

Молекулярные механизмы лейкозогенеза

Лекция № 3

Гемобластозы миелоидного происхождения

Д.А. Домнинский

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева
Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

Molecular mechanisms of leukaemogenesis

3. Myeloid hematological malignancies

D.A. Domninsky

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Предисловие

В 2 предыдущих лекциях были рассмотрены основные клеточные механизмы, нарушение которых способно вызвать индукцию онкогенных процессов в кроветворных клетках. Геномные aberrации, ведущие к развитию гемобластозов, условно подразделяются на 2 группы (мутации класса I и класса II), которые взаимно дополняют онкогенный потенциал друг друга (см. лекции № 1 и № 2 в журнале «Онкогематология» № 4 за 2010 г. и № 1 за 2011 г. соответственно). В этой лекции будут обсуждаться основные типы рекуррентных геномных aberrаций, встречающихся при лейкозах миелоидного происхождения, а также механизмы реализации онкогенного потенциала этих генетических нарушений.

Глава I. Современные принципы классификации гемобластозов

В последние годы молекулярно-генетическая характеристика опухолевых клеток становится ключевым диагностическим и прогностическим фактором. Прогностическая составляющая этой характеристики заключается в высокой степени корреляции между наличием определенного набора геномных aberrаций и особенностями заболевания. Диагностическая составляющая позволяет вносить уточнения в существующую классификацию гемобластозов, выделяя специфичные варианты заболеваний, которым присуще наличие определенных генетических аномалий [1]. Отдельным вопросом является соотношение между этими двумя составляющими и то, какие мутации можно считать диагностическими (т. е. определяющими вариант заболевания), а какие — прогностическими. Очень часто рекуррентные aberrации имеют как диагностическое, так и прогностическое значение, но есть и исключения. Например, мутации гена *FLT3* часто встречаются при разных вариантах острого лейкоза как миелоидного, так

и лимфоидного происхождения. Понятно, что такие мутации являются прогностическим фактором, а не диагностическим. Можно предположить, что к диагностическим aberrациям относятся нарушения, которые инициируют онкогенез в клетках, имеющих миелоидную или лимфоидную природу и находящихся на разных уровнях дифференцировки, что и обуславливает фенотип опухоли. К aberrациям, имеющим прогностическое значение, следует отнести дополнительные онкогенные мутации, которые могут быть комплементарны инициирующим (диагностическим) мутациям (мутация класса I + мутация класса II) и оказывать влияние на характер протекания болезни.

В таблице приведен список рекуррентных генных aberrаций при гемобластозах миелоидного происхождения, которые согласно рекомендациям ВОЗ имеют диагностический характер [1, 2]. Краткое описание понятий и терминов, применяемых для описания генетических аномалий, приведено в Приложении. Подразделение острого миелолейкоза (ОМЛ) на различные варианты, приведенное в таблице, основано на рекуррентных геномных изменениях в лейкозных клетках. В одних случаях классификация ВОЗ почти полностью совпадает с FAB-классификацией, составленной на основе цитоморфологической характеристики опухоли. Например, при M3-типе ОМЛ по FAB-классификации (ОПЛ, острый промиелоцитарный лейкоз) хромосомная транслокация $t(15;17)(q22;q12)$, связанная с образованием химерного гена *PML-RARA*, встречается у 98% больных. У 2% пациентов также выявляются транслокации, которые затрагивают локусы 17q12 и приводят к рекомбинации гена *RARA* с иными генами-партнерами. В других случаях FAB-классификация является очень «широкой» — некоторые типы ОМЛ не всегда сочетаются с какой-либо одной специфичной геномной aberrацией. Например, только в 40% случаев M2-типа ОМЛ по FAB-классифика-

Подтипы ОМЛ, выделенные в отдельные группы по классификации ВОЗ [1] (*), и подтипы миелопролиферативных заболеваний [2], характеризующиеся специфичными рекуррентными генными абберациями

Заболевание, хромосомная транслокация	Химерные гены	% (**)
ОМЛ, t(8;21)(q22;q22) [M2]	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	100
ОМЛ, inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22) [M4Eo]	<i>CBFB-MYH11</i>	100
ОМЛ, t(9;11)(p22;q23) [M4, M5]	<i>MLL-MLLT3</i>	100
ОМЛ, t(6;9)(p23;q34) [M2]	<i>DEK-NUP214</i>	100
ОМЛ, inv(3)(q21q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2) [M0, M4]	<i>RPN1-EVT1</i>	100
ОМЛ, t(1;22)(p13;q13) [M7]	<i>RBM15-MKL1</i>	100
ОПЛ, t(15;17)(q22;q12) [M3]	<i>PML-RARA</i>	100
ОМЛ с мутациями в гене <i>NPM1</i>		100
ОМЛ с мутациями в гене <i>CEBPA</i>		100
Миелопролиферативные заболевания		
Ph+ ХМЛ, t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	100
Истинная полицитемия, мутация <i>JAK2</i> V617F		95
мутации в 12-м экзоне гена <i>JAK2</i>		5
Эссенциальная тромбоцитемия, мутация <i>JAK2</i> V617F		50
Хронический идиопатический миелофиброз, мутация <i>JAK2</i> V617F		50
мутация <i>MPL</i> W515L/K		5
Хронический нейтрофильный лейкоз, мутация <i>JAK2</i> V617F		20
Хронический эозинофильный лейкоз с del14q12	<i>FIP1L1-PDGFRB</i>	100
Хронический эозинофильный лейкоз с перестройками в локусе 5q33	варианты химерного гена <i>PDGFRB</i>	100
Лейкоз/лимфома стволовых клеток с перестройками в локусе 8p11	варианты химерного гена <i>FGFR1</i>	100
Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, мутации в гене <i>PTPN11</i>		30
мутации в гене <i>NFI</i>		15
мутации в гене <i>RAS</i>		15
Системный мастоцитоз, мутации гена <i>KIT</i>		100

(*). В квадратных скобках указан тип ОМЛ по FAB-классификации, из которого выделен указанный подтип ОМЛ. (**) Частота встречаемости геномных аббераций при данном типе заболевания.

Аббревиатуры: *BCR* – breakpoint cluster region; *CBFB* – core binding factor β; *CEBPA* (C/EBPα) – CCAAT enhancer binding factor α; *EVT1* – ecotropic viral integration site 1; *FGFR1* – fibroblast growth factor receptor 1; *FIP1L1* – FIP1 like 1 (где FIP1 – factor interacting with PAP); *MKL-1* – megakaryoblastic leukemia (также известен как *MAL*, megakaryocytic acute leukemia); *MLL* – mixed lineage (myeloid/lymphoid) leukemia; *MLLT3* – mixed-lineage leukemia translocated to chromosome 3 (также известен как *AF9* – ALL1-fused gene from chromosome 9, где ALL1 – старое название гена *MLL*); *MPL* – myeloproliferative leukemia virus, human homolog (также известен как *TPOR*, рецептор тромбопоэтина); *MYH11* – smooth-muscle myosin heavy chain 11; *NFI* – neurofibromin 1; *NPM1* – nucleophosmin 1; *NUP214* – nucleoporin 214kDa; *PDGFRB* – platelet-derived growth factor receptor β; *PDGFRA* – platelet-derived growth factor receptor α; *Ph* – филадельфийская хромосома (22q–); *PML* – promyelocytic leukemia; *PTPN11* – protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; *RARA* – retinoic acid receptor α; *RAS* – rat sarcoma virus; *RBM15* – RNA binding motif protein 15 (также известен как *OTT*, one twenty-two); *RPN1* – ribophorin 1; *RUNX1* – runt-related transcription factor 1 (также известен как *AML1* – acute myeloid leukemia 1); *RUNX1T1* – runt-related transcription factor 1; translocated to 1 (также известен как *ETO* – eight twenty one).

Приложение. Основные типы геномных aberrаций

Геномные aberrации можно условно подразделить на крупные (хромосомные) aberrации, которые выявляются цитогенетическими методами, и более мелкие (скрытые, криптические) aberrации, которые можно выявить только молекулярными методами, типа ПЦР и с эквенирования ДНК. На рис. 1 показаны 2 основных типа хромосомных aberrаций: (1) Сбалансированные (реципрокные) хромосомные транслокации не приводят к изменению количества генетического материала. В области хромосомной рекомбинации могут образовываться химерные гены, одна часть которых («голова», N-концевая часть гибридного белка) принадлежит гену из одной хромосомы, а другая («хвост», С-концевая часть гибридного белка) — гену из другой хромосомы. С химерных генов экспрессируются гибридные (или «слитные», fusion) белки. Химерные гены образуются на обеих рекомбинантных хромосомах, но только один из них, как правило, обладает онкогенным потенциалом. Ген на другой хромосоме, так называемый реципрокный ген, может кодировать гибридный реципрокный белок, структура которого является зеркальным отражением онкобелка (см. рис. 1, слева внизу). Если хромосомы обмениваются фрагментами разной величины, то хромосома, получившая больший фрагмент, обозначается как «Nq+» (или «Np+», если транслокация затронула короткое плечо хромосомы N), а другая, уменьшившаяся в размере хромосома, обозначается как «Nq-» или «Np-». (2) Несбалансированные aberrации могут приводить к увеличению (gain) или потере (loss) генетического материала. Увеличение генетического материала (помимо полной или частичной трисомии) может представлять собой внутри- или внехромосомную амплификацию, приводящую к возникновению однородно окрашенных локусов (HSR, *homogeneously staining regions*) или двойных минихромосом (dmim, *double-minute chromosomes*) соответственно. Потеря генетического материала может быть разного размера — от потери целых хромосом (моносомия) до потери всего лишь нескольких нуклеотидов ДНК (микроделеции).

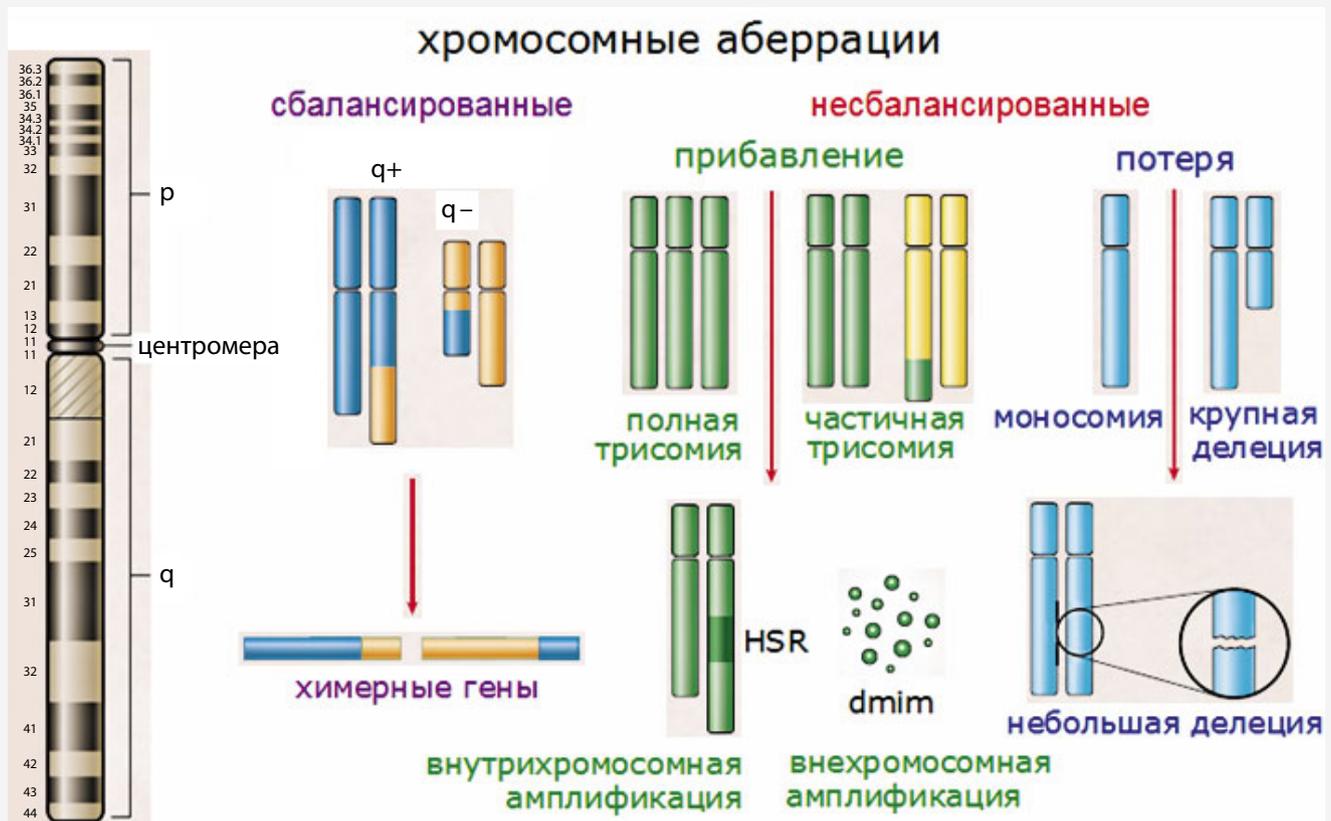


Рис. 1. Основные типы хромосомных aberrаций. Рисунок адаптирован из обзора S. Frohling & H. Dohner [37]

В хромосомах выделяют короткое (p, в акроцентрических хромосомах оно почти отсутствует) и длинное (q) «плечи», разделенные центромерой. Хромосомы содержат участки с более (г етерохроматин, «молчащая» ДНК) и менее (эухроматин, содержит активные гены) плотной упаковки, которые отличаются по интенсивности окрашивания (полосы, бэнды, рис. 1, слева). Нумерация этих полос (от центромеры к полюсам каждого плеча) позволяет указывать положение локусов хромосомных aberrаций или месторасположение генов. Например, $t(9;22)(q34.1;q11.23)$ означает транслокацию между хромосомами 9 и 22 с разрывами в локусах 9q34.1 и 22q11.23; $inv(16)(p13.11q22.1)$ — инверсия хромосомы 16 с разрывом в локусах 16p13.11 и 16q22.1; $del(5)(q13q35)$ — делеция в длинном плече хромосомы 5 с потерей материала между 5q13 и 5q35 локусами.

Однонуклеотидные (точковые) мутации подразделяют на: нейтральные (не изменяют кодируемую аминокислоту), миссенс (missense, изменение смысла кодона, кодирование другой аминокислоты), нонсенс (nonsense, бессмысленные, возникновение стоп-кодона, обрыв белкового синтеза).

Небольшие вставки (или дупликации) и делеции (если их размер не кратен 3) могут приводить к «сдвигу рамки считывания» (frameshift) и синтезу, после сайта мутации, другой белковой последовательности. Клетки опухоли генерируют большое число мутаций, но только небольшая их часть индуцирует или поддерживает онкогенез — «движущие» (driver) мутации — остальные мутации относятся к нейтральным, «пассажирским» (passenger) мутациям. Онкогенные мутации подразделяются на активирующие мутации (gain of function) и мутации инактивирующие (loss of function), частично или полностью, функции гена. Активирующие мутации, свойственные онкогенам, являются доминантно-негативными и обладают гапloedостаточностью (haploinsufficient), когда одного нормального аллеля недостаточно для выполнения обычной клеточной функции (онкобелок всегда побеждает). Для нейтрализации активности генов-супрессоров опухолей требуется инактивация (мутации или делеции) обеих аллелей.

ции выявляется хромосомная транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, сопровождаемая возникновением химерного гена *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)*. Еще 1 % больных ОМЛ М2 имеет $t(6;9)(p23;q34)$ транслокацию и химерный ген *DEK-NUP214 (DEK-CAN)*, а в оставшихся 59 % случаев ОМЛ М2 специфичных генетических aberrаций не обнаруживается. Это может быть связано или со слишком «грубыми» цитоморфологическими критериями FAB-классификации, приведшими к объединению в одну группу целого ряда различных по своей этиологии заболеваний, или с наличием при ОМЛ М2 каких-то трудно выявляемых (криптических) мутаций. В классификации ВОЗ лейкозы с $t(8;21)(q22;q22)$ и $t(6;9)(p23;q34)$ хромосомными транслокациями выделены в отдельные диагностические варианты (100 % в таблице). В некоторых случаях обнаружение в схожих по цитоморфологическим и иммунофенотипическим показателям заболеваниях нескольких вариантов геномных aberrаций еще не является причиной подразделять их на разные подтипы, так как результатом всех этих мутаций могут быть, например, нарушения в одном и том же пути сигнальной трансдукции. В главе II будет приведен пример такого заболевания, при котором идентичная конститутивная активация одного из триггеров сигнальной трансдукции (белка RAS) вызывается несколькими генетическими нарушениями в разных генах.

Использование данных молекулярно-генетического тестирования делает классификацию гематологических опухолей сложнее, но такой подход имеет большие перспективы, так как уже сегодня позволяет точнее дифференцировать гемобласты, выделяя группы с различным прогнозом. А в недалеком будущем такая классификация поможет при планировании индивидуальной терапевтической тактики с применением таргетных препаратов, мишенями которых являются онкогенные продукты конкретных геномных aberrаций.

Глава II. Мутации I класса

К мутациям I класса относятся генетические нарушения, которые увеличивают пролиферативный потенциал и жизнеспособность клеток, повышая их способность не отвечать на проапоптотические сигналы. В гематологических опухолях рекуррентные aberrации I класса активируют гены, которые кодируют околочелювные компоненты путей сигнальной трансдукции — рецепторы и медиаторы (см. лекцию № 1, рис. 1). Основные механизмы передачи сигнала от клеточной мембраны к ядру связаны, так или иначе, с переносом фосфатных групп с одного белка на другой. Это может быть прямое фосфорилирование белков протеинкиназами, т. е. перенос фосфатных групп с АТФ на аминокислотные остатки белков-акцепторов, что приводит к активации последних. Кроме того, активацию некоторых сигнальных белков можно формально приравнять к фосфорилированию — замена ГДФ (гуанозиндифосфата) на ГТФ (гуанозинтри-

фосфат, т. е. «добавление» еще одной фосфатной группы в белковый комплекс) в G-белках также приводит к их активации (см. лекцию № 2). В этой главе будут рассмотрены основные механизмы онкогенной активации генов, кодирующих сигнальные белки, которые наиболее часто встречаются в гематологических опухолях. Из данных, приведенных в таблице, к мутациям класса I относятся все рекуррентные геномные aberrации, которые характерны для миелопролиферативных заболеваний. При ОМЛ часто встречающиеся мутации I класса в генах *FLT3*, *KIT* и *RAS* не являются специфичными только для этого вида лейкоза, на основании этого они относятся к прогностическим признакам и не включены в классификацию ВОЗ.

Протеинкиназы — фосфатазы

«Все активные киназы похожи друг на друга, каждая неактивная киназа неактивна по-своему»
(своеобразный «научный» парафраз первых строк романа «Анна Каренина», приведенный в обзоре Луизы Джонсон и др. [3]).

Активные протеинкиназы обладают высоким онкогенным потенциалом. Поэтому в клетке существует много механизмов контроля их активности: от удаления активирующих фосфатных групп фосфатазами до полной деградации активированных белков убиквитин-протеасомной системой. Однако основным механизмом защиты является «самоконтроль» протеинкиназ — в отсутствие внешних воздействий они находятся в состоянии автоингибирования [4]. Все известные онкогенные aberrации, затрагивающие гены протеинкиназ, приводят к разрушению конформации автоингибирования. А так как в стабилизации такого автоингибирующего состояния в разных ферментах участвуют различные белковые домены (см. эпиграф к этой главе и лекцию № 2, рис. 3), то и механизмы разрушения этой конформации (онкогенная активация) в разных протеинкиназах могут существенно отличаться [4, 5].

На рис. 1А показана схема организации активной конформации киназного домена протеинкиназ. У всех исследованных протеинкиназ структурные особенности этой конформации подобны независимо от их специфичности (тирозиновые или серин-треониновые киназы) или особенностей клеточной локализации (цитозольные или рецепторные — RTKs, receptor tyrosine kinases) [6, 7]. К основным структурным элементам киназного домена, определяющим его активность, относятся: (1) петля активации (А-петля) в С-половине киназного домена, представляющая собой подвижную пептидную цепь, несущую аминокислотные остатки, способные к фосфорилированию (тирозин или треонин в зависимости от типа протеинкиназ); (2) в основании А-петли содержатся 2 консервативных мотива из 3 аминокислот — HRD (Г ис-Арг-Асп) и DFG (Асп-Фен-Глу), которые принимают участие

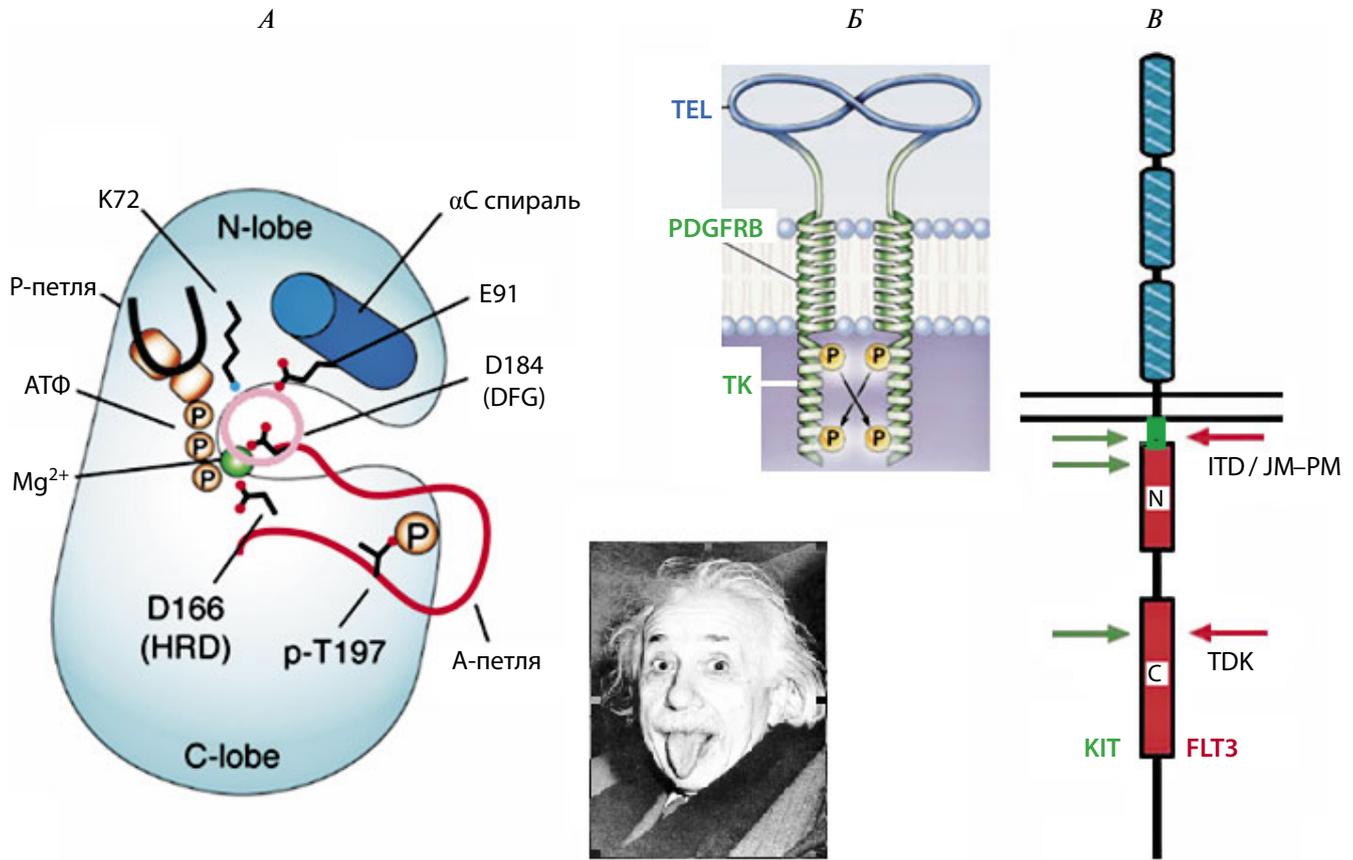


Рис. 1. Схематическое изображение протеинкиназы в активной конформации (А) и различных вариантов онкогенной активации рецепторных протеинкиназ (Б и В): (А) Основные структурные особенности активной конформации протеинкиназы на примере протеинкиназы А. Указано положение консервативных аминокислотных остатков (международная система обозначения аминокислот): D — аспарагиновая кислота, E — глутаминовая кислота, K — лизин, T — треонин. Подробности см. в тексте лекции; (Б) Схема активации тирозинкиназного рецептора PDGFRB в результате хромосомной транслокации t(5;12)(q33;p13), которая приводит к образованию химерного гена TEL-PDGFRB, с которого экспрессируется гибридный белок TEL-PDGFRB, содержащий N- и C-концевые области TEL- и PDGFRB-белков, соответственно. В гибридном белке внеклеточный домен PDGFRB заменен на последовательность TEL-белка (голубой цвет), которая содержит домен димеризации, опосредующий димеризацию и онкогенную активацию белка TEL-PDGFRB, при которой сближенные киназные домены (TK) гибридных рецепторов перекрестно активируют (P, фосфорилируют) друг друга. TEL — translocation ets leukemia (также известен как ETV6, ETS variant gene 6); (В) Схема строения рецепторов KIT и FLT3. Голубым цветом окрашен внеклеточный домен, зеленым — подмембранный (JM) домен, красным — C- и N-половины киназного домена, соединенные между собой подвижным белковым «шарниром» (черная вертикальная полоса между «N» и «C»). Стрелками указано местоположение онкогенных мутаций, обнаруженных в генах KIT (зеленые стрелки) и FLT3 (красные стрелки). Подробности см. в тексте лекции. Рисунок адаптирован из работ N. Jura et al. [6] и R. Schwartz [17]

в формировании каталитического (активного) центра белка (на рис. 1А активный центр фермента очерчен розовым кругом); (3) подвижная α C спираль в N-половине киназного домена осуществляет перемещения консервативного остатка глутаминовой кислоты (E91 на рис. 1А), который также формирует каталитический центр. Активная конформация киназного домена выглядит следующим образом: А-петля подвергнута фосфорилированию (по тирозину или треонину, в зависимости от типа протеинкиназы) и находится за пределами каталитического центра; HRD и DFG участки С-половины и глутамат α C спирали N-половины киназного домена «сдвинуты» друг к другу, формируя активный центр, способный связывать белок-субстрат и АТФ (в связывании АТФ также участвует «фосфатная петля», Р-петля). Такое взаиморасположение белковых участков внешне напоминает человека (голова — киназный домен), который высунул язык (А-петля) и при этом не

раскрыл широко рот (верхнее и нижнее «небо», E91 и HRD/DFG, соответственно, формируют «активный центр»). В общем, как на знаменитой фотографии «Эйнштейн показывает язык» (рис. 1).

Как же в рамках программы строгого самоконтроля формируется огромное разнообразие неактивных конформаций протеинкиназ? Если продолжить аналогию с человеческой головой, то эти процессы можно описать примерно так: широко открытый рот (увеличение «щели» между С- и N-половинами киназного домена, которое обеспечивается подвижным белковым «шарниром» между ними, при этом пептидные мотивы, формирующие активный центр, расходятся в разные стороны), но этого мало — образовавшаяся щель заполняется близлежащими белковыми фрагментами. Как было показано ранее (см. лекцию № 2, рис. 3), разрушенный каталитический центр может стабилизироваться путем проникновения в эту область различных под-

важных пептидных участков белка: А-петли (как, например, в случае FGFR и рецептора инсулина), С-концевого «хвоста» (TIE2 рецептор ангиопоэтинов, MET/HGFR и RON/MST1R рецепторы) и подмембранного домена (JM, juxtamembrane domain; KIT, PDGFR и FLT3 рецепторы) в случае RTKs [4], или фрагментов других (регуляторных) субъединиц ферментов [6]. Протеинкиназы семейства JAK для стабилизации автоингибирующей конформации используют свой 2-й (не рабочий) киназный домен, который в процессе эволюции приобрел регуляторные функции. А в случае ц-АМФ-зависимой протеинкиназы А (РКА) киназный домен ингибируется взаимодействием с регуляторной субъединицей этого фермента.

Конформация автоингибирования протеинкиназ является энергетически более выгодной, т. е. равновесие между активной и неактивной формой фермента сдвинуто в сторону неактивной конформации. Для изменения этого равновесия и разрушения стабильных ингибирующих конформаций протеинкиназ требуется внешнее воздействие [6]. Такое воздействие могут осуществлять другие активированные киназы, например, RTKs при их связывании с лигандом, которые фосфорилируют в белках-мишенях А-петлю (или другие заполняющие «щель» пептидные фрагменты, например JM-домен), что приводит к вытеснению А-петли и формированию активного каталитического центра. Цитозольные киназы, например SRC или ABL, могут активироваться субстратами этих ферментов или адапторными белками, которые рекрутируют к своим стыковочным сайтам регуляторные SH2- и/или SH3-домены фермента, что приводит к разрушению ингибирующей конформации «широко открытый рот» (см. лекцию № 2, рис. 3А). Циклин-зависимые киназы (CDKs, cyclin-dependent kinases), играющие ключевую роль в регуляции клеточного цикла, активируются белками циклинами. Циклины имеют участки связывания в районе αС спирали CDKs. Их связывание с киназой приводит к транслокации αС спирали в область активного центра, вытеснению из нее А-петли, формированию каталитического центра и активации CDK. Высокая внутриклеточная концентрация ц-АМФ вызывает активацию РКА — ц-АМФ связывается с регуляторной субъединицей киназы, это приводит к изменению конформации белка и освобождению активной РКА [6].

Онкогенными мутациями в генах, кодирующих протеинкиназы, являются только те, которые приводят к дестабилизации неактивной конформации фермента и, следовательно, к его неконтролируемой, конститутивной (постоянной) активации. То есть при таких мутациях изменениям подвергаются участки белка, которые отвечают за стабильность конформации автоингибирования, что делает эту конформацию энергетически невыгодной, и равновесие между активной и неактивной формой фермента сдвигается в сторону активной конформации. Зная особенности формирования неактивных структур протеинкиназ, можно в принципе пред-

сказать местоположение возможных онкогенных мутаций в этих белках. Если, например, неактивная конформация киназы стабилизируется JM-доменом (тирозинкиназные рецепторы KIT, FLT3 и PDGFR), то можно ожидать, что мутации будут затрагивать именно этот участок рецептора. Действительно, онкогенные мутации в генах, кодирующих KIT и FLT3 рецепторы, затрагивают всего 2 участка белковой молекулы — JM-домен и А-петлю (рис. 1В) [8]. Причем если в области А-петли выявляются в основном точечные онкогенные мутации (TKD, tyrosine kinase domain), локализованные около остатка аспартата (D835), то в JM-доме могут происходить как точечные мутации (JM-PM, JM single point mutations), так и более крупные изменения (делеции и вставки). Наиболее часто в гене FLT3 обнаруживаются внутренние тандемные дубликации (ITDs, internal tandem duplications — дублирование небольшого, кодирующего 3–10 аминокислот, участка ДНК) в JM-доме, которые имеют различное положение и размер. Наличие ITDs-мутации в гене FLT3 существенно ухудшает прогноз. Все мутации в генах этих рецепторов (TDK и ITD/JM-PM) затрагивают область контакта А-петли и JM-домена, который играет ключевую роль в формировании неактивной конформации белка. Нарушение такого контакта вследствие изменения аминокислотных последовательностей в этой области приводит к дестабилизации неактивной конформации, конститутивной активации рецепторов и онкогенезу [9–11]. Похожий тип нарушения ингибирующих белок-белковых взаимодействий наблюдается при мутациях в гене JAK2, которые являются рекуррентными aberrациями при некоторых миелопролиферативных заболеваниях (см. таблицу). Так как в формировании конформации автоингибирования активное участие принимает 2-й (не рабочий) киназный домен белка, то все выявленные в гене JAK2 онкогенные мутации (включая V617F) локалируются в области, которая кодирует N-концевую (регуляторную) часть псевдокиназного домена [12].

Наиболее частым механизмом активации генов (относящихся к мутациям как класса I, так и класса II) при гемобластозах являются сбалансированные (реципрокные) хромосомные транслокации, приводящие к возникновению химерных генов (см. Приложение и таблицу) [5, 13, 14]. При этом обычно ген-партнер по транслокации привносит в гибридный белок домены димеризации, что приводит к образованию димеров между мутантными протеинкиназами (аналогично димеризации RTKs при связывании с лигандом) и конститутивной активации ферментов. Именно таким образом активируется цитозольная киназа ABL при хромосомной транслокации t(9;22) и тирозинкиназные рецепторы FGFR1 (около 10 типов транслокаций локуса 8p11 с разными геномными локусами, приводящими к рекомбинации гена FGFR1 с различными генами-партнерами) и PDGFRB (более 20 разных хромосомных транслокаций с участием локуса 5q33). Все эти гибридные белки имеют сходное строение: N-концевая часть белка

(«голова») принадлежит белку-партнеру и несет домены димеризации, С-концевая часть белка («хвост») представляет собой часть протеинкиназы с киназным доменом. При этом в рекомбинантных RTKs, как правило, отсутствует большая часть внеклеточного домена (которая заменяется фрагментом белка-партнера), все остальные домены RTK сохраняются, что позволяет гибриднему белку функционировать в качестве лиганд-независимого, конститутивно активированного рецептора (рис. 1Б) [5, 13–15].

Достаточно необычен механизм онкогенной активации рецептора PDGFRA при хроническом эозинофильном лейкозе. Ген *PDGFRA* и его ген-партнер *FIP1L1* расположены недалеко друг от друга на 14-й хромосоме. Образование химерного гена *FIP1L1-PDGFR*A происходит в результате несбалансированной внутрихромосомной перестройки (делеции del14q12 размером 800 тыс. пар нуклеотидов), которая приводит к стыковке участков ДНК, кодирующих N-концевую область белка *FIP1L1* и С-концевую область белка *PDGFRA*. Однако белок *FIP1L1* не имеет доменов димеризации, поэтому онкогенный потенциал гибридного белка *FIP1L1-PDGFR*A реализуется с помощью другого механизма. В белке *FIP1L1-PDGFR*A отсутствует (частично или полностью) JM-домен от *PDGFRA*, который у рецептора *PDGFRA* отвечает за автоингибирование, поэтому киназный домен *FIP1L1-PDGFR*A находится в активном состоянии. Но так как в белке *FIP1L1-PDGFR*A также отсутствует и трансмембранный домен (который расположен «выше» JM-домена и в гибридный белок не включается), то он не может связываться с мембраной подобно рецептору и функционирует в клетке как конститутивно активированная цитозольная протеинкиназа [16]. Интересно, что при других хромосомных транслокациях, в которых участвует ген *PDGFRA*, в образующихся химерных генах также отсутствует трансмембранный домен *PDGFRA*, а JM-домен может сохраняться полностью, но в этих случаях белок-партнер (*STRN*, *TEL* или *BCR*) содержит домен димеризации, что позволяет гибриднему цитозольному белку находиться в активированном состоянии [18].

Знание структурных особенностей разнообразных неактивных конформаций протеинкиназ позволяет не только предсказывать расположение возможных онкогенных мутаций в этих белках (и наоборот, знание расположения онкогенных мутаций позволяет судить об автоингибирующей структуре фермента), но может помочь при проектировании нового поколения высокоспецифичных ингибиторов для различных вариантов мутантных белков. Первые ингибиторы протеинкиназ были спроектированы таким образом, что их мишенью являлись АТФ-связывающие «карманы» в активном центре ферментов. Такие ингибиторы моделировать достаточно просто, так как у исследователей есть структурный прототип лекарственного препарата — АТФ. Однако все протеинкиназы имеют участки связывания АТФ, поэтому первое поколение ингибиторов (к кото-

рым относится, например, иматиниб) в той или иной степени инактивирует целый ряд нормальных клеточных киназ, что приводит к побочным цитотоксическим эффектам препарата. Учитывая разнообразие неактивных конформаций протеинкиназ, следует ожидать, что препараты, мишенью которых будут конкретные структуры неактивных белков, и которые будут способны переводить онкогенные киназы в неактивное состояние и фиксировать их в этой конформации, будут более специфичны и могут совершить прорыв в онкологии [6, 19]. Но об этом речь пойдет в заключительной лекции нашего цикла.

Комплексные мутации, затрагивающие RAS-сигнализацию

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ) является примером гемобластоза, развитие которого связано с онкогенными мутациями в различных генах, но все эти мутации приводят к активации одного сигнального белка (*RAS*) и одного сигнального пути (*RAS-RAF-MAPK*) (см. лекцию № 2, глава III). Чаще всего при ЮММЛ выявляются активирующие мутации в генах *RAS* (*N-RAS* и *K-RAS*) и *PTPN11* (кодирует фосфатазу *SHP2*, SH2 domain-containing phosphatase 2), а также инактивирующие мутации в гене *NF1* [20]. Активность малых G-белков, к которым относятся белки *RAS*-семейства, контролируется на нескольких уровнях: собственной ГТФазной активностью G-белков, факторами, увеличивающими ГТФазную активность G-белков (*GAP*, супрессоры G-белков) и факторами обмена ГДФ на ГТФ (*GEF*, активаторы G-белков) (лекция № 2, глава III). *NF1* относится к белкам *GAP*-семейства и является ингибитором *RAS*-белков, поэтому его инактивация приводит к увеличению активности *RAS*. Фосфатаза *SHP2* «по определению» должна относиться к супрессорам опухолей, как и все остальные фосфатазы, но в случае ЮММЛ она выступает в роли онкогена, что является первым описанным примером такой неожиданной метаморфозы фосфатаз [21]. Действительно, фосфатазы, осуществляя дефосфорилирование сигнальных и адапторных белков, прерывают цепь сигнальной трансдукции, так как уничтожают активирующие сайты (фосфорилированные аминокислотные остатки в А-петле протеинкиназ) у первых, и стыковочные сайты (фосфотирозины) — у вторых.

На рис. 2 показан процесс активации *RAS-RAF-MAPK* пути сигнальной трансдукции, в котором в качестве активатора участвует *SHP2*-фосфатаза.

Было предложено несколько гипотез для объяснения активации *SHP2*-фосфатазой *RAS*-сигнального пути, но ни одна из них не нашла пока экспериментального подтверждения [22, 23]. Во всяком случае, установлено, что конститутивно активированная *SHP2*-фосфатаза формирует «шунт» (своеобразное «короткое замыкание», исключаящее из сигнальной цепи активированный рецептор), который индуцирует последова-

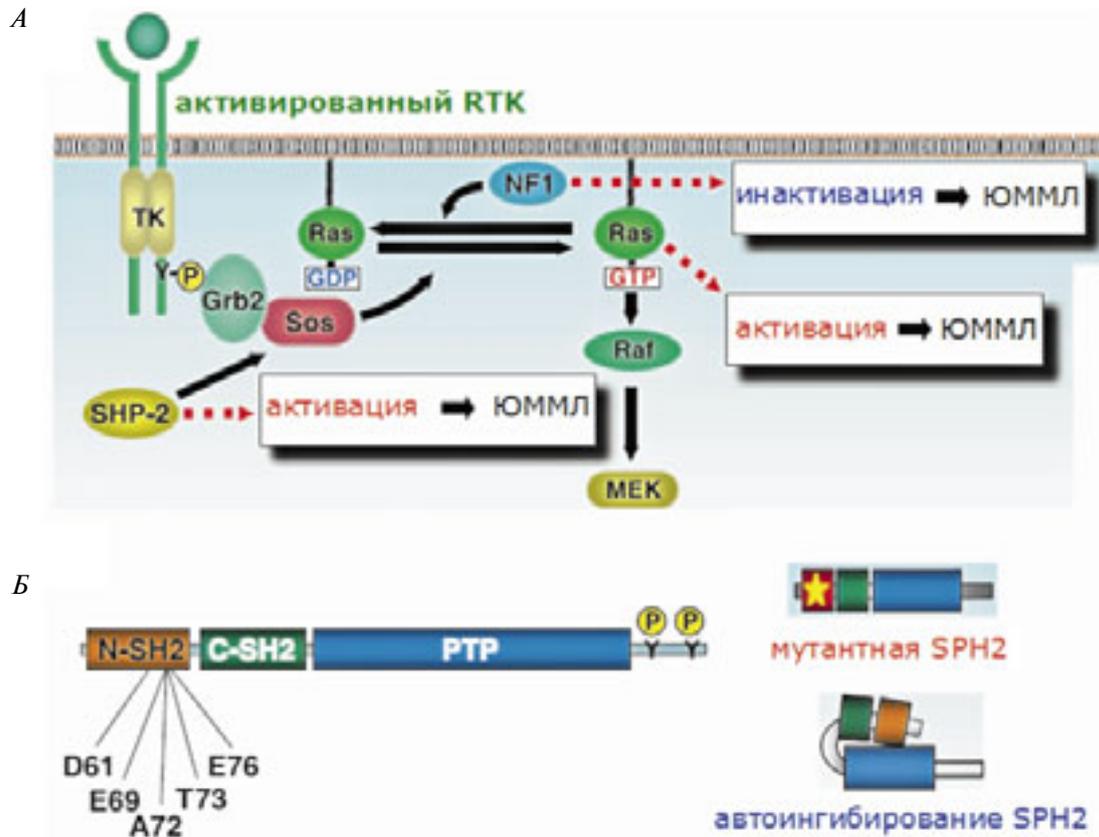


Рис. 2. Схема 3 вариантов конститутивной активации RAS-RAF-MAPK сигнального пути (А) и активации SHP2 фосфатазы при мутагенезе (Б): (А) Активация тирозинкиназного рецептора (RTK) приводит к фосфорилированию сигнальных и адапторных белков. Активная фосфатаза SHP2 в этом процессе функционирует как индуктор сборки комплекса из адапторного белка GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) и GEF-белка SOS (son of sevenless), что приводит к активации SOS-белком G-белка RAS и «запуску» RAS-RAF-MAPK-пути сигнальной трансдукции (см. также лекцию № 2, рис. 4). Ингибитором этого процесса является GAP-белок NF1. Мутации, активирующие SHP2- или RAS-белки и инактивирующие белок NF1, приводят к одному и тому же результату – конститутивной активации RAS-RAF-MAPK-сигнального пути и индукции онкогенеза; (Б) Схема формирования неактивной структуры SHP2. Взаимодействие N-концевого SH2-домена (N-SH2) белка SHP2 с C-концевыми стыковочными сайтами (P, фосфотирозин) приводит к экранированию каталитического домена (PTP) и к автоингибированию фосфатазы (схема внизу, справа). Онкогенные мутации (обозначены звездочкой на схеме сверху, справа) изменяют ключевые аминокислотные остатки в N-SH2-домене (D61-E76), которые отвечают за связь с фосфотирозином (схема слева). Это приводит к дестабилизации инактивирующей конформации SHP2 и конститутивной активации фосфатазы. Рисунок адаптирован из работы T. Matozaki et al. [22]

тельную лиганд-независимую реакцию: формирование стабильного комплекса из GRB2 адапторного белка и GEF белка SOS → активация RAS-белка → MAPK каскад сигнализации.

Глава III. Мутации II класса

Из данных, приведенных в таблице, к мутациям класса II относятся все диагностические рекуррентные геномные aberrации при О МЛ. Мутации класса II, влияющие на процессы дифференцировки и самоподдержания клеток крови, чаще всего происходят в генах, кодирующих белки-регуляторы генной экспрессии. Белки, регулирующие синтез мРНК, образуют в районе генных промоторов сложные комплексы, состоящие из активаторов и коактиваторов (репрессоров и корепрессоров) транскрипции, белков-модификаторов хроматина, белков комплекса инициации транскрипции (PIC) и других белков (см. лекцию № 1, Приложения 3 и 4). Такие активирующие (или репрессирующие) транскрипцию белковые комплексы собираются благодаря

большому числу очень тонких белок-ДНК и белок-белковых взаимодействий, нарушение которых (например, в результате мутаций в генах, кодирующих белки этих комплексов) может привести к фатальным для клетки последствиям, а в некоторых случаях — к развитию опухолеродных процессов. Так как все эти белки формируют своеобразный эпигенетический «ландшафт», определяющий постоянно меняющуюся на разных этапах развития клетки картину (паттерн) генной экспрессии, то кодирующие их гены можно условно отнести к «эпигенетическим» онкогенам и генам-супрессорам опухолей [24].

В рамках данного курса лекций подробно рассмотреть все лейкозогенные мутации класса II, приведенные в таблице, не представляется возможным. Поэтому основные механизмы реализации онкогенного потенциала мутаций этого класса будут рассмотрены на примере гена *MLL*, геномные aberrации с участием которого инициируют развитие опухолей как миелоидного, так и лимфоидного происхождения.

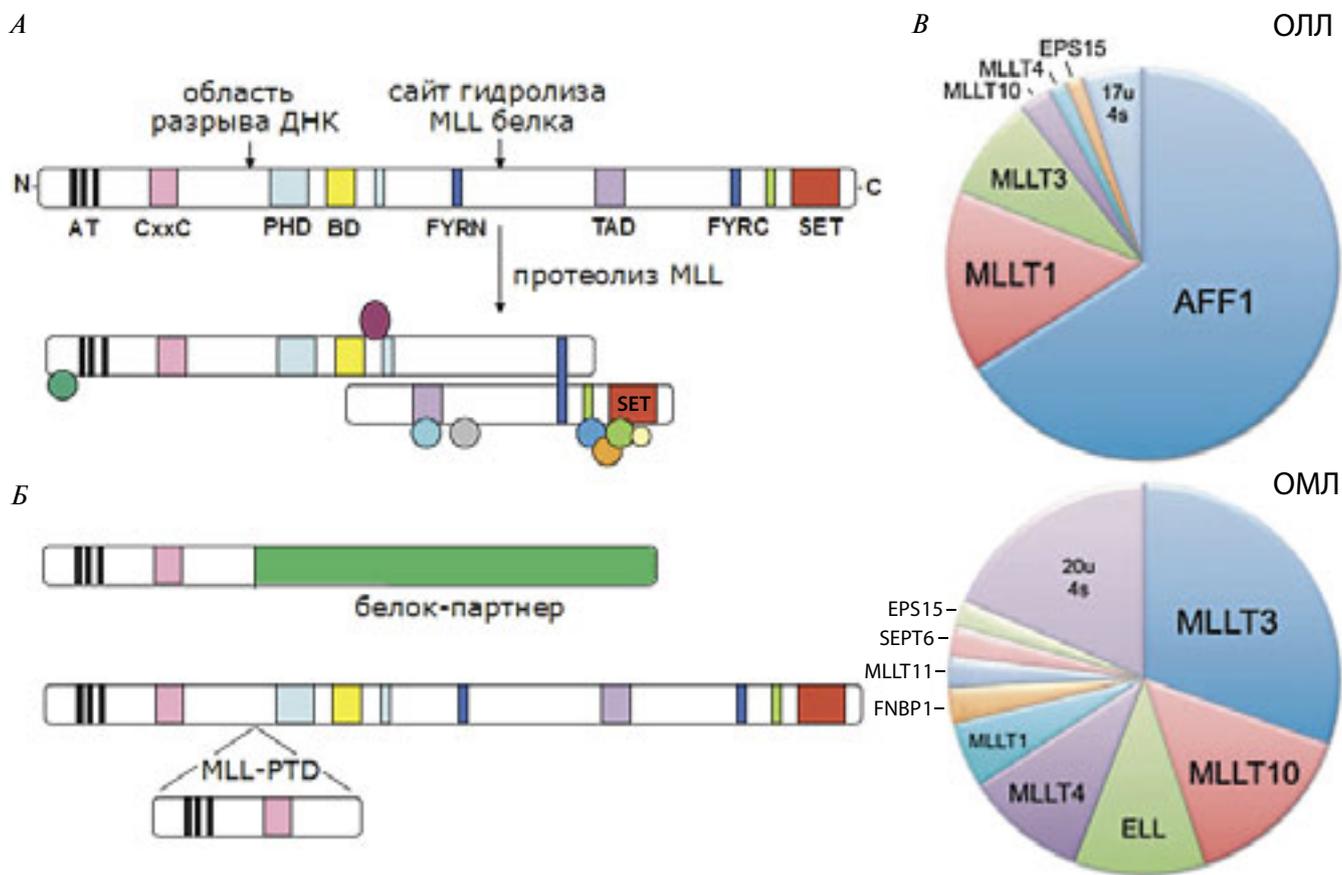


Рис. 3. Структурная организация нормального *MLL*-белка (А) и 2 типов мутантных *MLL*-белков (Б); частота встречаемости различных рекомбинантных *MLL*-генов при острых лейкозах (В):

(А) Доменная организация *MLL*-белка и схема его созревания. Сверху показана структура *MLL*-белка с указанием некоторых его функциональных доменов. Стрелками отмечена область, которая соответствует точкам разрыва ДНК при хромосомных aberrациях, а также участок расщепления *MLL*-белка протеазой при его созревании. Внизу показан зрелый белок, состоящий из 2 половин (*MLLN* и *MLLC* фрагменты), которые соединены мотивами димеризации (*FYRN* и *FYRC*), образуя стабильный комплекс. Разноцветные кружки обозначают различные белки, которые взаимодействуют с *MLL* при формировании транскрипционных комплексов. Аббревиатуры: *AT* – *AT*-hooks (мотивы связывания с *AT*-богатymi участками ДНК); *BD* – bromodomain (узнавание ацетильных групп); *CxxC* – цинк-пальцевый мотив (связывание с неметилированными CpG-участками промоторов); *FYRN/C* – *FY* rich N/C terminus (где *F* – фенилаланин, *Y* – тирозин); *PHD* – plant homeodomain (домен связывания с различными регуляторными «метками» на гистонах, например, с H3K4me3); *SET* – *Su* (var) 3-9, enhancer of zeste, trithorax (название домен получил по 3 белкам, у которых впервые был обнаружен; обладает HMT-активностью); *TAD* – trans-activation domain (белок-белковые взаимодействия, например, с гистон-ацетилазой *CBP/P300*); (Б) Вверху – типичная структура гибридного белка, состоящего из N-концевой части *MLL*-белка и C-концевой части белка-партнера. Видно, что большая часть белок-взаимодействующих доменов в рекомбинантном *MLL*-белке заменяется последовательностями белка-партнера. Внизу – мутантный *MLL*-белок с частичной тандемной дупликацией (*MLL*-PTD), которая сопровождается дублированием участка с 3-го по 9-й экзон; (В) Диаграмма, показывающая результаты исследования частоты встречаемости различных хромосомных транслокаций, затрагивающих локус 11q23 [29]. Определенные типы транслокаций (в порядке уменьшения частоты встречаемости) у смешанных групп (дети и взрослые) больных ОЛЛ и ОМЛ распределились следующим образом (в скобках приведены другие распространенные названия генов-партнеров, жирным шрифтом выделена транслокация t(9;11), вошедшая в классификацию ВОЗ):

– ОЛЛ (6 транслокаций составили ~94 % всех случаев): t(4;11) – ген-партнер *AFF1* (*AF4*); t(11;19) – *MLLT1* (*ENL1*); t(9;11) – *MLLT3* (*AF9*); t(10;11) – *MLLT10* (*AF10*); t(6;11) – *MLLT4* (*AF6*); t(1;11) – *EPS15*. Было выявлено еще 17 других уникальных транслокаций (17u), из них 4 транслокации являлись общими для ОЛЛ и ОМЛ (4s);

– ОМЛ (9 транслокаций составили ~80 % всех случаев): t(9;11) – *MLLT3*; t(10;11) – *MLLT10*; t(11;19) – *ELL*; t(6;11) – *MLLT4*; t(11;19) – *MLLT1*; t(11;17) – *MLLT6* (*AF17*); t(1;11) – *MLLT11* (*AF1Q*); t(X;11) – *SEPT6*; t(1;11) – *EPS15*. Еще 20 уникальных транслокаций (20u) и 4 общих (4s).

Рисунок адаптирован из работ М. Cosgrove & А. Patel [28] и R. Marschalek [29]

Онкогенные aberrации в локусе 11q23

Ген *MLL* (myeloid/lymphoid или mixed lineage leukemia), расположенный в 11-й хромосоме (локус 11q23), участвует в огромном числе (более 60) реципрокных хромосомных транслокаций, в результате которых *MLL* образует химерные гены с разными генами-партнерами. Белок *MLL* является одним из ключевых факторов регуляции экспрессии большо-

го числа генов, связанных с дифференцировкой клеток и контролем клеточного цикла. Важнейшими генами-мишенями *MLL*-регуляторных комплексов (которые относятся к Триторакс группе, см. лекцию № 1, Приложение 4) являются гены, содержащие ДНК-последовательности так называемых «гомеобоксов» (**HOX, homeobox**). Гомеобоксы кодируют очень консервативные белковые ДНК-связывающиеся до-

мены (гомеодомены), присутствующие в группе факторов активации транскрипции (НОХ-белках), которые регулируют эмбриональное развитие организма и дифференцировку стволовых клеток. То есть функционирование белка *MLL* напрямую связано с регуляцией этих важнейших клеточных процессов [25–27].

На рис. 3А представлена схема структурной организации *MLL*-белка, показывающая расположение основных функциональных доменов. Среди этих доменов есть ДНК-связывающие участки (А Т, СххС), домены, осуществляющие белок-белковые взаимодействия (PHD, TAD), домены с гистон-метилтрансферазной (SET) и ДНК-метилтрансферазной (домен в области СххС мотивов) активностями. Крупный *MLL*-белок (состоит из почти 4 тыс. остатков аминокислот) содержит много функциональных доменов, что позволяет ему взаимодействовать с большим числом белков и выполнять функцию «платформы» (скэффолд белка), на которой собирается транскрипционный комплекс. Обладая гистон-метилтрансферазной (HMT) активностью, белок *MLL* играет важную роль в создании H3K4me3-меток (признак активного хроматина) в промоторных областях геномишеней, кроме того, он способен инициировать транскрипцию путем самостоятельного рекрутирования белков PIC комплекса [30] (см. лекцию № 1, Приложения 3 и 4).

Локус 11q23 (ген *MLL*) относится к так называемым «горячим точкам» рекомбинации ДНК. Кроме многочисленных хромосомных транслокаций, ген *MLL* или его участки могут претерпевать различные перестройки: делеции, инверсии, вставки фрагментов локуса 11q23 в другие хромосомы [29]. Несмотря на такую повышенную рекомбинационную активность, лишь очень небольшая часть образующихся производных *MLL*-генов (Δ *MLL*) обладает заметной онкогенной активностью. При острых лейкозах выявляются небольшие внутригенные абберрации, которые заключаются в дублировании нескольких первых экзонов гена *MLL* (рис. 3Б). Эта аномалия, которая получила название частичной тандемной дупликации (PTD, **p**artial **t**andem **d**uplication), не выявляется цитогенетическими методами и часто встречается при ОМЛ с нормальным кариотипом [31]. Такие дупликации в *MLL*-гене существенно крупнее (приблизительно в 100 раз) ITD-дупликаций в гене *FLT3* (см. главу II). Смысл таких отличий понятен — если в *FLT3*-рецепторе даже небольшое изменение в JM-домене приводит к дестабилизации ингибирующей конформации и онкогенному эффекту, то в случае *MLL* требуется масштабная «перекройка» белковой структуры, позволяющая существенно изменить свойства этого многофункционального белка. Такого рода пертурбации достигаются или путем добавления в структуру *MLL*-белка последовательностей, несущих дополнительный набор функциональных доменов (*MLL*-PTD), или путем удаления значительной (С-концевой)

части белка и привнесения на ее место чужеродных последовательностей (хромосомные транслокации).

Перестройки в локусе 11q23 (Δ *MLL*+ лейкозы) выявляются в ~5% случаев ОЛЛ, в ~10% случаев ОМЛ и фактически во всех случаях лейкозов смешанного происхождения [25]. На рис. 3В показана диаграмма, иллюстрирующая частоту встречаемости различных вариантов хромосомных абберраций, затрагивающих *MLL*-ген, у больных ОЛЛ и ОМЛ [29]. Следует отметить, что количественное соотношение различных типов рекомбинаций в локусе 11q23 при Δ *MLL*+ лейкозах существенно отличается у детей и взрослых, с возрастом эти различия постепенно нивелируются [32–34]. Этот факт, вероятно, является причиной того, что данные по частоте встречаемости у детей различных вариантов геномных абберраций (причем, не только в локусе 11q23) могут различаться в зависимости от того, дети какого возраста преобладали в исследовании. Например, в большинстве случаев В-клеточный ОЛЛ у младенцев (возраст до 1 года) относится к Δ *MLL*+ лейкозам, где основным типом хромосомной транслокации является t(4;11)(q21;q23) с образованием химерного гена *MLL-AFF1* (*MLL-AF4*). При Δ *MLL*+ ОЛЛ у детей старшего возраста с этой абберрацией начинают серьезно «конкурировать» t(11;19)(q23;p13.3)/*MLL-MLLT1* (*MLL-ENL1*) и t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* (*MLL-AF9*). Интересно, что у взрослых пациентов с Δ *MLL*+ ОЛЛ доминирующей транслокацией опять становится t(4;11)(q21;q23) [25, 34]. Считается, что все острые лейкозы с абберрациями в локусе 11q23 имеют неблагоприятный прогноз. Различные варианты прогноза, от «промежуточного» к «плохому», и даже «очень плохому», ассоциированы с конкретными типами хромосомных абберраций. Однако некоторые транслокации, например, t(1;11)(q21;q23)/*MLL-MLLT11* (*MLL-AF1q*), связаны с благоприятным течением болезни и хорошим ответом на терапию [35]. Поэтому стратификация Δ *MLL*+ лейкозов на различные диагностические варианты является важным моментом в определении эффективной терапии этого заболевания. Единственная 11q23-абберрация, включенная в классификацию ВОЗ (см. таблицу), не имеет никаких исключительных особенностей (типа повышенной агрессивности или хорошего прогноза), кроме ее широкой распространенности при острых лейкозах.

Гены-партнеры *MLL* по транслокации кодируют различные белки, которые привносят в гибридный белок большое число разнообразных доменов, оказывающих влияние на онкогенный потенциал химерных генов. По локализации в клетке кодируемых белков гены-партнеры *MLL* подразделяют на «цитоплазматические» и «ядерные». Цитоплазматические гены-партнеры кодируют белки с различными функциями: белки, участвующие в эндоцитозе (EPS15), белки-медиаторы сигнальной трансдукции (AF6) и даже проапоптозные белки митохондрий (AF1Q). Ядерные гены-партнеры кодируют белки цитоскелета ядра (SEPT6), гистон-ацетилтрансферазы (CBP/P300), но наиболее часто онкогенные гибридные *MLL*-белки содержат на С-конце фрагменты

белков, которые являются активаторами транскрипции или контролируют элонгацию (непрерывность синтеза мРНК) транскрипции (AF4, AF5, AF9, AF10, AF17, ELL и ENL) [26, 30, 36]. Учитывая такое разнообразие гибридных MLL-белков, можно предположить, что существует много механизмов, с помощью которых они реализуют свой онкогенный потенциал. Это могут быть механизмы, которые придают лейкозным клеткам свойства, характерные как для онкогенных мутаций класса II (блок дифференцировки и самоподдержание клеток), так и для мутаций класса I (увеличение пролиферативного потенциала и жизнеспособности клеток). Все эти механизмы так или иначе связаны с нарушением регуляции транскрипции генов-мишеней MLL-белка. Нарушения генной экспрессии могут быть опосредованы, например, изменениями модификации гистонов, такими как отсутствие или нестабильность специфических «меток» активного хроматина (H3K4me), вносимых SET-доменом MLL-белка — доменом, который отсутствует во всех рекомбинантных MLL-белках (см. рис. 3Б). Подобные или отличные эпигенетические изменения в генах-мишенях могут провоцироваться гистон- или ДНК-модифицирующими доменами белков-партнеров MLL. N-концевая MLL-составляющая гибридных белков, которая содержит ДНК-связывающие участки (AT и SxxC), выполняет, вероятно, только одну важную функцию — нацеливает онкогенные белки на гены-мишени интактного MLL-белка.

Анализ индивидуальных гибридных MLL-белков показал, что в основе их онкогенной активности могут лежать как минимум 2 типа механизмов — изменение трансактивации и димеризация. Считается, что присутствие цитоплазматической составляющей в гибридных MLL-белках может приводить к принудительной диме-

ризации N-концевых областей MLL-белка (своеобразный вариант MLL-PTD, см. рис. 3А), что вызывает модуляцию экспрессии генов-мишеней [36]. Учитывая, что среди ядерных белков-партнеров MLL много компонентов комплексов активации (репрессии) транскрипции, то это может приводить к сборке на генах-мишенях MLL-модифицированных транскрипционных комплексов, осуществляющих атипичную генную экспрессию [30, 36]. Наличие белков-партнеров, имеющих собственные ДНК-связывающие домены, позволяет предположить возможность участия в онкогенном процессе так называемых реципрокных белков, продуктов экспрессии с реципрокных химерных генов (см. Приложение). Для транслокации t(4;11)(q21;q23) было показано, что не только MLL-AFF1-белок, который синтезируется на 11q+-хромосоме, но и реципрокный AFF1-MLL-белок (4q-) обладают онкогенной активностью. Причем совместная экспрессия этих белков взаимно дополняет их онкогенный потенциал (эффект комплементарности, как у мутаций класса I и II), приводя к заметному увеличению пролиферации и выживаемости лейкозных клеток [29].

Сегодня предпринимаются первые попытки понять, как работают разнообразные гибридные MLL-белки, как в зависимости от природы белка-партнера изменяется работа сложных транскрипционных комплексов, собранных на их основе [26, 28–30, 36]. Эти механизмы необходимо понять, чтобы появилась возможность проектировать препараты, нацеленные на патогенные MLL-белки.

В следующей лекции будут рассмотрены молекулярные механизмы рекуррентных генетических aberrаций, характерных для гематологических опухолей лимфоидного происхождения.

Л и т е р а т у р а

- Vardiman J., Thiele J., Arber D. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937–51.
- Tefferi A., Gilliland G. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007;6:550–66.
- Noble M., Endicott J., Johnson L. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004;303:1800–5.
- Lemmon M., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34.
- Toffalini F., Demoulin J.B. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases. *Blood* 2010;116:2429–37.
- Jura N., Zhang X., Endres N. et al. Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. *Mol Cell* 2011;42:9–22.
- Taylor S., Kornev A. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 2011;36:65–77.
- Matsumura I., Mizuki M., Kanakura Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. *Cancer Sci* 2008;99:479–85.
- Griffith J., Black J., Faerman C. et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004;13:169–78.
- Hubbard S. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:464–71.
- Reindl C., Spiekermann K. From kinases to cancer. Leakiness, loss of autoinhibition and leukemia. *Cell Cycle* 2006;5:599–602.
- Jatiani S., Baker S., Silverman L., Reddy P. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. *Genes Cancer* 2010;1:979–93.
- Chalandon Y., Schwaller J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *Haematologica* 2005;90:949–68.
- Krause D., van Etten R. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New Engl J Med* 2005;353:172–87.
- Bain B. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB or FGFR1. *Haematologica* 2010;95:696–8.
- Gotlib J., Cools J. Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFR: what we have learned about the fusion and other

- molecularly defined eosinophilias. *Leukemia* 2008;22:1999–2010.
17. Schwartz R. A molecular star in the wars against cancer. *New Engl J Med* 2002;347:462–3.
18. Curtis C., Grand F., Musto P. et al. Two novel imatinib-responsive PDGFRA fusion genes in chronic eosinophilic leukaemia. *Brit J Haematology* 2007;138:77–81.
19. Eswaran J., Knapp S. Insights into protein kinase regulation and inhibition by large scale structural comparison. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:429–32.
20. Sugimoto Y., Muramatsu H., Makishima H. et al. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Brit J Haematol* 2010;150:83–7.
21. Chan R., Feng G.S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. *Blood* 2007;109:862–7.
22. Matozaki T., Murata Y., Saito Y. et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a protooncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci* 2009;100:1786–93.
23. Ostman A., Hellberg C., Bohmer F. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:307–20.
24. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Brit J Cancer* 2006;94:179–83.
25. Krivtsov A., Armstrong S. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007;7:823–33.
26. Slany R. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* 2009;94:984–93.
27. Marschalek R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J* 2010;277:1822–31.
28. Cosgrove M., Patel A. Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J* 2010;277:1832–42.
29. Marschalek R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Brit J Haematology* 2011;152:141–54.
30. Mohan M., Lin C., Guest E., Shilatifard A. Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010;10:721–8.
31. Basecke J., Whelan J., Griesinger F., Bertrand F. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Brit J Haematology* 2006;135:438–49.
32. Greaves M. Childhood leukaemia. Molecular genetics provide exciting new insights into the pathogenesis of childhood leukaemia. *Brit Med J* 2002;324:283–7.
33. Wiemels J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: natural history, mechanisms and epidemiology. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2008;39:87–90.
34. Meyer C., Kowarz E., Hofman J. et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23:1490–9.
35. Balgobind B., Raimondi S., Harbott J. et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood* 2009;114:2489–96.
36. Liu H., Cheng E., Hsieh J. MLL fusions. Pathways to leukemia. *Cancer Biol & Therapy* 2009;8:1204–11.
37. Frohling S., Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *New Engl J Med* 2008;359:722–34