

## Роль транскрипционного фактора Ikaros в нормальном гемопоэзе и лейкозогенезе: биологические и клинические аспекты

О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»  
Минздрава Республики Беларусь; Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

**Контакты:** Ольга Сергеевна Вшивкова vshyukova@gmail.com

Изучение патогенеза, факторов прогрессии и развития рецидивов, причин лекарственной резистентности острых лейкозов (ОЛ) остается главной задачей онкогематологии и смежных областей. В патогенезе ОЛ достоверно известна роль более 50 генов и белков, в числе которых хорошо изученные опухолевые супрессоры (CDKN2A/CDKN2B, RB1, PTEN, p53) и классические химерные онкогены (BCR/ABL1, TEL/AML1, E2A/PBX, транслокации с участием MLL). Помимо этого установлена высокая частота aberrаций в генах, ответственных за лимфоидную дифференцировку, таких как транскрипционные факторы (PAX5, IKZF1 и EBF1), гены регуляции транскрипции (ETV6, ERG), сигнальных путей и антигенных рецепторов (BTLA, CD200, TOX, BLNK, VPREB1), а также гены, участвующие в развитии химиорезистентности лейкозов (NR3C1). Согласно результатам исследований последних 5 лет, частым молекулярным событием при лейкозах являются aberrации гена IKZF1 (Ikaros), белковый продукт которого относится к ДНК-связывающим белкам семейства Kruppel наряду с другими членами семейства IKZF2 (Helios), IKZF3 (Aiolos), Eos и Pegasus.

В гемопоэтических клетках Ikaros функционирует как транскрипционный фактор, является ключевым белком, контролирующим ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров и дендритных клеток. На ранних стадиях гемопоэза регуляторная роль Ikaros как транскрипционного фактора сводится к репрессии генов миелоидной и эритроидной линий дифференцировки и стимуляции генов, ответственных за лимфоидную дифференцировку.

Ikaros выступает в роли модулятора иммунного ответа и является опухолевым супрессором для лимфоидных опухолей. Данные многочисленных клинических исследований подтверждают связь между наличием aberrаций IKZF1 и развитием В-клеточных и, в меньшей степени, Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов. Вместе с тем в публикациях последних лет нарушения функций Ikaros связывают с развитием миелопролиферативных заболеваний и острого миелоидного лейкоза у детей. В контексте клинической значимости особая роль отводится внутригенным делециям IKZF1, а также коротким (нефункциональным) изоформам белка Ikaros, которые могут появляться в результате внутригенных делеций или aberrантного сплайсинга. Продемонстрировано, что перечисленные нарушения гена IKZF1 и его белкового продукта играют ключевую роль в лимфоидной трансформации, опухолевой прогрессии и, возможно, в развитии химиорезистентности лейкозных клеток, что может отражаться в некорректной стратификации по группам риска, плохом результате лечения и низких показателях выживаемости.

В данном обзоре описаны частота и типы нарушений гена IKZF1 и его белкового продукта Ikaros, целесообразность включения этих маркеров в диагностические панели всех типов лейкозов и учета при определении минимальной остаточной болезни.

Несмотря на то, что Ikaros уже находит применение в клинической практике, с развитием интереса к этому молекулярному маркеру появляется ряд открытых вопросов. С точки зрения молекулярной биологии недостаточно исследованы механизмы регуляции экспрессии IKZF1 на этапах транскрипции и сплайсинга.

Предстоит определить клиническую роль точечных и субклональных делеций IKZF1, более точно выяснить прогностическое значение внутригенных делеций и aberrантного сплайсинга для разных групп пациентов с ОЛ и другими гемобластомами в связи с известными генетическими маркерами и схемой проводимой химиотерапии. Более детального изучения aberrации Ikaros требуют в качестве прогностического фактора развития костномозгового рецидива. Следует также решить вопрос о возможности учета статуса Ikaros при стратификации пациентов по группам риска, а также при определении уровня минимальной остаточной болезни.

**Ключевые слова:** Ikaros, IKZF1, альтернативный сплайсинг, гемобластоzy, делеции, изоформы, лейкозогенез, опухолевый супрессор, острый лимфобластный лейкоз, прогностический маркер, транскрипционный фактор

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.013–026

The role of Ikaros transcriptional factor in normal hematopoiesis and leukemogenesis: biological and clinical aspects

V. S. Vshivkova, A. N. Meleshko

Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of Belarus;  
43 Frunzenskaya St., v. Borovlyany, Minsk region, 223053, Belarus

Investigation of the pathogenesis and factors effecting recurrence, progression and drug resistance in acute leukemia (AL) remains a major challenge for hematology and other related areas. The role of more than 50 genes and proteins in the AL pathogenesis has been shown, including the well-studied tumor suppressor (CDKN2A/CDKN2B, RB1, PTEN, p53), and classical fusion genes (BCR/ABL1, TEL/AML1,

*E2A/PBX, MLL translocations). In addition, high frequency of aberrations in genes responsible for lymphoid differentiation have been identified such as transcription factors (PAX5, IKZF1 and EBF1), transcriptional regulation of the genes (ETV6, ERG), and signaling pathways of antigen receptors (BTLA, CD200, TOX, BLNK, VPREB1), as well as genes involved in chemoresistance of leukemia cells (NR3C1). In recent studies, Ikaros abnormalities have been reported to be frequently associated with AL. Ikaros is a member of a Kruppel-like family of zinc finger transcription factors that also includes IKZF2 (Helios), IKZF3 (Aiolos), Eos and Pegasus, and encoded by the IKZF1 gene. In hematopoietic cells Ikaros functions as a transcription factor, a key protein controlling T-, B-, NK-, and dendritic cells early differentiation. At the early hematopoiesis stages, it represses the myeloid and erythroid lineages, and stimulates the lymphoid differentiation. Ikaros also normally modulates immune response and plays role of a tumor suppressor in lymphoid malignances.*

*Data from numerous clinical studies confirmed an association between the presence of IKZF1 aberrations and B-cell and, to a lesser extent, T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) development.*

*Besides, loss of Ikaros function was associated with progression of myeloproliferative diseases to acute myeloid leukemia (AML) in children. From clinical point of view, particular intragenic IKZF1 deletions and a short (non-functional) protein Ikaros isoforms, which may occur as a result of intragenic deletions or aberrant splicing, are the most significant features.*

*These mutations of IKZF1 gene and Ikaros aberrant expression play a key role in the lymphoid transformation, tumor progression, and may cause development of leukemic cells chemoresistance. Therefore, IKZF1 aberrations should be taken into account as a valuable prognostic marker for risk groups stratification, poor outcome and low survival rare.*

*This review compiles currently available data regarding the frequency and variants of the IKZF1 (Ikaros) aberrations, and the use of them in diagnostics of all types of leukemia and minimal residual disease detection.*

*Although Ikaros has already applied in clinical studies, a growing number of questions still remain unanswered. Molecular biology of IKZF1 expression and splicing regulation is not well understood. Clinical value of point mutations and subclonal deletion in IKZF1 locus should be elucidated. Prognostic significance of intragenic deletions and aberrant splicing is necessary to clarify for different groups of ALL patients, in connection with other genetic markers and therapy protocol. More detailed clinical analysis required for proving IKZF1 impact on probability of relapse, improving patients' risk stratification and application of minimal residual disease.*

**Key words:** Ikaros, IKZF1, alternative splicing, hemoblastoses, deletions, isoforms, leukemogenesis, tumor suppressor, acute lymphoblastic leukemia, prognostic marker, transcription factor

### Ген *IKZF1*. Структура и функции доменов «цинковых пальцев»

Ген *IKZF1* (*IKAROS* family zinc finger 1; *Ikaros*; *Lyf-1*) общей протяженностью 120 тыс. пар оснований расположен на хромосоме 7p12.2, состоит из 8 экзонов, 7 из которых являются белок-кодирующими. Длина полноразмерного транскрипта *IKZF1* насчитывает 6189 пар оснований, протяженность открытой рамки считывания (последовательность нуклеотидов, кодирующая белок) полноразмерной изоформы составляет 1560 пар оснований, при этом длина белкового продукта Ikaros – 519 аминокислотных остатков [1].

Ikaros – представитель отдельного семейства белков транскрипционных факторов (ТФ), отличительной особенностью которых является наличие ДНК-связывающих доменов, так называемых цинковых пальцев (Zn-fingers, ZnFs). «Цинковый палец» – это структурный домен, образованный полипептидной петлей, стабилизированной ионом цинка, который связан координационными связями с аминокислотными остатками двух молекул – цистеина и гистидина, что определяет отнесение этого домена к классу C2H2 [2].

Полноразмерная изоформа белка Ikaros содержит два отдельных кластера с «цинковыми пальцами»: 4 ZnFs на N-конце белковой молекулы (F1–4), необходимые для связывания с ДНК, а также 2 ZnFs на C-конце (F5, F6), обеспечивающие димеризацию Ikaros и его взаимодействие с другими белками (рис. 1). Отдельно можно выделить регион активации/репрессии, расположенный между кластерами «цинковых пальцев». В регионе активации локализована большая часть сайтов фосфорилирования для эпигенетическо-

го контроля работы белка – его «включения» или «выключения» на различных этапах клеточного цикла [2].

Функциональная активность Ikaros напрямую зависит от его способности связываться с ДНК при помощи четырех N-концевых «цинковых пальцев». Для стабильного связывания с ДНК белки семейства «цинковых пальцев» должны обладать как минимум 2 тандемными ZnFs. Потеря 2 и более «цинковых пальцев» в результате альтернативного сплайсинга, внутригенных или хромосомных делеций приводит к появлению коротких изоформ белка с низкой аффинностью или полной инертностью к ДНК. Такие короткие изоформы оказывают доминантно-негативный (DN) эффект, нарушая способность длинных изоформ Ikaros и других членов белкового семейства, таких как Aiolos и Helios, к связыванию с ДНК (рис. 2а). В экспериментах *in vivo* подтвержден факт наличия разных генных мишеней для каждого из ZnFs Ikaros [2, 3]. Благодаря наличию «цинковых пальцев» на C-конце белковые молекулы Ikaros способны формировать гомо- или гетеродимеры. Гомодимеризация происходит за счет взаимодействия аналогичных изоформ белка (рис. 2а). Партнерами для гетеродимеризации могут служить как различные изоформы Ikaros, так и другие члены этого семейства (Helios, Aiolos и др.), несущие белок-связывающие «цинковые пальцы» (рис. 2б, в). Существует предположение, что гетеродимеры, состоящие из разных изоформ белка, обладают различными функциями [3]. Тем не менее основная задача димеризации – контроль работы белкового комплекса при регуляции транскрипции и организации структуры хроматина.

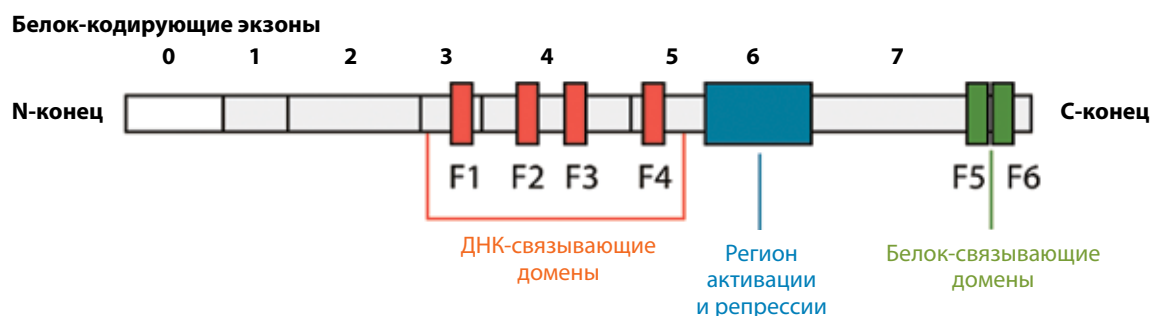


Рис. 1. Доменная структура полноразмерного белкового продукта *IKZF1*. ДНК-связывающие цинковые пальцы F1–4 отмечены красным, белок-связывающие мотивы F5, F6 — зеленым

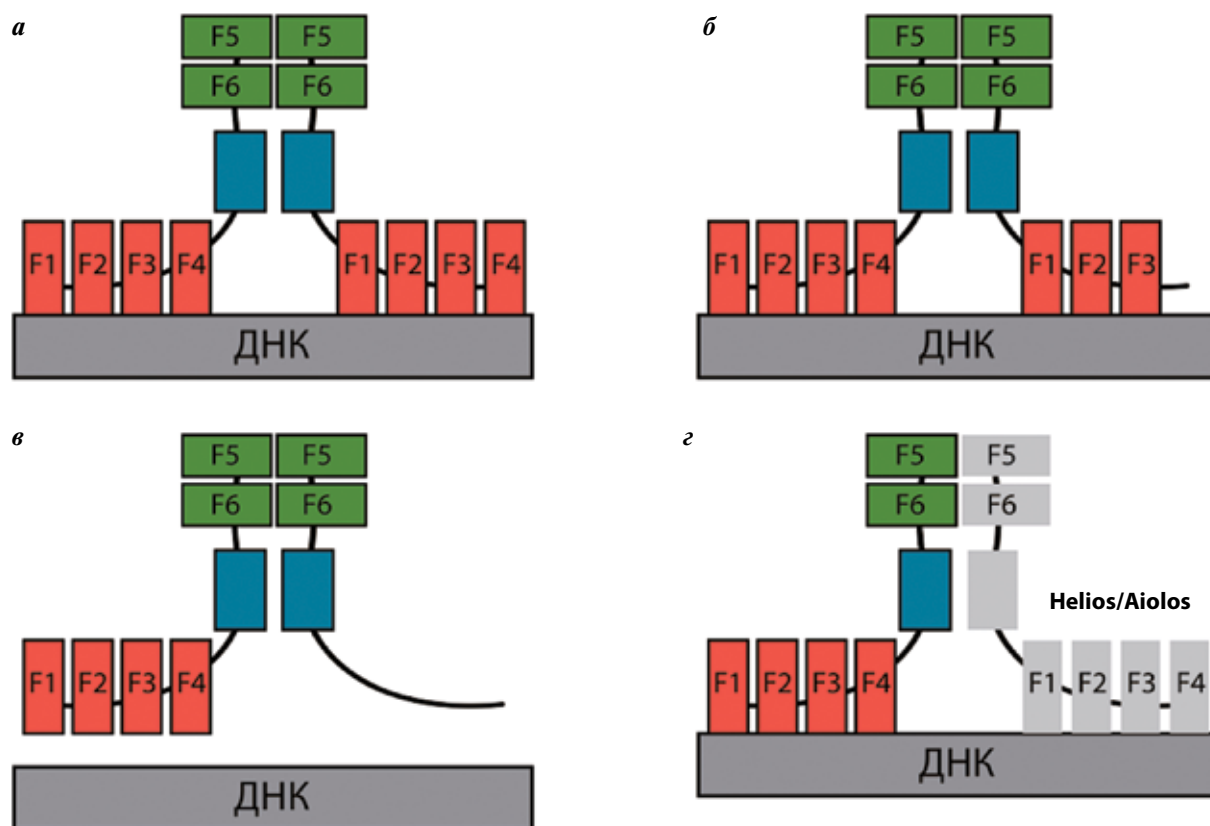


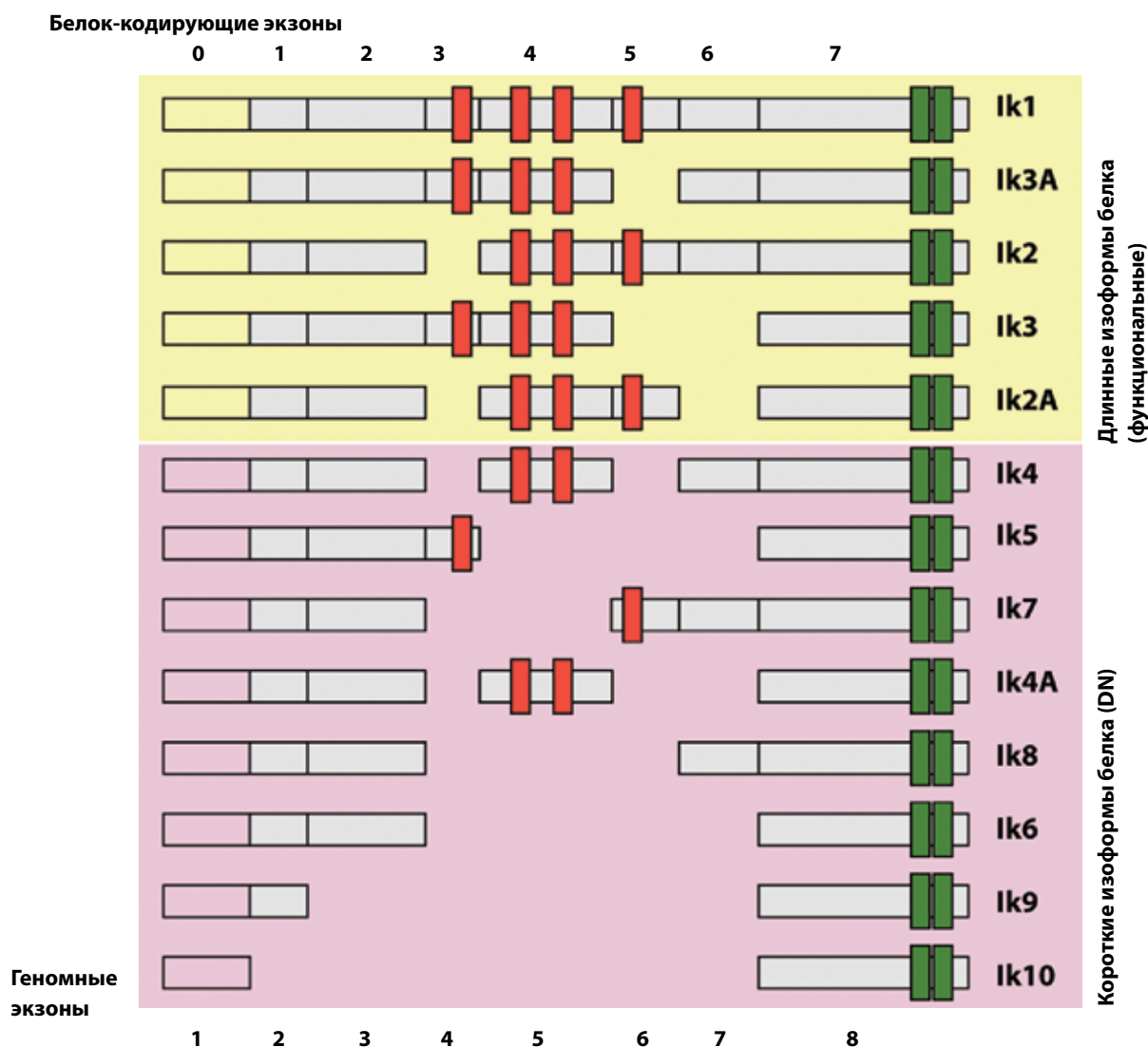
Рис. 2. Способы димеризации *Ikaros*: а — образование гомодимера между двумя молекулами *Ikaros*; б — гетеродимеризация двух длинных изоформ белка; в — гетеродимеризация *Ikaros* и короткой изоформы (DN) *Ikaros* — комплекс не способен к связыванию ДНК и выполнению своих функций по причине отсутствия ДНК-связывающих доменов; г — образование гетеродимера между *Ikaros* и другим белком этого семейства (*Helios*, *Aiolos* и др.). Адаптировано из [3]

### Альтернативный сплайсинг

Семь белок-кодирующих экзонов *IKZF1* транскрибируются по меньшей мере в 13 различных транскриптов посредством **альтернативного сплайсинга** (рис. 3). В результате образуются изоформы белка, отличающиеся между собой размерами и функциональной активностью.

Известные в настоящее время изоформы имеют идентичные белок-связывающие С-концевые домены, но различаются составом ДНК-связывающих ZnFs на N-конец. Изоформы белка *Ikaros*, в которых отсутствует 2 и более ДНК-связывающих «цинковых пальца», называются короткими: они не способны к взаи-

модействию с ДНК и, соответственно, выполнению своей основной функции [4]. Полноценно функционирующие, т.е. длинные изоформы *Ikaros* (1, 2, 2a, 3, 3a), содержат 3 или все 4 ZnFs в ДНК-связывающем домене. Длинные изоформы характеризуются внутриядерной локализацией в клетке и обладают высокой аффинностью к определенному промотору ДНК, функционируют как ТФ и участвуют в организации структуры хроматина. Мутационный анализ показал, что наличие функциональных ZnF2 и ZnF3 критично для высокоаффинного связывания мотива TGGAAT в регуляторных участках контролируемых генов. Два соседних домена ZnF1 и ZnF4 моделируют это связы-



**Рис. 3.** Продукты альтернативного сплайсинга Ikaros (изоформы), описанные в настоящее время. Адаптировано из [12]. Кодированные экзонично представлены в виде светло-серых прямоугольников, красные и зеленые прямоугольники символизируют домены типа «цинковых пальцев». ДНК-связывающие «цинковые пальцы» кодируются 3–5-м экзонами (красные), 7-й экзон кодирует два дополнительных «цинковых пальца» для белковых взаимодействий (зеленые). Длинные (1, 2, 2a, 3, 3a) и короткие изоформы Ikaros (4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9) выделены блоками

вание. N-концевые домены (ZnF5, ZnF6) определяют ядерную локализацию Ikaros [3, 4].

Короткие изоформы Ikaros (4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9) обладают DN-эффектом: они не только не способны к связыванию с ДНК, но и препятствуют функционированию длинных изоформ, а также других белков семейства Ikaros (см. рис. 2в); локализованы в цитоплазме. Наиболее распространенным вариантом коротких изоформ белка является Ik6 (80 % от всех DN-форм Ikaros). Транскрипционный вариант Ik10 описан как нетранслируемый транскрипт матричной РНК. В нем отсутствует большая часть кодирующего региона, включая 2-й геномный экзон, в котором находится старт-кодон [2, 5].

Разнообразие изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга, усложняется дополнительными вариациями на уровне «редактирования» РНК. Так, в нормальных гемопоэтических клетках

человека, а также линиях лейкозных клеток К. J. Payne et al. (2001) обнаружили инсерцию 60 пар оснований между 1-м и 2-м экзонами, характерную для транскрипционных вариантов Ik1, Ik2, Ik4, Ik7, Ik8, а также делецию 30 пар оснований для транскрипционных вариантов Ik1, Ik2. Авторы сообщают о необходимости дальнейших исследований для установления значения этих вариаций [5]. Был идентифицирован новый сплайс-вариант — Ik3a (другие используемые обозначения IkH, Ikx, Ik1+), идентичный Ik3, за исключением транскрибируемого экзона 6. Кроме того, в Ik3a обнаружена инсерция 60 пар оснований между экзонами 2 и 3, которая предположительно является добавочным экзоном. Таким образом, Ik3a является самой длинной из известных изоформ Ikaros у человека, за исключением полноразмерного транскрипта Ik1. Результаты иммуноблот-анализа продемонстрировали, что преобладающим в нормальных гемопоэтических



клетках является Ik3a, в то время как для опухолевого клона более характерна экспрессия Ik1, что может свидетельствовать о значительной роли Ik3a в контроле нормального гемопоэза у человека [5]. Однако, согласно нашим результатам, как в нормальных гемопоэтических, так и в лейкозных клетках наиболее высокий уровень экспрессии имеют изоформы Ik2 и Ik3/3a, каждая из которых превосходит Ik1 по уровню экспрессии в 1,5–2 раза [6].

L. Lhanjun et al. (2011) провели оценку функциональных различий двух наиболее длинных изоформ у человека – Ik1 и Ik3a. Исследование впервые позволило предположить, что Ik1 и Ik3a, а возможно и другие изоформы, могут иметь свои уникальные или даже противоположные функции в клетке, локализуясь при этом в различных субклеточных регионах [3].

### **Функционирование Ikaros как транскрипционного фактора**

Основная функция белков семейства Ikaros – дифференцировка лимфоцитов, их созревание и модуляция иммунного ответа. Функционируя как ТФ, белок Ikaros связывается с определенными последовательностями в регуляторных районах генов и осуществляет избирательный контроль экспрессии генов-мишеней. Кроме того, Ikaros задействован в организации структуры хроматина, поскольку способен переводить ДНК в конденсированное состояние (гетерохроматин) и удерживать ее в такой форме. При этом Ikaros работает в составе белковых комплексов, контролирующих химические модификации гистонов и, следовательно, плотность упаковки ДНК в хроматине, ее доступность для транскрипции регулируемых генов.

Описано участие Ikaros в трех комплексах такого типа. В составе комплекса NuRD (nucleosome remodeling and deacetylating) белок Ikaros связывает ключевой компонент комплекса, белок Mi-2 $\beta$ , и рекрутирует его к промоторам генов-мишеней. Гистон-деацетилаза (HDAC) в составе комплекса NuRD деацетилирует гистоны и сохраняет хроматин в конденсированном состоянии, что подавляет экспрессию генов-мишеней на протяжении нескольких клеточных делений [7, 8].

Часть белка Ikaros входит в состав комплекса Sin3. В этом случае Ikaros связывается с транскрипционно-активными генами, ассоциирует с ко-репрессором Sin3, что приводит к рекрутированию HDAC, конденсированию хроматина и снижению экспрессии генов [7, 8].

Наконец, Ikaros может выступать в качестве активатора экспрессии генов, рекрутируя комплекс Swi/Snf к генам-мишеням. Этот комплекс способствует «открытию» структуры хроматина за счет привлечения гистон-ацетилаз (HAC) или другого аденозинтрифосфат-зависимого механизма, что способствует активации транскрипции генов [7, 8]. Ikaros также способен кооперироваться с другими активаторами транскрипции, такими как Sp1 и USF1 [9, 10].

В целом на ранних стадиях гемопоэза регуляторная роль Ikaros как ТФ сводится к репрессии генов миелоидной и эритроидной линий дифференцировки и стимуляции генов, ответственных за лимфоидную дифференцировку.

### **Регуляция функциональной активности Ikaros**

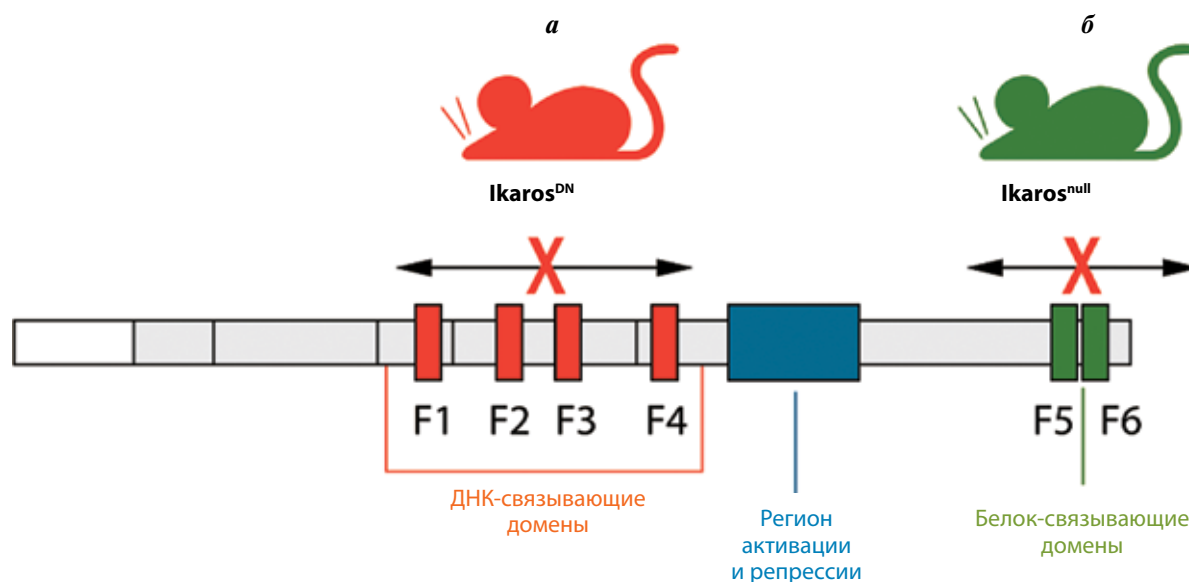
Существуют немногочисленные данные о механизмах, регулирующих экспрессию гена *IKZF1* на этапе транскрипции, однако механизмы посттранскрипционной регуляции его активности и/или уровня экспрессии белка изучены в большей степени. Функциональная активность Ikaros может определяться по крайней мере четырьмя механизмами: 1) альтернативный сплайсинг длинных изоформ, приводящий к изменению сродства Ikaros к ДНК или специфичности этого связывания; 2) альтернативный сплайсинг, приводящий к появлению DN-изоформ Ikaros, ингибирующих ДНК-связывающую активность других изоформ и белков семейства; 3) фосфорилирование белка Ikaros, приводящее к снижению сродства к ДНК и изменению его локализации в ядре (например, сайт-специфическое фосфорилирование казеинкиназой-2); 4) вызванные фосфорилированием изменения в стабильности белка Ikaros, обеспечивающие его восприимчивость к убиквитин-опосредованной деградации [11].

Таким образом, существование многочисленных механизмов контроля функциональной активности Ikaros позволяет предположить, что полная картина регуляции более сложна и подчеркивает важность исследований Ikaros на уровне белка [11, 12].

### **Изучение функций Ikaros на мышинных knockout-моделях**

Первоначально *IKZF1* был описан как лимфоид-специфичный ТФ, отвечающий за регуляцию Т-клеточной дифференцировки. Было показано, что белок Ikaros выступает как энхансер, связывающийся с регуляторными последовательностями и усиливающий экспрессию ранних маркеров дифференцировки Т-клеток [13, 14]. Позже на нокаутных линиях мышей была более детально установлена функция этого гена в гемопоэзе и формировании иммунной системы.

В первом *in vivo* исследовании функций Ikaros K. Georgopoulos et al. (1994) получены knockout-мыши с гомозиготными и гетерозиготными делециями ДНК-связывающих доменов *IKZF1* (делеция 3-го и 4-го экзонов) [15]. Мутация не оказалась летальной *in utero*. Мыши с гомозиготной делецией (фенотип Ikaros<sup>DN/DN</sup>, рис. 4a) отставали в росте и погибали от множественных инфекций до 4 недель. Животные имели рудиментарный тимус, лимфатические узлы отсутствовали, селезенка была увеличена и заполнена клетками эритроидного и миелоидного происхождения. Наблюдалось полное отсутствие зрелых Т- и В-лимфоцитов,  $\gamma\delta$ -Т-клеток, эпидермальных дендритных клеток (ДК) (табл. 1).



**Рис. 4.** Характеристика нокаутных мышей, использованных *in vivo* исследованиях функций *Ikaros*: у *Ikaros<sup>DN</sup>*-мышей отсутствуют ДНК-связывающие домены; у *Ikaros<sup>null</sup>*-мышей из-за отсутствия белок-связывающих доменов *Ikaros* не способен к взаимодействию с другими белками и функционально неактивен. Адаптировано из [16]

**Таблица 1.** Основные фенотипические проявления дисфункции *Ikaros*, установленные в экспериментах на *knockout*-моделях мышей

Мутация	Экспрессия белка	Фенотип
<i>Ikaros<sup>null/null</sup></i>	Полная дисфункция белка. Null-фенотип	Снижение клоногенной активности стволовой клетки крови в 30–40 раз. Снижение количества В-, Т-клеток, натуральных киллеров (natural killers, NK), ДК. Клональная Т-клеточная экспансия. Смещение баланса CD4/CD8 Т-лимфоцитов в сторону CD4-клеток. Относительное снижение миелоидных клеток
<i>Ikaros<sup>DN/DN</sup></i>	Все экспрессирующиеся изоформы белка являются DN-изоформами	Снижение клоногенной активности стволовой клетки крови более чем в 100 раз. Полное отсутствие всех лимфоцитов, NK, ДК
<i>Ikaros<sup>null/wt</sup></i>	Null-мутация в гетерозиготе. Экспрессируется одна аллель гена	Нормальное количество и фенотип лимфоцитов. Увеличенная TCR-опосредованная лимфопролиферация. Повышенная частота Т-клеточных лейкозов и лимфом
<i>Ikaros<sup>DN/wt</sup></i>	DN-мутация в гетерозиготе. Экспрессия как длинных, так и коротких (DN) изоформ белка	Нормальное количество и фенотип лимфоцитов. Увеличенная TCR-опосредованная лимфопролиферация. Развитие Т-клеточных лейкозов и лимфом с частотой 100 %
<i>Aiolos<sup>null/null</sup></i>	Полное отсутствие белка. Null-фенотип	Повышение пре-В и В-лимфоцитов в костном мозге. Снижение рециркулирующих, перитонеальных и других периферических В-лимфоцитов. Продукция аутоантител. Увеличенная BCR-опосредованная лимфопролиферация. Переключение изотипа иммуноглобулина (Ig) без иммунизации. Развитие В-клеточных опухолей
<i>Aiolos<sup>null/null</sup> Ikaros<sup>null/wt</sup></i>		Усиленный эффект мутации <i>Aiolos<sup>null/null</sup></i> в периферии. Повышенная частота Т- и В-клеточных опухолей

**Примечание.** TCR — Т-клеточный рецептор (T-cell receptor).

В последующей работе авторов [16] на *knockout*-мышцах с гомозиготными и гетерозиготными делециями ДНК-связывающих доменов *IKZF1* установлено его влияние на процессы Т-клеточной пролиферации. Мыши с гетерозиготной делецией демонстрировали значительную TCR-опосредованную лимфопролиферацию Т-клеток в отсутствие антигенной стимуляции. По истечении 3 мес у 100 % мышей развились лимфаденопатии, характеризовавшиеся увеличением лим-

фоузлов в 20–50 раз, развитием Т-клеточных лейкозов или лимфом. Аберрантная популяция лимфоцитов имела клональную природу и происходила из тимуса. При этом в опухолевых клетках наблюдалась потеря гетерозиготности, т. е. инактивация нормальной аллели гена *IKZF1*.

J. H. Wang et al. [17] получили *knockout*-мышей с делецией 7-го экзона, кодирующего белок-связывающие домены на С-конце *Ikaros*. Эта мутация в гомо-

зиготном состоянии выражается в *Ikaros*<sup>null</sup>-фенотипе (рис. 4б).

Такой белок не способен к димеризации, взаимодействию с другими белками и функционально не активен. Однако нарушения в лимфоидной системе у *null*-мышей оказались менее фатальными, чем у животных с *DN*-фенотипом: полностью отсутствовали зрелые В-лимфоциты; тимоциты накапливались в тимусе в количестве в 100–300 раз меньшем, чем у равновозрастных мышей дикого типа. Дальнейшая дифференцировка Т-клеток также была нарушена в сторону значительного преобладания *CD4+CD8*– Т-клеток. Не обнаруживались  $\gamma\delta$ -Т-клетки, NK и эпидермальные ДК. При этом эритроидная и миелоидная линии дифференцировки существенно не пострадали. Гетерозиготные мыши с генотипом *Ikaros*<sup>null/wt</sup> также были склонны к образованию Т-клеточных опухолей, но в меньшей степени, чем *Ikaros*<sup>DN/wt</sup>-мыши (см. табл. 1).

При сравнении фенотипических эффектов двух типов мутаций *Ikaros*<sup>null</sup>, *Ikaros*<sup>DN</sup> и их гетерозигот привлекают внимание более тяжелые нарушения лимфоидной дифференцировки *DN*-генотипа в сравнении с *null*-генотипом. Различия в фенотипе этих двух мутаций определяются комплементарным действием других членов семейства — *Helios* и *Aiolos*. Короткие изоформы у *Ikaros*<sup>DN</sup>-мышей не способны к связыванию ДНК, однако сохраняют способность к гетеродимеризации с другими членами семейства, подавляя их активность по доминантно-негативному механизму.

### **Ikaros – ключевой фактор развития Т-клеток**

Согласно современным представлениям, в норме развитие клеточных элементов костного мозга начинается от плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки (hematopoietic stem cell, HSC). Лимфомиелоидный росток подвергается сложной дифференцировке, на первом этапе которой HSC индуцируется в мультипотентную лимфоидную клетку-предшественника (lymphoid-primed multipotent progenitor, LMPP). Она дифференцируется до клетки-предшественника миелоцитов (granulocyte-macrophage progenitor, GMP) и ранней лимфоидной клетки-предшественника (early lymphoid progenitor, ELP) — клетки с широким потенциалом дифференцировки, включая миелоидный путь. Последняя мигрирует из костного мозга в тимус, где в результате ее праймирования каскад событий приводит к появлению ранних предшественников лимфоцитов (earliest thymic precursors, ETP) и общей лимфоидной клетки-предшественника (common lymphoid progenitor, CLP) [18, 19].

ETP являются наиболее ранними представителями Т-клеточного ряда и имеют фенотип *CD4*–*CD8*–, в связи с чем их называют дважды отрицательными (ДО, англ. double negative). ETP проходят несколько последовательных стадий развития (от ДО1 до ДО3), оставляя за собой фенотип *CD4*–*CD8*–, претерпевают при этом реаранжировку тяжелых цепей иммуногло-

булинов (*V(D)J*-рекомбинация), что приводит к формированию антиген-распознающих участков иммуноглобулинов ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей) и TCR. Созревают популяции *TCR* $\alpha\beta$  и *TCR* $\gamma\delta$  ( $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -Т-клетки) предшественников Т-клеток, параллельно с этими событиями происходит созревание пула NK-клеток и эпидермальных ДК (клеток Лангерганса). Клетки с функциональным TCR переходят на стадию ДО4 и подвергаются процессу позитивной селекции, превращаясь в дважды положительные (ДП, англ. double-positive) *CD4+CD8+*-клетки. ДП-timoциты активно делятся, теряют один из рецепторов *CD4* или *CD8* (негативная селекция), переходят в стадию моноположительных клеток (single-positive) и мигрируют из тимуса в периферические органы иммунной системы для осуществления своей функции [18, 20].

Экспрессия белка *Ikaros* появляется уже на раннем этапе дифференцировки (рис. 5), когда стволовая клетка крови дифференцируется до общих LMPP, которые, в свою очередь, дают начало миелоидным и общим лимфоидным предшественникам (GMP, ELP) [18]. Выбор дальнейшей дифференцировки между В- и Т-лимфоцитами зависит от ряда вне- и внутриклеточных сигналов. При обособлении Т-клеточного ряда такими триггерами служат белки *Gata-3* и *Notch-1*, экспрессия которых находится под контролем *Ikaros* [21, 22]. Дальнейшие этапы дифференцировки лимфоцитов контролируются совместно с другими линейно-специфическими ТФ.

Показано участие ТФ *Ikaros* в контроле этапов реаранжировки генов *TCR* [23]. В данном случае целевыми для *Ikaros* являются гены  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\delta$ -цепи *TCR*, субъединицы *CD3*, *CD4*, *CD2*, интерлейкин-2 (*IL-2*), *IL-2R $\alpha$*  и др. [24]. При наличии мутаций *IKZF1* на поверхности клеток снижается плотность функционирующих TCR, в результате подавляющее большинство клеток не способно воспринимать достаточный для последующей дифференцировки уровень сигнала извне и вступать в фазу позитивной селекции [25]. K. W. Tinsley et al. отметили неспособность ДП-клеток к дифференцировке в зрелый Т-лимфоцит при экспрессии доминантно-негативных изоформ *Ikaros*. Вместо этого клетки приобретали смешанный профиль маркеров дифференцировки, характерный как для зрелых, так и для незрелых тимоцитов. Такой фенотип не приводил к развитию опухолей, поскольку атипичные клетки подвергались аресту и массовому апоптозу, однако влек за собой полное отсутствие зрелых форм лимфоцитов, ДК и NK [26].

Таким образом, *Ikaros* является ключевым фактором как минимум на трех различных стадиях Т-клеточной дифференцировки: 1) на стадии деления LMPP; 2) при обособлении лимфоидных предшественников (ELP, а затем и ETP) от общего ствола и 3) на ранних этапах Т-клеточной дифференцировки при реаранжировке TCR и переходе ДО3/ДО4-клеток в ДП *CD4+CD8+* пре-Т-клетки [17, 18, 27, 28].

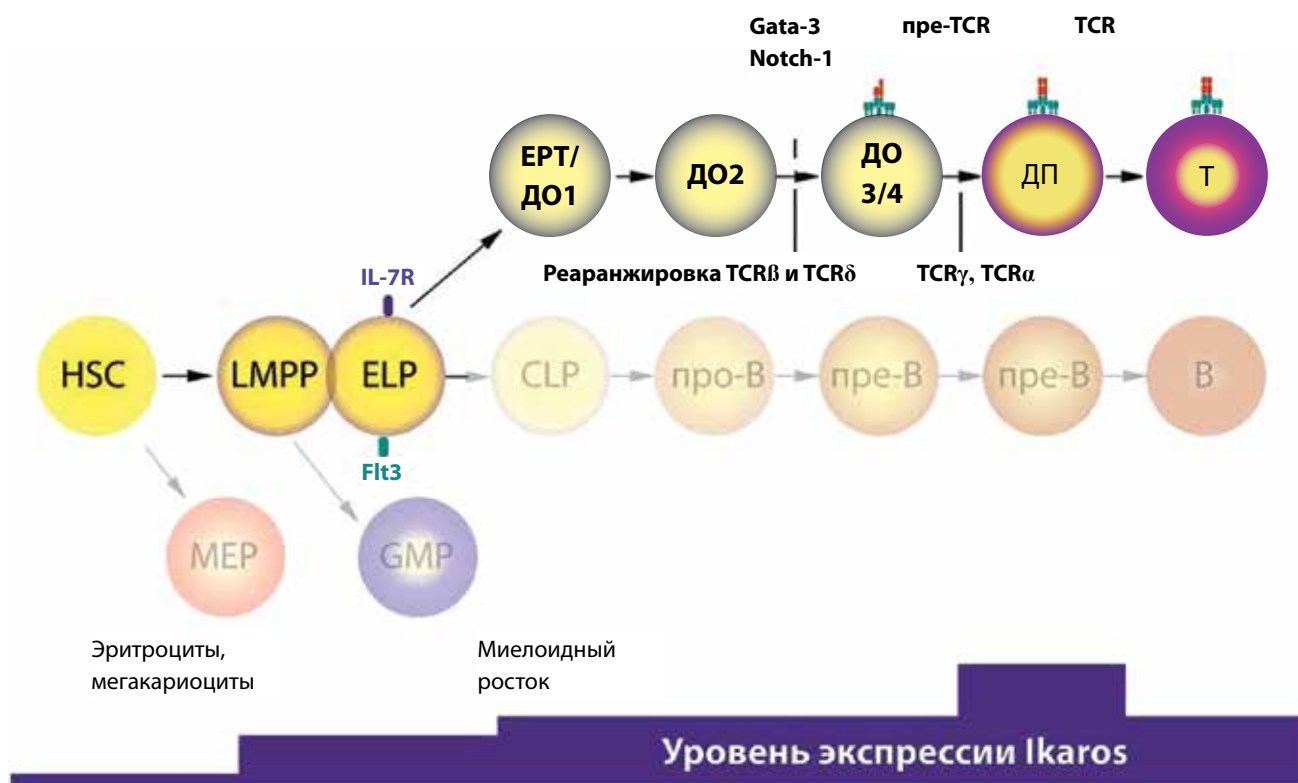


Рис. 5. Уровень экспрессии Ikaros отражает степень его участия на разных этапах созревания Т-клеток. Адаптировано из [13]

### Контроль В-клеточной дифференцировки

Параллельно с созреванием Т-клеток в костном мозге несколько последовательных стадий развития проходят В-клетки, предшественником которых является CLP. Дифференцировка CLP в направлении про- и пре-В-клеток (от англ. progenitor — предок и precursor — предшественник) происходит в случае активации поверхностных рецепторов Flt3 и IL-7 (IL-7R). На этом этапе характерна экспрессия ТФ EBFI, что делает возможным дальнейшее прогрессирование к стадии про-В и индуцирует экспрессию генов, специфичных для В-клеток. В частности, ген *Rax5*, который является ключевым фактором обособления В-линии, ограничивает возможности развития лимфоидных прогениторов только путем развития В-клеток [19, 29, 30]. Начиная экспрессироваться в ELP, Ikaros стимулирует экспрессию генов *Flt3* и *IL-7R* [20, 31] на поверхности CLP (рис. 6).

В дальнейшем, на этапе про-В, клетки подвергаются V(D)J-рекомбинации, что приводит к экспрессии поверхностного В-клеточного рецептора (B-cell receptor, BCR) и обеспечивает клеткам способность воспринимать сигнал к созреванию до пре-В-клеток. Далее, после нескольких раундов деления и реаранжировки легких цепей Ig, клетки, экспрессирующие функциональные BCR, мигрируют в селезенку для заключительных стадий созревания [20]. На данном этапе специфика работы Ikaros заключается в регуляции реаранжировки генов Ig, в первую очередь путем активации экспрессии генов *Rag1/2*, осуществляющих

рекомбинацию [19, 32]. На этапе реаранжировки легких цепей Ig Ikaros принимает участие в контроле процесса аллельного исключения, т. е. обеспечивает специфичность антигенсвязывающего участка зрелой В-клетки. Дисфункция ТФ на данном этапе отражается в нарушениях сигнальных путей предшественников В-клеток и их неспособности к дальнейшей дифференцировке в зрелые лимфоциты [13]. Исследования последних лет демонстрируют вклад Ikaros в динамическое регулирование генов адгезии и миграции клеток: обеспечение репрессии этих генов на стадии про-В-клеток и более высокой экспрессии на стадиях CLP и пре-В-клеток [19].

После дифференцировки клеток из про-В в пре-В Ikaros подавляет экспрессию компонента пре-В-клеточного рецептора Lambda5 [19, 20].

В периферических отделах Ikaros регулирует порог активации В-клеток по отношению к антигену или Т-клеточной ко-стимуляции; ингибирует пролиферацию гиперактивированных В-клеток. Наконец, во время переключения изотипа антител Ikaros контролирует выбор изотипа путем ингибирования перехода на IgG2b и IgG2a и инициирует переход ко всем другим изотипам [13, 20].

Таким образом, исследования функций Ikaros у нокаутных мышей наряду с клиническими данными убедительно свидетельствуют о роли этого белка в качестве опухолевого супрессора, однако механизмы контроля опухолесупрессорной функции Ikaros до настоящего времени не определены [33]. Данные много-



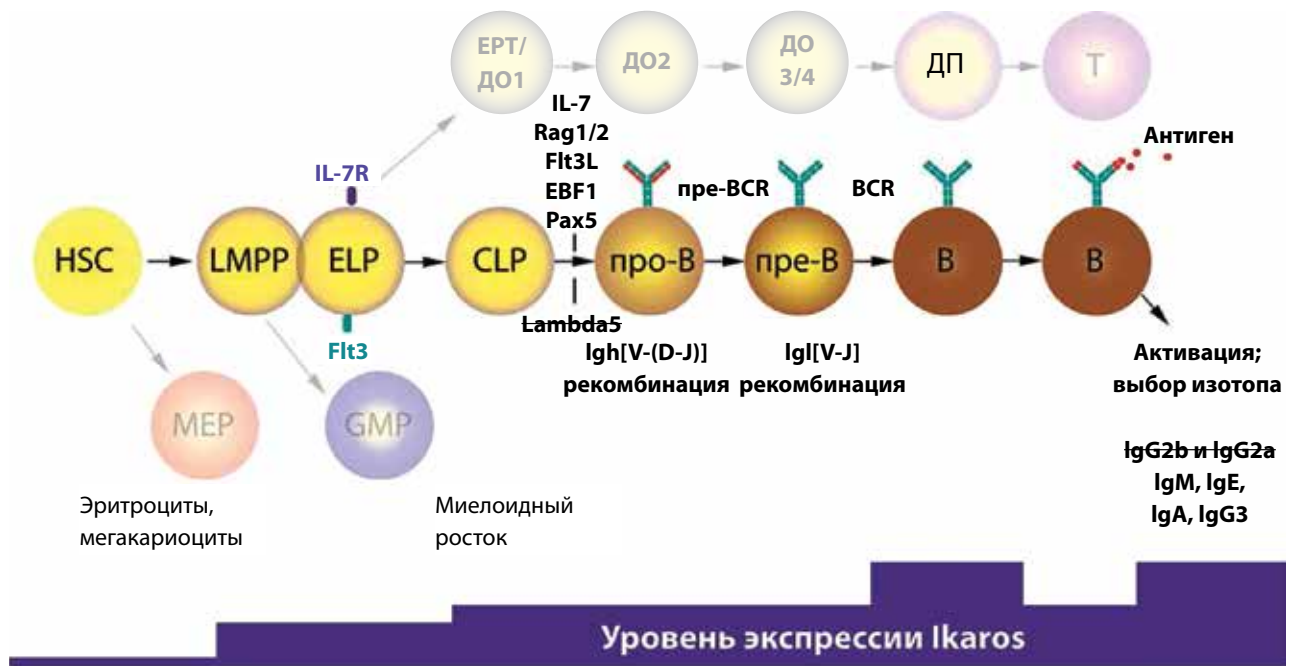


Рис. 6. *Ikaros* контролирует клеточную дифференцировку на нескольких этапах развития В-лимфоцитов. Адаптировано из [19]

численных клинических исследований подтверждают связь между наличием aberrаций *IKZF1* и развитием В-клеточных и, в меньшей степени, Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ). Вместе с тем в публикациях последних лет нарушения функций *Ikaros* связывают с развитием миелоидных заболеваний [13, 34, 35] и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей [36].

#### Характеристика структурных нарушений *IKZF1*

При лейкозах обнаружены следующие варианты структурных мутаций гена *IKZF1*: геномные aberrации (моносомия 7-й хромосомы), хромосомные перестройки (крупные делеции и транслокации) и внутригенные мутации (небольшие делеции и точечные мутации). Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в сверхэкспрессии коротких изоформ (рис. 7).

В функциональном отношении все структурные aberrации являются loss-of-function, т. е. приводят к потере или нарушению функции белка. **Моносомия 7-й хромосомы**, делеция ее короткого плеча и в особенности **хромосомные перестройки** во всех случаях выражаются серьезными комплексными нарушениями

физиологических функций не только со стороны системы гемопоэза. Частота перечисленных aberrаций не превышает 5 % и всегда ассоциирована с полной потерей как минимум одного из аллелей *IKZF1*.

Наиболее распространенным (45 %) типом aberrаций *IKZF1* при острых лейкозах (ОЛ) являются **внутригенные делеции** 15–200 тыс. пар оснований, приводящие к потере нескольких экзонов (рис. 8).

Среди внутригенных делеций наиболее часто (не менее 30 %) обнаруживается делеция экзонов 3–6 ( $\Delta Ex3-6$ ). Стабильность точек разрыва ДНК можно объяснить расположением в этих локусах последовательностей, между которыми происходит ошибочная RSS-рекомбинация при V(D)J-реаранжировке про-В-клеток из-за aberrантной активации генов *Rag1/2* (контроль над активностью которых, как сказано выше, осуществляет *Ikaros*) [37]. Вторая распространенная делеция (15 %) также происходит в результате aberrантной RSS-рекомбинации и захватывает экзоны 1–6 ( $\Delta Ex1-6$ ). Мутация, вероятнее всего, приводит к образованию нефункционального аллеля гена, поскольку 1-й экзон включает в себя стоп-кодон ATG. Частота встречаемости других известных делеций ( $\Delta Ex1-7$  и  $\Delta Ex3-7$ ) по разным данным не превышает 4 %.

#### К дисфункции белка *Ikaros* приводят:

Моносомия 7-й хромосомы, делеция p7 или хромосомные перестройки

Внутригенные делеции (45 %)

Нарушения сплайсинга

Рис. 7. Варианты нарушений, приводящие к дисфункции гена *IKZF1*

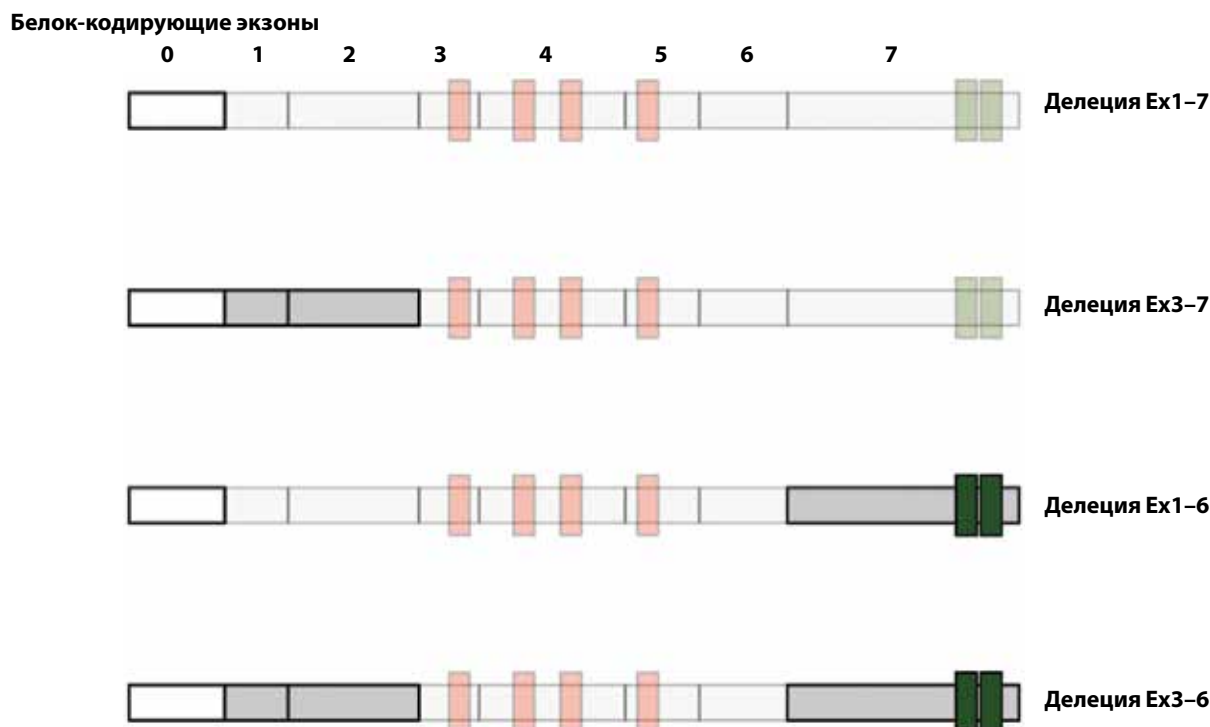


Рис. 8. Схемы образования внутригенных делеций *IKZF1*. Полупрозрачные элементы — участки гена, которые удаляются во время альтернативного сплайсинга при образовании разных изоформ белка

Логично предположить, что в результате делеций такого типа механизм сплайсинга будет нарушен, и это, вероятно, приведет к образованию нефункциональных, т.е. DN-изоформ белка. Так, наиболее часто встречающаяся DN-изоформа Ikaros образуется в результате делеции Ex3–6 и последующего сплайсинга между экзонами 2 и 7. Однако до настоящего времени вопрос взаимосвязи этих двух молекулярных событий остается спорным — в литературе высказаны две гипотезы появления коротких изоформ Ikaros. Согласно первой (F. Klein et al., 2006), такой альтернативный сплайсинг является результатом эпигенетического воздействия, в том числе вызванного биохимическими эффектами химерного онкогена *BCR/ABL*. Другой точки зрения придерживаются проф. C.G. Mullighan et al., указывая, что наличие делеций в гене является единственной причиной aberrантного сплайсинга [38, 39]. Сопоставив частоту внутригенных делеций в гене *IKZF1* и уровень экспрессии коротких изоформ гена *Ikaros* у пациентов с ОЛЛ и здоровых доноров, мы поддерживаем теорию C. Mullighan и продолжаем дальнейшие исследования в этой области [6].

У здоровых доноров может регистрироваться невысокий уровень экспрессии коротких изоформ Ikaros [40]. Предполагается, что их появление отражает естественный механизм отрицательной регуляции функции *IKZF1* как ТФ [10].

Таким образом, полная потеря функции гена может быть вызвана делецией сразу двух аллелей *IKZF1* (12 % всех *IKZF1*-мутаций), а также мутациями, приводящими к образованию DN-форм Ikaros (33 % всех

*IKZF1*-мутаций). Частичная потеря функции *IKZF1* может быть связана с инактивацией одной аллели [5, 36, 39]. Аберрации, связанные с потерей функции Ikaros, — биаллельные делеции и DN-формы — особенно характерны для Ph<sup>+</sup> ОЛЛ. Другие мутации приводят к менее выраженному угнетению функции Ikaros, т.е. гаплodefициту, что наблюдается в 55–70 % всех мутаций *IKZF1* при Ph<sup>–</sup> ОЛЛ [39].

Открытым остается также вопрос наличия субклональных делеций *IKZF1*. Нередко у пациентов с ОЛ помимо основного лейкоэмического клона регистрируется один или более субклонов, характеризующихся собственной кинетикой и молекулярными событиями. Исследование близнецов и отслеживание субклональных нарушений в различных генах позволяет предположить, что транслокация *BCR/ABL1* является первым событием онкогенеза, в то время как мутации *IKZF1* происходят позже, уже на стадии развития лейкоза. Сообщается о случаях «конвергентной» эволюции мутаций *IKZF1*, при этом у одного и того же пациента могут обнаруживаться несколько субклонов, несущих различные мутации *IKZF1*, однако до сих пор эти данные не нашли практического применения [41].

Исследования частоты делеций *IKZF1* (табл. 2) могут быть условно разделены на те, которые были проведены до 2008 г., и более поздние, опубликованные в период активного развития геномных технологий (что отражается в росте частоты обнаруживаемых мутаций). В настоящее время структурные изменения *IKZF1* регистрируются в более чем 20 % случаев детских ОЛЛ (из них около 90 % — внутригенные делеции

Таблица 2. Частота встречаемости внутригенных делеций *IKZF1* при лейкозах

Авторы, год [источник]	Диагноз, число пациентов в исследовании	Частота делеций, %				
		$\Delta Ex1-7$	$\Delta Ex3-7$	$\Delta Ex1-6$	$\Delta Ex3-6$	все
Mullighan C. G. et al., 2007 [43]	В-ОЛЛ (BCR/ABL1+/- ОЛЛ), $n = 242$					9
Mullighan C. G. et al., 2008 [39]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 43$					83,7
	Хронический миелоидный лейкоз, $n = 23$					1,12
Kawamata N. et al., 2008 [44]	В-ОЛЛ (BCR/ABL1+/- ОЛЛ), $n = 399$					< 2
Paulsson K. et al., 2008 [45]	ОЛЛ, $n = 45$					18
Martinelli G. et al., 2009 [46]	BCR/ABL1+ ОЛЛ, $n = 83$			20	37	63
Mullighan C. G. et al., 2009 [47]	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 221$					28,6
Den Boer M. L. et al., 2009 [48]	BCR/ABL1+ ОЛЛ					73
	BCR/ABL1- ОЛЛ, $n = 297$ в 2 группах					39
Okamoto R. et al., 2010 [49]	В-ОЛЛ					15
	Т-ОЛЛ; в 2 группах $n = 75$ (взрослые) + 399 (дети)					0
Iacobucci I. et al., 2012 [50]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 106$			26	49	75
	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 38$					58
Cayre A. et al., 2012 [51]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 60$	2	4	7	24	75*
	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 512$	1	4	8	34	13,5*
Tocunaqa K. et al., 2013 [52]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 24$					83,3
	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 54$					38,9
de Rooij J. et al., 2014 [53]	ОМЛ, $n = 258$					4,3

Примечание. \* — с учетом субклональных делеций.

и 10 % — точечные мутации; 70 % случаев приходится на *BCR/ABL1*-позитивный ОЛЛ); в 30–50 % случаев взрослых ОЛЛ, в том числе при *de novo* ОЛЛ, а также при ОМЛ и гораздо реже — при хроническом миелоидном лейкозе на стадии прогрессирования болезни в бластный криз [42].

**Точечные мутации**, как правило, представляют собой мутации сдвига рамки считывания, ведущие к появлению стоп-кодонов. Их клиническое значение еще предстоит установить. Известны точечные мутации в локусах ДНК-связывающих доменов «цинковых пальцев», приводящие к дисфункции Ikaros при Т-ОЛЛ у мышей [54]. В более ранних исследованиях больших когорт пациентов с В-ОЛЛ точечные мутации выявлены не были. Эти расхождения могут отражать технические недостатки методов исследования или же невысокую частоту точечных мутаций *IKZF1* при *BCR/ABL1*+ ОЛЛ [39, 54, 55]. Тем не менее частота точечных мутаций *IKZF1* при ОЛЛ по результатам полногеномного секвенирования, обеспечившего получение более точных данных, составляет 10 % [56]. Появились данные о повышенной частоте некоторых точечных замен (например, полиморфизм rs4132601) при В-ОЛЛ [57].

### Прогностическое значение мутаций *IKZF1*

Значение aberrаций гена *IKZF1* при ОЛЛ было установлено относительно недавно — в исследованиях, начатых проф. C. G. Mullighan в St. Jude Children's Research Hospital (США). В первом исследовании делеции *IKZF1* были охарактеризованы как наиболее часто встречающиеся генетические aberrации в *BCR/ABL1*+ лейкозах и, таким образом, установлена ассоциация между этими двумя структурными нарушениями ДНК. Были проанализированы *BCR/ABL1*+ В-линейные ОЛ у детей и взрослых методом SNP-arrays. Из 43 таких случаев в 36 (83,7 %) были выявлены делеции в *IKZF1* (16 из 21 ребенка и 20 из 22 взрослых) [42].

В следующем исследовании тех же авторов геномный анализ был выполнен на большой группе детей с В-линейным ОЛЛ методом SNP-arrays на ДНК, выделенной из лейкозных клеток костного мозга [47]. Была доказана достоверно повышенная частота рецидивов в общей когорте больных: 46,3 % пациентов с делецией в гене *IKZF1* против 22,5 % без нее ( $n = 258$ ;  $p = 0,002$ ). Еще большие различия выявлены в стандартизированной когорте пациентов (без *BCR/ABL1*, младенцев и гиподиплоидных ОЛЛ) — 55,2 % у па-

циентов с делецией в гене *IKZF1* против 14 % без нее ( $n = 221$ ;  $p < 0,001$ ). В этом же исследовании продемонстрирована ассоциация между наличием делеций в локусе *IKZF1* и уровнем минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й и 29-й день терапии. Из 67 пациентов с делециями в этом гене 16 (23,9 %) имели высокий уровень МОБ ( $> 1$  %) на 29-й день в сравнении с 6,6 % пациентов без этой аберрации ( $p = 0,001$ ).

Группа европейских исследователей по результатам геномного анализа высокого разрешения установила, что у пациентов с В-линейным ОЛЛ, развивших впоследствии рецидив (13 из 34; 38,2 %), частота делеций в гене *IKZF1* на 2-м месте по частоте встречаемости после аберраций гена ингибитора циклин-зависимых киназ *CDKN2A* (15 из 34; 44,1 %) [58]. Пациенты с делециями *IKZF1* имели значительно более низкую безрецидивную выживаемость (39 % с делециями против 89 % wt,  $p < 0,001$ ) и сниженную общую выживаемость (56 % с делециями против 91 % wt,  $p < 0,001$ ) в общей группе пациентов. Достоверные различия сохранялись как для группы высокого риска, так и для пациентов без высокого риска.

В исследованиях китайских авторов на большой группе больных ОЛЛ показана худшая безрецидивная выживаемость у пациентов со сверхэкспрессией короткой изоформы Iκ6 [59, 60]. Iκ6 оказался независимым неблагоприятным прогностическим фактором для показателей общей и безрецидивной выживаемости у детей, в том числе при *BCR/ABL1*-негативных детских В-линейных ОЛ, но не *BCR/ABL1*-негативных взрослых лейкозов.

Необходимость учета делеций гена *IKZF1* для стратификации пациентов по группам риска поставлена под сомнение в исследовании итальянских авторов [61]. Делеции в локусе *IKZF1* были оценены методом мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) в группе из 410 детских В-линейных *BCR/ABL1*-негативных ОЛЛ. В общей группе пациенты с делециями *IKZF1* сохраняли сниженную бессобытийную выживаемость и повышенную вероятность рецидива. Пациенты с делециями *IKZF1* неравномерно распределились по группам риска (выделенным согласно стратификации, основанной на оценке уровня МОБ): в группе стандартного риска делеции обнаружены у 8 (6,8 %) из 117 больных, промежуточного — у 42 (15,9 %) из 264 и высокого — у 4 (13,8 %) из 29. Ни у одного из 8 пациентов с делецией в группе стандартного риска не развился рецидив. В группе промежуточного риска пациенты с делециями *IKZF1* имели повышенную частоту рецидивов, но различия не достигли достоверности. Таким образом, прогностическое значение *IKZF1* зависит от применяемого протокола и может не иметь дополнительной ценности для стратификации после разделения на принятые группы риска. Авторы предполагают, что усиленное применение L-аспарагиназы в используемом протоколе могло снизить прогностическую роль гена *IKZF1*. Предпо-

лагается, что комбинирование такого классического прогностического критерия, как уровень МОБ, с анализом мутаций *IKZF1* может значительно улучшить стратификацию пациентов с ОЛЛ по группам риска [62].

Наконец, группа немецких авторов детально изучила прогностические факторы для первого костномозгового рецидива В-линейного ОЛЛ у детей [63]. С использованием метода MLPA была выявлена высокая частота делеций *IKZF1* (33,3 %). Анализ бессобытийной и общей выживаемости показал достоверно худший исход у пациентов с делецией *IKZF1*. Различия особенно велики для пациентов в группе высокого риска, для получивших аллотрансплантацию костного мозга, а также для больных с низким уровнем МОБ. Многофакторный анализ показал, что независимыми неблагоприятными факторами для рецидивов ОЛЛ выступают только делеции гена *IKZF1* и мутации в гене опухолевого супрессора *TP53*.

Некоторые факты свидетельствуют о вкладе Ikaros в развитие лекарственной устойчивости лейкозов [64]. I. Iacobucci et al. (2008) впервые провели анализ связей между наличием молекулярных нарушений гена *IKZF1* и устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназ (ИТК) у пациентов с *BCR/ABL1*+ ОЛЛ. Короткая изоформа Iκ6 была обнаружена у 49 % исследуемых пациентов, при этом наблюдалась высокая степень корреляции между наличием DN-изоформ Ikaros и уровнем транскриптов *BCR/ABL1*. Для лейкозных клеток пациентов экспрессия коротких изоформ Ikaros была характерна до лечения ИТК и преимущественно на момент рецидива, но не во время ответа на ИТК [65].

Гиперэкспрессия *in vitro* Iκ6 активирует синтез ДНК и ингибирует апоптоз в ИТК-чувствительных клетках. В эксперименте на клеточных линиях F. Zhou et al. (2014) подтвердили гипотезу развития множественной химиорезистентности за счет антиапоптотического эффекта, который наблюдался при гиперэкспрессии короткой изоформы Iκ6 [66].

У *BCR/ABL1*-негативных больных В-ОЛЛ в работе N. A. Vitanza et al. закономерностей между наличием мутаций *IKZF1* и развитием лекарственной устойчивости обнаружено не было. Исследователи предполагают, что плохой прогноз заболевания в данном случае мог быть обусловлен другими генетическими нарушениями или особенностями микроокружения клеток костного мозга [67].

Обобщив данные, можно констатировать, что Ikaros является опухолевым супрессором для лимфоидных опухолей. Мутации, приводящие к утрате функций белка, ассоциированы с неблагоприятным прогнозом заболевания. Анализ структурных аберраций и альтернативного сплайсинга гена *IKZF1* целесообразно включать в диагностические панели всех типов лейкозов и в дальнейшем принимать во внимание при определении МОБ. Более точное прогностическое значение этих признаков еще предстоит выяснить для разных групп пациентов с учетом других генетических маркеров и схемы проводимой химиотерапии.



## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. OriGene Technologies database. URL: [http://www.origene.com/Human\\_cDNA/SC331775.aspx](http://www.origene.com/Human_cDNA/SC331775.aspx).
2. Gounari F, Kee B. L. Fingerprinting Ikaros. *Nat Immunol* 2013;14(10):1034–5.
3. Jhanjun L., Perez-Casellas L. A., Savić A. et al. Ikaros isoforms the saga continues. *World J Biol Chem* 2011;2(6):140–5.
4. Molnár A., Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14(12):8292–303.
5. Payne K. J., Nicolas J. H., Zhu J. Y. et al. Cutting edge: predominant expression of a novel Ikaros isoform in normal human hemopoiesis. *J Immunol* 2001;167(4):1867–70.
6. Meleshko A. N., Movchan L. V., Belevtsev M. V., Savitskaja T. V. Relative expression of different Ikaros isoforms in childhood acute leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41(3):278–83.
7. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):162–74.
8. Cortes M., Wong E., Koipally J., Georgopoulos K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 1999;11(2):167–71.
9. Liu M., Whetstone J. R., Payton S. G. et al. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem J* 2004;383(Pt 2):249–57.
10. Zinc finger proteins: From atomic contact to cellular function. S. Iuchi, N. Kuldel (eds.). Landes Bioscience, 2005. P. 201.
11. Song C., Li Z., Erbe A. K. et al. Regulation of Ikaros function by casein kinase 2 and protein phosphatase 1. *World J Biol Chem* 2011;2(6):126–31.
12. Francis O. L., Payne J. L., Su R. J., Payne K. J. Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros. *World J Biol Chem* 2011;2(6):119–25.
13. Schwickert T. A., Tagoh H., Gültekin S. et al. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat Immunol* 2014;15(3):283–93.
14. Georgopoulos K., Moore D. D., Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 1992;258(5083):808–12.
15. Georgopoulos K., Bigby M., Wang J. H. et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79(1):143–56.
16. Winandy S., Wu P., Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 1995;83(2):289–99.
17. Wang J. H., Nichogiannopoulou A., Wu L. et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 1996;5(6):537–49.
18. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A. A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)].
19. Sellars M., Kastner P., Chan S. Ikaros in B cell development and function. *World J Biol Chem* 2011;2(6):132–39.
20. Yoshida T., Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol* 2014;100(3):220–9.
21. Osborne B. A. Transcriptional control of T cell development. *Curr Opin Immunol* 2000;12(3):301–6.
22. Rothenberg E. V., Taghon T. Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:601–49.
23. Winandy S. Ikaros to the rescue of TCR- $\alpha$  chain gene rearrangement. *Eur J Immunol* 2013;43(2):314–7.
24. Schmitt C., Tonnelie C., Dalloul A. et al. Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis* 2002;7(3):277–84.
25. Avitahl N., Winandy S., Friedrich C. et al. Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity* 1999;10(3):333–43.
26. Tinsley K. W., Hong C., Luckey M. A. et al. Ikaros is required to survive positive selection and to maintain clonal diversity during T-cell development in the thymus. *Blood* 2013;122(14):2358–68.
27. Yoshida T., Ng S. Y., Zuniga-Pflucker J. C., Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 2006;7(4):382–91.
28. Ng S. Y., Yoshida T., Zhang J., Georgopoulos K. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Immunity* 2009;30(4):493–507.
29. Nutt S. L., Kee B. L. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 2007;26(6):715–25.
30. Smith E., Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *J Leukoc Biol* 2004;75(6):973–81.
31. Ng S. Y., Yoshida T., Georgopoulos K. Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol* 2007;19(2):116–22.
32. Kirstetter P., Thomas M., Dierich A. et al. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 2002;32(3):720–30.
33. Liberg D., Smale S. T., Merkenschlager M. Upstream of Ikaros. *Trends Immunol* 2003;24(11):567–70.
34. Jäger R., Gisslinger H., Passamonti F. et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010;24(7):1290–8.
35. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24(60):1128–38.
36. Yagi T., Hibi S., Takanashi M. et al. High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood* 2002;99(4):1350–5.
37. Meyer C., Zur Stadt U., Escherich G. et al. Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. *Am J Blood Res* 2013;3(2):165–73.
38. Klein F., Feldhahn N., Herzog S. et al. BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 2006;25(7):1118–24.
39. Mullighan C. G., Miller C. B., Radtke I. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453(7191):110–4.
40. Yuan T., Zhao X. L., Zhang L. X. et al. Expression and clinical significance of IKZF1 gene IK6 isoform in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Hematol* 2013;21(3):539–43.
41. Burmeister T., Gesine B., Gröger D. Germline variants in IKZF1, ARID5B, and CEBPE as risk factors for adult-onset acute lymphoblastic leukemia: an analysis from the GMALL study group. *Haematologica* 2014;99(2):e23–5.
42. Mullighan C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:389–96. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.389.
43. Mullighan C. G., Goorha S., Radtke I. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758–64.
44. Kawamata N., Ogawa S., Zimmermann M. et al. Molecular allelotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 2008;111(2):776–84.
45. Paulsson K., Cazier J. B., Macdougall F. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(18):6708–13.
46. Martinelli G., Iacobucci I., Storlazzi C. T. et al. IKZF1(Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence

- of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5202–7.
47. Mullighan C. G., Su X., Zhang J. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360(5):470–80.
  48. Den Boer M. L., van Slegtenhorst M., de Menezes R. X. et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10(2):125–34.
  49. Okamoto R., Ogawa S., Nowak D. et al. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95(9):1481–8.
  50. Iacobucci I., Iraci N., Messina M. et al. IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2012;7(7):e40934.
  51. Caye A., Beldjord K., Mass-Malo K. et al. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2013;98(4):597–601.
  52. Tokunaga K., Yamaguchi S., Iwanaga E. et al. High frequency of IKZF1 genetic alterations in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2013;91(3):201–8.
  53. de Rooij J., Beuling E., Zwaan C. M. et al. IKZF1 deletions in pediatric acute myeloid leukemia. 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting & Exposition. URL: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper71902.html>.
  54. Kastner P., Chan S. Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *World J Biol Chem* 2011;2(6):108–14.
  55. Iacobucci I., Storlazzi C. T., Cilloni D. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood* 2009;114(10):2159–67.
  56. Roberts K. G., Morin R. D., Zhang J. et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012;22(2):153–66.
  57. Boehm V., Lebenatus A., Bartels M. et al. Subclonal IKZF1 deletions indicate a multiclonal evolution in BCR-ABL1-positive B-cell precursor ALL. *Blood* 2013;122(21):1327.
  58. Kuiper R. P., Waanders E., van der Velden V. H. et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010;24(7):1258–64.
  59. Liu P., Lin Z., Qian S. et al. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms and associated genetic alterations in Chinese adult patients with leukemia. *Ann Hematol* 2012;91(7):1039–49.
  60. Mi J. Q., Wang X., Yao Y. et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (II): prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases. *Leukemia* 2012;26(7):1507–16.
  61. Palmi C., Valsecchi M. G., Longinotti G. et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica* 2013;98(8):1226–31.
  62. Waanders E., van der Velden V. H., van der Schoot C. E. et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79 % of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25(2):254–8.
  63. Krentz S., Hof J., Mendioroz A. et al. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013;27(2):295–304.
  64. Martinelli G., Iacobucci I., Papayannidis C., Soverini S. New targets for Ph+ leukaemia therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22(3):445–54.
  65. Iacobucci I., Lonetti A., Messa F. et al. Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood* 2008;112(9):3847–55.
  66. Zhou F., Xu Y., Qiu Y. et al. Ik6 expression provides a new strategy for the therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2014;31(3):1373–9.
  67. Vitanza N. A., Zaky W., Blum R. et al. Ikaros deletions in BCR-ABL-negative childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with a distinct gene expression signature but do not result in intrinsic chemoresistance. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(10):1779–85.