
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК [616.155.392.1-036.11:576.385.5]:[577.217:575.224.232.52]

АНАЛИЗ ТОЧЕК РАЗРЫВА ПРИ ДЕЛЕЦИЯХ ГЕНА *IKZF1* У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ИЗ В-КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

М. А. КЕРЕЗЬ¹⁾, Д. А. БОГАТЕНКОВА¹⁾, О. С. ВШИВКОВА¹⁾, А. Н. МЕЛЕШКО¹⁾

¹⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Боровлянский с/с, Минский р-н, Беларусь

Аннотация. Помимо давно известных диагностически значимых перестроек при остром лимфобластном лейкозе из В-клеток-предшественников, таких как *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1* (*E2A::PBX1*) и *KMT2A* (*MLL*), значительный интерес для прогнозирования течения заболевания представляют мутации в генах транскрипционных

Образец цитирования:

Керезь МА, Богатенкова ДА, Вшивкова ОС, Мелешко АН. Анализ точек разрыва при делециях гена *IKZF1* у пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;3:50–58.
EDN: AYAVFX

For citation:

Keraz MA, Bogatenkova DA, Vshyukova VS, Meleshko AN. Breakpoint analysis of *IKZF1* gene deletions in patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;3:50–58. Russian.
EDN: AYAVFX

Авторы:

Мария Александровна Керезь – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.

Дарья Александровна Богатенкова – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований.

Ольга Сергеевна Вшивкова – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий, ученый секретарь.

Александр Николаевич Мелешко – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.

Authors:

Maryia A. Keraz, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.

kerezz-z@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0007-6357-3147>

Darya A. Bogatenkova, junior researcher at the laboratory of molecular genetic research.

yanchenko.darya255@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0008-2154-6463>

Volha S. Vshyukova, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of genetic biotechnologies and scientific secretary.

vshyukova@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4881-7891>

Alexander N. Meleshko, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.

meleshko@tut.by

<https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>

факторов, контролирующих лимфоидную дифференцировку, в первую очередь мутации в гене *IKZF1*. Ген *IKZF1* кодирует ДНК-связывающий белок Ikaros – ключевой транскрипционный фактор, регулирующий ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и дендритных клеток. При остром лимфобластном лейкозе из В-клеток-предшественников наиболее распространенными генетическими событиями, затрагивающими ген *IKZF1*, являются внутригенные делеции, приводящие к потере нескольких экзонов. Эти делеции наблюдаются у пациентов детского и взрослого возраста, их частота увеличивается при наличии транслокации *BCR::ABL1*. Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в повышенной экспрессии коротких транскриптов (изоформ) гена *IKZF1*. Однако в подавляющем большинстве случаев повышенная экспрессия коротких изоформ является следствием внутригенной делеции. Данные молекулярно-генетические изменения обуславливают нарушение регуляции дифференцировки лимфоидных клеток и ассоциируются с плохим прогнозом для пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников. Понимание генетических изменений в ключевых транскрипционных факторах, таких как Ikaros, может дать ценные сведения о биологии острого лимфобластного лейкоза из В-клеток-предшественников и помочь в прогнозировании клинических результатов для пациентов с этим заболеванием.

Ключевые слова: *IKZF1*; Ikaros; криптические сигнальные последовательности рекомбинации; cRSS; острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников; В-ОЛЛ; точки разрыва; сайты рекомбинации; горячие точки; делеции.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной научно-технической программы «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» (подпрограмма «Злокачественные опухоли», задание «Разработать и внедрить метод молекулярно-генетической диагностики BCR-ABL1-like острого лимфобластного лейкоза и оценить показатели прогноза при данном типе лейкоза у пациентов детского возраста, подростков и “молодых” взрослых», договор № 02.14/2020).

BREAKPOINT ANALYSIS OF *IKZF1* GENE DELETIONS IN PATIENTS WITH B-CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

M. A. KERAZ^a, D. A. BOGATENKOVA^a, V. S. VSHYUKOVA^a, A. N. MELESHKO^a

^aRepublican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Barawliany 223053, Barawlianski sielsaviet, Minsk District, Belarus

Corresponding author: M. A. Keraz (kerezz-z@mail.ru)

Abstract. In addition to the long-known diagnostically significant rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, such as *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1* (*E2A::PBX1*) and *KMT2A* (*MLL*), mutations in genes of transcription factors, which controls lymphoid differentiation, primarily mutations in the *IKZF1* gene, are of considerable interest in predicting the course of the disease. The *IKZF1* gene encodes a DNA-binding protein Ikaros, which is a key transcription factor that regulates early steps in the differentiation of T- and B-lymphocytes, NK cells and dendritic cells. In B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, the most common genetic events involving the *IKZF1* gene are intragenic deletions that result in the loss of several exons. These deletions are observed in pediatric and adult patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, with a higher prevalence in cases where there is a *BCR::ABL1* translocation. There are also known splicing disorders expressed in increased expression of short *IKZF1* gene transcripts (isoforms). However, in the vast majority of cases, increased expression of short isoforms is a consequence of intragenic deletion. These molecular genetic changes contribute to the dysregulation of lymphoid differentiation and are associated with a poor prognosis for patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Understanding the genetic alterations in key transcription factors, such as Ikaros, can provide valuable insights into the biology of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and help in predicting the clinical outcomes of patients with this disease.

Keywords: *IKZF1*; Ikaros; cryptic recombination signal sequences; cRSS; B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; BCP-ALL; breakpoints; recombination sites; hotspots; deletions.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of the state scientific and technical programme «Scientific and technical provision of quality and accessibility of medical services» (subprogramme «Malignant tumors», assignment «To develop and implement a method of molecular genetic diagnostics of BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia and evaluate prognosis indicators for this type of leukemia in pediatric patients, adolescents and “young” adults», contract No. 02.14/2020).

Введение

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – злокачественное заболевание системы кроветворения, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией незрелых лимфоидных клеток (лимфобластов) [1; 2]. Стоит отметить, что ОЛЛ из В-клеток-предшественников (В-ОЛЛ) встречается гораздо чаще, чем ОЛЛ из Т-клеток-предшественников, и ассоциируется с хорошим прогнозом, но, несмотря на это, занимает лидирующие позиции по детской смертности от рака. Характерные генетические аномалии обнаруживаются примерно в 80 % случаев В-ОЛЛ у пациентов детского возраста и в 60–70 % случаев заболевания у пациентов взрослого возраста [3].

Основной задачей диагностического этапа при В-ОЛЛ является изучение факторов, позволяющих выделить пациентов с неблагоприятным прогнозом. Результаты многих исследований доказывают значимую роль делеций гена *IKZF1* в патогенезе и прогрессировании ОЛЛ. Ген *IKZF1* кодирует транскрипционный фактор, ДНК-связывающий белок семейства цинковых пальцев Ikaros [4–8].

В норме белок Ikaros участвует в ремоделировании хроматина и регулирует дифференцировку Т- и В-клеток. На ранних стадиях гемопоэза регуляторная роль данного белка как транскрипционного фактора сводится к репрессии генов миелоидной и эритроидной линий дифференцировки и стимуляции генов, ответственных за лимфоидную дифференцировку [9; 10]. Нарушение функций белка Ikaros опосредует блокаду дифференцировки В-лимфоцитов на стадии перехода от про-В-клеток к пре-В-клеткам, а полная потеря его функций может привести к отсутствию всего В-клеточного компартмента [10]. Кроме того, описаны дополнительные механизмы патогенетического влияния: усиление пролиферации клеток по причине отключения контроля со стороны белка Ikaros над рядом ключевых генов, а также сверхэкспрессия антиапоптотических генов *JAK1*, *JAK3*, *STAT3* и *STAT5* в результате нарушения передачи каскада сигналов по одному из важнейших коммуникационных узлов клетки – сигнальному пути JAK/STAT [10; 11].

Ген *IKZF1* общей протяженностью 108 019 пар оснований (п. о.) расположен на коротком плече 7-й хромосомы человека (локус 7p12.2). Он состоит как минимум из девяти экзонов, первый из которых не является белоккодирующим, но может вместе с промоторной областью регулировать транскрипцию (рис. 1) [5; 9; 12]. Экзоны 4–6 кодируют четыре N-концевых ДНК-связывающих домена типа «цинковые пальцы», а экзон 8 кодирует два С-концевых домена типа «цинковые пальцы», которые необходимы для гомо- и гетеродимеризации белка Ikaros с другими членами своего семейства (Helios, Aiolos, Eos, Pegasus) [9; 12].

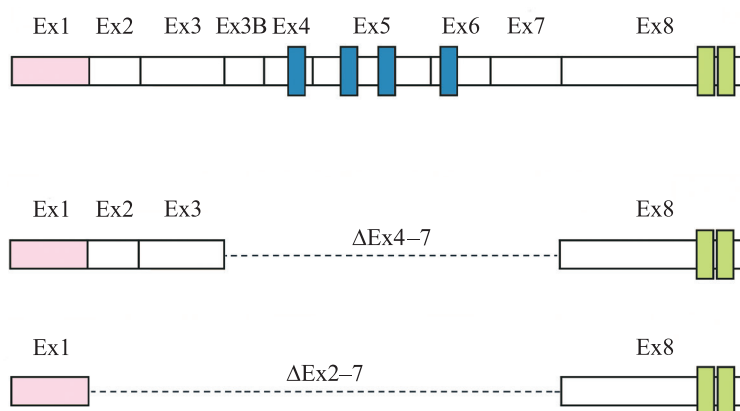


Рис. 1. Структура гена *IKZF1*. Синим цветом обозначены участки ДНК, кодирующие N-концевые домены типа «цинковые пальцы», зеленым цветом – участки ДНК, кодирующие С-концевые домены типа «цинковые пальцы», розовым цветом отмечен первый некодирующий экзон

Fig. 1. Structure of the *IKZF1* gene. Blue colour indicates DNA regions encoding N-terminal zinc domains, green colour indicates DNA regions encoding C-terminal zinc domains, pink colour marked the first non-coding exon

Аберрации гена *IKZF1* разнообразны, они включают моносомию 7-й хромосомы, образование ее дериватов, потерю короткого плеча, точечные мутации и внутригенные делеции. Все перечисленные аберрации, за исключением точечных мутаций, описаны как вторичные события лейкозогенеза, которые приводят к потере или нарушению функций белка Ikaros и выражаются в существенных комплексных изменениях со стороны системы гемопоэза [10; 13]. При В-ОЛЛ наиболее распространенными молекулярно-генетическими событиями в локусе гена *IKZF1* являются внутригенные делеции участка размером 15 000–200 000 п. о.,

обуславливающие потерю нескольких экзонов. Частота других aberrаций не превышает 5 % [10]. Делеции гена *IKZF1* определяются в среднем у 10 % пациентов детского возраста с В-ОЛЛ. Среди взрослых пациентов распространенность делеций увеличивается до 30–50 %, а при наличии транслокации *BCR::ABL1* – до 80 % [4; 5]. Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в повышенной экспрессии коротких транскриптов (изоформ) гена *IKZF1*. Однако в подавляющем большинстве случаев повышенная экспрессия коротких изоформ является следствием внутригенных делеций [10].

С гена *IKZF1* транскрибируются как минимум 13 различных транскриптов. В результате образуются изоформы белка, отличающиеся между собой размерами и функциональной активностью. Известные в настоящее время изоформы имеют идентичные белоксвязывающие домены на С-конце, но различаются составом ДНК-связывающих доменов типа «цинковые пальцы» на N-конце. Функциональные длинные изоформы (Ik1, Ik2, Ik2a, Ik3, Ik3a) содержат как минимум три ДНК-связывающих цинковых пальца. Такие изоформы характеризуются внутриядерной локализацией, обладают высокой аффинностью к определенному промотору ДНК, функционируют как транскрипционный фактор и участвуют в организации структуры хроматина. Изоформы белка Ikaros, в которых отсутствуют два и более ДНК-связывающих цинковых пальца, называются короткими, или доминантно-негативными (Ik-DN) (Ik4, Ik4a, Ik5, Ik6, Ik7, Ik8, Ik9). Они неспособны к взаимодействию с ДНК и, соответственно, выполнению своей основной функции, но могут образовывать димеры с длинными изоформами белка Ikaros, нарушая тем самым их нормальное функционирование [13].

Среди внутригенных делеций гена *IKZF1*, приводящих к aberrантному сплайсингу, наиболее часто (не менее 30 % случаев) обнаруживается делеция с 4-го по 7-й экзоны (Ex4–7 (ранее Ex3–6), на рисунках обозначена как ΔEx4–7). Еще одна распространенная делеция (Ex2–7 (ранее Ex1–6), на рисунках обозначена как ΔEx2–7) захватывает с 2-го по 7-й экзоны. Делеция Ex2–7 приводит к образованию нефункциональной аллели гена, поскольку 1-й экзон не является белоккодирующим. Частота встречаемости других известных делеций (Ex2–8 и Ex4–8) при ОЛЛ, по разным данным, не превышает 4 % [7].

Логично предположить, что в результате делеций такого типа механизм сплайсинга будет нарушен и, вероятно, это приведет к образованию нефункциональных коротких изоформ белка. Так, наиболее часто встречающаяся короткая изоформа Ik6 образуется в результате делеции Ex4–7 и последующего сплайсинга между 3-м и 8-м экзонами [7; 14].

Цель данного исследования – охарактеризовать координаты точек разрыва-соединения, определить особенности фланкирующих нуклеотидных последовательностей ДНК при делециях (Ex4–7 и Ex2–7) гена *IKZF1* у пациентов детского возраста с В-ОЛЛ.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования служили последовательности ДНК, полученные из клеток костного мозга пациентов детского возраста с подтвержденным первично диагностированным В-ОЛЛ. Размер выборки составил 266 пациентов. Среди них у 14 человек методом ПЦР выявлена делеция Ex4–7, у 3 человек – делеция Ex2–7. Другие распространенные типы делеций (Ex2–8 и Ex4–8) у пациентов исследуемой группы не обнаружены. Делеции выявляли согласно инструкции «Метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых»¹, где изложен метод обнаружения большинства известных (в том числе четырех вышеперечисленных) внутригенных делеций гена *IKZF1*, однако авторы не исключают, что в редких случаях он может быть нечувствительным в отношении крайне редких делеций, точки разрыва при которых могут лежать за пределами зоны амплификации праймеров.

Для выравнивания последовательностей и визуализации полученных результатов применяли программу *SnapGene* (версия 2.3.2) (*GSL Biotech, LLC*, США).

В качестве референсной последовательности использовали вариант NG_034231.1 из базы данных RefSeqGene (NCBI Reference Sequence)².

Для поиска сигнальных последовательностей рекомбинации (*recombination signal sequences*, RSS) применяли веб-сервер *RSSsite*, который включает в себя базу данных RSSdb для идентификации предварительно вычисленных потенциальных RSS и инструмент поиска DnaGrab, позволяющий оценивать потенциальные RSS в последовательностях, предоставленных пользователем [15]. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программной среды R (версия 3.4.2).

¹Метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 17.05.2019 / Респ. науч.-практ. центр дет. онкологии, гематологии и иммунологии ; О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко. Минск, 2019. 13 с.

²Homo sapiens Ikaros family zinc finger 1 (*IKZF1*), RefSeqGene (LRG_1121) on chromosome 7 [Electronic resource]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_034231.1 (date of access: 17.07.2023).

Результаты и их обсуждение

Анализ внутригенных делеций гена *IKZF1* был проведен в 266 образцах моноклеарных клеток костного мозга пациентов детского возраста с первичным В-ОЛЛ, частота делеций составила 6,4 %. Все выявленные делеции являлись моноаллельными. Наиболее часто обнаруживалась внутригенная делеция Ex4–7 – в 14 случаях (5,3 %) первичного В-ОЛЛ и 6 случаях (100 %) рецидивов заболевания. Вариант более крупной делеции Ex2–7 был выявлен у 3 пациентов (1,1 %) с первичным В-ОЛЛ (при рецидивах заболевания данная делеция не обнаруживалась). Другие распространенные типы делеций (Ex2–8 и Ex4–8) у пациентов исследуемой группы не выявлены.

При делеции Ex2–7 гена *IKZF1* точки разрыва-соединения находились в 1-м и 7-м интронах, размер делеций варьировал от 88 137 до 88 549 п. о. (табл. 1, рис. 2). В 1-м интроне общий разброс точек разрыва-соединения составил 4–411 п. о. При делеции Ex4–7 точки разрыва-соединения располагались в 3-м и 7-м интронах, размер делеций варьировал от 50 735 до 50 752 п. о. (см. табл. 1, рис. 3). В 3-м интроне общий разброс точек разрыва-соединения составил 13 п. о. Как видно, у всех 17 пациентов точки разрыва-соединения находились в 7-м интроне, где их общий разброс составил 14 п. о. Почти во всех случаях (у 15 из 17 пациентов) достраивались нематричные нуклеотиды (от 1 до 17 п. о.). Локализация точек разрыва являлась уникальной для каждого пациента.

Таблица 1

Размер и локализация делеций Ex2–7 и Ex4–7
у пациентов с первичным В-ОЛЛ

Table 1

Size and localisation of Ex2–7 and Ex4–7 deletions
in patients with primary B-cell precursor
acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)

Номер пациента	Размер делеции, п. о.	Координаты делеции, п. о.
<i>Делеция Ex2–7</i>		
1	88 549	8302–96 850
2	88 153	8709–96 861
3	88 137	8713–96 849
<i>Делеция Ex4–7</i>		
4	50 735	46 117–96 851
5	50 740	46 116–96 855
6	50 737	46 115–96 851
7	50 741	46 115–96 855
8	50 736	46 115–96 850
9	50 735	46 114–96 848
10	50 736	46 114–96 849
11	50 739	46 114–96 851
12	50 739	46 114–96 852
13	50 743	46 111–96 853
14	50 739	46 111–96 849
15	50 752	46 109–96 860
16	50 747	46 107–96 853
17	50 747	46 104–96 850

Примечание. Координаты делеций указаны относительно референсной последовательности гена *IKZF1* (NG_034231.1).

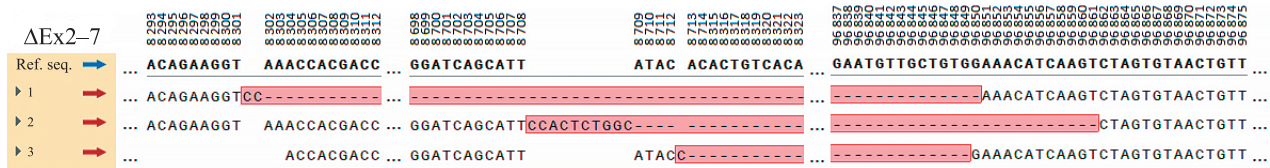


Рис. 2. Точки разрыва-соединения гена *IKZF1*

у пациентов детского возраста с В-ОЛЛ, имеющих делецию Ex2-7:

1-3 – нуклеотидные последовательности, принадлежащие пациентам 1-3.

Область делеции, включая нематричные нуклеотиды, выделена красным цветом, координаты указаны относительно референсной последовательности гена *IKZF1* (NG_034231.1), обозначенной как Ref. seq.

Fig. 2. Breakpoints of the *IKZF1* gene in pediatric BCP-ALL patients with Ex2-7 deletion:

1-3 – nucleotide sequences of patients 1-3. The deletion region, including non-matrix nucleotides, is highlighted in red colour, coordinates are given relative to the reference sequence of the *IKZF1* gene (NG_034231.1) designated Ref. seq.

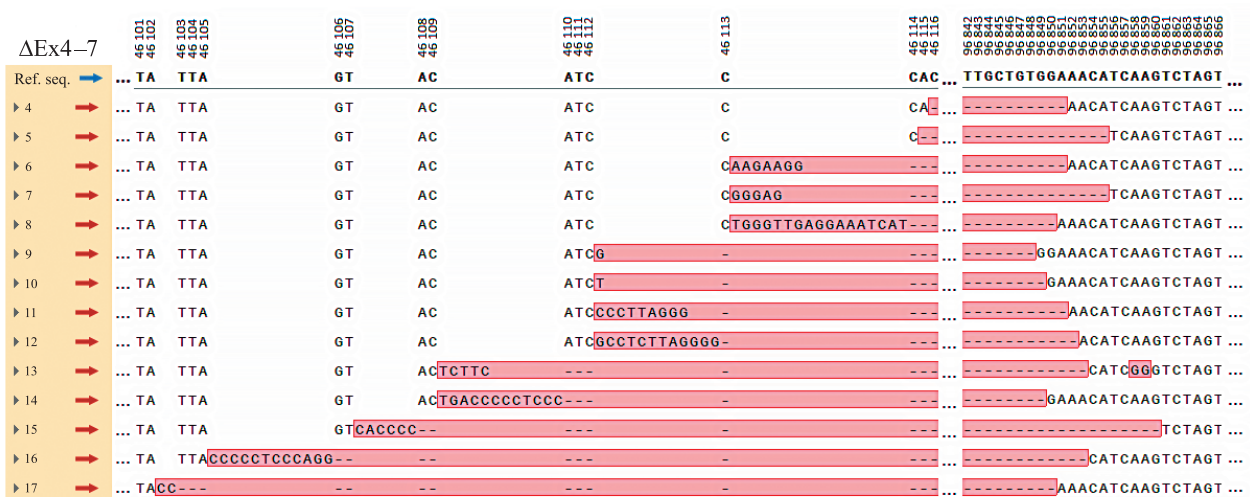


Рис. 3. Точки разрыва-соединения гена *IKZF1*

у пациентов детского возраста с В-ОЛЛ, имеющих делецию Ex4-7:

4-17 – нуклеотидные последовательности, принадлежащие пациентам 4-17.

Область делеции, включая нематричные нуклеотиды, выделена красным цветом, координаты указаны относительно референсной последовательности гена *IKZF1* (NG_034231.1), обозначенной как Ref. seq.

Fig. 3. Breakpoints of the *IKZF1* gene in pediatric BCP-ALL patients with Ex4-7 deletion:

4-17 – nucleotide sequences of patients 4-17. The deletion region, including non-matrix nucleotides, is highlighted in red colour, coordinates are given relative to the reference sequence of the *IKZF1* gene (NG_034231.1) designated Ref. seq.

Ввиду того что точки разрыва-соединения гена *IKZF1* у разных пациентов локализовались в одном диапазоне нуклеотидных последовательностей, они были проверены на наличие RSS.

Стоит отметить, что RSS представляют собой консервативные последовательности некодирующей ДНК, которые распознаются и разрезаются ферментным комплексом RAG1/RAG2 во время рекомбинации V(D)J в незрелых Т- и В-клетках. RSS фланкируют сегменты генов *V*, *D* и *J*, подвергающиеся рекомбинации в процессе формирования вариабельных областей тяжелой и легкой цепей.

Все RSS состоят из семи консервативных нуклеотидов (5'-CACAGTG-3'), за которыми следуют спейсер и консервативный нонамер (5'-ACAAAAACC-3'). Последовательность спейсера может варьировать, а его длина соответствует одному (12 ± 1 нуклеотид) или двум (23 ± 1 нуклеотид) виткам двойной спирали ДНК. Ошибки в рекомбинации V(D)J, включая расщепление RSS-подобных последовательностей, или криптоических RSS (*cryptic RSS*, cRSS), вне локусов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов, связаны с онкогенными транслокациями, наблюдаемыми при некоторых лимфоидных злокачественных новообразованиях [2].

В пределах гена *IKZF1* было обнаружено 130 последовательностей cRSS-12 и 149 последовательностей cRSS-23 с оценкой показателя RIC (*recombination information content*), превышающей пороговые

значения, которые составили $RIC \geq -38,81$ для cRSS-12 и $RIC \geq -58,45$ для cRSS-23. Чем выше показатель RIC, тем с большей вероятностью рекомбиназа V(D)J свяжется с сайтом. Максимальное значение показателя RIC среди всех cRSS было равно $-28,01$ для cRSS-12 и $-47,57$ для cRSS-23. Основные статистические показатели (Me (Q25; Q75), где Me – медиана, а (Q25; Q75) – интерквартильный размах) для cRSS-12 и cRSS-23 составили $-36,47$ ($-37,55$; $-34,53$) и $-56,48$ ($-57,84$; $-54,88$) соответственно.

Точки разрыва-соединения у пациентов с делециями гена *IKZF1* были расположены в области cRSS – внутри сайта либо в пределах 10–35 п. о. (рис. 4, табл. 2). Распределение расстояний между сайтами cRSS (cRSS-12, cRSS-23) и точками разрыва-соединения представлено на рис. 5. При делеции Ex2–7 гена *IKZF1* точки разрыва-соединения находились в пределах cRSS-12-45 (у пациента 1), cRSS-12-1 (у пациентов 2 и 3) и cRSS-23-40, а при делеции Ex4–7 гена *IKZF1* – в пределах cRSS-12-5 и cRSS-23-40 (первое число в обозначении cRSS соответствует типу cRSS относительно длины спейсера (12 или 23 п. о.), второе число – номеру cRSS относительно величины показателя RIC (от 1 до 130 для cRSS-12 и от 1 до 149 для cRSS-23)).

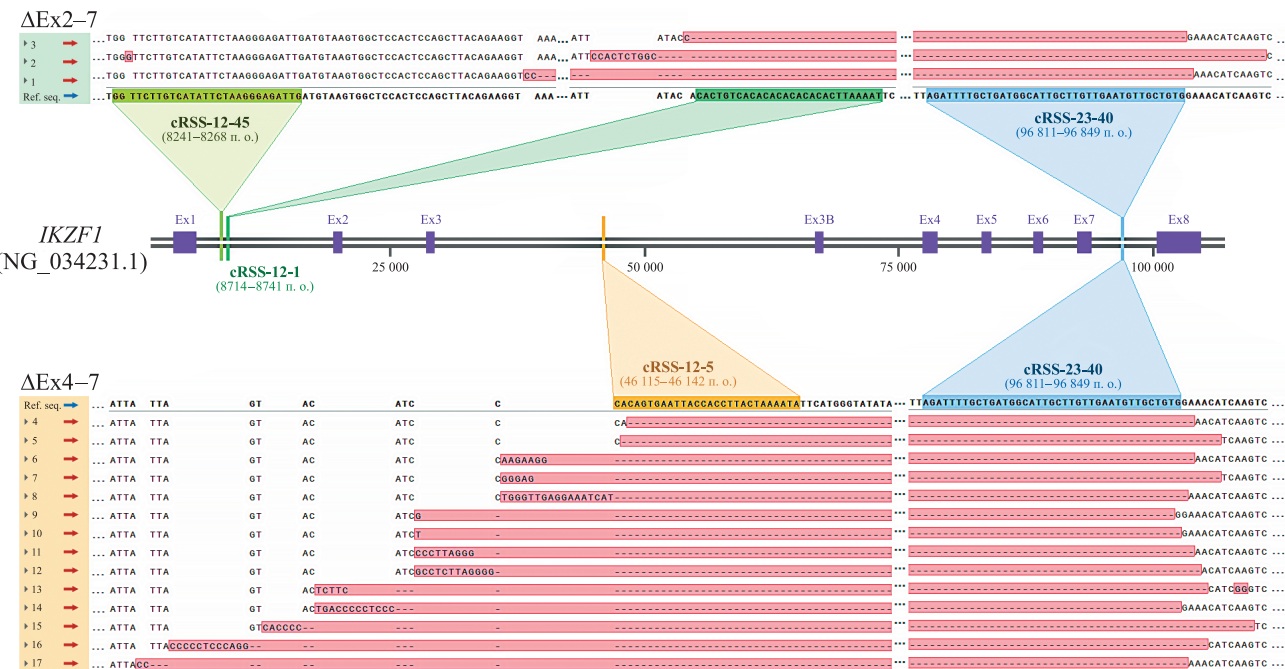


Рис. 4. cRSS в пределах точек разрыва-соединения гена *IKZF1* у пациентов с делециями Ex2–7 и Ex4–7

Fig. 4. cRSS within breakpoints of the *IKZF1* gene in patients with Ex2–7 and Ex4–7 deletions

Таблица 2

Характеристика cRSS
в пределах точек разрыва-соединения гена *IKZF1*

Table 2

Characterisation of cRSS
within breakpoints of the *IKZF1* gene

cRSS	Координаты, п. о.	RIC	Ориентация	Нуклеотидная последовательность
cRSS-12-45	8241–8268	–35,57	3'–5'	CAATCTCCCTTAGAATATGACAAGAACC
cRSS-12-1	8714–8741	–28,01	5'–3'	CACTGTACACACACACACTTAAAAT
cRSS-12-5	46 115–46 142	–30,62	5'–3'	CACAGTGAATTACCACCTTACTAAAATA
cRSS-23-40	96 811–96 849	–54,97	3'–5'	CACAGCAACATTCAACAAGCAATGCCATCAGCAAAATCT

Примечание. Координаты cRSS указаны относительно референсной последовательности гена *IKZF1* (NG_034231.1).

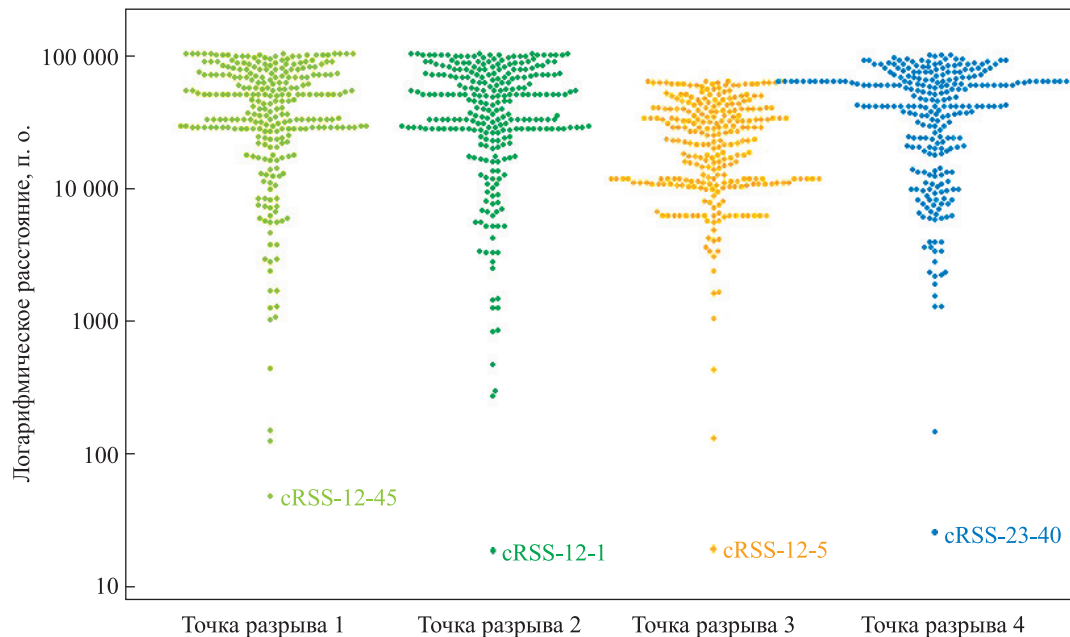


Рис. 5. Распределение расстояний между сайтами cRSS (cRSS-12, cRSS-23) и точками разрыва-соединения:
точка разрыва 1 – координаты точки разрыва-соединения для пациента 1 с делецией Ex2–7;
точка разрыва 2 – среднее значение координат точек разрыва-соединения для пациентов 2 и 3 с делецией Ex2–7;
точка разрыва 3 – среднее значение координат точек разрыва-соединения для пациентов 4–17 с делецией Ex4–7;
точка разрыва 4 – среднее значение координат точек разрыва-соединения для пациентов 1–17 с делециями Ex2–7 и Ex4–7

Fig. 5. Distribution of distances between cRSS sites (cRSS-12, cRSS-23) and breakpoints:
breakpoint 1 – breakpoint coordinates for patient 1 with Ex2–7 deletion;
breakpoint 2 – average value of breakpoint coordinates for patients 2 and 3 with Ex2–7 deletion;
breakpoint 3 – average value of breakpoint coordinates for patients 4–17 with Ex4–7 deletion;
breakpoint 4 – average value of breakpoint coordinates for patients 1–17 with Ex2–7 and Ex4–7 deletions

В норме рекомбиназа V(D)J, состоящая из белков RAG1 и RAG2, вводит двухцепочечные разрывы ДНК в месте соединения между RSS и фланкирующим сегментом гена. Затем за счет репарации ДНК разрывы на двух удаленных разрезах вновь объединяются, образуя функциональный ген посредством хромосомной перестройки. Сборка правильного состава сегментов гена определяется длиной спейсера (так называемое правило рекомбинации 12/23: рекомбинация соединяет только сегменты генов, фланкированные RSS с разной длиной спейсера (RSS-12 и RSS-23 или наоборот)). Ферментный комплекс RAG1/RAG2 чаще всего вносит разрывы в пределах 1–20 п. о. от границ RSS. Так, в нашем случае рекомбинация, предположительно, происходит между cRSS-12-5 и cRSS-23-40 (делеция Ex4–7, пациенты 4–17), между cRSS-12-45 и cRSS-23-40 (делеция Ex2–7, пациент 1) и между cRSS-12-1 и cRSS-23-40 (делеция Ex2–7, пациенты 2 и 3) согласно правилу рекомбинации 12/23. У пациента 1 точка разрыва находится на расстоянии 33 п. о. от сайта cRSS-12-45. Разрывы на таком расстоянии от сайта cRSS считаются редкими событиями, однако могут быть следствием различных нарушений в работе ферментного комплекса RAG1/RAG2.

Аберрантная рекомбинационная активность V(D)J связана с онкогенными хромосомными перестройками при лимфолейкозах и лимфомах. Механизмы транслокации остаются неясными, но, по-видимому, включают аберрантное разрезание cRSS рекомбиназой V(D)J в сайтах за пределами локусов Ig и TCR. Соединение этих разрывов потенциально приводит к возникновению делеций в лимфоцитах и лейкоэмической трансформации. Однако хромосомные мутации, опосредованные рекомбиназой V(D)J, остаются редкими явлениями. В настоящее время неизвестны механизмы контроля, которые предотвращают более частое участие аберрантных разрывов, обусловленных рекомбиназой V(D)J, в потенциально онкогенных хромосомных перестройках.

Экспериментальное определение *in vivo* корреляции оценки показателя RIC с уровнями RAG-опосредованного расщепления и активности рекомбинации V(D)J показывает, что оценка показателя RIC может быть некорректной из-за влияния структуры хроматина на распознавание функциональности RSS. Но на данный момент это не включено в оценку показателя RIC, что может объяснить причину разрывов между cRSS с немаксимальными значениями показателя RIC.

Заключение

Посредством альтернативного сплайсинга с гена *IKZF1* кодируется как минимум 13 различных изоформ белка, которые образуют димеры и мультимеры, регулируя экспрессию генов и ремоделирование хроматина. Реализация белка Ikaros в клетке зависит от количества и типа изоформ, так как они обладают разными свойствами. К сверхэкспрессии нефункциональных коротких (доминантно-негативных) изоформ белка Ikaros могут приводить делеции нескольких экзонов (встречаются чаще) и aberrantный сплайсинг.

В настоящем исследовании установлены и проанализированы точки разрыва-соединения гена *IKZF1* для 17 пациентов детского возраста с делециями Ex2–7 и Ex4–7. При делеции Ex4–7 точки разрыва гена *IKZF1* располагались в 3-м и 7-м интронах (их общий разброс составил 14 п. о.) и являлись уникальными для каждого пациента. В место разрыва достраивались нематричные нуклеотиды. При делеции Ex2–7 точки разрыва-соединения находились в 1-м и 7-м интронах (их общий разброс составил 4–400 п. о.) и также были уникальными для каждого пациента. Низкий разброс точек разрыва-соединения ДНК при делециях Ex2–7 и Ex4–7 можно объяснить расположением в этих локусах последовательностей, между которыми происходит ошибочная RSS-рекомбинация при V(D)J-реаранжировке про-B-клеток из-за aberrантной активности ферментного комплекса RAG1/RAG2. У 14 пациентов с делецией Ex4–7 точки разрыва находились в пределах сайтов cRSS-12-5 и cRSS-23-40, у 2 пациентов с делецией Ex2–7 – вблизи сайтов cRSS-12-1 и cRSS-23-40, у 1 пациента с делецией Ex2–7 – вблизи сайтов cRSS-12-45 и cRSS-23-40.

На основании полученных данных были уточнены текущие знания о внутригенных делециях гена *IKZF1*, представлены точки разрыва-соединения при делециях Ex2–7 и Ex4–7 для 17 пациентов детского возраста с В-ОЛЛ. Приведенные результаты помогут расширить понимание механизмов, приводящих к дисфункции белка Ikaros, что, в свою очередь, позволит другим исследователям более точно определять наличие aberrаций гена *IKZF1* в клинической практике.

Библиографические ссылки

1. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2020;105(11):2524–2539. DOI: 10.3324/haematol.2020.247031.
2. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*. 2015; 62(1):47–60. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.09.004.
3. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*. 2013;50(4): 314–324. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2013.10.001.
4. Vairy S, Tran TH. *IKZF1* alterations in acute lymphoblastic leukemia: the good, the bad and the ugly. *Blood Reviews*. 2020; 44:100677. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100677.
5. Stanulla M, Cavé H, Moorman AV. *IKZF1* deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? *Blood*. 2020;135(4):252–260. DOI: 10.1182/blood.2019000813.
6. Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG. Biologic and therapeutic implications of genomic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(17):3792. DOI: 10.3390/jcm10173792.
7. Klcio JM, Mullighan CG. Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. *Nature Reviews Cancer*. 2021;21(2):122–137. DOI: 10.1038/s41568-020-00315-z.
8. Vshyukova VS, Krasko OV, Yanchanka DA, Meleshko AN. Aberrant *IKZF1* gene as relapse predictor in standard-risk pediatric patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2022;44(4):769–776. DOI: 10.1111/ijlh.13853.
9. Olsson L, Johansson B. Ikaros and leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2015;169(4):479–491. DOI: 10.1111/bjh.13342.
10. Vshivkova VS, Meleshko AN. The role of Ikaros transcriptional factor in normal hematopoiesis and leukemogenesis: biological and clinical aspects. *Advances in Molecular Oncology*. 2015;2(1):13–26. Russian. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.013-026.
11. Yadav V, Ganesan P, Veeramani R, Dinesh Kumar V. Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2021;21(1):e57–e65. DOI: 10.1016/j.clml.2020.08.011.
12. Xia R, Cheng Y, Han X, Wei Y, Wei X. Ikaros proteins in tumor: current perspectives and new developments. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:788440. DOI: 10.3389/fmolb.2021.788440.
13. Affar M, Bottardi S, Quansah N, Lemarié M, Ramón AC, Affar EB, et al. Ikaros: from chromatin organization to transcriptional elongation control. *Cell Death & Differentiation* [Internet]. 2023 August 24 [cited 2024 March 17]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41418-023-01212-2>. Epub ahead of print. DOI: 10.1038/s41418-023-01212-2.
14. Wang Y, Cheng Yu, Zhang Yv, Zhang Yu, Sun T, Zhu Y, et al. Identification of *IKZF1* genetic mutations as new molecular subtypes in acute myeloid leukaemia. *Clinical and Translational Medicine*. 2023;13(6):e1309. DOI: 10.1002/ctm2.1309.
15. Merelli I, Guffanti A, Fabbri M, Cocito A, Furia L, Grazini U, et al. RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic recombination signal sequences in human and murine genomes. *Nucleic Acids Research*. 2010;38(supplement 2): W262–W267. DOI: 10.1093/nar/gkq391.

Получена 25.03.2024 / исправлена 19.07.2024 / принята 30.07.2024.
Received 25.03.2024 / revised 19.07.2024 / accepted 30.07.2024.