

А.В. Виноградов¹, С.В. Сазонов^{2,3}

РОЛЬ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ASXL1 В ОНКОГЕНЕЗЕ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ ВЗРОСЛЫХ

¹ ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

² ГАУЗ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи
«Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация;

³ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. *Цель исследования* — оценить значение мутаций гена ASXL1 в онкогенезе острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) взрослых. *Материалы и методы.* Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 49 больных в возрасте от 18 до 84 лет с впервые выявленным ОМЛ, наблюдавшихся в Свердловском областном онкогематологическом центре. Среди них с морфологическим вариантом ОМЛ M0 – 3, M1 – 4, M2 – 19, M3 – 6, M4 – 10, M5 – 1, M6 – 1, M7 – 1, бластная плазмацитоидная дендритно-клеточная опухоль – 1, острый гибридный лейкоз – 2, ОМЛ в исходе ХМПЗ – 2. Детекцию мутаций в гене ASXL1 проводили в образцах периферической крови и костного мозга методом прямого секвенирования тотальной РНК (n=26) и массового параллельного секвенирования ДНК (n=23) на автоматических генетических анализаторах ABI Prism 310 и MiSeqDX, соответственно. *Результаты.* Установлено, что патогенетически значимые мутации гена ASXL1 обнаруживались в 16,3% проб при ОМЛ M0, M2, M4, ОМЛ из ХМПЗ и остром гибридном лейкозе. В 4 случаях они были представлены делецией p. Del (1755;2007), в 3 – дупликацией c.1934dupG, в одном – несинонимичной трансверсией c.1348A>T. Наряду с мутациями гена ASXL1 в указанных образцах определялись количественные и структурные aberrации хромосом, в т.ч. del(5)(q13), t(8;21)(q22;q22), t(9;22)(q34;q11), а также точечные мутации в генах SEBPA, IDH2, NRAS, RUNX1, SRSF2, TET2, внутренняя tandemная дупликация FLT3. Это указывает на кооперацию двух и более мутационных событий в онкогенезе ASXL1-позитивных ОМЛ, что, по-видимому, определяет различный ответ опухоли на химиотерапевтическое лечение и прогноз заболевания.

Ключевые слова: мутация, острый миелоидный лейкоз, ген ASXL1, онкогенез, возраст

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Виноградов Александр Владимирович

a.vinogradov@egov66.ru

Дата поступления: 12.07.2023

Образец цитирования:

Виноградов А.В., Сазонов С.В. Роль мутаций в гене ASXL1 в онкогенезе острых миелоидных лейкозов взрослых. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2023, Том 20, № 3, с. 18–23, DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-3-18-23

Ген ASXL1, расположенный в области 20q11.21, является одним из трех членов семейства человеческих гомологов гена Asx (Additional sex combs) дрозофилы и участвует в эпигенетической регуляции. Соматические мутации гена ASXL1 обнаруживаются при многих миелоидных опухолях, таких как миелодиспластический синдром, хронический миеломоноцитарный лейкоз, а также острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Кроме того, латентные аномалии ASXL1 часто выявляются при клональных изменениях кроветворения, связанных со старением у клинически

здоровых доноров. При этом большинство мутаций ASXL1, выявляемых как при клональном гемопоэзе, так и злокачественных новообразованиях миелоидной ткани, представляют собой мутации со сдвигом рамки считывания или нонсенс-мутации в экзоне 12, обуславливающие синтез укороченной С-концевой формы полипептида. Показано, что кодируемый геном ASXL1 белок участвует в эпигенетической модуляции кроветворения посредством взаимодействия с комплексом PRC2 (polycomb repressive complex 2) и различными регуляторами транскрипции, а также ядерными рецепторами ретиноевой кислоты и гормонов, в т.ч. эстрогенов и андрогенов. Однако, несмотря на то, что аномалии гена ASXL1 достаточно широко распространены при различных гемобластозах и клональном гемопоэзе, их роль в онкогенезе ОМЛ продолжает активно исследоваться, в т.ч. — в контексте их взаимодействия с другими мутационными событиями, обуславливающими различные фенотипические характеристики опухоли [1-3].

Цель работы — оценить значение мутаций гена ASXL1 в онкогенезе острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) взрослых больных.

Материалы и методы

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 49 больных ОМЛ в возрасте от 18 до 84 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2012 по 2022 г. Среди них с морфологическим вариантом ОМЛ M0 по классификации ВОЗ [4] наблюдалось трое пациентов, M1 – 4, M2 – 19, M3 – 6, M4 – 10, M5 – 1, M6 – 1, M7 – 1, бластная плазмацитоидная дендритно-клеточная опухоль – 1, острый гибридный лейкоз – 2, ОМЛ в исходе хронических миелопролиферативных заболеваний (ХМПЗ) – 2. Диагноз устанавливался на основе клинической картины, цитологического, цитохимического исследования, по медицинским показаниям для его уточнения осуществлялось иммунофенотипирование, а также гистологическое, иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата подвздошной кости [4].

Детекцию мутаций в гене ASXL1 проводили в образцах периферической крови и костного мозга методом прямого секвенирования тотальной РНК (n=26) и массового параллельного секвенирования ДНК (n=23) на автоматических генетических анализаторах ABI Prism 310 и MiSeqDX, соответственно. Кроме того, в образцах, исследованных методом прямого секвенирования, были протестированы на наличие ко-мутаций гены FLT3 (n=24), NRAS (n=23), c-KIT (n=22), WT1 (n=22), TP53 (n=21), NPM1 (n=21), DNMT3A (n=20) и TET2 (n=17) в соответствии с ранее описанными методиками [5-7]. В 48 случаях выполнено цитогенетическое (G-banding) и/или молекулярно-генетическое исследование для типирования хромосомных аномалий. Экспрессия транскриптов химерных генов, образующихся в результате реципрокных транслокаций, подтверждалась методом полимеразной цепной реакции.

Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA X [8]. Патогенетическую значимость выявленных мутаций оценивали в соответствии с классификацией AMP/ACMG/ASCO/CAP для интерпретации соматических генетических вариантов [9]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия хи-квадрат, доверительные интервалы (ДИ) определяли на основе оценки средних значений с вероятностью 95%.

Результаты исследования, обсуждение

Точечные мутации гена ASXL1 выявлены в 8 пробах (16,3%, при 95% ДИ от 8,5 до 29,0%) при ОМЛ M0, M2, M4, остром гибридном лейкозе (ОМЛ/ОЛЛ ВП) и ОМЛ в исходе ХМПЗ. Они были представлены делецией p. Del (1755;2007) (n=4, 8,1%, при 95% ДИ от 3,2 до 19,2%), дупликацией c.1934dupG (n=3, 6,1%, при 95% ДИ от 2,1 до 16,5%), а также несинонимичной трансверсией c.1348A>T (n=1, 2,0%, при 95% ДИ от 0,4 до 10,7%). Известно, что дупликация c.1934dupG является одним из наиболее часто встречающихся молекулярных повреждений в гене ASXL1 и сопровождается вставкой дополнительного гуанина в положении 1935 кодирующей последовательности. Это обуславливает сдвиг рамки считывания, преждевременную терминацию трансляции и синтез укороченного полипептида. Делеция нуклеотидов p. Del (1755;2007) также приводит к образованию стоп-кодона, что также ведет к потере С-терминальной последовательности кодируемого белка. Как следствие, при

обоих мутациях происходит нарушение эпигенетической регуляции экспрессии генов, регулирующих рост и дифференцировку кроветворных клеток, что, по данным литературы [1-3], может обуславливать их предлейкемическое состояние. Подробной информации по молекулярным последствиям замены с.1348A>T для регуляции генов-мишеней ASXL1 в доступной литературе найти не удалось, однако указано, что в соответствии с классификацией AMP/ACMG/ASCO/CAP для интерпретации соматических генетических вариантов [9] она также является патогенетически значимой.

Примечательно, что наряду с мутациями в гене ASXL1, в исследованных пробах выявлялись иные генетические изменения, влияющие на патогенез ОМЛ (таблица).

Таблица
Варианты генных и хромосомных ко-мутаций при ASXL1-позитивном ОМЛ

Морфологический вариант	Тип мутации в гене ASXL1	Хромосомные аномалии	Выявленные генные ко-мутации
M0	n.Del (1755;2007)	del(5)(q13), del(15)(q21)	NRAS c.181 C>A
M2	n.Del (1755;2007)	Комплексные изменения	NRAS c.182 A>G
Гибридный	n.Del (1755;2007)	t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL	Нет
M2	c.1934dupG	t(8;21)(q22,q22), RUNX1-ETO	Нет
M4	c.1934dupG	+8	FLT3 ITD TET2 c.5284 A>G
ОМЛ из ХМПЗ	c.1934dupG	Нет*	CEBPA c.683dupC IDH2 c.419G>A RUNX1 c.1170dupA SRSF2 c.283C>G
M2	c.1348A>T	+X	NRAS c.182 A>G

* Кариотипирование проводилось в хроническую фазу заболевания.

Table
Variants of gene and chromosomal mutations in ASXL1-positive AML

Morphological subtype	Variant of ASXL1 gene mutation	Chromosomal abnormalities	Co-mutations in other studied genes
M0	n.Del (1755;2007)	del(5)(q13), del(15)(q21)	NRAS c.181 C>A
M2	n.Del (1755;2007)	Complex karyotype lesions	NRAS c.182 A>G
Acute hybrid leukemia	n.Del (1755;2007)	t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL	Not detected
M2	c.1934dupG	t(8;21)(q22,q22), RUNX1-ETO	Not detected
M4	c.1934dupG	+8	FLT3 ITD TET2 c.5284 A>G
AML after CMPD	c.1934dupG	Not detected*	CEBPA c.683dupC IDH2 c.419G>A RUNX1 c.1170dupA SRSF2 c.283C>G
M2	c.1348A>T	+X	NRAS c.182 A>G

* Karyotyping was performed in the chronic phase of the disease.

При анализе генных ко-мутаций установлено, что в трех образцах от больных ОМЛ с комплексными, количественными и структурными хромосомными аномалиями определялись молекулярные изменения в гене NRAS, кодирующем малый ГТФазный белок, участвующий во внутриклеточной сигнализации. В двух пробах с экспрессией химерных генов BCR-ABL и RUNX1-ETO, дополнительных ко-мутаций исследованных генов выявлено не было. В одной пробе с трисомией по хромосоме 8 определены одновременно две ко-мутации в генах TET2 (эпигенетический регулятор) и FLT3 (рецепторная тирозинкиназа). Наконец, в одном случае при ОМЛ из ХМПЗ одновременно выявлялись 4 ко-мутации в нескольких генах: CEBPA, RUNX1 (факторы транскрипции), IDH2 (эпигенетический регулятор), SRSF2 (фактор сплайсинга). Все это указывает на кооперацию двух и более молекулярных событий в онкогенезе ASXL1-позитивных ОМЛ, что, по-видимому, определяет фенотипическую неоднородность опухоли, включая различный ответ лейкемических клеток на химиотерапевтическое лечение и прогноз заболевания.

Заключение

Средняя частота мутаций, выявленных в гене ASXL1 при ОМЛ взрослых, составила 16,3%, в

том числе подгруппе ОМЛ М2 — 21,1% (при 95% ДИ от 8,5 до 43,3%). При этом, наряду с мутациями гена ASXL1 в исследуемых образцах определялись также количественные и структурные хромосомные aberrации, в т.ч. del(5)(q13), t(8;21)(q22;q22), t(9;22)(q34;q11), а также точечные мутации в генах СЕВРА, IDH2, NRAS, RUNX1, SRSF2, TET2, внутренняя tandemная дупликация FLT3. Это может свидетельствовать о различных вариантах и этапности молекулярной кооперации в ходе злокачественной трансформации гемопоэтической клетки-предшественницы, которая включает минимум два генетических события. Различные варианты кооперации мутаций могут обуславливать различный опухолевый фенотип, чувствительность лейкозных клеток к химиотерапевтическим препаратам и прогноз ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Katoh M., Functional and cancer genomics of ASXL family members. Br. J. Cancer. 2013. Vol. 109. pp. 299–306.
2. Kishtagari A., Levine R.L.; Viny A.D. Driver mutations in acute myeloid leukemia. Curr. Opin. in Hematol. 2020. Vol 27(2). pp. 49-57.
3. Shivarov V., Gueorguieva R., Ivanova M., Tiu R.V. ASXL1 mutations define a subgroup of patients with acute myeloid leukemia with distinct gene expression profile and poor prognosis: A meta-analysis of 3311 adult patients with acute myeloid leukemia. Leuk. Lymphoma. 2015. Vol. 56. pp. 1–3.
4. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016. Vol. 127(20). pp. 2391-2405.
5. Виноградов А.В., Литвинова Д.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций в гене ASXL1 при гемобластозах методом прямого автоматического секвенирования // Уральский медицинский журнал. – 2020. – Т. 185. - № 2. – С. 11-14.
6. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Изотов Д.В., Сергеев А.Г. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом // Вестник Уральской медицинской академической науки. -2016. – Т. 59. - №4. - С. 89-101.
7. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г., Капитонова М.Ю. Молекулярно-генетический анализ мутаций в генах ASXL1, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами зрелого возраста // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15. № 1. – С. 32-36.
8. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35(6). pp. 1547-1549.
9. Спектор М.А., Ясько Л.А., Друй А.Е. Интерпретация соматических генетических вариантов, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, на примере онкологических заболеваний детского возраста // Медицинская генетика. – 2021. - Т 20. - №3. - С. 3-25.

Авторы

Виноградов Александр Владимирович

ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1», отделение гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга,

Министерство здравоохранения Свердловской области, отдел организации специализированной медицинской помощи

Врач-гематолог, кандидат медицинских наук, главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области

a.vinogradov@egov66.ru

Екатеринбург, Российская Федерация

Сазонов Сергей Владимирович

ГАУЗ СО «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских кле-

точных технологий;

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии,

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, зам. главного врача института
prof-ssazonov@yandex.ru

Екатеринбург, Российская Федерация

A.V. Vinogradov¹, S.V. Sazonov^{2,3}

THE VALUE OF MUTATIONS IN THE ASXL1 GENE IN THE ONCOGENESIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN ADULTS

¹ State Autonomous Healthcare Institution of the Sverdlovsk Region
«Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1»,

Yekaterinburg, Russian Federation;

² State Autonomous Healthcare Institution of the Sverdlovsk Region

“Center for Specialized Types of Medical Care “Institute of Medical Cell Technologies”,
Yekaterinburg, Russian Federation;

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education

Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. *The aim* was to evaluate the significance of the ASXL1 gene mutations in the oncogenesis of acute myeloid leukemia (AML) in adults.

Materials and methods. Bone marrow and peripheral blood samples of 49 patients with AML aged from 18 to 84 years, treated at the Sverdlovsk regional hematological center, were examined, including those with a morphological variant of AML M0 – 3, M1 – 4, M2 – 19, M3 – 6, M4 – 10, M5 – 1, M6 – 1, M7 – 1, blast plasmacytoid dendritic cell neoplasm – 1, acute hybrid leukemia – 2, AML after chronic myeloproliferative disease (CMPD) – 2. Mutations in the ASXL1 gene were detected in peripheral blood and bone marrow samples by direct RNA sequencing (n=26) and high-throughput DNA sequencing (n=23) on automatic genetic analyzers ABI Prism 310 and MiSeqDX, respectively.

Results. It was found that pathogenetically significant mutations of the ASXL1 gene were detected in 16.3% of samples with AML M0, M2, M4, AML from CMPD and acute hybrid leukemia. The distribution of ASXL1 anomalies was as follows: deletion n. Del (1755;2007) — 4, duplication c.1934dupG — 3, non-synonymous transversion c.1348A>T — 1. Along with lesions of the ASXL1 gene, quantitative and structural chromosomal aberrations were determined in these samples, including del(5)(q13), t(8;21)(q22;q22), t(9;22)(q34;q11), as well as point mutations in the CEBPA, IDH2, NRAS, RUNX1, SRSF2, TET2 genes, internal tandem duplication in the FLT3 gene. This indicates the cooperation of two or more mutational events in the oncogenesis of ASXL1-positive AML, which can determine the different reaction of the tumor to chemotherapeutic treatment and the prognosis of the disease.

Keywords: mutation, acute myeloid leukemia, ASXL1 gene, oncogenesis, age

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Alexander V. Vinogradov

a.vinogradov@egov66.ru

Received 12.07.2023

For citation:

Vinogradov A.V., Sazonov S.V. The value of mutations in the ASXL1 gene in the oncogenesis of acute

myeloid leukemia in adults. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2023, Vol. 20, no. 3, pp. 18–23. DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-3-18-23 (In Russ)

REFERENCES:

1. Katoh M., Functional and cancer genomics of ASXL family members. *Br. J. Cancer*. 2013. Vol. 109. pp. 299–306.
2. Kishtagari A., Levine R.L.; Viny A.D. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. in Hematol.* 2020. Vol 27(2). pp. 49-57.
3. Shivarov V., Gueorguieva R., Ivanova M., Tiu R.V. ASXL1 mutations define a subgroup of patients with acute myeloid leukemia with distinct gene expression profile and poor prognosis: A meta-analysis of 3311 adult patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2015. Vol. 56. pp. 1–3.
4. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. Vol. 127(20). pp. 2391-2405.
5. Vinogradov A.V., Litvinova D.V., Rezyaykin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Detection of ASXL1 gene point mutations in blood malignancies using direct automatic sequencing. *Ural Medical Journal [Ural'skij medicinskij žurnal]*. 2020. no. 2. pp. 11-14. [In Russ.]
6. Vinogradov A.V., Rezyaykin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype using direct sequencing technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2016. no. 4. pp. 38-51. [In Russ.]
7. Vinogradov A.V., Rezyaykin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G., Kapitonova M.Yu. Molecular genetic analysis of ASXL1, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 mutations in acute myeloid leukemia patients 45-60 years old. *Medical News of the North Caucasus [Medicinskiy vestnik Severnogo Kavkaza]*. 2020. no. 1. pp. 32-36. [In Russ.]
8. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35(6). pp. 1547-1549.
9. Spektor M.A., Yasko L.A., Druy A.E. The interpretation of somatic genetic variants identified with high-throughput sequencing of DNA from paediatric solid tumors. *Medical genetics [Meditsinskaya genetika]*. 2021. no. 3. pp 3-25. [In Russ.]

Authors

Alexander V. Vinogradov

State Autonomous Healthcare Institution of the Sverdlovsk Region «Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1», Department of Hematology, Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation
Hematologist, MD, chief therapist of Sverdlovsk Regional Ministry of Health
a.vinogradov@egov66.ru
Yekaterinburg, Russian Federation

Sergey V. Sazonov

State Autonomous Healthcare Institution of the Sverdlovsk Region “Center for Specialized Types of Medical Care “Institute of Medical Cell Technologies”,
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
MD, professor, chief of the department, deputy chief of the institute
prof-ssazonov@yandex.ru
Yekaterinburg, Russian Federation