

DOI 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-204-208

УДК 591.156:575.113:616-005.6:616.155.191

¹Полубень Л. О., ²Чен С., ²Юан Ш., ³Шумейко О. О., ²Вознесенски О.,

⁴Адам М., ⁴Френкель Е., ⁵Разник Р., ⁵Линдал М., ¹Клименко С. В., ²Балк С., ²Френкель П.

СПЕКТР ПОШКОДЖЕНИХ ГЕНІВ У ХВОРИХ НА ПЕРВИННИЙ МІЕЛОФІБРОЗ В УКРАЇНІ

¹ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини

НАМН України», відділ медичної генетики (м. Київ)

²Бес Израел Диконесс Медичний Центр, відділ гематології/онкології (м. Бостон, МА, США)

³Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця (м. Київ)

⁴Массачусетський технологічний інститут, відділ біологічної інженерії (м. Кембридж, МА, США)

⁵Хебрю університет, школа комп'ютерних наук, відділ біологічної хімії (м. Єрусалим, Ізраїль)

larysa.poluben@gmail.com

klymenko_sergiy@yahoo.co.uk

paula.fraenkel@gmail.com

sbalk@bidmc.harvard.edu

shumeikooleksandr@gmail.com

fraenkel@mit.edu

michall@mail.huji.ac.il

*Вклад авторів в роботу рівнозначний.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Публікація є фрагментом планової науково-дослідної роботи ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»: «Молекулярно-генетичні особливості Рh-негативних мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС», № державної реєстрації 0117U000625.

Вступ. Первинний мієлофіброз (ПМФ), справжня поліцитемія (СП) та есенціальна тромбоцитемія відносяться до групи Рh-негативних хронічних мієлопроліферативних неоплазій (МПН), які загалом характеризуються клональною проліферацією мієлоїдних клітин різної морфологічної зрілості. Сьогодні причина розвитку МПН може бути встановлена у більшості випадків на молекулярно-генетичному рівні [1,2,3,4,5,6]. Зазвичай набуті соматичні мутації виявляють у *Janus Kinase 2 (JAK2)*, *Thrombopoietin Receptor (MPL)* та *Calreticulin (CALR)* генах (до 90% випадків), які взаємно виключають одна одну та призводять до постійної активації JAK/STAT сигнального внутрішньоклітинного шляху і встановлення мієлопроліферативного фенотипу [2,6,7]. Однак, у випадках, коли соматичні мутації *JAK2*, *MPL* або *CALR* генів відсутні (близько 15%) у хворих на МПН, можливе залучення інших молекулярно-генетичних механізмів до розвитку захворювання [2,4,6,8]. Додаткові мутації у хворих на МПН можуть визначатися одночасно з однією із мутацій генів *JAK2*, *MPL* або *CALR* або у взаємовиключний спосіб з ними. Зазначені мутації були описані в генах, які приймають участь у внутрішньоклітинному сигналюванні, пригніченні пухлинного росту, сплайсингу, епігенетичному регулюванні або лейкоемічній трансформації [8,9,10,11,12].

Метою нашого дослідження було визначення спектру пошкоджених генів у хворих на ПМФ в Україні, додатково до мутацій у звичайних драйверних генах (*JAK2*, *MPL* та *CALR*).

Об'єкт і методи досліджень

Пацієнти та зразки. В дослідження включено 30 хворих на ПМФ, яким був встановлений діагноз у різних медичних закладах України з 2009 по 2016 рік, з них 17 чоловіків та 13 жінок. Середній вік хворих на момент встановлення діагнозу склав 56,2 роки (24 – 79 років). Діагностичні критерії Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) 2016 року перегляду були використані для верифікації діагнозу ПМФ. Пацієнти підписали інформовану згоду на проведення дослідження в ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (ННЦРМ). Дослідження було схвалене Етичним Комітетом ННЦРМ. Зразки ДНК отримані із лейкоцитів периферичної крові за допомогою набору для виділення ДНК Qiamp DNA (Qiagen, Німеччина) у відповідності до рекомендацій виробника.

Повне екзомне сіквенування. Дослідження генетичних варіант здійснювали за допомогою сіквенування наступного покоління (повне екзомне сіквенування). Асамблея геному людини GRCh37/hg19 була використана у якості контролю. Генетичні варіанти кодуєчих ділянок ДНК були проаналізовані. Для уникнення помилок сіквенування та ампліфікації під час проведення полімеразної ланцюгової реакції, генетичні варіанти були проаналізовані, якщо вони відповідали наступним умовам: (1) принаймні 5 абсолютних зчитувань; (2) варіант було виявлено в > 5% усіх зчитувань в ділянці локалізації варіанта. Статистичні розрахунки проводили за допомогою статичного пакету для аналізу даних в середовищі Microsoft Excel 2016. Дані оцінювали із використанням t-критерія Стюдента. Різницю між показниками вважали значимою при $p < 0.05$.

Експресія векторів та клітинна культура. В дослідженні були використані MSCV-MPL-Neo та MSCV-MPL(W515L)-IRES-GFP ретровірусні вектори. *MPL* p.P222S (с. С664Т) міссенс варіант було згенеровано за допомогою QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Санта Клара,

Каліфорнія, США), відповідно до рекомендацій виробника, та підтверджено Сангерівським секвенуванням. 293Т клітини культивували в середовищі DMEM із додаванням фетальної бичачої сироватки (ФБС). Трансфекція 293Т клітин та продукція ретровірусного супернатанту були здійснені, використовуючи Lipofectamine 3000 Reagent Kit (ThermoFisher Scientific, США), відповідно до рекомендацій виробника. Ва/F3 клітини культивували в середовищі RPMI 1640 із додаванням ФБС та інтерлейкіну 3 (IL3). Ва/F3 були трансдуковані вірусним супернатантом. Селекцію клітини проводили, використовуючи неоміцин в концентрації 4 мг/мл. Живі клітини були переміщені у середовище без додавання цитокінів або у середовище із різною концентрацією тромбопоетину.

Вестерн-блот аналіз. Клітини були зібрані та лізовані у лізуючому розчині, білкові молекули були розділені методом електрофорезу. Нітроцелюльозну мембрану блокували в TBST/5% молоці та інкубували з переліченими антитілами: анти-STAT3, анти-pSTAT3, анти-JAK2, анти-pJAK2, анти-TPOR, анти-rTPOR та анти-актин.

Результати дослідження та їх обговорення

Частоти канонічних мутацій трьох драйверних генів (JAK2, MPL та CALR). Повне екзомне секвенування (ПЕС) було проведене, використовуючи зразки ДНК, отримані із лейкоцитів периферичної крові від 30 хворих на ПМФ. За допомогою ПЕС були виявлені попередньо ідентифіковані в інших дослідженнях та нові генетичні варіанти, розцінені як патогенні або потенційно патогенні, керуючись ClinVar, dbSNP, COSMIC та іншими базами даних. Канонічні мутації трьох драйверних генів МПН були виявлені у 70% (21/30) хворих на ПМФ: JAK2 V617F – у 43.3% (13/30), MPL W515K/L – у 10% (3/30) та мутації гена CALR (1-ий тип: делеція 52 пар нуклеотидів; та 2-ий тип: інсерція 5 пар нуклеотидів) – у 16.7% (5/30) випадків. В нашому дослідженні частота мутацій JAK2 V617F була дещо нижчою у хворих на ПМФ, ніж за даними опублікованих досліджень (50–60%), що можна пояснити відносно малою вибіркою хворих [1,5,6]. Частоти мутацій MPL та CALR генів, отриманих у нашому дослідженні, не суперечать даним літератури – 5 – 10% та 12% - 35%, відповідно [6,7]. Також, в одного хворого, негативного за цими мутаціями, ми ідентифікували міссенс варіант MPL P222S (с.С664Т), локалізований поза 10-им

екзоном, в зовнішньоклітинній частині тромбопоетинового рецептора [13]. В нещодавніх опублікованих дослідженнях було виявлено декілька мутацій MPL гена із набуттям функції поза 10-им екзоном [6]. Враховуючи, що деякі із них (MPL P204S, MPL E230G) знаходяться поблизу MPL P222S, ми припустили, що цей варіант набуває біологічної функції та може бути потенційним драйвером захворювання.

Гени, залучені до розвитку та еволюції ПМФ. Загалом, виключаючи канонічні мутації звичайних драйверних генів (JAK2, MPL та CALR), більше патогенних та потенційно патогенних генетичних варіантів було виявлено серед хворих, негативних за цими мутаціями. Серед хворих на ПМФ, позитивних за мутаціями в звичайних драйверних генах, середня кількість патогенних або потенційно патогенних генетичних варіантів склала 3.3 (1 – 9), а серед хворих, негативних за мутаціями цих генів, - 5 (4 – 7) (p = 0.03). Це вказує на складність та гетерогенність генетичних пошкоджень серед хворих на ПМФ, негативних за мутаціями звичайних драйверних генів, у яких розвиток та модифікація захворювання реалізуються за рахунок комбінованих молекулярно-генетичних механізмів.

Серед рекуррентно пошкоджених генів у хворих на ПМФ, як позитивних, так і негативних за мутаціями звичайних драйверних генів, були ASXL1, PEG3, EZH2, ATM, U2AF1 та CDH23. (рис. 1). Одним із найчастіше пошкоджених генів у нашому дослідженні, додатково до звичайних драйверних генів, був Additional Sex Combs Like1 (ASXL1), регулятор транскрипції, частота пошкоджень якого склала 23.3% (8/30), що відповідає результатам інших досліджень [11,14]. Експресія мутованого ASXL1 призводить до порушення функцій гематопоетичної стовбурової клітини, що надає їй перевагу до виживання та лейкоемічної трансформації [15]. Мутації та цитогенетичні пошкодження Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit (EZH2) гена порушують функцію Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) та часто описують у хворих на МПН (~10%). В представленому дослідженні пошкодження EZH2 гена були виявлені у 16.7% (5/30) хворих на ПМФ, в тому числі у 22.2% (2/9) хворих на ПМФ, негативних за мутаціями в трьох драйверних генах. Пошкодження EZH2 гена – це найбільш ранні події лейкомогенезу, які асоціюються із поганим прогнозом та модифікаціями МПН фенотипу [16,17]. Додатково, гени JARID2,

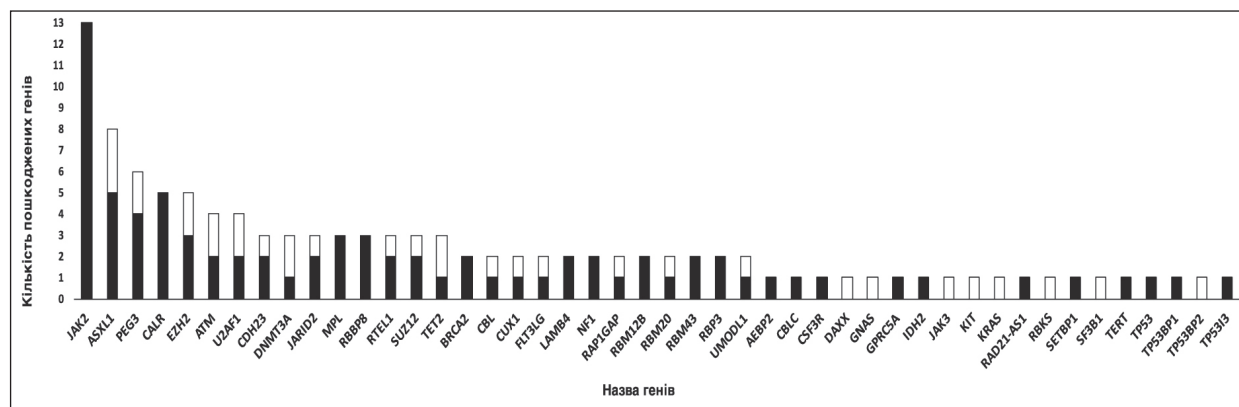


Рис. 1. Спектр генів із патогенними або потенційно патогенними генетичними варіантами, виявленими у хворих на первинний мієлофіброз, позитивних за однією із канонічних мутацій звичайних драйверних генів (JAK2, MPL або CALR) (чорний), та хворих, негативних за цими мутаціями (білий).

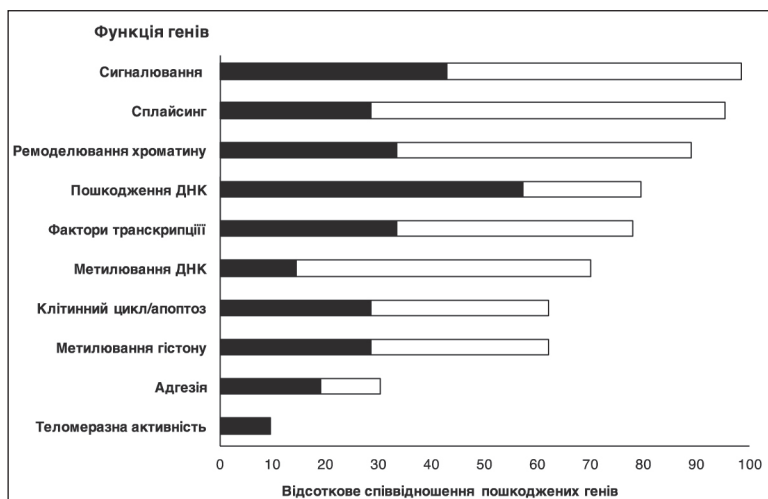


Рис. 2. Потенційно пошкоджені внутрішньо-клітинні механізми у хворих на первинний мієлофіброз, позитивних за однією із канонічних мутацій звичайних драйверних генів (*JAK2*, *MPL* або *CALR*) (чорний), та хворих, негативних за цими мутаціями (білий).

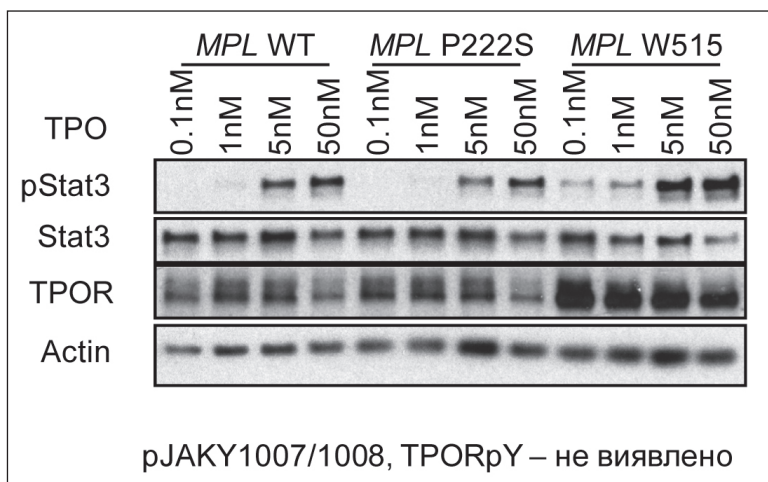


Рис. 3. Вестерн-блот. Не виявлено активації STAT3 сигнальної молекули в клітинній культурі Ва/Ф3 клітин з експресією *MPL* P222S за умови стимулювання тромбопоетином у різних концентраціях протягом 7 хвилин. TPO: тромбопоетин; TPOR: рецептор тромбопоетину; Actin: актин; *MPL* WT: клітинна культура Ва/Ф3 клітин з експресією *MPL* дикого типу (негативний контроль); *MPL* W515: клітинна культура Ва/Ф3 клітин з експресією канонічної мутації *MPL* (позитивний контроль).

RBBP8, *RTEL1*, *SUZ12*, *BRCA2*, *LAMB4*, *NF1*, *RBM12B*, *RBM43*, *RBP3* були рекуррентно пошкоджені серед хворих, позитивних за канонічними мутаціями в драйверних генах. Серед хворих на ПМФ, негативних за канонічними мутаціями в трьох драйверних генах, додатковими рекуррентно пошкодженими генами були *DNMT3A* та *TET2*, хоча значна кількість генетичних варіантів була виявлена у *RTEL1*, *SUZ12*, *CBL*, *CUX1*, *FLT3LG* і *UMODL1* генах в одиничних випадках.

Деякі гени були пошкоджені виключно серед хворих на ПМФ, негативних за канонічними мутаціями в трьох драйверних генах, в одиничних випадках. Згадані гени включали *KIT*, *SF3B1*, *JAK3*, *KRAS*, *GNAS*, *DAXX* та *RBKS*, які можуть бути потенційними драйверами захворювання у цій групі хворих на ПМФ (рис. 1). *Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase (KIT)* функціонує, як клітинний рецептор та бере участь у регуляції клітинної проліферації і виживання, гематопоезу, підтримання життєдіяльності стовбурових

клітин та розвитку мастоцитів. Близько у 90% хворих мастоцитозом виявляють соматичні мутації із набуттям функції гена *KIT* [18]. *Splicing Factor 3b Subunit 1 (SF3B1)* – це компонент протеїнового комплексу сплайсингового фактору 3b. Мутації *SF3B1* гена були описані при декількох мієлоїдних неоплазіях, найчастіше у хворих на мієлодиспластичний синдром, а також у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, злоякісні новоутворення молочної залози та підшлункової залози [19,20,21]. Мутації *Guanine Nucleotide-Binding Protein G(S) Subunit Alpha (GNAS)* гена раніше були описані у випадках лейкемії, а нещодавнє дослідження вказує, що пошкодження вказаного гена можуть бути подіями, ініціюючими розвиток МПН, мієлодиспластичного синдрому, хронічної лімфоцитарної лейкемії та гострої мієлоїдної лейкемії [22].

Загалом, серед 30 хворих на ПМФ найчастіше були пошкоджені гени, які приймають участь у внутрішньоклітинному сигналюванні, сплайсингу, ремоделюванні хроматину, механізмах реагування на пошкодження ДНК та транскрипції (рис. 2).

Функціональний аналіз *MPL* P222S. Після стимуляції клітинної культури (Ва/Ф3) з експресією *MPL* P222S тромбопоетином протягом 7 хвилин, вестерн-блот не показав відмінностей щодо інтенсивності фосфорилування JAK/STAT сигнальних білків у порівнянні з культурою клітин з експресією *MPL* дикого типу (негативний контроль). Хоча, в культурі клітин (Ва/Ф3) з експресією *MPL* W515L спостерігається гіперчутливість до тромбопоетинової стимуляції

(рис. 3).

Висновки. В представленому дослідженні ми визначили спектр генів, пошкоджених у хворих на ПМФ в Україні, які можуть приймати участь у розвитку та модифікації захворювання. Серед них були виявлені рекуррентно пошкоджені гени, як одночасно із канонічними мутаціями драйверних генів (*JAK2*, *MPL* та *CALR*), так і окремо від них. Серед хворих на ПМФ, негативних за канонічними мутаціями драйверних генів, ми ідентифікували декілька генетичних варіантів, які можуть бути потенційними драйверами МПН.

Перспективи подальших досліджень. Необхідне подальше вивчення у функціональних експериментах ідентифікованих у нашому дослідженні генетичних варіантів, які можуть потенційними драйверами мієлопроліферативних неоплазій, для вивчення їх біологічних функцій.

Література

1. Constantinescu SN, Leroy E, Gryshkova V, Pecquet C, Dusa A. Activating Janus kinase pseudokinase domain mutations in myeloproliferative and other blood cancers. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(4):1048-54.
2. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1607-16.
3. Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer.* 2012;12:304.
4. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of pre-fibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood.* 2017;129(24):3227-36.
5. Bartels S, Lehmann U, Büsche G, Schlupe J, Mozer M, Stadler J, et al. SRSF2 and U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are associated with JAK2 and MPL but not calreticulin mutation and may independently reoccur after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2015;29(1):253-5.
6. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127:325-32.
7. Lim K-H, Lin H-C, Chen CG-S, Wang W-T, Chang Y-C, Chiang Y-H, et al. Rapid and sensitive detection of CALR exon 9 mutations using high-resolution melting analysis. *Clin Chim Acta.* 2015;440:133-9.
8. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017;129(6):680-92.
9. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014;123(14):2220-8.
10. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature.* 2012;492(7427):108-12.
11. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer.* 2009;115(17):3842-7.
12. Yagarajah M, Tefferi A. Leukemic Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: a Literature Review on Risk, Characteristics, and Outcome. *Mayo Clinic Proceedings.* 2017;92(7):1118-28.
13. Poluben L, Puligandla M, Neuberger D, Bryke CR, Hsu Y, Shumeiko O, et al. Characteristics of myeloproliferative neoplasms in patients exposed to ionizing radiation following the Chernobyl nuclear accident. *Am J Hematol.* 2018. DOI: 10.1002/ajh.25307
14. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(8):743-55.
15. Nagase R, Inoue D, Pastore A, Fujino T, Hou H-A, Yamasaki N, et al. Expression of mutant Asxl1 perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. *J Exp Med.* 2018;215(6):1729-47.
16. Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D, et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2012;119(5):1208-13.
17. Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Torres E, Serrano S, Bellosillo B. TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, and c-CBL genes in JAK2- and MPL-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol.* 2012;91(4):533-41.
18. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol.* 2015;28(8):1138-49.
19. Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature.* 2012;491(7424):399-405.
20. Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, et al. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med.* 2016;213(8):1459-77.
21. Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(23):4627-34.
22. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendt MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014;20(12):1472-8.

СПЕКТР ПОШКОДЖЕНИХ ГЕНІВ У ХВОРИХ НА ПЕРВИННИЙ МІЕЛОФІБРОЗ В УКРАЇНІ

Полубень Л. О., Чен С., Юан Ш., Шумейко О. О., Вознесенски О., Адам М., Френкель Е., Разник Р., Линдал М., Клименко С. В., Балк С., Френкель П.

Резюме. Метою нашого дослідження було вивчення спектру пошкоджених генів у хворих на первинний мієлофіброз (ПМФ) в Україні. За допомогою повного екзомного секвенування були визначені раніше ідентифіковані та неідентифіковані генетичні варіанти, які були розцінені, як патогенні або потенційно патогенні. Найчастіше пошкодженими генами серед хворих на ПМФ в Україні були *ASXL1*, *PEG3*, *EZH2*, *ATM*, *U2AF1* та *CDH23* додатково до *JAK2*, *MPL* та *CALR*. Крім того, у одного хворого був ідентифікований неканонічний варіант *MPL* P222S. В клітинній культурі експресія *MPL* P222S в клітинах Ba/F3 не продемонструвала відмінностей у фосфорилуванні сигнальних молекул JAK/STAT у відповідь на стимулювання тромбоепоеїном у порівнянні із експресією *MPL* дикого типу. Загалом більше патогенних та потенційно патогенних варіантів було визначено серед хворих на ПМФ, негативних за канонічними мутаціями в трьох драйверних генах (*JAK2*, *MPL* та *CALR*), порівняно з хворими, позитивними за цими мутаціями. Крім того, ми ідентифікували декілька генів, пошкоджених в окремих випадках (*KIT*, *SF3B1*, *GNAS*) у хворих на ПМФ, негативних за канонічними мутаціями в трьох драйверних генах, які можуть бути потенційними драйверами МПН.

Ключові слова: первинний мієлофіброз, мутація, ген.

СПЕКТР ПОРАЖЕННИХ ГЕНОВ У ПАЦІЕНТОВ С ПЕРВИЧНИМ МІЕЛОФІБРОЗОМ В УКРАЇНІ

Полубень Л. А., Чен С., Юан Ш., Шумейко А. А., Вознесенски О., Адам М., Френкель Э., Разник Р., Линдал М., Клименко С. В., Балк С., Френкель П.

Резюме. Целью нашего исследования было изучение спектра поврежденных генов у украинских пациентов с диагнозом первичного миелофиброза (ПМФ). Используя полное экзомное секвенирование (ПЭС), мы обнаружили ранее идентифицированные и неидентифицированные генетические варианты, которые считаются патогенными или потенциально патогенными. Наиболее часто поврежденными среди украинских пациентов с ПМФ были гены *ASXL1*, *PEG3*, *EZH2*, *ATM*, *U2AF1* и *CDH23* в дополнение к *JAK2*, *MPL* и *CALR*. Кроме того, у одного пациента, был обнаружен неканонический вариант *MPL* P222S. Однако, в анализе клеточной культуры, экспрессия *MPL* P222S в клетках Ba/F3 не продемонстрировала различий в фосфорилировании сиг-

нальных белков JAK/STAT в ответ на стимуляцию тромбopoэтином по сравнению с экспрессией *MPL* дикого типа. В целом, больше патогенных и потенциально патогенных вариантов было обнаружено среди пациентов с ПМФ, негативных по каноническим мутациям в трех драйверных генах (*JAK2*, *MPL* и *CALR*), по сравнению с пациентами, положительными по одной из этих мутаций. Кроме того, мы идентифицировали несколько генов, поврежденных в единичных случаях (*KIT*, *SF3B1*, *GNAS*) у пациентов с ПМФ, негативных по каноническим мутациям в трех драйверных генах, которые могут быть потенциальными драйверами МРН.

Ключевые слова: первичный миелофиброз, мутация, ген.

SPECTRUM OF AFFECTED GENES IN UKRAINIAN PATIENTS WITH PRIMARY MYELOFIBROSIS

Poluben L., Chen S., Yuan X., Shumeiko O., Voznesensky O., Adam M., Fraenkel E., Rasnic R., Linial M., Klymenko S., Balk S. P., Fraenkel P. G.

Abstract. In this study we aimed to identify the spectrum of affected genes in Ukrainian patients diagnosed with primary myelofibrosis (PMF). DNA samples were obtained from peripheral blood leukocytes of 30 Ukrainian PMF patients. Using Whole Exome Sequencing, we detected previously reported and unreported sequence variants considered as pathogenic or potentially pathogenic. Canonical mutations of usual MPN-driver genes were detected in 70% of PMF patients, including *JAK2* V617F – in 43.3%, *MPL* W515 – in 10% and *CALR* mutations (type 1-like and 2-like) – in 16.7% of patients. Also, a non-canonical *MPL* P222S variant was detected in one patient negative for these mutations. However, in cell culture assay, *MPL* P222S expression in Ba/F3 cells did not demonstrate differences in phosphorylation of JAK/STAT signaling proteins in response to TPO stimulation compared to *MPL* WT expression. Overall, more pathogenic and potentially pathogenic sequence variants were found among PMF patients negative for canonical mutations in three driver genes (*JAK2*, *MPL* and *CALR*), compared to patients, positive for one of these mutations. The mean numbers of variants were 5 (range: 4 – 7) versus 3.3 (range: 1 – 9), respectively ($p = 0.03$). The most frequently affected among Ukrainian PMF patients were genes *ASXL1*, *PEG3*, *EZH2*, *ATM*, *U2AF1*, and *CDH23* in addition to *JAK2*, *MPL* and *CALR*. Pathogenic or potentially pathogenic sequence variants of *ASXL1* and *EZH2* genes were identified in 23.3% and 16.7% of cases, respectively. Genes *JARID2*, *RBBP8*, *RTEL1*, *SUZ12*, *BRCA2*, *LAMB4*, *NF1*, *RBM12B*, *RBM43*, and *RBP3* were recurrently affected in PMF patients who were also positive for usual mutations in three driver genes. Among PMF patients negative for usual mutations in three driver genes recurrently affected genes were *DNMT3A* and *TET2* in addition to mentioned earlier, and some genetic variants were identified in *RTEL1*, *SUZ12*, *CBL*, *CUX1*, *FLT3LG* and *UMODL1* genes in single cases. Also, we identified several genes affected in single cases (*KIT*, *SF3B1*, *GNAS*) in PMF patients negative for canonical mutations in three driver genes which may be potential MPN drivers.

Key words: primary myelofibrosis, mutation, gene.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.
Стаття надійшла 01.11.2018 року