

## Клиническое значение полноэкзомных исследований миелоидных опухолей методом секвенирования следующего поколения

С.А. Смирнихина<sup>1</sup>, А.В. Лавров<sup>1</sup>, Э.П. Адильгереева<sup>1</sup>,  
А.Г. Туркина<sup>2</sup>, С.И. Куцев<sup>1,3</sup>

### Clinical significance of the whole-exome studies in myeloid neoplasms using next-generation sequencing

S.A. Smirnikhina<sup>1</sup>, A.V. Lavrov<sup>1</sup>, E.P. Adilgerееva<sup>1</sup>,  
A.G. Turkina<sup>2</sup>, and S.I. Kutsev<sup>1,3</sup>

#### ABSTRACT

The article reviews application of next-generation sequencing (NGS) for studying pathogenesis of myeloid neoplasms. The tumor-cell exome studies in patients with various myeloid tumors demonstrated new recurrent mutations which are important for understanding molecular mechanisms of pathogenesis, prediction of therapy effectiveness, and development of new approaches to targeted therapy in these diseases.

**Keywords:** exome, next-generation sequencing, myeloid neoplasms.

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics, RAMS, Moscow

<sup>2</sup> Hematology Research Center, RF Ministry of Health, Moscow

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, RF Ministry of Health, Moscow

Контакты: kutsev@mail.ru

Принято в печать: 13 февраля 2013 г.

#### РЕФЕРАТ

В обзоре рассматривается применение секвенирования следующего поколения (next-generation sequencing) для изучения патогенеза миелоидных опухолей. Исследования экзомов опухолевых клеток у пациентов с разными формами миелоидных опухолей позволили выявить новые рекуррентные мутации, имеющие значение для понимания молекулярных механизмов патогенеза, определения прогноза эффективности лечения, разработки новых подходов к таргетной терапии этих заболеваний.

#### Ключевые слова:

экзом, секвенирование следующего поколения, миелоидные опухоли.

#### ВВЕДЕНИЕ

Технологии секвенирования следующего поколения (ССП) в настоящее время считаются одними из наиболее перспективных и быстроразвивающихся. До недавнего времени секвенирование ДНК сопровождалось большими финансовыми и временными затратами. Однако стремительное развитие технологий позволило значительно снизить стоимость и уменьшить время проведения исследований, что во многих областях сделало ССП методом выбора. Более того, преимущества данного подхода этим не ограничиваются. Так, ССП в отличие от классического секвенирования по Сэнгеру позволяет выявлять мутации в клетках, составляющих менее 20 % от общего числа в образце, что особенно важно при онкогематологических заболеваниях.

ССП позволяет определять последовательность всей ДНК, включая не кодирующие области (полногеномное исследование), только кодирующей

части ДНК (полноэкзомное исследование) или секвенировать определенный набор генов (таргетное исследование). С помощью ССП можно также изучать все последовательности мРНК в геноме, т. е. оценивать экспрессию всех генов (полнотранскриптомное исследование).

Широкий спектр применения ССП позволяет использовать его для разных целей. Прежде всего, это исследовательские и диагностические задачи. Первые заключаются в поиске мутаций, участвующих в патогенезе того или иного онкогематологического заболевания. Понимание молекулярных закономерностей патогенеза болезни — основа для создания таргетной терапии. Исторически наиболее ранним примером успешного использования знания молекулярных механизмов патогенеза для разработки таргетной терапии стало создание в конце XX в. первого препарата класса ингибиторов тирозинкиназ — иматиниба

<sup>1</sup> ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва

для терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ). Более 80 % пациентов с ХМЛ, получающих терапию ингибиторами тирозинкиназ, находятся в ремиссии [1]. Столь же успешная таргетная терапия для других онкогематологических заболеваний пока не разработана. Кроме того, знание патогенеза на молекулярно-генетическом уровне позволит более четко определять группы риска и корректно оценивать прогноз выживаемости у больных с опухольми кроветворной ткани.

Применение ССП с диагностической целью оправдано при онкогематологических заболеваниях, вызванных мутациями в разных генах. Чем больше количество генов, участвующих в патогенезе отдельного заболевания, тем менее полезными оказываются традиционные методы ПЦР-диагностики и классического секвенирования, т. к. их проведение сопряжено с повышенной трудоемкостью и дороговизной. В этом случае можно использовать таргетное секвенирование выбранного списка генов с помощью ССП. Кроме того, применение ССП возможно и с целью мониторинга остаточной болезни для быстрого выявления ранних признаков рецидива.

Цель настоящего обзора современных данных литературы — анализ эффективности использования технологии ССП в исследовании экзона опухолевого клона клеток при злокачественных миелопролиферативных заболеваниях.

## ЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Секвенирование экзона человека — эффективный способ изменения соотношения цена/качество при проведении исследований генома человека. Данный подход позволяет существенно снизить стоимость секвенирования и получить при этом максимум информации. Так, при полноэкзомном секвенировании исследуется только 1 % всего генома, который, однако, содержит, по многочисленным данным, до 85 % мутаций, связанных с заболеваниями [2]. В настоящее время стандартные наборы по извлечению из геномной ДНК человека экзона позволяют получить около 45–50 млн нуклеотидов. Эти последовательности включают не только экзоны, но и, в некоторых случаях, небольшие фланкирующие последовательности, не кодирующие белки. Тем не менее в целом можно считать, что при секвенировании экзона получают данные о той части генома, которая непосредственно кодирует белки. При этом стоимость секвенирования экзона по сравнению с секвенированием полного генома в несколько раз меньше. Таким образом, выполняется правило Парето: 20 % усилий дают 80 % результата, а остальные 80 % усилий — лишь 20 % результата.

Для целевого секвенирования экзона наиболее эффективным методом обогащения является гибридизация. Образец анализируемой ДНК расщепляют на фрагменты, например, ультразвуком и гибридизуют с пулом связанных с магнитными частицами олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидной последовательности экзонов. После завершения гибридизации с помощью магнита извлекается только та часть ДНК, которая относится к экзому. Секвенирование экзона возможно на всех основных платформах параллельного высокопроизводительного секвенирования: Illumina, Life Technologies, Roche.

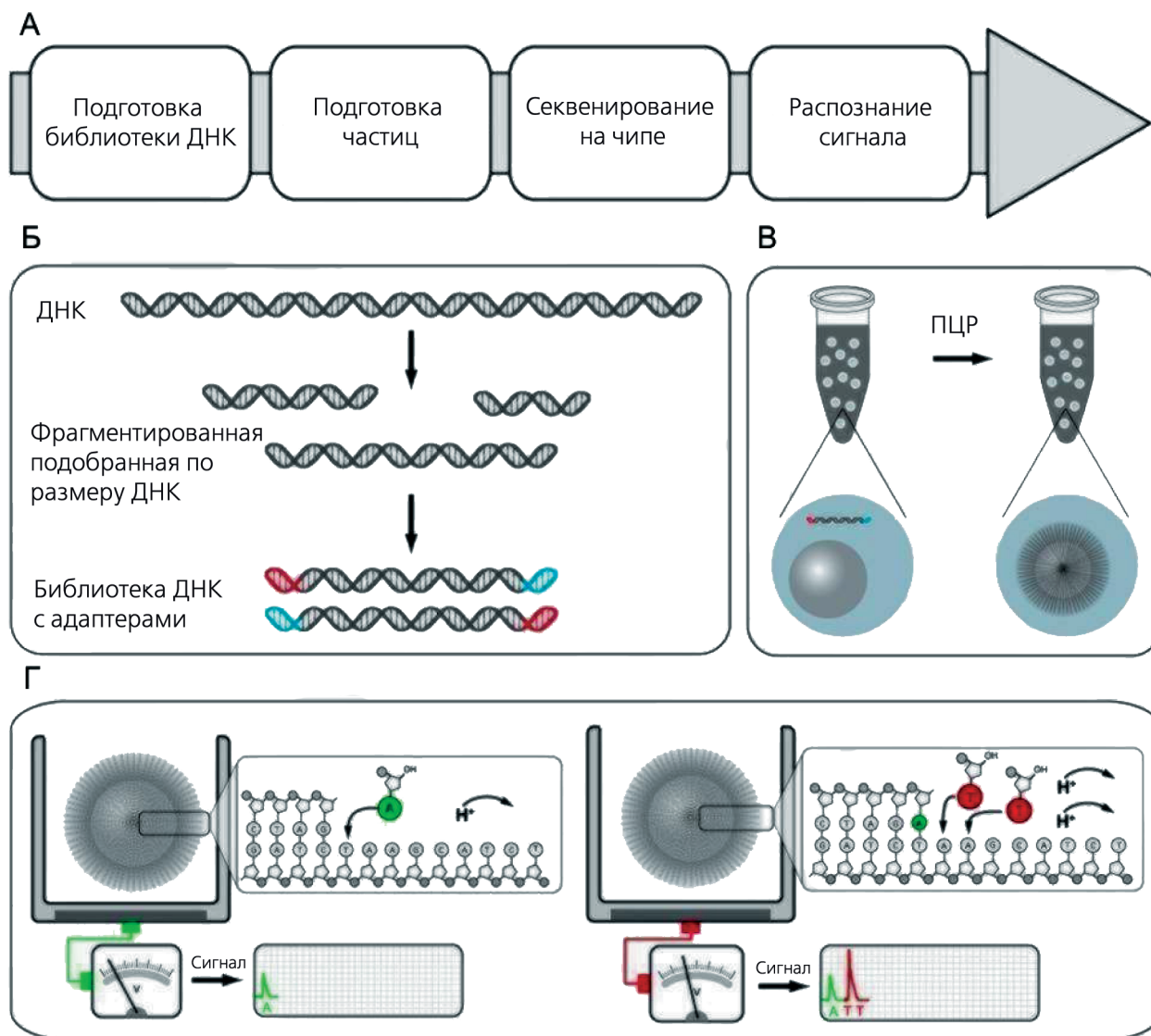
Несмотря на некоторые различия технологий, метод параллельного секвенирования имеет общую

схему исполнения и состоит из трех основных этапов: 1) подготовка библиотеки ДНК; 2) амплификация ДНК-библиотеки; 3) параллельное секвенирование нескольких сотен тысяч клонов амплифицированной ДНК-библиотеки. Для подготовки библиотеки расщепленные фрагменты ДНК лигируют со специальными адаптерами и отбирают фрагменты необходимой длины в зависимости от используемого метода. В настоящее время распространено секвенирование довольно больших фрагментов от 200 до 1000 пар оснований. На этом же этапе проводят обогащение образца последовательностями экзона. На II этапе выбранные фрагменты амплифицируют в эмульсии или на твердой подложке таким образом, чтобы каждая молекула дала пространственно отграниченные клоны идентичных молекул. Данный этап необходим для того, чтобы на следующем этапе усилить регистрируемый в ходе секвенса сигнал от каждой анализируемой молекулы. На III этапе сотни тысяч и даже миллионы клонов секвенируют одновременно. В качестве примера приведена схема процесса секвенирования на персональном секвенаторе PGM Ion Torrent (рис. 1).

Важным методическим аспектом массивного параллельного секвенирования является необходимость многократного прочтения каждого нуклеотида изучаемой последовательности. Это обусловлено тем, что в процессе секвенирования неизбежны ошибки распознавания отдельных нуклеотидов. Несмотря на то что уровень таких ошибок существенно ниже 1 % и в современных протоколах в среднем не превышает 0,1 %, величина анализируемых последовательностей обуславливает наличие значительного числа неправильно распознанных нуклеотидов при однократном прочтении. Для итоговой точности определения последовательности нуклеотидов в целом на уровне примерно 100 % достаточно 20–30-кратного прочтения каждого нуклеотида. Однако на практике нередко используется 100-кратное прочтение в связи с тем, что при подготовке библиотеки отдельные фрагменты представлены неравномерно и для достижения 30-кратного прочтения редко представленных последовательностей необходимо общее 100-кратное прочтение. Кроме того, 100- или более кратное прочтение позволяет анализировать возможную клональную изменчивость изучаемого материала, что крайне важно при исследовании опухолевых заболеваний.

Экзомное секвенирование уже зарекомендовало себя как высокоэффективный метод поиска генов и мутаций, вызывающих редкие менделирующие заболевания [4, 5]. Параллельное секвенирование экзона позволяет находить генетические причины болезней в тех случаях, когда прежние технологии были бессильны. Несмотря на то что стоимость метода пока остается относительно высокой, он получает широкое распространение не только в научных исследованиях, но и в диагностике отдельных сложных случаев заболеваний. Несомненно и то, что технологии секвенирования находятся в стадии экспоненциального роста производительности при сохранении или даже снижении стоимости оборудования и расходных материалов.

Одной из главных проблем параллельного секвенирования, и в частности секвенирования экзона, является сложность обработки терабайтов получаемой генетической информации. Более того, в настоящее время недостаточно стандартизации в биоинформационных подходах к чтению



**Рис. 1.** Процесс секвенирования на PGM Ion Torrent (по [3]):

А — общая схема процесса; Б — подготовка библиотеки ДНК, фрагментирование, лигирование специальных адаптеров, необходимых для дальнейшей универсальной амплификации молекул; В — амплификация на сферах. ДНК с присоединенными адаптерами клонально амплифицируют на сфере. С помощью магнитной сортировки отбирают только сферы, несущие амплифицированные молекулы ДНК (обогащение); Г — секвенирование на микрочипе. После отжига праймеров для секвенирования и посадки ДНК-полимеразы на отжигшиеся праймеры сферы загружают на микрочип так, что в каждую ячейку микрочипа попадает одна сфера. После этого микрочип циклически промывают отдельными нуклеотидами. В результате присоединения нуклеотида высвобождается протон, что регистрируется микро-рН-метром, который встроен в каждую ячейку микрочипа

и выравниванию получаемых последовательностей, что затрудняет сравнение результатов различных исследований, выполненных на разном оборудовании и с применением различных алгоритмов обработки данных [6].

Несмотря на то что экзом представляет собой всего около 1 % генома человека, основная часть получаемой информации должна быть отброшена с тем, чтобы получить возможность проанализировать наиболее значимые находки. Так, в стандартные процедуры фильтрации получаемой информации входит исключение из анализируемых данных всех изменений ДНК, описанных ранее в базах данных ДНК условно здоровых людей, а также синонимичные замены нуклеотидов в ДНК. Затем проводят другие, более специфичные процедуры фильтрации данных с той целью, чтобы выявить мутации генов, наиболее вероятно имеющих функциональное и клиническое значение. Таким образом, огромная часть информации

о геноме остается непроанализированной. Вместе с тем большинство информации попадает в международные базы данных, где они доступны для анализа заинтересованными научными группами.

Существует еще один сложный вопрос, возникающий из-за обилия информации, получаемой в результате параллельного секвенирования. Практически каждый человек является носителем полиморфизмов, связанных с повышенным риском тех или иных заболеваний, а в некоторых случаях — мутаций, ответственных за развитие менделирующих болезней. Далеко не очевиден ответ на вопрос, должен ли человек иметь доступ к такой «случайно» полученной информации, во многих случаях требующей профессиональной интерпретации специалистом-генетиком. Этот и другие этические аспекты проблемы избыточной и/или незапрошенной информации активно обсуждаются в профессиональном сообществе [7].

### Исследования экзома при острых миелоидных лейкозах

Большинство геномных исследований при изучении миелоидных опухолей приходится на острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Этому есть несколько объяснений. Во-первых, молекулярно-генетические основы патогенеза различных вариантов этих заболеваний до сих пор окончательно не изучены, поэтому неясны причины быстрого прогрессирования ОМЛ [8, 9]. Во-вторых, существующее в настоящее время деление пациентов с ОМЛ на группы риска, основанное на данных цитогенетического анализа костного мозга, не позволяет достоверно прогнозировать продолжительность жизни больных. Эти группы довольно гетерогенны, особенно группа промежуточного риска, куда входит большинство пациентов (61 %), в т. ч. с нормальным кариотипом [10, 11]. В-третьих, ясно, что многообразие молекулярно-генетических находок при ОМЛ не позволяет разработать единую таргетную терапию, поэтому необходим поиск мишеней для индивидуализированной терапии на основе генотипа пациента [11].

Первые результаты полногеномных исследований при ОМЛ появились в 2008 г. Пилотная статья американских ученых включала данные всего одной пациентки с M1-вариантом ОМЛ в соответствии с FAB-классификацией. У пациентки был нормальный кариотип и отсутствовали маркерные мутации, как и у большинства больных с этой формой ОМЛ [12]. В работе сравнивали геном опухолевых клеток и геном нормальных клеток, полученных в результате биопсии кожи, с 30-кратным прочтением последовательности нуклеотидов. Примечательно, что при полногеномном секвенировании в экзоме опухолевого генома была найдена 181 несинонимичная мутация, из которых только 8 (4 %) подтвердились при секвенировании по Сэнгеру. Кроме того, были обнаружены описанные ранее для ОМЛ мутации в генах *FLT3* и *NPM1*, встречающиеся у 25–30 % больных ОМЛ [13]. Гены, в которых обнаружены новые мутации, можно разделить на связанные с прогрессированием онкологических заболеваний (*PTPRT*, *CDH24*, *PCLKC* и *SLC15A1*) и участвующие в метаболических путях (*KNDС1*, *GPR123*, *EBI2* и *GRINL1B*). Все выявленные в опухолевом геноме мутации также встречались и в геноме клеток кожи (с частотой 5–10 %), что, по мнению авторов, возможно, свидетельствует о контаминации кожи лейкозными клетками. В целом первые полученные результаты показали применимость ССП для изучения патогенеза ОМЛ [14].

Полногеномные исследования опухолевых клеток при ОМЛ были продолжены этим коллективом авторов, и в 2009 г. вышла одна из ключевых статей, в которой представлено описание первой рекуррентной мутации, обнаруженной у пациентов с ОМЛ методом ССП. Как известно, рекуррентные мутации определяются у 30 % больных ОМЛ [15]. Сначала было проведено полногеномное исследование у больного ОМЛ с нормальным кариотипом, по результатам которого был составлен список из 12 генов с несинонимичными мутациями в опухолевом экзоме, в т. ч. в описанных ранее генах *NPM1* и *NRAS*. Кроме того, была найдена мутация в гене *IDH1*, ранее не описанная при ОМЛ. Поиск мутаций данного гена у 187 пациентов с ОМЛ позволил авторам обнаружить рекуррентные мутации в нем с частотой 8,5 %. Все пациенты, у которых были выявлены такие мутации, входили в группу среднего риска [16].

Вторая ключевая публикация по поиску рекуррентных мутаций была опубликована этими же авторами в 2010 г. В данной работе было проведено повторное секвенирование генома у пациентки, описанной в 2008 г., с большим количеством прочтений последовательностей нуклеотидов, в результате чего была обнаружена мутация в гене *DNMT3A* — делеция одного нуклеотида со сдвигом рамки считывания. При секвенировании по Сэнгеру геномов опухолевых клеток у 282 больных ОМЛ мутации в этом гене были обнаружены в 22 % случаев, что возводит мутации в этом гене в статус рекуррентных. Поиск функциональной значимости мутаций в гене *DNMT3A* не дал однозначных результатов. Примечательно, что мутации в этом гене часто были связаны с другими рекуррентными для ОМЛ мутациями (в генах *FLT3*, *IDH1* и *NPM1*). Кроме того, мутации в этом гене не были обнаружены ни у одного больного из группы низкого риска, но часто присутствовали у пациентов из группы среднего риска. Авторы указывают, что пациенты с мутациями в гене *DNMT3A* имеют худший прогноз по показателям общей и бессобытийной выживаемости. Если мутация в гене *DNMT3A* связана с мутацией в гене *FLT3*, то такие пациенты имеют очень плохой прогноз. Из результатов данного исследования очевидно, что ген *DNMT3A* участвует в патогенезе ОМЛ и определяет прогноз, однако пока неясно, каким образом [17].

Как видно из описанных выше примеров, исследователи сосредоточили свое внимание в основном на мутациях в кодирующих регионах генома, поэтому начиная с 2011 г. полногеномный подход к анализу экзома постепенно стал уступать место полноэкзомному секвенированию. Международная группа исследователей продолжила изучение патогенеза ОМЛ. Для этого был проанализирован экзом опухолевых и нормальных клеток с 66–69-кратным прочтением последовательностей нуклеотидов у пациента с ОМЛ (нормальный кариотип, отсутствие ключевых мутаций *NPM1*, *FLT3*-ITD, *CEBPA*, *MLL*-PTD). В результате обнаружили 13 генов с несинонимичными мутациями, из которых был выбран ген *BCOR*, т. к. частота мутаций в нем среди 30 пациентов с ОМЛ была самой высокой (16,6 %). Мутации в гене *BCOR* были обнаружены у 17,1 % больных ОМЛ с нормальным кариотипом и отсутствием ключевых мутаций, однако у пациентов с цитогенетическими нарушениями мутации в гене *BCOR* не были найдены, а среди всех пациентов с ОМЛ частота составила всего 3,8 %. Также в исследовании показано, что мутации в генах *NPM1* и *BCOR* редко встречаются у одного и того же пациента (1 %). Как полагают авторы, это связано с тем, что данные мутации запускают разные сигнальные пути, обуславливающие развитие болезни. Такие же результаты получены и в отношении мутации *FLT3*-ITD. При этом в 50 % случаев мутации в гене *BCOR* были связаны с мутациями в гене *DNMT3A*, указывая на совместный вклад этих генов в развитие заболевания. В статье также показано, что мутации в гене *BCOR* приводят к худшему прогнозу по показателям общей и бессобытийной выживаемости в течение 2 лет [18].

Известно, что онкогематологические заболевания имеют клональную природу, т. е. развиваются из одной клетки с мутациями, получившей селективное преимущество. Для доказательства такого постулата американскими исследователями была проведена работа на основе полноэкзомного исследования опухолевых и выделенных



у тех же пациентов с ОМЛ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Последние отличались наличием определенного спектра поверхностных маркеров и отсутствием мутации *FLT3-ITD*, присутствующей в опухолевых клетках. В 5 из 6 случаев в ГСК было найдено 32 из 51 мутации, обнаруженной в опухолевых клетках. Кроме того, в ГСК выявлено 7 из 13 рекуррентных для ОМЛ мутаций. В зависимости от донора количество клеток с мутациями в ГСК варьировало от 10 до 99 %. Авторы предложили называть такие клетки прелейкозными и разработали модель клонального роста этих измененных клеток, дающих основу клональной лейкозной экспансии [19].

Еще одной точкой приложения ССП служит мониторинг остаточной болезни для раннего выявления рецидивов. Так, например, в 2012 г. было опубликовано исследование, в которое были включены больные ОМЛ (дети и взрослые). Каждому пациенту было сделано несколько секвенирований в разный срок заболевания. Как упоминалось ранее, ССП позволяет определить наличие мутаций в небольшом количестве клеток, что очень важно при клональных изменениях на фоне опухолевых заболеваний. Таким путем удалось сопоставить находки с мутациями и рецидив у 2 пациентов и доказать, что этим методом можно выявить рецидив задолго до его возникновения [20].

Примером использования ССП с диагностической целью при ОМЛ служит работа американских исследователей, опубликованная в 2012 г. Для этого было предложено использовать целевое секвенирование генов, мутации или транслокации в которых, как доказано ранее, вносят свой вклад в патогенез заболевания и влияют на прогноз. К таким генам относятся *RUNX1*, *CBFB*, *RARA*, *ABL*, *CEBPA*, *FLT3*, *KRAS*, *IDH1* и некоторые другие. Спектр этих мутаций довольно широкий, что затрудняет их поиск стандартными методами ПЦР-диагностики или секвенирования по Сэнгеру. К тому же стоимость ССП в настоящее время снизилась настолько, что позволяет проводить эти исследования с большим количеством прочтений последовательностей нуклеотидов, рассчитывая на выявление единичных клонообразующих опухолевых клеток. Результаты исследования показывают, что 177-кратное прочтение достаточно для выявления транслокаций, тогда как 150-кратное позволяет определять однонуклеотидные варианты и инделы. Однако авторами отмечены и недостатки такого подхода: он требует биоинформационных знаний для обработки полученной информации и использования большого количества компьютерных программ с целью получить однозначный результат [21].

Таким образом, анализ экзона, полученного при полногеномном секвенировании, и собственно полноэкзомные исследования генома опухолевых клеток показали свою незаменимость в выявлении мутаций, связанных с ОМЛ. Из 281 выявленной таким способом мутации только 16 были известны ранее. При этом метод ССП позволил определить 4 из 10 рекуррентных мутаций (в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TTN*). Однако нельзя не отметить, что лишь 10 мутаций (3,5 % общего числа) являются рекуррентными, т. е. встречаются с частотой более 5 % и обнаружены более чем у 100 человек [9]. Кроме того, остается непонятным, определяется ли течение ОМЛ только рекуррентными мутациями или комбинацией рекуррентных мутаций с другими, индивидуальными для

каждого пациента [22]. Все это требует продолжения исследования патогенеза ОМЛ, в т. ч. с применением метода ССП.

### **Исследования экзона при миелодиспластическом синдроме**

Миелодиспластические синдромы (МДС) — это гетерогенная группа онкогематологических заболеваний, способных к прогрессии в ОМЛ. При МДС описано множество мутаций, однако их наличие не считается достаточным для развития заболевания, т. к. они обнаруживаются и при других болезнях, а МДС, в свою очередь, может развиваться и без этих мутаций. Примерно у 25 % пациентов миелодисплазия сопровождается повышенным числом кольцевых сидеробластов (> 15 %). Для определения патогенеза этой формы МДС было проведено полноэкзомное секвенирование опухолевых клеток у 9 пациентов с рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами. По результатам исследования обнаружено 64 несинонимичных мутации, в т. ч. рекуррентные в генах *DNMT3A* (у 3 из 9) и *TET2* (у 1 из 9). Кроме того, была выявлена новая рекуррентная мутация в гене *SF3B1* (у 6 из 9), ранее не описанная при МДС. При дальнейшем изучении выяснилось, что мутации в этом гене присутствуют у 20 % больных МДС, причем чаще всего у пациентов с рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами (65 %). Также мутации в этом гене обнаружили при других миелоидных опухолях кроветворной системы, но с меньшей частотой (5 % — ОМЛ, 5 % — ХММЛ) и в единичных случаях при других онкологических заболеваниях. При наличии мутаций в гене *SF3B1*, выявленных у пациентов с другими формами МДС, в костном мозге всегда обнаруживается большое количество кольцевых сидеробластов. Таким образом, данная публикация является одной из первых, в которой высказано предположение, что мутации в гене *SF3B1* связаны с избыточным образованием кольцевых сидеробластов [23].

В следующей публикации эти же авторы проанализировали частоту мутаций в гене *SF3B1* у пациентов с МДС и миелодиспластическими/миелопролиферативными неоплазиями (МДС/МПН) и их связь с кольцевыми сидеробластами. Из 533 пациентов с МДС у 150 были выявлены мутации в гене *SF3B1*, при этом чаще мутации встречались при рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами (79 %) и рефрактерной цитопении с мультилинейной дисплазией и кольцевыми сидеробластами (58 %). В группе с МДС/МПН наибольшая частота мутаций наблюдалась при рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом (67 %). Всего мутации были выявлены у 168 (25,7 %) пациентов из обеих групп. В статье указывается, что наличие мутации служит предиктором появления сидеробластов с вероятностью 97,7 %, в то время как отсутствие сидеробластов — предиктором отсутствия мутации в 97,8 % случаев. Наличие мутации связывают с лучшим прогнозом по общей выживаемости, выживаемости без лейкоза и бессобытийной выживаемости [24].

Для более глубокого понимания связи между мутациями в гене *SF3B1* и появлением кольцевых сидеробластов было проведено другое исследование. В нем разными способами доказывалось, что нарушение функции белка, кодируемого этим геном, приводит к накоплению железа в клетках. Для этого использовали клеточную линию K562 с нокадаунм данного гена, мышей с нокаутом гена *SF3B1* и ингибирование данного белка меямицином в

экспериментах *in vitro* [25]. В результате данного исследования была подтверждена роль мутаций гена *SF3B1* в образовании избыточного количества сидеробластов. Таким образом, данные применения ССП для изучения патогенеза МДС стали основой для понимания патогенеза рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами.

В 2011 г. в Японии завершилось исследование по изучению патогенеза МДС с использованием полноэкзомного секвенирования. В работе было обнаружено 235 новых мутаций, а также подтверждены рекуррентные мутации в генах *BCOR*, *DNMT3A*, *KRAS*, *NRAS*, *RUNX1*, *TET2* и некоторых других. Кроме того, были найдены мутации в генах, кодирующих белки сплайсосомы — структуры, участвующей в сплайсинге (рис. 2).

Суммарно частота мутаций в этих генах составила 55,2 % у пациентов с МДС. Мутации генов сплайсингового комплекса специфичны для МДС и наблюдаются с достаточно высокой частотой при рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами (84,9 %), рефрактерной анемии (43,9 %), хроническом миеломоноцитарном лейкозе (ХММЛ) (54,5 %). Однако мутации редки в случаях впервые выявленного ОМЛ (6,6 %) и МПН (9,4 %). Мутации в гене *SF3B1* более характерны для рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами, а мутации в гене *SRSF2* — для ХММЛ. Возможно, разные мутации определяют преобладание разных типов опухолевых клеток. В результате проведенного исследования становится очевидно, что патогенез МДС и МДС/МПН сложнее, чем это казалось ранее, и включает в себя нарушения в процессе сплайсинга. Частота и специфичность мутаций этих генов указывают на то, что изменения в сплайсинговом комплексе — признак миелоидной опухоли и они играют центральную роль в патогенезе миелодисплазии. Несомненно, изучение патогенеза МДС и МДС/МПН на таком глубоком уровне стало возможным только благо-

даря развитию новых технологий и широкому использованию ССП [26].

В совместной работе американских и японских исследователей изучались мутации в генах сплайсингового комплекса у пациентов с разными формами миелоидных неоплазий: МДС, МДС/МПН, включая атипичный ХМЛ, а также ОМЛ (первичный и вторичный). С помощью полноэкзомного секвенирования у 120 пациентов удалось обнаружить мутации во многих генах, участвующих в сплайсинге, однако только в трех генах (*U2AF1*, *SF3B1*, *SRSF2*) мутации были рекуррентными. Причем мутации в первом гене чаще встречались при рефрактерной цитопении, во втором — преимущественно при рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами, в третьем — при ХММЛ. При изучении корреляции генотип-фенотип выявлено, что мутации в гене *SF3B1* связаны с лучшим прогнозом по показателям выживаемости при МДС/МПН, как и отсутствие мутаций в гене *U2AF1* при том же заболевании. При этом в общей выборке из всех больных эта тенденция сохраняется. Мутации в генах сплайсингового комплекса могут приводить к нарушению сплайсинга, включая сохранение интрона, нарушение распознавания сайта сплайсинга или нарушение альтернативного сплайсинга. При проведении транскриптомного анализа выяснилось, что в случаях мутаций в генах могут возникать изменения в сплайсинге генов *TET2* и *RUNX1*, а они связаны с патогенезом миелопролиферативных заболеваний [27].

Как показывают данные, полученные в ходе американско-британского исследования, частота мутаций в гене *U2AF1* при МДС составляет 8,7 %. Это исследование было проведено с использованием полногеномного секвенирования у 130 пациентов [28].

Описанные выше примеры показывают, что ССП является мощным и зачастую незаменимым инструментом для изучения патогенеза МДС и МПН. Использование

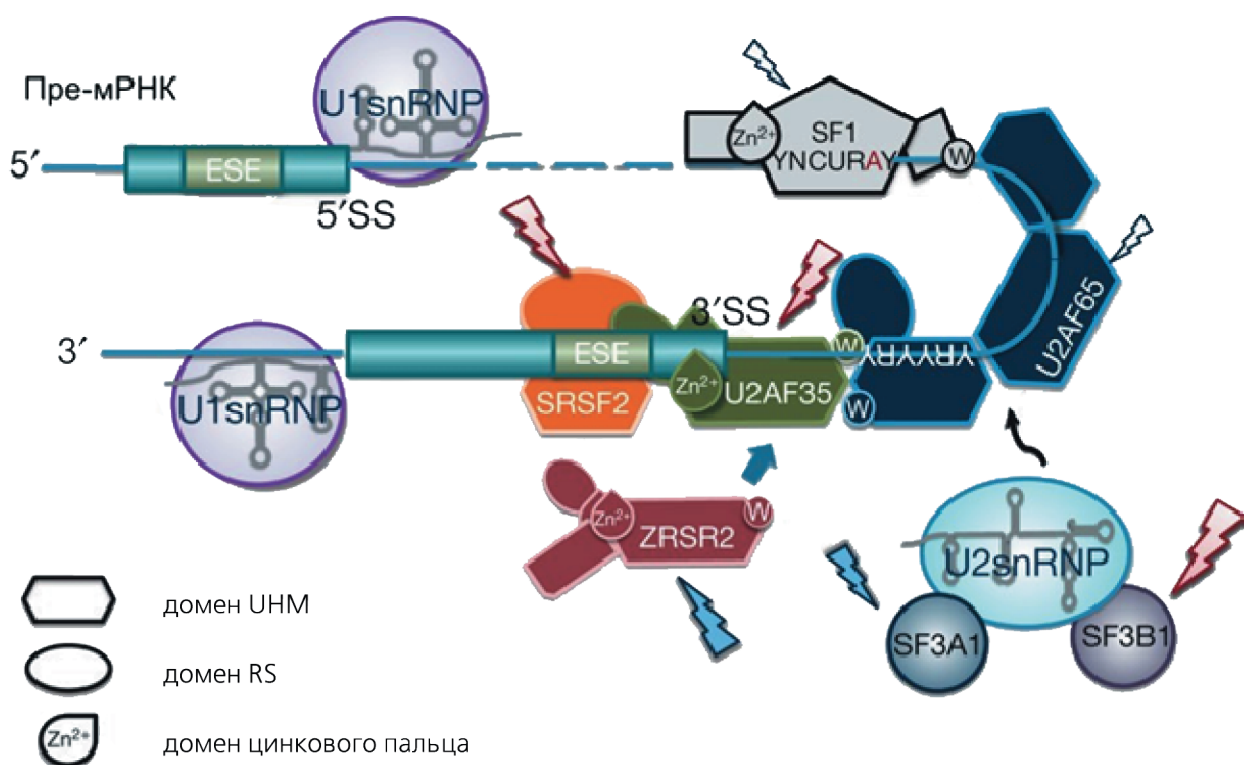


Рис. 2. Компоненты сплайсингового комплекса, мутации в которых обнаружены при миелодисплазии (указаны стрелками) (по [26])

ССП позволяет выявлять новые механизмы развития заболеваний — нарушение сплайсинга ключевых генов, а также служит отправной точкой в открытии связи между мутациями в гене *SF3B1* и образованием кольцевых сидеробластов. Находки в исследовании патогенеза миелопролиферативных заболеваний дают возможность надеяться на скорую разработку таргетной терапии. Уже сейчас описано несколько препаратов, влияющих на белки, участвующие в сплайсинге, например меямицин, сплайсеостатин, пладиенолид и др. [29, 30].

### Исследования экзома при других миелоидных опухолях

Полногеномные и полноэкзомные исследования при других миелоидных опухолях кроветворной системы проводятся намного реже, чем при описанных ранее заболеваниях. Однако имеются единичные исследования острого моноцитарного, острого промиелоцитарного, хронического миеломоноцитарного и тучноклеточного (мастоцитоз) лейкозов.

Острый монобластный лейкоз (ОМоЛ) — онкогематологическое заболевание с общей выживаемостью 25 % в течение 3 лет после постановки диагноза [31]. В исследовании, проведенном в Китае с участием 9 больных ОМоЛ, методом ССП обнаружены мутации в 63 генах, в т. ч. в генах *NRAS*, *FLT3*, а также характерный для этой формы лейкоза химерный ген *MLL/MLLT4*. При дальнейшем поиске этих мутаций в большей выборке пациентов с ОМоЛ выявили только 14 генов с рекуррентными мутациями. При этом наиболее частыми были мутации в гене *DNMT3A* (20,5 %). Функционально такие мутации приводили к нарушению метилирования в генах семейства *HOX* и в гене *IDH1*. При поиске мутаций гена *DNMT3A* при других онкогематологических заболеваниях выявлено, что они также определяются при остром миеломоноцитарном лейкозе (13,9 % случаев), но только в случае выраженной инфильтрации моноцитами. Из этого авторы делают вывод, что мутации в этом гене специфичны при нарушениях в развитии моноцитарного роста кроветворения. В данном исследовании мутации в гене *DNMT3A* были связаны с худшим прогнозом для жизни [32].

Еще одной формой миелоидных неоплазий является острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), основную роль в патогенезе которого играет транслокация  $t(15;17)$  с появлением химерного гена *PML/RARA* [33]. Однако образование этого гена, по мнению ряда авторов, не является достаточной причиной для развития ОПЛ. Первые полногеномные исследования у больных ОПЛ выявили у них в экзоме мутации в генах, рекуррентных для ОМЛ: *WT1*, *KRAS*, *LYN* (функционально связанный с *FLT3*). Проведенное исследование является пилотным и служит основой для дальнейшего изучения патогенеза ОПЛ [34].

Как указывалось ранее, ССП можно применять и в диагностических целях, примером служит описанный в 2011 г. в США сложный клинический случай. Пациентке на основании результатов клинико-лабораторного исследования был поставлен диагноз ОМЛ (ОПЛ, М3-вариант по FAB-классификации) и начата терапия индукции препаратами АТРА, цитарабин и идарубицин. Однако результаты цитогенетического исследования и флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) показали сложный кариотип и перестройку *PML/RARA*. Лечение препаратом АТРА было приостановлено. Для уточнения диагноза

пациентке было проведено полноэкзомное секвенирование опухолевых клеток, при котором выявили 2 точки разрывов в локусе *PML/LOXL1* и локусе *RARA*, которые приводили к образованию 3 транскриптов (*PML/LOXL1* и *RARA/LOXL1*), сложно обнаруживаемых стандартными методами, и типичный для ОПЛ транскрипт *PML/RARA*, образующийся в результате реципрокной перестройки  $t(15;17)$ . Таким образом, диагноз ОПЛ у пациентки был подтвержден и назначена индукционная терапия препаратом АТРА. Кроме того, в статье указывается, что на уточнение диагноза и определение ключевых мутаций у исследователей затрачено всего 7 нед., что не слишком длительный срок, учитывая сложность анализов такого рода. Кроме того, авторы указывают еще на одну точку приложения ССП — выявление генотипов, связанных с чувствительностью или резистентностью к терапии ретиноевой кислотой. Например, наличие таких генов, как *NuMA1-RARA*, *NPM1-RARA*, *STAT5B-RARA*, *PRKARIA-RARA*, *FIP1L1-RARA*, *BCOR-RARA*, *NUP98-RARG*, *PLZF-RARA* [35].

Применение ССП описано и в случае тучноклеточного лейкоза (ТКЛ). До полноэкзомного секвенирования пациентке с ТКЛ был проведен анализ на наличие характерной мутации в гене *KIT* (D816V); мутацию не обнаружили. Данная мутация связана с резистентностью к терапии иматинибом, поэтому ее отсутствие позволяло назначить препарат. При проведении секвенирования были выявлены мутации в 13 генах, большинство из которых ранее было описано как связанное с опухолями, в т. ч. обнаружили мутации в генах *KIT* и *MS4A2*. В случае с геном *KIT* была выявлена мутация V654A, описанная ранее для других онкологических заболеваний — не для миелоидных опухолей. Эта мутация также вызывала резистентность к иматинибу, что объясняло отсутствие эффективности терапии, назначенной пациентке. Мутации в гене *MS4A2* для ТКЛ нехарактерны. Этот ген кодирует компонент рецептора IgE и, по-видимому, участвует в регулировании выживаемости клеток и активации сигнальных путей. Мутации в этом гене могут приводить к увеличению жизнеспособности клеток [36].

Хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) — еще одно клональное онкогематологическое заболевание, при котором цитогенетические аномалии выявляются лишь у 20–30 % пациентов, тогда как природа остальных случаев заболевания неясна. В 15–30 % случаев ХММЛ трансформируются в ОМЛ. Для изучения молекулярно-генетических особенностей заболевания было проведено таргетное секвенирование генов (*CBL*, *JAK2*, *MPL*, *NRAS*, *KRAS*, *RUNX1* и *TET2*) у 81 больного ХММЛ. Мутации в этих генах были обнаружены у 73 % пациентов. Чаще всего мутации присутствовали в генах *TET2* (44,4 % пациентов), *CBL* и *NRAS* (по 22,2 %) и в гене *KRAS* (12,3 % пациентов). Мутации в гене *MPL* не были обнаружены ни у одного пациента. Также авторы указывают на то, что мутации в гене *TET2* связаны с лучшим прогнозом по общей выживаемости при ХММЛ [37].

Как упоминалось ранее, некоторые авторы отмечают сложность обработки полученных с помощью ССП результатов, необходимость использования большого числа программ для достижения однозначного результата [21]. В 2011 г. было опубликовано исследование по использованию ССП в 10 лабораториях по всему миру с целью



сопоставить полученные результаты для клинического использования. Объектом послужили геномы 18 больных ХММЛ. Заранее этим пациентам было проведено классическое секвенирование по Сэнгеру генов *TET2*, *CBL* и *KRAS*. У каждого пациента была обнаружена как минимум одна мутация в гене *TET2*. Далее в каждой лаборатории параллельно проводили таргетное секвенирование этих генов с использованием подхода ССП с количеством прочтений от 541 до 872 (в среднем 689). В результате все найденные ранее мутации были обнаружены. Кроме того, поскольку ССП позволяет выявлять мутации в единичных клетках, удалось выявить и редкие мутации во всех трех генах (2 — в гене *TET2*, 8 — *CBL* и 4 — *KRAS*). В заключение авторы утверждают, что такой подход очень удобен, сопоставим со стандартным секвенированием, позволяет выявить редкие мутации. Однако для этого необходимо проводить ССП с большим количеством прочтений последовательности нуклеотидов. Так, 250-кратное прочтение обеспечивает обнаружение мутаций, встречающихся с частотой 3%. Этого может оказаться недостаточным для поиска редких мутаций. По этой причине авторы рекомендовали проводить секвенирование с 500-кратным прочтением последовательности нуклеотидов [38].

Таким образом, приведенные выше примеры показывают, что ССП сегодня успешно применяется для изучения различных онкогематологических заболеваний как с исследовательской, так и диагностической целью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологии секвенирования следующего поколения (next generation sequencing) революционизировали изучение молекулярного патогенеза онкологических заболеваний, в частности миелоидных неоплазий. Эти технологии все чаще заменяют традиционные подходы, такие как секвенирование по Сэнгеру, ПЦР-диагностику и методы, основанные на использовании микрочипов. В реальности публикации результатов исследований с использованием этих современных технологий пока единичны. Однако наблюдаемое в последние годы существенное снижение стоимости проведения ССП и уменьшение времени секвенирования позволяют надеяться на рост количества такого рода исследований. Публикации, вошедшие в этот обзор, раскрывают основные способы применения ССП в изучении экзона опухолевых клеток миелоидных опухолей. Исследования экзотов опухолевых клеток у пациентов с разными формами миелоидных опухолей позволили выявить несколько рекуррентных мутаций и оптимизировать составление прогноза для таких пациентов. Кроме того, применение ССП показало новый аспект патогенеза МДС и других неоплазий — мутации в генах, участвующих в процессе сплайсинга. Описаны примеры успешного применения ССП и в диагностических целях, например, при мониторинге остаточной болезни или верификации сложных клинических случаев. Это достигается, прежде всего, за счет большей разрешающей способности ССП по сравнению с другими методами. Одним из наиболее важных моментов при использовании метода в диагностических целях является воспроизводимость результатов. Как показывают недавние исследования, ССП позволяет получать сопоставимые результаты в лабораториях по всему миру. Помимо описанных примеров использования ССП такой подход можно применять и

для поиска индивидуальных маркеров и предикторов развития рецидивов, оценки эффективности терапии, что открывает новые горизонты перед исследователями и позволяет ожидать значительного увеличения исследований на основе ССП в ближайшее время.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения № 8599 от 14.09.2012 г. «Геномные маркеры стабильности молекулярной ремиссии и возможного излечения хронического миелолейкоза при терапии ингибиторами тирозинкиназы» и соглашения № 8113 от 24.08.2012 г. «Экзомный и транскриптомный анализ опухолевого генома при хроническом миелоидном лейкозе».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hochhaus A., O'Brien S.G., Guilhot F. et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23(6): 1054–61.
2. Choi M., Scholl U.I., Ji W. et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106(45): 19096–101.
3. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; 475(7356): 348–52.
4. Ng S.B., Turner E.H., Robertson P.D. et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009; 461(7261): 272–6.
5. Ng S.B., Buckingham K.J., Lee C. et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat. Genet.* 2010; 42(1): 30–5.
6. Kahvejian A., Quackenbush J., Thompson J.F. What would you do if you could sequence everything? *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(10): 1125–33.
7. Biesecker L.G. Exome sequencing makes medical genomics a reality. *Nat. Genet.* 2010; 42(1): 13–4.
8. Gregory T.K., Wald D., Chen Y. et al. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J. Hematol. Oncol.* 2009; 2: 23.
9. Riva L., Luzi L., Pelicci P.G. Genomics of acute myeloid leukemia: the next generation. *Front Oncol.* 2012; 2: 40.
10. Walter M.J., Payton J.E., Ries R.E. et al. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106(31): 12950–5.
11. Walter M.J., Graubert T.A., Dipersio J.F. et al. Next-generation sequencing of cancer genomes: back to the future. *Per. Med.* 2009; 6(6): 653.
12. Mrozek K., Heerema N.A., Bloomfield C.D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004; 18: 115–36.
13. Kelly L.M., Kutok J.L., Williams I.R. et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 8283–8.
14. Ley T.J., Mardis E.R., Ding L. et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukemia genome. *Nature* 2008; 456(7218): 66–72.
15. Arber D.A., Brunning R.D., Le Beau M.M. et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Ed. by S. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris. Geneva: IARC Press, 2008: 110–23.
16. Mardis E.R., Ding L., Dooling D.J. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(11): 1058–66.
17. Ley T.J., Ding L., Walter M.J. et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(25): 2424–33.
18. Grossmann V., Tiacci E., Holmes A.B. et al. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood* 2011; 118(23): 6153–63.
19. Jan M., Snyder T.M., Corces-Zimmerman M.R. et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(149): 149ra118.
20. Thol F., Kolking B., Damm F. et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromos. Cancer* 2012; 51(7): 689–95.
21. Duncavage E.J., Abel H.J., Szankasi P. et al. Targeted next generation sequencing of clinically significant gene mutations and translocations in leukemia. *Mod. Pathol.* 2012; 25(6): 795–804.
22. Mardis E.R., Wilson R.K. Cancer genome sequencing: a review. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(R2): R163–8.



23. Papaemmanuil E., Cazzola M., Boulton J. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(15): 1384–95.
24. Malcovati L., Papaemmanuil E., Bowen D.T. *et al.* Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118(24): 6239–46.
25. Visconte V., Rogers H.J., Singh J. *et al.* SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012 Jul 23. [Epub ahead of print]
26. Yoshida K., Sanada M., Shiraishi Y. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; 478(7367): 64–9.
27. Makishima H., Visconte V., Sakaguchi H. *et al.* Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* 2012; 119(14): 3203–10.
28. Graubert T.A., Shen D., Ding L. *et al.* Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* 2011; 44(1): 53–7.
29. Albert B.J., McPherson P.A., O'Brien K. *et al.* Meayamycin inhibits pre-messenger RNA splicing and exhibits picomolar activity against multidrug-resistant cells. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8(8): 2308–18.
30. Visconte V., Makishima H., Maciejewski J.P., Tiu R.V. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia* 2012 May 15. doi: 10.1038/leu.2012.130. [Epub ahead of print]
31. Tallman M.S., Kim H.T., Paietta E. *et al.* Acute monocytic leukemia (French-American-British classification M5) does not have a worse prognosis than other subtypes of acute myeloid leukemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1276–86.
32. Yan X.J., Xu J., Gu Z.H. *et al.* Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2011; 43(4): 309–15.
33. Grimwade D., Biondi A., Mozziconacci M.J. *et al.* Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action «Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies». *Blood* 2000; 96(4): 1297–308.
34. Greif P.A., Yaghmaie M., Konstantin N.P. *et al.* Somatic mutations in acute promyelocytic leukemia (APL) identified by exome sequencing. *Leukemia* 2011; 25(9): 1519–22.
35. Welch J.S., Westervelt P., Ding L. *et al.* Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 2011; 305(15): 1577–84.
36. Spector M.S., Iossifov I., Kritharis A. *et al.* Mast-cell leukemia exome sequencing reveals a mutation in the IgE mast-cell receptor  $\beta$  chain and KIT V654A. *Leukemia* 2012; 26(6): 1422–5.
37. Kohlmann A., Grossmann V., Klein H.U. *et al.* Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(24): 3858–65.
38. Kohlmann A., Klein H.U., Weissmann S. *et al.* The Interlaboratory ROBustness of Next-generation sequencing (IRON) study: a deep sequencing investigation of TET2, CBL and KRAS mutations by an international consortium involving 10 laboratories. *Leukemia* 2011; 25(12): 1840–8.

