

## Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний

А.В. Мисюрин

**Реферат.** Существенный прогресс в понимании молекулярных основ миелопролиферативных заболеваний связан с недавним обнаружением ряда генетических дефектов, среди которых наиболее важными являются мутации генов *Jak2* и *MPL*. Эти и другие гены, с которыми связан молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний, кодируют регуляторные белки, обладающие тирозинкиназной активностью. Дефекты этих генов являются характерной особенностью данной группы заболеваний системы кроветворения.

**Ключевые слова:** миелопролиферативные заболевания, мутации генов тирозинкиназ.

### Введение.

Классические хронические Ph<sup>-</sup>-негативные миелопролиферативные заболевания (хМПЗ) – группа болезней, включающая в себя эритремию (истинная полицитемия, ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и идиопатический миелофиброз (ИМФ) [1,2].

Клиническую картину, свойственную ИМФ, с характерным фиброзом костного мозга и экстрамедуллярным кроветворением, впервые описал в 1879 году Gustav Heuck [3]. Истинную полицитемию в 1892 году впервые описал Louis Henri Vaquez [4]. Он предположил, что эритроцитоз и гепатоспленомегалия у наблюдавшегося им больного являлись следствием усиленной пролиферации гемопоэтических клеток. В 1903 году William Osler ввел термин «болезнь Вакеза» при описании несколько больных с выраженным эритроцитозом и спленомегалией [5]. В 1934 году Emil Epstein и Alfred Goedel выделили в отдельную нозологическую форму эссенциальную тромбоцитемию, описав больных с тромбоцитозом в отсутствие заметного эритроцитоза [6].

Более 30 лет назад с использованием в качестве метки явления инактивации одной из X-хромосом у женщин, было показано, что при хМПЗ большинство больных имеет клональные популяции миелоидных и эритроидных клеток [2,7]. Эти, а также более поздние исследования клональности при хМПЗ [8,9] позволили сделать вывод о том, что опухолевая масса при данных заболеваниях происходит от одной измененной гемопоэтической клетки-предшественницы. В 2002 году у больных эритремией была обнаружена потеря гетерозиготности в локусе 9q24, наблюдавшаяся как в миелоидном, так и в лимфоидном ростке [10,11]. Данный факт подтвердил высказанное ранее мнение о том, что при хМПЗ малигнизированная клетка-предшественница сохраняет способность дифференцироваться по всем росткам кроветворения. Кроме того, потеря гетерозиготности в локусе 9q24 при хМПЗ свидетельствовала о том, что с 9 хромосомой может быть связан один из молекулярных дефектов, лежащих в основе патогенеза этих заболеваний. Исследование цитогенетических аномалий 9 хромосомы при хМПЗ показало, что они возникают в соматических клетках и не передаются по наследству.

Таким образом, классические хМПЗ являются хроническими лейкозами с поражением на уровне клетки-предшественницы гемопоэза с характерной для опухоли неограниченной пролиферацией этой клетки, потомки которой дифференцируются по всем росткам кроветворения. При этом для эритремии свойственно преобладание красного ростка, для эссенциальной тромбоцитемии – мегакариоцитов и тромбоцитов. Классические хМПЗ и некоторые другие менее распространенные миелопролиферативные заболевания являются приобретенными, спорадическими нарушениями гемопоэза, однако, известны и наследственные формы миелопролиферативных заболеваний - семейные эритремия и тромбоцитемия.

При эритремии клетки-предшественницы гемопоэза способны образовывать эритроидные колонии в отсутствие экзогенного эритропоэтина. В меньшей степени эта особенность характерна для эссенциальной тромбоцитемии и идиопатического миелофиброза [12]. Получение эндогенных эритропоэтин-независимых колоний (ЭЭК) является одним из способов отличить истинную полицитемию от вторичного эритроцитоза [13,14]. Обнаружение феномена роста ЭЭК при эритремии и других хронических миелопролиферативных заболеваний (хМПЗ) явилось важной вехой в понимании механизмов, приводящих к развитию этих аномалий кроветворения. Этот феномен позволил предположить, что в основе патогенеза хМПЗ лежат дефекты, которые приводят к нарушению процесса реализации регуляторных сигналов, получаемых миелоидной клеткой из внешней среды [15,16]. Действительно, последующие исследования подтвердили эту догадку и позволили заключить, что молекулярные события, лежащие в основе патогенеза хМПЗ, связаны с дефектами генов, которые кодируют белки, ответственные за нормальное поддержание миелопоэза.

Поскольку определены уже многие из регуляторных процессов, необходимых для поддержания нормального миелопоэза, то существует возможность проведения целенаправленного и систематического изучения участвующих в этих процессах генов и их белковых продуктов с использованием молекулярно-биологических методов у пациентов с установленным диагнозом хМПЗ. Например, в настоящее время хорошо известны факторы, регулирующие поддержание эритрона. При снижении концентрации кислорода в крови на это реагируют интерстициальные клетки почек, ответственные за синтез эритропоэтина [17]. В этих клетках происходит сложный молекулярный процесс, затрагивающий работу множества генов. Основным регулятором этого процесса является индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1) [18,19]. Гетеродимерный белок HIF-1 состоит из двух субъединиц: HIF-1alpha и HIF-1beta (Рис.1).

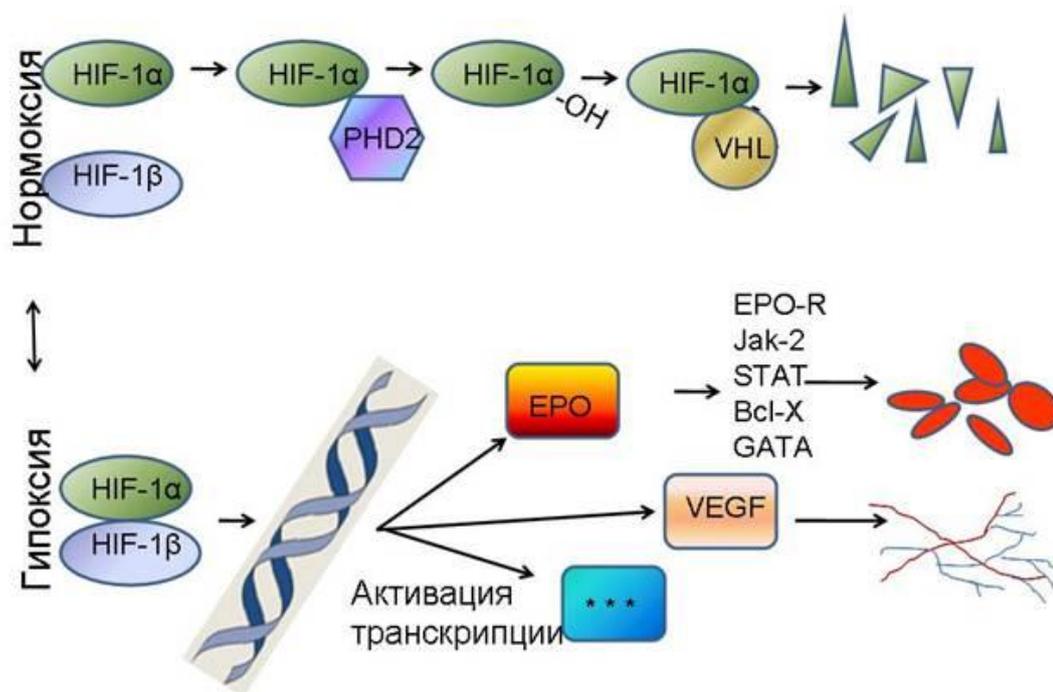


Рис.1. Эритропоэз в условиях нормо- и гипоксии. Пояснения в тексте.

При нормальной концентрации кислорода происходит гидроксилирование аминокислотных остатков пролина свободно существующей молекулы HIF-1 $\alpha$  в результате активности особого регуляторного фермента PHD2 (prolyl 4-hydroxylase-2), который является молекулярным сенсором кислорода [20]. Измененная таким образом субъединица HIF-1 $\alpha$  приобретает способность связываться с белком фон

Хиппель-Линдау (белок VHL – опухолевый супрессор; с мутациями гена, кодирующего этот белок, связан наследственный синдром фон Хиппель-Линдау, для которого характерны множественные гемангиомы, а также почечная карцинома, рак поджелудочной железы, ангиома сетчатки глаза). Белок VHL, в свою очередь, образует комплекс с рядом других белков, относящихся к классу E3-убиквитин-лигаз. Активированные убиквитин-лигазы образуют ковалентную связь с некоторыми другими белками, являясь для последних своеобразной «черной меткой», которая означает, что получивший такую метку «убиквитинизированный» белок вскоре должен быть направлен в протеосому и там разрушен. Таким образом, связывание белка VHL с гидроксированными пролинами HIF-1 $\alpha$  приводит к убиквитинизации этого белка и последующей его протеосомной деградации. В состоянии гипоксии белковая молекула HIF-1 $\alpha$  не гидроксимируется и остается стабильной, избежав убиквитин-зависимого протеолиза. Субъединицы HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  объединяются, и образовавшийся в результате этого гетеродимерный белок HIF-1 направляется из цитоплазмы в ядро, где связывается с особыми последовательностями ДНК в промоторных областях генов, экспрессия которых индуцируется гипоксией. В ответ на последовательность этих регуляторных событий интерстициальные клетки почек выделяют в кровеносное русло эритропоэтин [21].

Клетки-предшественницы миелопоэза осуществляют заложенную в них генетическую программу в ответ на стимулирующее воздействие цитокинов, которые связываются с соответствующими рецепторами на поверхности этих клеток. Для группы хМПЗ особое значение имеют эритропоэтин (EPO) и тромбопоэтин (THPO), а также рецепторы этих цитокинов EPO-R и MPL. Связывание эритропоэтина с EPO-R приводит к димеризации этого рецептора (Рис.2).

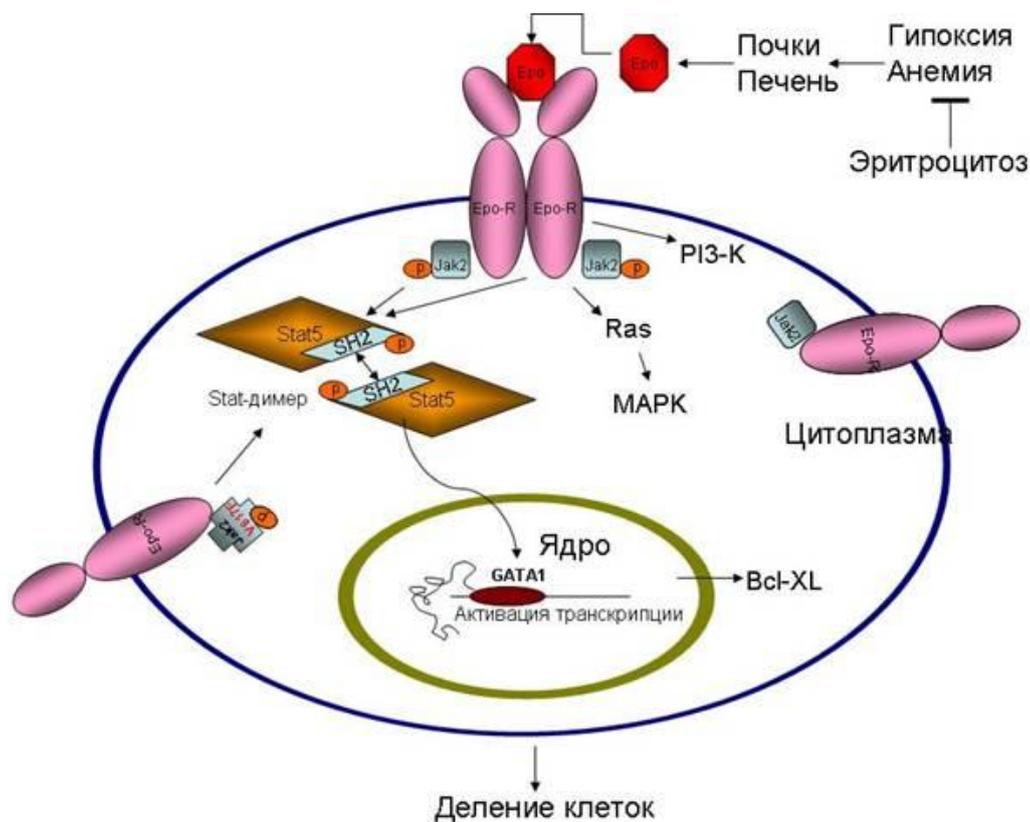


Рис.2. Связывание молекулы эритропоэтина с рецептором на поверхности предшественников эритроцитов. Сигнал от EPO-R передается внутрь клетки посредством JAK-2. Мутантная форма JAK2V617F сохраняет активность в отсутствии связывания эритропоэтина.

С внутриклеточными доменами EPO-R связана киназа Jak2, которая активируется в ответ на димеризацию рецептора. Белок Jak2 принадлежит семейству Janus-киназ (Jak), которая включает в себя четырех представителей (Jak1, Jak2, Jak3 и TYK2), но для гемопоэза особое значение среди них имеет именно киназа Jak2, которая осуществляет передачу сигнала не только от эритропоэтина, но и от тромбопоэтина и колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF). Активированная Jak2 киназа фосфорилирует ряд цитоплазматических белков-мишеней, важнейшими из которых являются адапторные белки семейства STAT (signal transducers and activators of transcription) [22]. Конститутивная активация гена STAT3 была обнаружена у 30% больных эритремией [23]. Снижение уровня экспрессии рецептора тромбопоэтина MPL было описано при эритремии и при эссенциальной тромбоцитемии [24,25]. Авторы данных сообщений высказали предположение, что в рассмотренных ими случаях хМПЗ снижение уровня рецептора тромбопоэтина являлось вторичным по отношению к неизвестному генетическому дефекту, который ответственен за развитие данных заболеваний. Способность этого неизвестного фактора вызывать гиперплазию миелоидного ростка должно быть настолько сильным, что ему не способно противодействовать снижение экспрессии MPL, носящее явный компенсаторный характер.

Таким образом, гены, кодирующие HIF-1, VHL, PHD2, EPO, EPO-R, TPO, MPL, Jak2, STATn, а также сопряженные с ними, необходимы для поддержания нормального миелопоэза. В процессе поиска специфических генетических нарушений структура этих генов была проанализирована у пациентов с врожденными и приобретенными формами хМПЗ.

### **Наследственные хМПЗ.**

При анализе семейного эритроцитоза, связанного с аномальной реакцией на гипоксию, были найдены дефекты гена VHL, приводящие к снижению деградации и повышению уровня фактора HIF-1. Гомозиготная мутация 598C>T этого гена приводит к семейному эритроцитозу, характерному для представителей населения Чувашии (семейный эритроцитоз 2 типа или чувашский, или VHL-зависимая полицитемия; OMIM 263400) [26]. Известны и другие варианты дефектного гена VHL, с которыми связаны наследственные формы эритроцитоза в других человеческих популяциях. Кроме того, семейный эритроцитоз может быть связан с мутациями, затрагивающими цитоплазматический домен рецептора эритропоэтина EPO-R (семейный эритроцитоз 1 типа; OMIM 133100) [27], а также с дефектами гена EGLN1, кодирующего пролил-гидроксилазу PHD2 (семейный эритроцитоз 3 типа; OMIM 609820) [28-30]. Интересны случаи семейного эритроцитоза, связанного с мутациями альфа- и бета-глобиновых генов. Например, мутация бета-глобинового гена beta109 Val->Leu приводит к синтезу варианта гемоглобина, называемого Hb Johnstown [31]. Эта форма гемоглобина обладают повышенным сродством к кислороду, что приводит к гипоксии, которая, по закону обратной связи, компенсируется за счет усиленного образования эритроцитов, что проявляется в виде эритроцитоза, имеющего наследственный характер.

Наследственная тромбоцитемия или семейный тромбоцитоз является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором клинические проявления напоминают те, которые наблюдаются при эссенциальной тромбоцитемии (в литературе описано несколько случаев этого заболевания в некоторых семьях Дании, Японии и Польши). Активная пролиферация мегакариоцитов и избыток тромбоцитов при этом заболевании чаще всего зависят от мутаций 5'-нетранслируемого (5'-UTR) участка гена тромбопоэтина TPO [32-40]. В 5'-нетранслируемой области мРНК TPO находится короткая открытая рамка считывания, которая конкурирует с рамкой считывания белка TPO за связывание рибосом. Наличие этой дополнительной короткой рамки считывания обуславливает механизм негативной регуляции трансляции мРНК тромбопоэтина. Мутации, исключаяющие эту последовательность из-за дефекта сплайсинга или нарушающие ее структуру путем сдвига рамки считывания, приводят к усилению транскрипционной

активности мРНК и повышению уровня тромбopoэтина и тромбоцитов. Однако семейный тромбоцитоз может зависеть и от дефектов других генов. Японскими авторами описана форма этого заболевания, которая связана с мутацией рецептора тромбopoэтина MPL, которая приводит к замене серина на аспарагин в 505 положении аминокислотной последовательности этого белка [41]. Эта мутация приводит к гиперактивности тромбopoэтинового рецептора и усиленной пролиферации мегакариоцитов. Недавно была описана форма наследственной тромбоцитемии в семьях испанского происхождения [42], при которой анализ сцепления с использованием микросателлитных маркеров исключил участие в развитии заболевания генов TNPO и MPL. При проведении семейного анализа было обнаружено достоверное сцепление маркеров из локуса, в котором расположен ген TIE, с клиническими признаками данного заболевания. Ген TIE кодирует характерный для мегакариоцитов и клеток эндотелия тирозинкиназный рецептор. Авторы предположили, что выявленный ими случай семейного тромбоцитоза связан с нарушением работы именно этого гена.

### **Классические Ph'-негативные хМПЗ.**

В 1951 году Вильям Дамешек [1] предложил объединить ИП, ЭТ и ИМФ вместе с хроническим миелолейкозом в одну группу благодаря сходству клинических и морфологических свойств, а также на основании предположения об общей патогенетической природе этих заболеваний. Однако до недавнего времени молекулярные дефекты и соответствующие маркеры хМПЗ были неизвестны, поэтому арсенал рутинных лабораторных методов, применявшихся для диагностики хМПЗ, исчерпывался методикой получения ЭЭК, оценкой клональности и определением уровня эритропоэтина и тромбopoэтина в крови больных [43].

При проведении цитогенетических исследований у больных хМПЗ выявляются различные хромосомные аномалии [44-52]. При ИП чаще всего наблюдают делецию длинного плеча 20 хромосомы (20q-) и аномалии 9 хромосомы [44-47,10,12], при ЭТ обнаруживают трисомию 8 и 9 хромосом, делеции 5, 7, 13, 17 и 20 хромосом [48], для ИМФ характерны делеции 13q- и 20q-, частичная дупликация 1 хромосомы, трисомия 8 хромосомы и аномалии 7 и 9 хромосом [49-51]. Однако эти аномалии скорее свидетельствуют о гетерогенности хМПЗ или указывают на клональную эволюцию и не могут рассматриваться в качестве диагностических маркеров или исходных патогенетических признаков. Была предпринята попытка найти среди генов, которые утрачиваются при делециях 20 и 13 хромосом, кандидатов на роль участников патогенетического процесса, приводящего к развитию хМПЗ, но интенсивное исследование этих локусов пока не привело к осязательному результату [52]. Определенные надежды связаны только с геном L3MBTL из длинного плеча 20 хромосомы, для которого при хМПЗ описано явление генетического импринтинга [53], заключающееся в том, что активной является только одна копия гена, принадлежащая либо материнской, либо отцовской хромосоме.

В 2000 году с использованием метода вычитающей гибридизации на основе супрессионной ПЦР был проведен поиск генов, экспрессия которых отличает зрелые гранулоциты больных ИП и здоровых доноров. В результате был обнаружен первый молекулярный маркер хМПЗ – гиперэкспрессия гена PRV-1, кодирующего белок, относящийся к суперсемейству рецепторов uPAR [54]. Оказалось, что количественная оценка уровня экспрессии гена PRV-1 является очень чувствительным и специфическим молекулярным показателем при проведении дифференциального диагноза между больными эритремией и вторичным эритроцитозом. Важно, что гиперэкспрессия этого гена не зависела от стадии заболевания и определялась в 90-100% случаев первичных и длительно болеющих пациентов. [55,56]. Кроме того, гиперэкспрессия PRV-1 была обнаружена почти у 50% пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и идиопатическим миелофиброзом [57-60]. В 2005 году у больных, страдающих хМПЗ, была обнаружена точечная мутация 14

экзона гена JAK2 киназы, при которой в псевдокиназном домене JH2 белка JAK2 происходит замена аминокислоты валин на фенилаланин в 617 положении (мутация JAK2V617F) (Рис.3,4)[61-64].

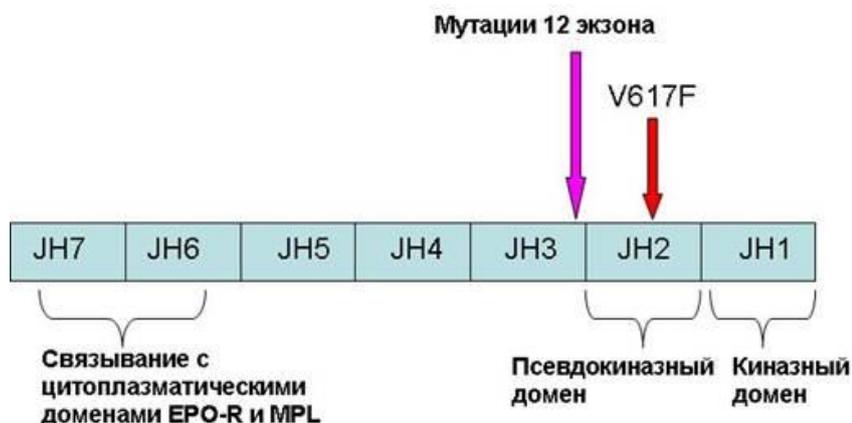


Рис.3. Расположение доменов белка JAK2 и мутаций, характерных для хМПЗ.

Ген JAK2 расположен в локусе 9q24, для которого ранее была описана потеря гетерозиготности при хМПЗ [6]. Таким образом, удалось обнаружить и охарактеризовать молекулярный дефект 9 хромосомы, лежащий в основе патогенеза хМПЗ, который ранее наблюдали лишь только путем анализа сцепления патогенетического признака с косвенными молекулярными маркерами, расположенными в локусе 9q24. При помощи анализа герминальной ДНК было показано, что JAK2V617F является соматической мутацией, возникающей в гемопоэтических клетках-предшественниках. Оказалось, что у определенной доли пациентов при хМПЗ, и в основном при эритремии, эта мутация в клетках-предшественниках гемопоэза представлена в гомозиготной форме. У таких больных происходит превращение гетерозиготной мутации JAK2V617F в гомозиготную форму благодаря митотической рекомбинации и дупликации мутантного аллеля. Мутация JAK2V617F обнаруживается у 90-95% больных эритремией, в 50-70% случаев эссенциальной тромбоцитемии и в 40-50% случаев миелофиброза. Мутация JAK2V617F оказалась полезным маркером, при помощи которого можно проводить первичную и дифференциальную диагностику хронических миелопролиферативных заболеваний, а также молекулярный мониторинг минимальной остаточной болезни [65,66]. Вслед за JAK2V617F у небольшого числа JAK2V617F-негативных больных, страдающих эритремией, был открыт кластер мутаций гена JAK2 в 12 экзоне (микроделеции и точечные мутации, затрагивающие аминокислотные остатки в положении 537-542 белка Jak2) (Рис.3) [67]. Соматические мутации гена JAK2 были найдены не только при хМПЗ. Например, точечная мутация киназного домена JAK2T875N была обнаружена при остром мегакариобластном лейкозе [68]. В случаях В-клеточного ОЛЛ, связанного с болезнью Дауна, описана делеция гена JAK2, при которой в положении 682-686 белка Jak2 утрачивается мотив IREED, принадлежащий консервативному участку псевдокиназного домена [69].

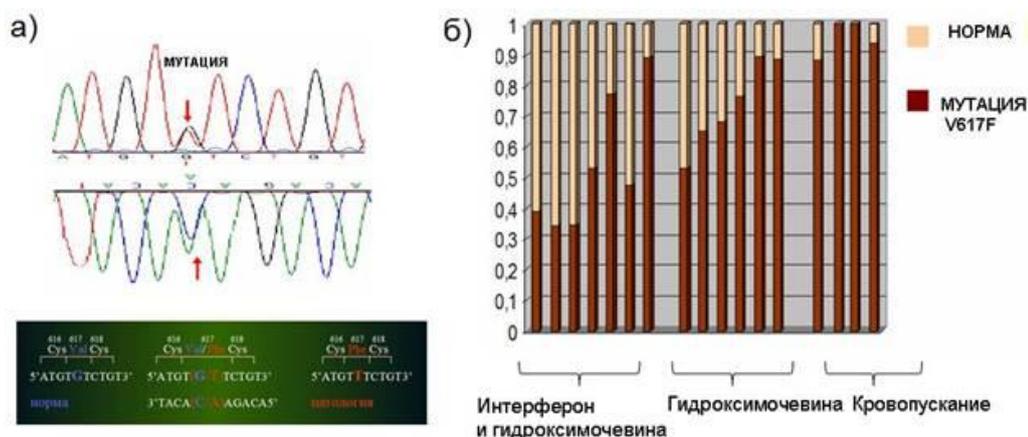
Обнаружение мутации JAK2V617F у больных Ph<sup>-</sup>-негативными хМПЗ явилось подтверждением высказанного Вильямом Дамешекком предположения о том, что в основе этой группы заболеваний должен быть общий патогенетический механизм. Однако, несмотря на то, что патогенетическая роль мутации JAK2V617F для манифестации классических хМПЗ не вызывает сомнений, остается еще много неясных вопросов, которые относятся к этиологии хМПЗ, не ассоциированных с JAK2V617F. Кроме того, не вполне понятно, каким образом один и тот же молекулярный дефект может приводить к развитию заболеваний, далеко не всегда совпадающих по своим клиническим проявлениям, хотя и относящихся к одной группе хМПЗ. И особенно удивительным представляется то, что единственная точечная мутация встречается у подавляющего большинства больных хМПЗ. Впрочем, последнее обстоятельство делает эту мутацию очень удобным диагностическим маркером.

Воздействие низкомолекулярным ингибитором гена JAK2 на эритроидную линию HEL, которая несет точечную мутацию JAK2V617F, приводит к остановке клеточного цикла. Это связано с тем, что подавление активности JAK2 снижает экспрессию гена адапторного белка STAT5, что влечет за собой подавление экспрессии циклина D2 и усиление экспрессии ингибитора клеточного цикла p27kip. Применение в аналогичном эксперименте для подавления экспрессии JAK2V617F малых ингибиторных РНК приводит к сходному эффекту. Активность JAK2V617F и STAT5 приводит также к увеличению уровня активных форм кислорода, которые способствуют переходу клеточного цикла из фазы G1 в S. Обработка несущих мутацию JAK2V617F клеток линии HEL антиоксидантом N-ацетилцистеином также приводит к остановке клеточного цикла, что сопровождается снижением экспрессии циклина D2 и увеличением экспрессии p27kip. Таким образом, регуляторный сигнал от JAK2V617F передается посредством адапторного белка STAT5 и активных форм кислорода генам циклина D2 и p27kip, что приводит к ускоренному переходу клеточного цикла из фазы G1 в S и усилению пролиферации эритроидных клеток, несущих мутантную форму гена JAK2 [70]. Эти и другие данные о молекулярном механизме патогенетического действия измененного гена JAK2 учитываются при разработке низкомолекулярных лекарственных средств направленного действия для лечения пациентов, страдающих JAK2V617F-положительными вариантами хМПЗ.

Кроме классических хМПЗ, мутация JAK2V617F была также обнаружена у небольшой доли пациентов с хроническим миеломоноцитарным лейкозом (ХММЛ), миелодиспластическим синдромом и острым миелолейкозом (ОМЛ) [71]. Однако у большинства пациентов с JAK2V617F-положительным ОМЛ началу этого заболевания предшествовал период эритремии, ЕТ или ИМФ. В научной литературе встречаются единичные упоминания о наличии этой мутации у больных ХМЛ [72]. В своей практике мы также наблюдали пациента с диагнозом ХМЛ, у которого помимо экспрессии гена p210 BCR-ABL была обнаружена и мутация JAK2V617F. Несмотря на то, что активация сигнального пути JAK-STAT характерна как для различных гемопоэтических злокачественных заболеваний, так и для солидных опухолей, присутствие точечной мутации JAK2V617F – феномен, характерный исключительно для поражений миелоидного ростка, и не описан ни для солидных опухолей, ни в случаях опухолей лимфоидного происхождения.

Обнаружение мутации JAK2V617F позволило разрешить существовавшую до недавнего времени дилемму: когда же при хМПЗ происходит злокачественная трансформация, на уровне стволовой гемопоэтической клетки или на уровне более поздних плюрипотентных клеток-предшественниц? При разделении клеток крови при помощи проточной цитофлуориметрии на отдельные фракции было показано, что у JAK2V617F-положительных больных хМПЗ эта мутация обнаруживается не только в миелоидных клетках, но и в В- и Т- лимфоцитах, а также в клетках натуральных киллеров. Таким образом, было показано, что эта мутация возникает, по крайней мере, у общего раннего предшественника миелоидных и лимфоидных клеток, однако только клетки миелоидной линии в связи с этим генетическим дефектом получают пролиферативное преимущество в сравнении с нормой [73]. Использование селекции клеток при помощи проточной цитофлуориметрии позволило обнаружить, что ИП, ЭТ и ИМФ различаются между собой по количеству несущих мутацию JAK2V617F зрелых миелоидных клеток и ранних предшественников [74]. Оказалось, что при ИП и ЭТ соотношение мутантного и нормального аллеля достаточно часто было низким в CD34+ клетках в сравнении со зрелыми нейтрофилами, однако при ИМФ содержание мутантных клеток было одинаково высоким как в зрелых, так и в незрелых клетках. Клональное доминирование, которые авторы работы [74] определили как совпадение высокой аллельной нагрузки мутантным геном во фракциях CD34+ клеток и зрелых нейтрофилов, было характерно для 24% ЭТ, 56% ИП и 93% ИМФ. Больные ИП с клональным доминированием демонстрировали более тяжелую клиническую картину в сравнении с теми больными, у которых этот феномен не был обнаружен. Таким образом, ЭТ, ИП и ИМФ различаются по частоте клонального доминирования, а при ИП этот признак является фактором неблагоприятного прогноза.

Связь уровня аллельной нагрузки с неблагоприятным течением хМПЗ была обнаружена разными авторами [66, 75-77] и в настоящее время является общепризнанным фактом (Рис.4).



Tutaeva V, Misurin AV, Michiels JJ, et al. *Hematology*. 2007 Dec;12(6):473-9

Рис.4. Мутация JAK2V617F при эритремии.

а) Определение первичной последовательности части 14 экзона гена JAK2 и выявление мутации JAK2V617F.

б) Аллельная нагрузка мутации JAK2V617F при разных видах терапии эритремии.

Поэтому теперь при проведении диагностических исследований при подозрении на хМПЗ, а также для осуществления контроля эффективности лечения, рекомендуется определять этот параметр, который выражают в виде отношения уровня мутантного аллеля JAK2V617F к уровню аллеля дикого типа JAK2wt. Качественного анализа или обычной констатации наличия или отсутствия данной мутации для полного понимания клинической картины при хМПЗ уже недостаточно.

В 2006 году при эссенциальной тромбоцитемии была найдена соматическая активирующая точечная мутация гена тромбопоэтинового рецептора MPLW515L,K, которая нехарактерна для наследственной формы этого заболевания. Мутация MPLW515L,K встречается у 5-10% больных ЭТ и ИМФ, отрицательных по JAK2V617F [78]. Исследования *in vitro* показали, что замена триптофана на лейцин или лизин в 515 положении белка MPL приводит к активации регуляторного пути JAK2-STAT, что происходит и в случае мутации JAK2V617F. Однако клинические наблюдения показывают, что MPLW515L,K приводит к сдвигу в сторону мегакариоцитарного компонента миелопоэза, что свидетельствует о неполном совпадении эффектов, оказываемых на регуляторные пути мутациями JAK2V617F и MPLW515L,K.

### Редкие варианты МПЗ.

Современная классификация ВОЗ включает в число МПЗ также и более редко встречающиеся патологии миелопоэза: хронический нейтрофильный лейкоз (ХНЛ), гиперэозинофильный синдром (ГЭС) или хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), а также неклассифицируемые МПЗ [79]. Кроме того, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) и Ph-отрицательный ХМЛ относят к так называемым миелодиспластическим/миелопролиферативным заболеваниям, так как при их возникновении наблюдается как гипер-, так и дисплазия компонентов миелоидного кроветворения. Системный мастоцитоз (СМ) также относят к МПЗ в связи с миелоидным происхождением mast клеток. Данные

заболевания возникают в результате трансформации стволовой кроветворной клетки, что приводит к клональному поражению гемопоэза и гиперплазии клеток миелоидного роста.

Известные на сегодняшний день молекулярные механизмы развития МПЗ связаны с гиперактивацией тирозинкиназ либо с аномалиями рецепторов цитокинов (Рис.5).

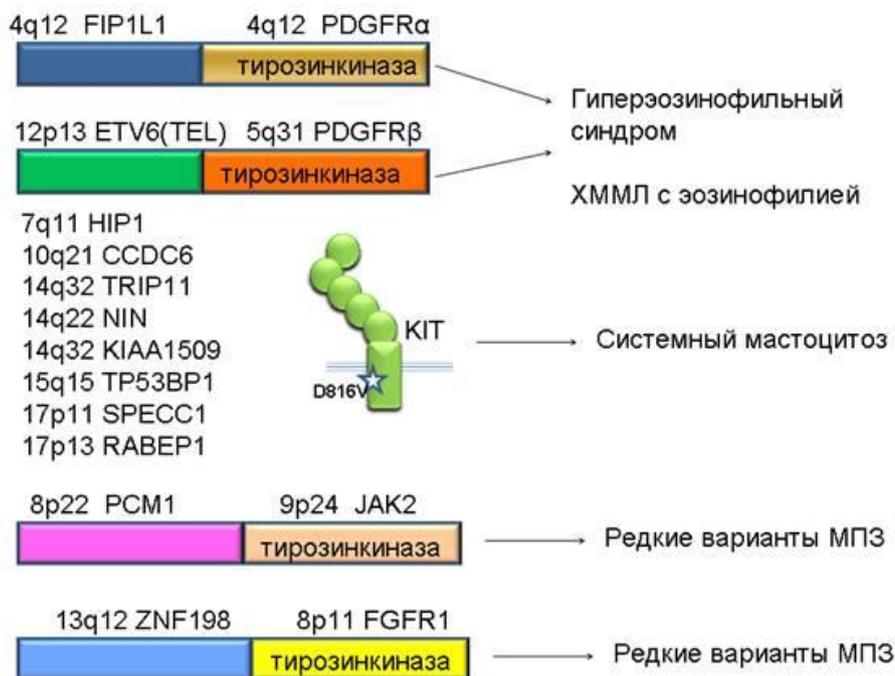


Рис.5. Варианты мутаций тирозинкиназных генов при МПЗ.

Расшифровка этих механизмов началась с выявления при ХМЛ патогенетической роли химерного онкогена BCR/ABL, обладающего аномальной тирозинкиназной активностью. Затем была установлена связь ГЭС с хромосомными перестройками, вовлекающими в образование химерных онкогенов рецептор фактора роста фибробластов-1 (FDFR1) и рецепторы тромбоцитарных факторов роста alpha и beta (PDGFRA и PDGFB) [80-82]. Кроме того, при CM была обнаружена мутация рецептора фактора роста стволовых клеток, кодируемого геном c-KIT (c-KIT D816V) [83].

Рассмотренные выше мутации генов Janus киназы 2 (JAK2) и тромбопоэтинового рецептора MPL также затрагивают регуляторные пути, зависящие от тирозинкиназной активности.

### Химерные онкогены, образованные из генов, кодирующих тирозинкиназы.

#### Ген BCR/ABL при хроническом миелолейкозе.

Специфическим маркером хронического миелолейкоза (ХМЛ) является филадельфийская хромосома (Ph<sup>1</sup>), которая возникает в результате реципрокной транслокации t(9;22) [84,85]. Почти во всех случаях ХМЛ разрыв 22-й хромосомы в гене BCR происходит в небольшом локусе M-bcr размером 5.8 т.п.н. Разрыв 9-й хромосомы возникает в протяженной 5'-области гена ABL длиной свыше 300 т.п.н. [84]. При осуществлении транслокации t(9;22) в составе Ph<sup>1</sup>-хромосомы образуется химерный ген BCR/ABL, белковый продукт которого p210 BCR/ABL служит причиной развития хронического миелолейкоза [85,86]. С равной частотой при ХМЛ выявляются транскрипционные варианты м-РНК BCR/ABL типов b2a2 и b3a2, причем в последнем случае белок p210 имеет в своем составе дополнительные 25 аминокислотных остатка, кодируемые

экзоном b3 (или e14). Белок p210 BCR/ABL обладает постоянной высокой тирозинкиназной активностью, которая приводит к накоплению дополнительных генетических дефектов и последующей трансформации миелоидных предшественников [87]. Было обнаружено, что N-концевая часть белка BCR способна связываться с SH2 доменом белка ABL [87,88]. Высказано предположение, что такое взаимодействие может осуществляться и в единой химерной молекуле p210 BCR/ABL. При этом может инактивироваться расположенный поблизости SH3 домен, который является негативным регулятором тирозинкиназной функции домена SH1. Однако следует заметить, что известные белки-ингибиторы тирозинкиназной активности ABL связываются непосредственно с доменом SH3 (3BP-1 [89], Abi-2 [90]), а не с доменом SH2. Интересно, что белок 3BP-1 имеет некоторое структурное сходство с BCR [89]. Аномальная тирозинкиназная активность белка p210 BCR/ABL приводит к нарушению регуляции многих внутриклеточных сигнальных путей [90,91]. Трансформирующее влияние онкогена BCR/ABL осуществляется многими путями, которые взаимно дополняют друг друга. Белок BCR/ABL реализует свою трансформирующую активность путем фосфорилирования и/или физического связывания с различными регуляторными и адапторными белками в клетках-предшественниках гематопоэза. В результате этого в опухолевых клетках происходит подавление апоптоза, нарушается их созревание, уменьшается зависимость от ростовых факторов, ослабевает способность к адгезии, изменяется характер миграции. В этот процесс оказываются вовлеченными RAS, P13K/АКТ, JNK и SRC киназы, фосфатазы белков и липидов, факторы транскрипции STAT, NF- $\kappa$ B и c-MYC [92,93]. Предполагают, что, действуя на регуляцию транскрипционных факторов BACH2, C/EBP $\beta$  и C/EBP $\delta$ , а также изменяя характер сплайсинга м-РНК Ikaros, белок p210 BCR/ABL приводит к блоку дифференцировки [93]. Кроме того, этот белок воздействует на процессы гомологичной рекомбинации, репарации, уменьшает защитную роль контрольных точек клеточного цикла, увеличивает опасность окислительного повреждения ДНК. Это приводит к накоплению дополнительных генетических поломок, среди которых описаны мутации генов TP53, RB и p16INK4A, транслокации, вовлекающие гены CBFA, CBFB и другие. При переходе в бластный криз усиливается экспрессия гена BCR/ABL и наблюдается гиперэкспрессия некоторых генов, работа которых в хронической фазе ХМЛ подавлена, как и в норме. Так, например, при переходе в фазу акселерации и бластный криз происходит гиперэкспрессия онкомаркера PRAME [94].

Расшифровка молекулярных механизмов ХМЛ создала предпосылки для разработки новых способов терапии этого заболевания. Появление в арсенале гематологов ингибиторов тирозинкиназной активности, специфически подавляющих функцию химерного онкогена BCR/ABL, привело к настоящей революции в лечении ХМЛ [95]. Знание регуляторных путей, затрагиваемых онкогеном BCR/ABL, расширяет спектр потенциальных молекулярных мишеней для терапии ХМЛ. Изучение антигенных свойств опухолевых клеток стимулирует исследования по созданию схем иммунотерапии ХМЛ. Перспективной мишенью для иммунотерапии ХМЛ является онкомаркер PRAME, способный инициировать противоопухолевый ответ, зависящий от активности цитотоксических Т-лимфоцитов [96].

### **Ген FIP1L1/PDGFR $\alpha$ и хронический эозинофильный лейкоз.**

По разным оценкам, от 12 до 47% случаев ХЭЛ связано с делецией 4 хромосомы, в результате которой образуется химерный ген FIP1L1/PDGFR $\alpha$  [97]. Конститутивная тирозинкиназная активность соответствующего онкобелка определяется тем, что в его состав входят киназные домены PDGFR $\alpha$  за исключением регуляторного ингибиторного домена.

### **Рearанжировки гена PDGFR $\beta$ при хроническом миеломонобластном лейкозе.**

Рearанжировка гена PDGFRB (5q33)– результат транслокации t(5;12)(q33;p12) - впервые была описана у больных ХММЛ с эозинофилией. Эта транслокация приводит к образованию слитного гена ETV6/PDGFRB. Этот вариант перестройки гена PDGFRB встречается у больных ХММЛ чаще всего. Однако список генов-партнеров, с которыми PDGFRB образует химерные онкогены с повышенной тирозинкиназной активностью, постоянно пополняется. Среди них HIP1 (7q11), SPECC1 (17p11), RABEP1 (17p13), NIN (14q22), KIAA1509 (14q32), TRIP11 (14q32), CCDC6 (10q21), TP53BP1 (15q15) [98]. Для повышенной тирозинкиназной активности таких химерных онкобелков необходима олигомеризация, которая осуществляется за счет доменов, кодируемых генами-партнерами PDGFRB.

### **Химерные онкогены, в образовании которых участвует FGFR1.**

Ген рецептора фактора роста фибробластов FGFR1 (8q11) участвует в реаранжировках с множеством генов-партнеров, среди которых ZNF198 (13q12), BCR (22q11), TRIM24 (7q32), CEP1 (9q33), LOC113386 (19q13.3), MYO18A (17q11), FGFR10P (6q27), FGFR10P2 (11q22). В результате образуются химерные белки, которые олигомеризуются путем нековалентного связывания доменов, которые кодируются генами-партнерами FGFR1. Образование олигомерных комплексов приводит к постоянной и высокой тирозинкиназной активности доменов FGFR1, входящих в состав этих химерных белков. Многие из генов-партнеров FGFR1 кодируют белки centrosомы, для которых характерно образование олигомерных комплексов. Высказано предположение о том, что и химерные белки, составленные из белков centrosомы и FGFR1, могут включаться в состав centrosомы, приводя к дестабилизации этой внутриклеточной органеллы, что влечет за собой нарушение регуляции клеточного цикла. Чаще всего ген FGFR1 перестраивается в результате транслокации t(8;13)(p11;q12), которая приводит к образованию химерного онкогена ZNF198/FGFR1 [98].

### **Химерные онкогены с участием JAK2.**

Описаны 3 транслокации, вовлекающие ген JAK2: t(8;9)(p22;p24), t(9;22)(p24;q11) и t(9;12)(p24;p13), которым соответствуют химерные онкогены PCM1/JAK2, BCR/JAK2 и ETV6/JAK2 [99-101]. Ген PCM1/JAK2 обнаруживается чаще всего при атипичном ХМЛ, МПЗ/МДС, ХЭЛ, при эритролейкозе, кроме того, при ОМЛ, пре-В-ОЛЛ и при Т-клеточной лимфоме. Описано несколько случаев типичного ХМЛ с обнаружением химерного онкогена BCR/JAK2. Химерный онкоген ETV6/JAK2 выявляется при атипичном ХМЛ, а также при Т- и В-ОЛЛ. Для этих химерных белков также характерна аномальная тирозинкиназная активность.

### **Молекулярная диагностика МПЗ.**

Для выявления химерных онкогенов, характерных для МПЗ, используют метод ОТ-ПЦР как в классическом варианте, позволяющем получить информацию о наличии или отсутствии анализируемого маркера, так и в модификации этого метода, которая предусматривает проведение стадии ПЦР в режиме реального времени. ПЦР в реальном времени позволяет количественно оценивать уровень исследуемого онкомаркера, что дает возможность правильно судить об эффективности используемой терапевтической тактики и вовремя изменять схему лечения, если ответ оказывается недостаточным.

Точечные мутации JAK2V617F и MPLW515L,K, микроделеции 12 экзона гена JAK2 при хМПЗ, а также точечную мутацию c-KIT D816V при СМ определяют при помощи ПЦР с последующим секвенированием

ампликонов. Кроме того, для выявления данных генетических дефектов применяют системы ПЦР с использованием аллель-специфических праймеров, способных различить мутантные варианты этих генов и структуры дикого типа. Для определения аллельной нагрузки применяют ПЦР в реальном времени с использованием аллель-специфических праймеров или зондов, либо исследует высоту пиков электрофореграммы, полученной при проведении прямого секвенирования ампликонов. При этом высоту пиков, соответствующих норме или патологии, сравнивают с высотой соседнего пика, соответствующего основанию, которое не бывает вовлечено в мутационный процесс при данных заболеваниях.

Несколько реже для молекулярной диагностики МПЗ применяют высокоразрешающий анализ кривых плавления продуктов ПЦР-амплификации, пиросеквенирование, высокоэффективную жидкостную хроматографию в денатурирующих условиях, тандемную масс-спектрометрию и ДНК-микрочипы, что связано с недостаточно широким распространением данных методик в лабораториях, проводящих рутинные исследования.

Современные данные о молекулярном патогенезе МПЗ позволяют составить оптимальный алгоритм проведения молекулярной диагностики этих заболеваний (Рис.6).

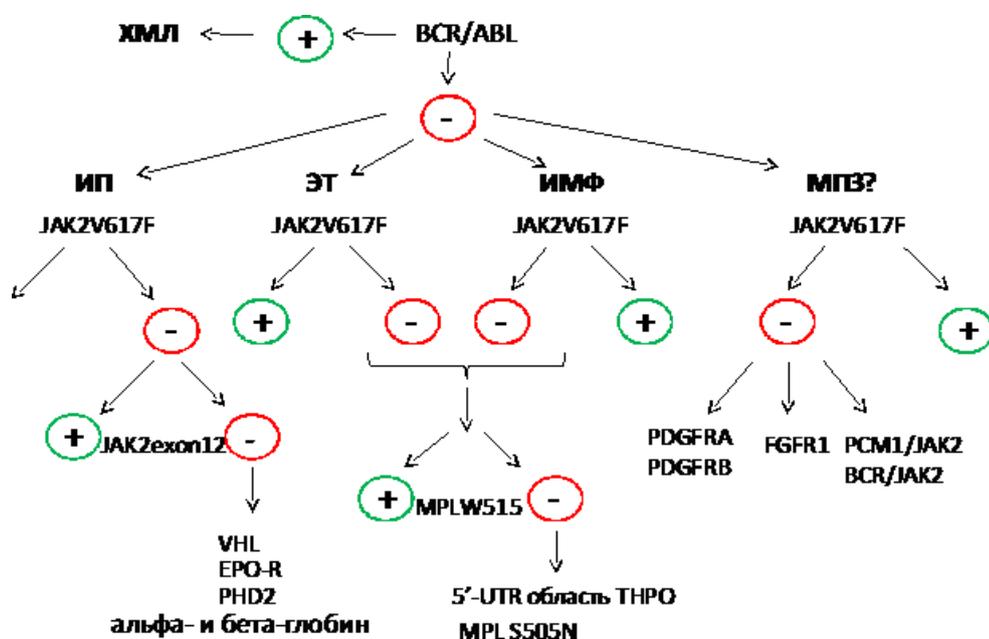


Рис.6. Алгоритм молекулярной диагностики МПЗ. Определение химерного онкогена BCR/ABL позволяет провести дифференциальный анализ XML и Rh-негативных МПЗ. Если в случае Rh-негативных МПЗ мутация JAK2V617F не найдена, то в случае ИП следует осуществить поиск мутаций в 12 экзоне гена JAK2, а в случае ЭТ и ИМФ – мутаций MPLW515L,K. В случае отрицательного результата следует исключить возможность наследственных дефектов генов VHL, EPO-R, PHD2, THPO, MPL и генов глобинов. При редких видах МПЗ, негативных по JAK2V617F, целесообразно осуществить поиск химерных онкотирозинкиназ.