis V., Leonard C., Wood S., Holmes O., Xu Q., Lewis K., Medina T., Gonzalez R., Saw R.P.M., Spillane A.J., Stretch J.R., Rawson R.V., Ferguson P.M., Dodds T.J., Thompson J.F., Long G.V., Levesque M.P., Robinson W.A., Pearson J.V., Mann G.J., Scolyer R.A., Waddell N., Hayward N.K. (2020) Whole-genome sequencing of acral melanoma reveals genomic complexity and diversity. *Nat. Commun.* **11**(1), 5259.
 65. Lindsley R.C., Mar B.G., Mazzola E., Grauman P.V., Shareef S., Allen S.L., Pigneux A., Wetzler M., Stuart R.K., Erba H.P., Damon L.E., Powell B.L., Lindeman N., Steensma D.P., Wadleigh M., DeAngelo D.J., Neuberg D., Stone R.M., Ebert B.L. (2015) Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. **125**(9), 1367–1376.
 66. Jahn N., Terzer T., Sträng E., Dolnik A., Cocciardi S., Panina E., Corbacioglu A., Herzig J., Weber D., Schrade A., Götze K., Schröder T., Lübbert M., Wellnitz D., Koller E., Schlenk R.F., Gaidzik V.I., Paschka P., Rucker F.G., Heuser M., Thol F., Ganser A., Benner A., Döhner H., Bullinger L., Döhner K. (2020) Genomic heterogeneity in core-binding factor acute myeloid leukemia and its clinical implication. *Blood Adv.* **4**(24), 6342–6352.
 67. Cerrano M., Duchmann M., Kim R., Vasseur L., Hirsch P., Thomas X., Quentin S., Pasanisi J., Passet M., Rabian F., Rahmé R., Lengliné E., Raffoux E., Dhédin N., Sébert M., Maarek O., Raimbault A., Cellier-Lebras K., Adès L., Fenaux P., Boissel N., Delhommeau F., Soulier J., Dombret H., Clappier E., Sujobert P., Itzykson R. (2020) Clonal dominance is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia treated with intensive chemotherapy. *Leukemia*. **35**(3), 712–723.
 68. Lin Z., Meng X., Wen J., Corral J.M., Andreev D., Kachler K., Schett G., Chen X., Bozec A. (2020) Intra-tumor heterogeneity correlates with reduced immune activity and worse survival in melanoma patients. *Front Oncol.* **10**, 596493.
 69. Caiado F., Silva-Santos B., Norell H. (2016) Intra-tumour heterogeneity – going beyond genetics. *FEBS J.* **283**(12), 2245–2258.
 70. Miles L.A., Bowman R.L., Merlinsky T.R., Csete I.S., Ooi A.T., Durruthy-Durruthy R., Bowman M., Famulare C., Patel M.A., Mendez P., Ainali C., Demaree B., Delley C.L., Abate A.R., Manivannan M., Sahu S., Goldberg A.D., Bolton K.L., Zehir A., Rampal R., Carroll M.P., Meyer S.E., Viny A.D., Levine R.L. (2020) Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature*. **587**(7834), 477–482.
 71. Easwaran H., Tsai H.-C., Baylin S.B. (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol. Cell.* **54**(5), 716–727.
 72. Gerstung M., Pellagatti A., Malcovati L., Giagounidis A., Porta M.G.D., Jädersten M., Dolatshad H., Verma A., Cross N.C.P., Vyas P., Killick S., Hellström-Lindberg E., Cazzola M., Papaemmanuil E., Campbell P.J., Boulwood J. (2015) Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* **6**, 5901.
 73. Blundell J.R., Levy S.F. (2014) Beyond genome sequencing: lineage tracking with barcodes to study the dynamics of evolution, infection, and cancer. *Genomics*. **104**, 417–430.
 74. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., Shalek A.K., Gillespie S.M., Wakimoto H., Cahill D.P., Nahed B.V., Curry W.T., Martuza R.L., Louis D.N., Rozenblatt-Rosen O., Suvà M.L., Regev A., Bernstein B.E. (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. **344**, 1396–1401.
 75. Junker J.P., van Oudenaarden A. (2015) Single-cell transcriptomics enters the age of mass production. *Mol. Cell.* **58**, 563–564.

DETERMINATION OF SUBCLONAL TUMOR STRUCTURE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CHILDREN AND ACRAL MELANOMA USING NEXT-GENERATION SEQUENCING DATA

G. S. Krasnov¹, L. G. Ghukasyan¹, I. S. Abramov¹, and T. V. Nasedkina^{1, *}

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

**e-mail: nased@biochip.ru*

Intratumoral heterogeneity and clonal variability is one of the central problems of clinical oncology, being the reason for the development of resistance to therapy, relapse and metastases. The use of high-throughput sequencing of tumor exome allows investigating tumor subclonal organization. Comparative analysis of target panel sequencing data, clinical exome and complete exome in tumors with different mutational load (acute myeloid leukemia in children and acral melanoma) was carried out. Target sequencing of acute myeloid leukemia (AML) samples shows the presence of more than one potential driver mutation in signaling pathway genes *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *FLT3* in one patient, reflecting the complex clonal structure of the tumor substrate. Analysis of exome sequencing data from the same AML patients allows the isolation of clusters of mutant alleles corresponding to different populations of leukemic cells in the sample. Comparison of the mutation profile of the primary AML sample, the sample in remission and in relapse makes it possible to trace the dynamics of change in the clonal composition of the tumor. Subclonal tumor structure was also investigated in the acral melanoma case as an example. Using SciClone and ClonEvol packages, the clustering of mutant alleles presented in the sample with a close frequency was carried out. Based on these data, a prediction of the intratumoral clonal composition was made and a model of clonal evolution was proposed describing changes in the clonal composition of the tumor during metastasis, including the appearance of new mutations that may be associated with further progression of the disease. The approach used allows the identification of mutations causing the formation of new tumor clones, which may have a proliferative advantage, also in the conditions of antitumor therapy.

Keywords: high-throughput sequencing, acral melanoma, acute myeloid leukemia, somatic mutations, variant allele frequency