

Mutace genů rodiny *RAS* u pacientů s akutní myeloidní leukemií

Řurínková A.^{1,2}, Folta A.², Čulen M.^{1,2,3}, Herudková Z.^{1,2}, Al Tukmachi D.³, Mayer J.^{1,2,3}, Ježíšková I.^{1,2}

¹Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, Brno

³CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

Transfuzní Hematol. dnes, 25, 2019, No. 4, p. 331–338

SOUHRN

Somatické mutace protoonkogenů *RAS* (*rat sarcoma viral oncogene homolog*) vedou k nekontrolované konstitutivní aktivaci *RAS* indukovaných signálních drah ovlivňujících procesy proliferace, diferenciací a apoptózy buněk. U pacientů s akutní myeloidní leukemií (AML) lze mutace genů *RAS* identifikovat u přibližně pětiny nemocných. Mutace jsou heterozygotní, typu „*missense*“, lokalizované především do kodonů G12, G13 a Q61 exonů 2 a 3. Nejčastěji mutovaným genem rodiny je *NRAS*. Vzácně lze identifikovat případy pacientů se současným výskytem mutací v genu *NRAS* i genu *KRAS*. Přibližně desetina *NRAS* pozitivních AML pacientů vykazuje polyklonalitu mutací. Mutace genů *RAS* jsou často detekovány společně s chromozomálními aberacemi *inv(16)/t(16;16)* či *t(8;21)*, ale také *inv(3)/t(3;3)* nebo s normálním karyotypem a mutacemi v genech *NPM1* a *DNMT3A*. Většina velkých publikovaných studií nepotvrdila vliv mutací na celkové přežití pacientů. Asociace mutací s dalšími klinickými parametry je nejednoznačná. V procesu leukemogeneze jsou mutace genů rodiny *RAS* sekundární událostí přispívající k progresi a proliferaci AML subklonů.

Cílem předkládané práce je shrnutí aktuálních poznatků o genové rodině *RAS* a jejím významu u pacientů s AML.

KLÍČOVÁ SLOVA

akutní myeloidní leukemie – AML – *RAS* – mutace

SUMMARY

Řurínková A., Folta A., Čulen M., Herudková Z., Al Tukmachi D., Mayer J., Ježíšková I.

Mutations of the *RAS* family in patients with acute myeloid leukaemia

Somatic mutations in *RAS* (*rat sarcoma viral oncogene homolog*) proto-oncogenes lead to constitutive activation of *RAS* signalling pathways impacting cellular proliferation, differentiation and apoptosis. *RAS* mutations are detected in approximately one fifth of patients with acute myeloid leukaemia (AML). Typically, the aberrations are missense heterozygous point mutations localized in codons G12, G13 and Q61 in exons 2 and 3, respectively. In AML, *NRAS* is the most frequently mutated gene of the *RAS* family. Simultaneously mutated *NRAS* and *KRAS* genes in one patient are possible, but rare. In approximately 10% of AML patients, multiple *NRAS* mutations are detected. The *RAS* mutations occur with higher frequency in AML patients with chromosomal aberrations *inv(16)/t(16;16)*, *t(8;21)*, *inv(3)/t(3;3)*. In patients with normal karyotype, the *RAS* genes are frequently co-mutated with the *NPM1* and *DNMT3A* genes. Most of the large cohort studies did not demonstrate any implication of *RAS* mutations on overall survival, and its occurrence was not significantly associated with any clinical parameters. During leukaemogenesis, *RAS* mutations play a role as late secondary events supporting increased proliferation of AML subclones.

The aim of this work is to summarize the current knowledge about the *RAS* gene family and its significance in patients with AML.

KEY WORDS

acute myeloid leukaemia – AML – *RAS* – mutations

ÚVOD

Molekulárně-cytogenetickým profilováním byla nedávno u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) identifikována řada somatických změn, které je možné asociovat s různými rizikovými skupinami a prognózou [1, 2]. Častými somatickými aberacemi jsou u pacientů s AML také mutace genů rodiny RAS (*rat sarcoma viral oncogene homolog*) [2–14]. Membránové proteiny rodiny RAS fungují v buňkách jako molekulární přepínače zodpovědné za regulaci signální transdukce mezi cytoplazmou a jádrem. Aktivační mutace protoonkogenů RAS vedou k nekontrolované konstitutivní signalizaci a deregulaci buněčných drah řídicích procesy proliferace, diferenciace a apoptózy [15, 16].

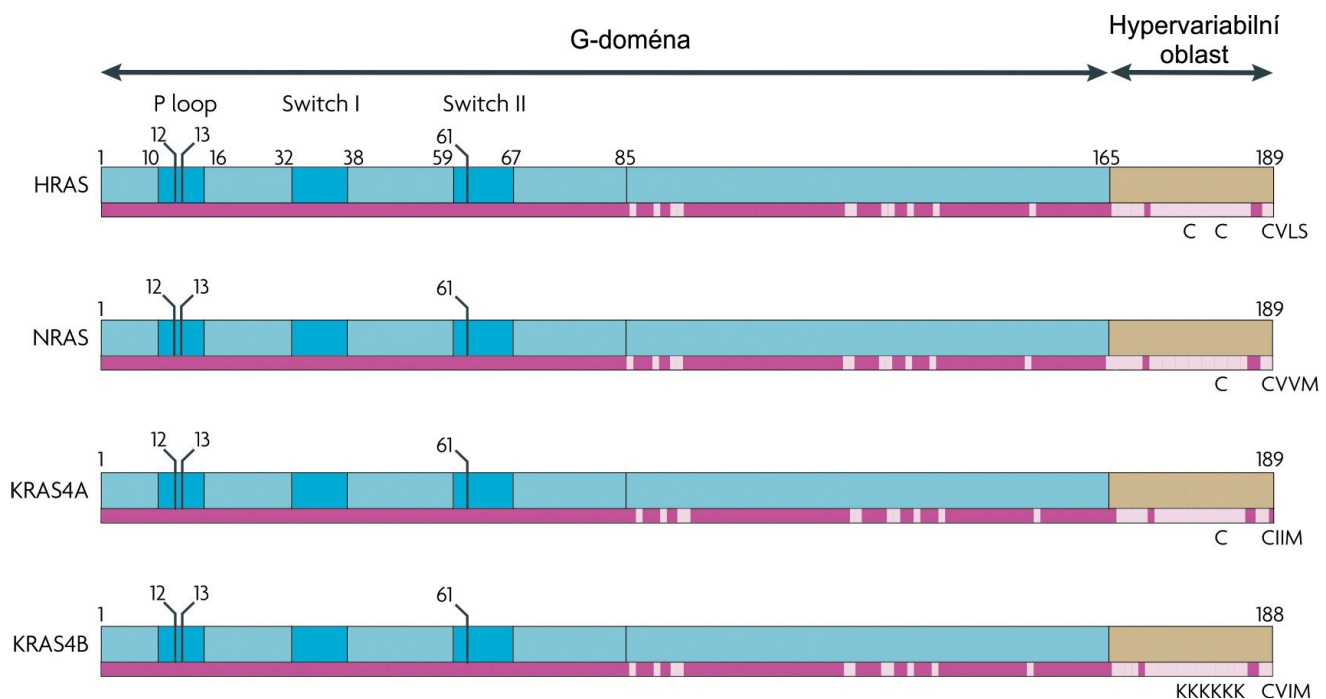
Cílem následujícího textu je shrnutí aktuálních poznatků o genové rodině RAS a jejím významu u pacientů s AML.

RODINA RAS

Proteiny RAS patří spolu s přibližně stem více či méně homologních proteinů rodin ARF, RAB, RAN a RHO do superrodiny RAS, označované též jako malé G-proteiny, nebo malé GTPázy. Rodinu genů RAS tvoří

tři geny kódující čtyři vysoce homologní 21 kD proteiny: NRAS (*neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog*), gen lokalizovaný v lokusu 1p13.2; HRAS (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), gen lokalizovaný v lokusu 11p15.5; a dvě sestříhové varianty KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) – KRAS4A/KRAS4B, gen lokalizovaný v lokusu 12p12.1. Geny KRAS a HRAS byly popsány v roce 1982 [17], gen NRAS byl popsán o rok později [18]. Původně byly geny rodiny RAS identifikovány jako virové geny transdukované z hlodavčího genomu, přičemž se zjistilo, že právě tyto geny určují transformační vlastnosti onkogenních retrovirů [19].

Zatímco N-terminální konec RAS proteinů je tvořen vysoce konzervovanou G-doménou, C-terminální konec je hypervariabilní. Prvních 85 aminokyselin (AMK) je identických pro všechny čtyři RAS proteiny a specifikuje vazbu na guanozindifosfát (GDP) a guanozintrifosfát (GTP). Aminokyseliny 10–16 tvoří fosfát vázající smyčku (P-loop), která se váže na γ -fosfát GTP. Oblasti aminokyselin 32–38 a 59–67 se nazývají spínač I (*Switch I*) a spínač II (*Switch II*). Následujících 80 AMK (AMK 85–165) vykazuje mezi jednotlivými RAS izoformami 85–90% sekvenční identitu. Hypervariabilní doména



Obr. 1. Srovnání izoform RAS

Schéma znázorňuje strukturu jednotlivých izoform: HRAS, NRAS, KRAS4A a KRAS4B. Všechny izoformy mají homologní vazebné domény P-loop, Switch I a Switch II; oblast aminokyselin 85–165 vykazuje 85–90% sekvenční identitu mezi různými izoformami. C-terminální doména je hypervariabilní, specifikuje membránovou lokalizaci izoform: HRAS – skrze sekvenci aminokyselin CVLS, NRAS – sekvence CVVM, KRAS4A – sekvence CIIM a KRAS4B sekvence CVIM. Dále se na membránové lokalizaci u HRAS, NRAS a KRAS4A podílí specifická pozice cysteinů (naznačeno). U KRAS4B je membránová lokalizace dána na základě repetitivní sekvence lysinů (KKKKKK, naznačeno). Barevně je vyznačen stupeň homologie mezi jednotlivými izoformami: fialově – konzervované domény, světle růžově – variabilní oblasti. Kodony nejčastěji postižené somatickými mutacemi jsou označeny v pozicích 12, 13 a 61. Upraveno podle Schubert et al. [15].

C-konce (AMK 165 až 188/189) specifikuje lokalizaci RAS proteinů v cytoplazmatické membráně pomocí posttranslačních modifikací (obr. 1) [15].

Všechny proteiny RAS mají identické vazebné domény, a proto interagují se stejnými vazebnými partnery. RAS proteiny se neustále aktivují a deaktivují v závislosti na vazbě s GTP (RAS + GTP → „zapnuto“) nebo GDP (RAS + GDP → „vypnuto“). Za normálních podmínek je RAS přítomný v neaktivním stavu ve vazbě s GDP, ve kterém zůstává, dokud nedojde k extracelulárnímu stimulu - vazbě ligandu na tyrozinkinázový receptor (TKR). Stimulem může být přítomnost mitogenů, cytokinů, hormonů nebo růstových faktorů. GTP-aktivovaný RAS může interagovat s více než 20 efektorovými molekulami, a regulovat tak různé dráhy zapojené do procesů proliferace, diferenciaci a přežívání buněk [20].

Přes aktivovaný RAS je signál přenášen dále na molekuly postavené níže v rámci signální dráhy. Mezi nejlépe prostudované dráhy ovlivňované RAS patří RAF-MEK-ERK kaskáda, která je zapojena do regulace exprese proteinů kontrolujících buněčný cyklus (např. cyclin D) [21]. Dalším významným efektem RAS signalizace je aktivace PIK3CA dráhy, která stimuluje aktivaci AKT kinázy. AKT kináza reguluje přežívání buněk fosforylací a deaktivací pro-apoptotických proteinů. Proteiny RAS mohou rovněž interagovat s aktivačními faktory RAL proteinů, které stimuluje expresi fosfolipázy D a mají významnou roli v transformaci a onkogenezi různých buněčných typů [22].

RAS supresorovými regulátory jsou především GTPázové aktivační proteiny (GAPs), které stimuluje a několikanásobně zvyšují vlastní GTPázovou aktivitu RAS proteinů vedoucí k hydrolýze GTP a deaktivaci RAS proteinů [23].

RAS ONKOGENY

Aktivační mutace v genech RAS jsou detekovatelné u přibližně 30 % všech lidských malignit. To je řadí mezi nejčastější aberace spojené s nádorovým onemocněním. Známa je asociace mutací jednotlivých RAS izoform s určitými typy nádorů. Mutace v genu KRAS jsou typicky spojovány s nádorovým onemocněním střev, pankreatu či dělohy, zatímco mutace v genu NRAS jsou s vyšší četností detekovány právě u hematologických malignit a pacientů s melanomem. Mutace v genu HRAS jsou obecně raritní, ve zvýšené míře se vyskytují u pacientů s nádory slinných žláz nebo močového traktu [24].

Mutace genů RAS postihují oblasti, které určují enzymatickou aktivitu proteinu. U všech čtyř RAS homologů jsou pozorovány výhradně substituční bodové

„missense“ mutace téměř výlučně lokalizované do „hot spot“ oblastí v exonech 2 a 3. Dominantně se jedná o glycinové substituce [9].

Studium krystalové struktury GDP-RAS komplexů pomohlo pochopit interakci, ke které dochází mezi GDP a RAS. Všechny dosud známé transformační lokusy mutací RAS jsou seskupeny v blízkosti vazby guaninového nukleotidu. Srovnáním neaktivních GDP-RAS komplexů s „wild type“ nebo onkogenním RAS proteinem nebyly zjištěny žádné výrazné strukturální rozdíly. Naproti tomu srovnání aktivovaných GTP-RAS komplexů odhalilo způsob, jakým je u mutovaného RAS zabráněno hydrolýze GTP. Děje se tak především změnou orientace γ -fosfátu nebo zabráněním jeho participace na hydrolýze GTP. Mutace vedou k zastavení indukce hydrolýzy GTP, a tedy ke konstitutivní aktivaci RAS proteinu, nezávislé na vnější signalizaci [25]. Zatímco mutace v kodonu 61 vedou k aktivaci RAS narušením jeho GTPázové aktivity, mutace v kodonech 12 a 13 dosahují stejného efektu snížením senzitivity RAS proteinu k supresorovým regulátorům GAPs [26].

MUTACE GENŮ RODINY RAS U PACIENTŮ S AML

Typy mutací

Mutace genů rodiny RAS byly u pacientů s AML identifikovány před více než 30 lety [27]. Publikované frekvence mutací, které jsou odrazem použité metody analýzy a také různé struktury testovaného souboru pacientů s AML, se pohybují v poměrně širokém rozmezí od 3 do 30 % (podrobně v tabulce 1). Více než tři čtvrtiny aberací genů rodiny RAS připadají na gen NRAS; gen KRAS je mutován méně často a mutace genu HRAS jsou u pacientů s AML zcela ojedinělé [2-14]. Podle dostupných studií se mutace v genech rodiny RAS ve vývoji AML objevují až jako pozdní událost přispívající spíše k progresi a proliferaci AML subklonů [2, 28, 29]. Z hlediska klonální hierarchie *de novo* AML jim zpravidla předchází vznik chromozomálních aberací nebo vznik mutace v genu NPM1 nebo jiném genu plnícím funkci transkripčního faktoru AML (RUNX1, CEBPA, GATA2). Teprve na ně obvykle navazuje mutace genu účastnického se buněčné signalizace (genů rodiny RAS nebo též genu FLT3 či KIT). Tomuto uspořádání může jako preleukemický stupeň předcházet vznik mutací v genech účastnických se epigenetické regulace (zejména DNMT3A a TET2) [30].

Mutace genů rodiny RAS nejčastěji postihují kodon G12. Nejfrekvencovanější aberací je u pacientů s AML mutace G12D v genu NRAS, která tvoří více než 40% podíl všech RAS detekovaných mutací. Z hlediska typu mu-

Tab. 1. Frekvence mutací v genech rodiny RAS u pacientů s AML

| Autor | Pacienti | | | Použitá metoda detekce | NRAS (%) | KRAS (%) | HRAS (%) |
|-------------------------------|----------|----------------|--|--|-------------------------------|------------------------------|----------|
| | počet | věková skupina | charakteristika | | | | |
| Farr et al. 1988 [12] | 52 | neuveđeno | <i>de novo</i> AML | alelově specifická dot-blot hybridizace | 27 | 0 | 0 |
| Neubauer et al. 1994 [11] | 99 | < 60 | <i>de novo</i> AML | hybridizace s alelově specifickými oligonukleotidy | 13 | 8 | ND |
| Bowen et al. 2005 [10] | 1106 | 18–60 | <i>de novo</i> AML | denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie | 11 | 5 | 0 |
| Bacher et al. 2006 [9] | 2502 | 18–92 | <i>de novo</i> AML, sAML, tAML | vysokorozlišovací analýza křivek tání | 10 | ND | ND |
| Schlenk et al. 2008 [8] | 872 | 18–60 | CN-AML | přímé sekvenování | 13 | ND | ND |
| Kadia et al. 2012 [54] | 609 | 17–88 | <i>de novo</i> AML | přímé sekvenování | 8 | 3 | ND |
| Yang et al. 2013[55] | 504 | 16–83 | <i>de novo</i> AML | vysokorozlišovací analýza křivek tání | 10 | 3 | ND |
| Dunna et al. 2014 [7] | 135 | neuveđeno | <i>de novo</i> AML | přímé sekvenování | 5 | ND | ND |
| Reuter et al. 2014 [16] | 204 | 18–60 | CN-AML | přímé sekvenování | 12 | 2 | ND |
| Krauth et al. 2014 [13] | 139 | 18–84 | <i>de novo</i> AML, tAML s t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 | neuveđeno | 14 <i>de novo</i> AML; 9 tAML | 4 <i>de novo</i> AML; 5 tAML | ND |
| Shin et al. 2016 [5] | 114 | < 60 | <i>de novo</i> AML, sAML | masivně paralelní sekvenování (Illumina Miseq) | 7 | 0 | ND |
| Ley et al. 2013 [4] | 200 | 39–71 | <i>de novo</i> AML | masivně paralelní sekvenování (Illumina HiSeq) | 8 | 4 | ND |
| Metzeler et al. 2016 [3] | 664 | 18–86 | <i>de novo</i> AML, sAML, tAML | celoexomové sekvenování (Illumina MiSeq) | 22 | 6 | ND |
| Papaemmanuil et al. 2016 [20] | 1540 | 18–84 | <i>de novo</i> AML, sAML, tAML | masivně paralelní sekvenování (Illumina HiSeq) | 18 | 5 | ND |

Vysvětlivky: ND – nedetekováno; CN-AML – AML s normálním karyotypem; sAML – sekundární AML; tAML – AML vzniklá v důsledku předchozí terapie

tací je v kodonech G12, G13 a Q61 nejčastěji detekována substituce bází G > A (60 %), následovaná transverzemi G > C, G > T a C > A [10, 11]. Nejčastějšími aminokyselinovými substitucemi jsou pro kodony 12 a 13 záměny glycin → kyselina asparagová (G12D, G13D), glycin → serin (G12S, G13S) a glycin → alanin (G12A, G13A). Pro kodon 61 jsou typické substituce C > A a A > G způsobující aminokyselinové záměny glutamin → lyzin (Q61K) a glutamin → arginin (Q61R). Spektrum mutací s predominancí substitucí G > A je typické pro onemocnění myeloidní řady (AML, myelodysplastický syndrom – MDS), zatímco u onemocnění lymfoidní krevní řady, resp. lymfomů jsou popisovány spíše transverze G > T. Mutace v kodonu 61 jsou s vyšší frekvencí detekovány především u pacientů s myelomem [10].

Vedle „hot spot“ mutací lze u pacientů s AML raritně detekovat také další somatické změny postihující jiné kodony genu. Tyner et al. popsali čtyři vzácné (nekanonické) mutace – V14I, A146T a T74P v genu KRAS a mutaci G60E v genu NRAS – u skupiny 7 z celkově 341 vyšetřených pacientů s AML [31]. Pro všechny uvedené mutace byl stanoven stejný onkogenní potenciál jako pro časté (kanonické) RAS mutace.

U NRAS pozitivních AML pacientů lze běžně identifikovat simultánní výskyt několika mutací genu NRAS současně. Tato tzv. polyklonalita mutací je detekována u přibližně 15 % NRAS pozitivních pacientů, přičemž její význam není zřejmý. Analýzy klonálního pozadí vícečetných NRAS mutací nicméně identifikovaly jednotlivé aberace lokalizované samostatně na dílčích alelách genů, tj. v jednotlivých AML subklonech [2, 12, 28]. Pouze starší práce Kubo et al. popisuje detekci klonu se dvěma mutovanými lokusy na jedné alele genu u AML pacienta s celkově 4 mutacemi genu NRAS lokalizovanými ve 3 různých kodonech [32].

Provedené analýzy mutací genů rodiny RAS na párových vzorcích z doby diagnózy a relapsu onemocnění pacientů s AML ukazují, že mutace v relapsu onemocnění často absentují. Důvodem pro to může být vyšší senzitivita buněk nesoucích mutace genů RAS k chemoterapii nebo už dříve zmiňovaný druhotný význam mutací ve vývoji AML [29, 33]. Raritně však lze identifikovat případy pacientů s AML, u nichž v relapsu onemocnění dochází ke změně typu mutace [34], nebo kdy se mutace v genech rodiny RAS objevují *de novo* [9, 35].

Koexistence mutací

Mutace v genech rodiny RAS jsou u pacientů s AML často asociovány s jinými somatickými aberacemi se známým vztahem k AML. S četností 9–45 % byly mutace v genech RAS detekovány ve skupině pacientů s t(8;21), resp. fuzním genem RUNX1/RUNX1T1 (dříve AML1/ETO)

[36–38]. Studie Zuber et al. a Zhao et al. prokázaly na RUNX1/RUNX1T1 pozitivních myších modelech korelaci mezi přítomností mutací G12D v genu NRAS a G12D v genu KRAS a rychlejší progresí onemocnění. Negativní korelaci identifikovali pro přítomnost mutací a celkové přežití [37, 38].

Také přibližně třetina pacientů s inv(16)/t(16;16), tj. fuzním genem CBFβ/MYH11, nese současně mutace genů rodiny RAS. Valk et al. identifikovali mutace genů rodiny RAS u přibližně 33 %, a Bacher et al. u necelých 38 % AML pacientů s inv(16)/t(16;16) [9, 40].

Také pacienti s inv(3)/t(3;3) vykazují zvýšenou frekvenci mutací genů NRAS a KRAS [9, 10, 41, 42]. Přímým důsledkem inv(3)/t(3;3) bývá aberantní exprese genu EVII v lokusu MECOM [43]. Deregulace exprese genu EVII byla u leukemických malignit popsána jako významný faktor progresu onemocnění [44]. Studie provedené za pomoci myších modelů naznačují, že samotná aberantní zvýšené exprese genu EVII není pro leukemogenezi AML dostatečná a vyžaduje přítomnost dalších změn, resp. určitého proliferativního signálu [43]. Groschel et al. ukázali, že 98 % analyzovaných pacientů s inv(3)/t(3;3) nese současně aktivační mutace genů rodiny RAS [45]. Vysoká frekvence mutací v genech RAS byla u pacientů s inv(3)/t(3;3) identifikována také v práci Lavallée et al. [46]. Společný výskyt uvedených aberací tak naznačuje, že se na plné leukemické transformaci pacientů s inv(3)/t(3;3) podílí také mutace genů rodiny RAS [43].

Za zajímavý lze považovat fakt, že u pacientů nesoucích výše uvedené chromozomální aberace, jsou mutace v genech rodiny RAS soustředěny primárně do kodonu 61. To může naznačovat, že je určitý typ chromozomální aberace asociován s konkrétním typem mutace v genu rodiny RAS [9, 47, 48].

Aberace genů rodiny RAS jsou často detekovány také ve skupině AML pacientů s normálním karyotypem, a to společně se somatickými mutacemi genů NPM1 a/nebo DNMT3A [2, 6, 49]. Překvapivé jsou rozdíly ve specifickém výskytu mutací RAS v rámci jednotlivých „hot spot“ genů. Příkladem mohou být mutace v genu NPM1, které jsou přednostně asociovány s NRAS mutacemi v kodonech G12 a G13, nikoliv však s Q61. Z toho lze usuzovat, že funkční důsledky „hot spot“ mutací v rámci jednoho genu nejsou rovnocenné a jakákoliv klinická asociace s těmito mutacemi může být ovlivněna jinými, současně mutovanými geny [2].

U malého procenta AML pacientů (0,3–3 %) lze detekovat současný výskyt mutací ve dvou různých genech rodiny RAS (KRAS a NRAS) [10, 11]. Podle Hiorns et al. se v tomto případě pravděpodobně jedná o proces postupné akumulace jednotlivých mutací [50]. U studované

ho pacienta byla mutace v genu *KRAS* detekována již v leukemické kmenové buňce a mutace v genu *NRAS* se objevila až v pozdější fázi leukemogeneze. Význam tohoto simultánního výskytu mutací *RAS* zatím není objasněn.

Mutace v genech rodiny *RAS* se jen vzácně vyskytují společně s mutacemi genů *FLT3*, *KIT* a *KMT2A* (dříve *MLL*), které jsou podobné jako geny *RAS* zapojeny do signální regulace proliferace [6, 38]. Raritní koexistenci mutací *RAS* a *FLT3* lze pravděpodobně vysvětlit tím, že oba geny poskytují leukemické buňce proliferční výhodu zapojením stejných signálních drah, přičemž je známo, že *FLT3*-ITD částečně využívá *RAS* signalizační dráhu [4, 10]. Tento jev zřejmě stojí i za velmi nízkým výskytem mutací genů *NRAS* u pacientů s akutní promyelocytární leukémií (APL) – vyskytují se jen u cca 2 % případů, u nichž je známa silná asociace s mutacemi v genu *FLT3* [9, 51, 52]. Dále bývají mutace genů rodiny *RAS* s nízkou četností zastoupeny také u podskupiny starších pacientů s mutacemi v genu *TP53*, komplexním karyotypem, aneuploidiemi nebo jejich vzájemnou kombinací [2, 53].

Prognostický význam mutací

Prognostický význam mutací genů rodiny *RAS* byl u pacientů s AML analyzován v několika studiích (podrobně viz tabulka 1). Rozsáhlá analýza 1106 AML pacientů byla provedena v roce 2005 skupinou Bowen et al., kteří prokázali, že přítomnost mutací v genu *NRAS* nemá u pacientů s AML signifikantní vliv na dosažení kompletní remise (CR), přežití bez nemoci (DFS) a celkové přežití (OS). Dále Bowen et al. uvádějí, že přítomnost mutací v genech rodiny *RAS* není asociována s věkem, pohlavím, počtem bílých krvinek nebo *de novo* vs. sekundárním výskytem AML (sAML) [10]. Bacher et al. analyzovali početnou skupinu 2502 AML pacientů. Mutace v genu *NRAS* nebyly v testovaném souboru signifikantně asociovány s OS, přežitím bez události (EFS) nebo přežitím bez relapsu (RFS). Studie dále potvrdila, že mutace genu *NRAS* nejsou asociovány s věkem a historií AML (*de novo* vs. sAML vs. AML asociovaná s předchozí terapií – tAML). Na rozdíl od předchozí práce ale studie identifikovala signifikantní asociaci mezi přítomností mutací v genu *NRAS* a nižším počtem bílých krvinek [9]. Kadia et al. publikovali analýzu 609 pacientů s *de novo* AML. Studie ukázala, že pacienti s mutacemi v genech rodiny *RAS* jsou signifikantně mladší než pacienti bez mutací (53 vs. 63 let) a mají vyšší počet bílých krvinek a procento blastů v kostní dřeni v době diagnózy. Práce neidentifikovala významný vliv přítomnosti mutací v genech *RAS* na celkové OS ani dosažení CR [54]. Další rozsáhlou stu-

dii zaměřenou na hodnocení klinických parametrů pacientů s mutacemi v genech rodiny *RAS* provedli Yang et al. Studie na 504 AML pacientech ukázala, že mutační status genů rodiny *RAS* není ovlivněn věkem či pohlavím pacientů, ale že pacienti s mutacemi genů rodiny *RAS* mají signifikantně vyšší počet bílých krvinek. Oproti předchozím studiím bylo touto studií identifikováno významně kratší OS u pacientů nesoucích mutace genů *RAS* [55]. Reuter et al. analyzovali skupinu AML pacientů s normálním karyotypem (CN-AML). Ve studii nebyly identifikovány signifikantní rozdíly pro věk, pohlaví, původ AML (*de novo* vs. sAML) ani počet bílých krvinek mezi testovanými skupinami pacientů. Pro mutační status genů rodiny *RAS* nebyl ve studii identifikován signifikantní vliv na OS či RFS [6]. Komplexní analýza vlivu interakcí mezi mutacemi v genech rodiny *RAS* a aberacemi v dalších genech s ohledem na OS byla provedena v práci Papaemmanuil et al. Studie identifikovala u skupiny *NPM1*^{mut}*DNMT3A*^{mut}*NRAS*^{G12/13mut} pacientů příznivější prognózu než u pacientů bez kombinace uvedených mutací [2]. Nedávno byla provedena rozsáhlá metaanalýza dat zaměřená na vliv mutací v genech rodiny *RAS* na celkové přežití pacientů s AML skupinou Liu et al. Metaanalýza zahrnovala celkem 24 studií (včetně 5 pediatrických) z období let 1990–2018. Výsledky studie ukázaly, že u dospělých pacientů s AML nemají mutace genů rodiny *RAS* signifikantní vliv na celkové přežití. Nicméně studie uvádí, že u dětských pacientů by mutace v genu *NRAS* mohly být prognostickým markerem pro kratší OS [56].

ZÁVĚR

Aberace genů rodiny *RAS* jsou u pacientů s AML identifikovány s vysokou četností. Mutace lze detekovat napříč všemi prognostickými skupinami AML, často jako další genetickou změnu vedle somatických chromozomálních či genových aberací. Relapsy onemocnění jsou běžně spojeny s absencí mutací detekovaných v době diagnózy. Většina velkých studií neidentifikovala vliv mutací v genech rodiny *RAS* na celkové přežití pacientů s AML, spojení mutací s dalšími klinickými parametry není jednoznačné. To vše, navzdory frekventovanému výskytu, aktuálně nepředikuje širší možnost využití mutací v genech rodiny *RAS* v rutinní diagnostice. Do budoucna, v souvislosti s příchodem nových léčiv, však nelze vyloučit uplatnění mutací jako prediktivních markerů odpovědi na určitý typ terapie.

Použité zkratky

AKT – serin/threonin protein kináza; AMK – aminokyselina; AML – akutní myeloidní leukémie; APL – akutní

promyelocytární leukemie; CBF AML – *core-binding factor* AML (AML s t(8;21) nebo inv(16)/t(16;16)); CN-AML – AML s normálním karyotypem; EFS – přežití bez události; ERK – skupina signalizačních kináz účastníci se signalizace v rámci MAPK dráhy; GDP – guanozindifosfát; GTP – guanozintrifosfát; MDS – myelodysplastický syndrom; MEK – pro-apoptická protein kináza, aktivující MAPK; OS – celkové přežití; RAS – *rat sarcoma viral oncogene homolog*; RFS – přežití bez relapsu; sAML – sekundární AML; tAML – AML vzniklá v důsledku předchozí terapie; TKR – tyrozin kinázový receptor; VAF – frekvence variantní alely

LITERATURA

- Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424–447.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(23):2209–2221.
- Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;128(5):686–698.
- Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368(22):2059–2074.
- Shin SY, Lee ST, Kim HJ, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations. *Oncotarget* 2016;7(34):54825–54837.
- Reuter CW, Krauter J, Onono FO, et al. Lack of noncanonical RAS mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2014;93(6):977–982.
- Dunna NR, Vuree S, Anuradha C, et al. NRAS mutations in de novo acute leukemia: prevalence and clinical significance. *Indian J Biochem Biophys* 2014;51(3):207–210.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358(18):1909–1918.
- Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006;107(10):3847–3853.
- Bowen DT, Frew ME, Hills R, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 2005;106(6):2113–2119.
- Neubauer A, Dodge RK, George SL, et al. Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1994;83(6):1603–1611.
- Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(5):1629–1633.
- Krauth MT, Eder C, Alpermann T, et al. High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome. *Leukemia* 2014;28:1449.
- Preston R, Däbritz J, Hänfler J, Oettle H. Mutational analysis of K-ras codon 12 in blood samples of patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2010;34(7):883–891.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):295–308.
- Illmer T, Thiede C, Fredersdorf A, et al. Activation of the RAS pathway is predictive for a chemosensitive phenotype of acute myelogenous leukemia blasts. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3217–3224.
- Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(16):4848–4852.
- Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* 1983;303(5916):396–400.
- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):459–465.
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 2005;15(14):R563–R574.
- Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* 2001;171(1):1–10.
- Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, et al. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell* 2005;7(6):533–545.
- Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1177–1195.
- Forbes SA, Bindal N, Bamford S, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D945–D950.
- Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(14):1062–1074.
- Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004;2004(250):RE13.
- Gambke C, Hall A, Moroni C. Activation of an N-ras gene in acute myeloblastic leukemia through somatic mutation in the first exon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(3):879–882.
- Bashey A, Gill R, Levi S, et al. Mutational activation of the N-ras oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-ras mutation in AML pathogenesis. *Blood* 1992;79(4):981–989.
- Welch JS. Mutation position within evolutionary subclonal architecture in AML. *Semin Hematol* 2014;51(4):273–281.
- Martignoles JA, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of acute myeloid leukemia: from clonal hematopoiesis to molecular residual disease. *Int J Mol Sci* 2018;19(12).
- Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, et al. High-throughput sequen-

- cing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood* 2009;113(8):1749–1755.
32. Kubo K, Naoe T, Kiyoi H, et al. Clonal analysis of multiple point mutations in the N-ras gene in patients with acute myeloid leukemia. *Jpn J Cancer Res* 1993;84(4):379–387.
 33. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;122(1):100–108.
 34. Nakamura H, Inokuchi K, Yamaguchi H, Dan K. Abnormalities of p51, p53, FLT3 and N-ras genes and their prognostic value in relapsed acute myeloid leukemia. *J Nippon Med Sch* 2004;71(4):270–278.
 35. Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, et al. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol* 1999;104(4):659–664.
 36. Kuchenbauer F, Schnittger S, Look T, et al. Identification of additional cytogenetic and molecular genetic abnormalities in acute myeloid leukaemia with t(8;21)/AML1-ETO. *Br J Haematol* 2006;134(6):616–619.
 37. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, et al. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev* 2009;23(7):877–889.
 38. Schessl C, Rawat VP, Cusan M, et al. The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 2005;115(8):2159–2168.
 39. Zhao S, Zhang Y, Sha K, et al. KRAS (G12D) cooperates with AML1/ETO to initiate a mouse model mimicking human acute myeloid leukemia. *Cell Physiol Biochem* 2014;33(1):78–87.
 40. Valk PJ, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Löwenberg B, Reilly JT. Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16). *Haematologica* 2004;89(1):106.
 41. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, et al. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28(24):3890–3898.
 42. Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, et al. The inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) is frequently accompanied by alterations of the RUNX1, KRAS and NRAS and NF1 genes and mediates adverse prognosis both in MDS and in AML: a study in 39 cases of MDS or AML. *Leukemia* 2011;25(5):874–877.
 43. Hinai AA, Valk PJ. Review: Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2016;172(6):870–878.
 44. Kataoka K, Kurokawa M. Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. *Cancer Sci* 2012;103(8):1371–1377.
 45. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. Mutational spectrum of myeloid malignancies with inv(3)/t(3;3) reveals a predominant involvement of RAS/RTK signaling pathways. *Blood* 2015;125(1):133–139.
 46. Lavallée VP, Gendron P, Lemieux S, D'Angelo G, Hébert J, Sauvageau G. EVI1-rearranged acute myeloid leukemias are characterized by distinct molecular alterations. *Blood* 2015;125(1):140–143.
 47. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, et al. Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1536.
 48. Boissel N, Leroy H, Brethon B, et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006;20:965.
 49. Wang M, Yang C, Zhang L, Schaar DG. Molecular mutations and their cooccurrences in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Stem Cells Int* 2017;2017:6962379.
 50. Hiorns LR, Cotter FE, Young BD. Co-incident N and K ras gene mutations in a case of AML, restricted to differing cell lineages. *Br J Haematol* 1989;73(2):165–167.
 51. Kuchenbauer F, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukaemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;130(2):196–202.
 52. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005;106(12):3768–3776.
 53. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97(11):3589–3595.
 54. Kadia TM, Kantarjian H, Kornblau S, et al. Clinical and proteomic characterization of acute myeloid leukemia with mutated RAS. *Cancer* 2012;118(22):5550–5559.
 55. Yang X, Qian J, Sun A, et al. RAS mutation analysis in a large cohort of Chinese patients with acute myeloid leukemia. *Clin Biochem* 2013;46(7–8):579–583.
 56. Liu X, Ye Q, Zhao XP, et al. RAS mutations in acute myeloid leukaemia patients: A review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2019;489:254–260.

Podíl autorů na přípravě rukopisu

AĎ – návrh a příprava první verze rukopisu, finalizace rukopisu

DAT, AF, MČ, ZH, JM – revize rukopisu

IJ – revize rukopisu a schválení finální verze

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu MŠMT (MUNI/A/1105/2018) a MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

Do redakce doručeno dne 2. 8. 2019.

Přijato po recenzi dne 10. 10. 2019.

Mgr. Anna Ďuriníková

Centrum molekulární biologie a genové terapie
Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno
Černopolní 9
613 00 Brno
e-mail: Durinikova.Anna@fnbrno.cz