

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра цитологии и гистологии

Шевчук Анастасия Сергеевна

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА NOTCH1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
ЛИМФОЦИТАРНОМ ЛЕЙКОЗЕ (ХЛЛ)

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена в Институте
гематологии Северо-Западного
Федерального медицинского
исследовательского центра
им. В.А. Алмазова

Научный руководитель:
м.н.с. Румянцев Андрей Михайлович

Санкт-Петербург

2016

Список используемых сокращений

- ККМ — Красный костный мозг
- МВЛ — Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз
- ПК — Периферическая кровь
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ХЛЛ – Хронический лимфоцитарный лейкоз
- BCR – В-клеточный рецептор (*B-cell antigen receptor*)
- CLP – Лимфоидный предшественник (*Common Lymphoid Progenitor*)
- Fab – *Fragment antigen binding*
- Fc – *Fragment cristallizable region*
- FISH – *Fluorescence in situ hybridization*
- IGH – *Immunoglobulin variable heavy chain*
- mIG – мембранный иммуноглобулин
- MZB-клетки – В-клетки маргинальной зоны (*Marginal Zone B-cell*)
- NCID – *Notch Intra-Cellular Domain*
- NEXT – Внеклеточный домен Notch1 (*Notch1 Extracellular Truncation*)
- NICD – Внутриклеточный домен Notch1 (*Notch1 Intra-Cellular Domain*)
- Pax – *Paired box protein*
- RAG – *Recombination activating gene*
- RS – рекомбинационный сигнал (*Recombination signal*)
- SHM – соматическая гипермутация (*Somatic Hypermutation*)
- SYK – *Spleen tyrosine kinase*
- TdT – Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*).
- X-RCC4 – (*X-ray repair cross-complementing factor 4*)

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение	4
2. Хронический лимфоцитарный лейкоз	5
3. Клинические стадии заболевания	6
4. Путь развития В-лимфоцитов	8
4.1 Иммуноглобулины и основы их вариабельности	10
4.2 Реаранжировка генов иммуноглобулинов	11
4.3 Соматическая гипермутация (SHM)	15
5. Микроокружение ХЛЛ	16
6. Молекулярные маркеры ХЛЛ	18
7. Ген NOTCH1, его функции и роль в развитии ХЛЛ	20
8. Цели и задачи работы	27
9. Материалы и методы	28
10. Результаты и обсуждение	31
10.1 Поиск мутаций в гене NOTCH1	31
10.2 Исследование мутационного статуса генов IGHV	34
10.3 Получение плазмид, содержащих фрагменты, кодирующие NICD домен гена NOTCH1	37
10.4 Исследование представленности мутаций в гене NOTCH1	39
10.5 Создание конструкций для экспрессии фрагментов гена NOTCH1	40
10.6 Получение клеточных линий экспрессирующих фрагменты гена NOTCH1	41
11. Выводы	44
12. Список литературы	45

1. Введение

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) — одна из наиболее часто встречающихся форм лимфопролиферативных заболеваний. На долю ХЛЛ приходится 11% всех форм опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной ткани (Dighiero, *et al.*, 2008). В России ХЛЛ выявляется реже, чем в других странах и медиана возраста на момент установления диагноза меньше, соразмерно меньшей продолжительности жизни россиян (Никитин, *et al.*, 2012). Не исключены и этнические различия, определяющие распространенность ХЛЛ в России. Ежегодно в России ХЛЛ заболевает 3—3,5 человека на 100'000 жителей, с возрастом число заболевших увеличивается и после 65 лет составляет 20 на 100'000 (Волкова, *et al.*, 2007). Заболеваемость ХЛЛ в США, по данным Национального института рака, составляет 3,5 на 100'000 населения (5,0 — у мужчин и 2,5 — у женщин) (Jemal *et al.*, 2008). ХЛЛ диагностируют чаще у лиц зрелого и пожилого возраста. Средний возраст мужчин в момент обнаружения заболевания — 70 лет, женщин — 74 года. ХЛЛ редко выявляют у лиц младше 50 лет и практически не диагностируют в более раннем возрасте (Shumacher, *et al.*, 1993). Частота его в европейских странах составляет 4:100'000 в год и непосредственно связана с возрастом. У лиц старше 80 лет она составляет >30:100'000 в год (Zenz, *et al.*, 2010). Медиана возраста на момент установления диагноза в европейских странах составляет 69 лет. В Азии заболеваемость примерно в 10 раз ниже, чем в западных странах. Причина этого различия в настоящее время неизвестно (Howlader, *et al.*, 2014).

ХЛЛ является гетерогенным заболеванием и включает несколько различных генетических нарушений клинически проявляющихся общими симптомами пролиферации В-лимфоцитов (Chiorazzi, *et al.*, 2011). У одних пациентов заболевание прогрессирует и требует лечения вскоре после постановки диагноза. При этом, у других пациентов может наблюдаться медленное развитие болезни, и терапия может не понадобиться в течение многих лет. Кроме того, ответ на лечение и восприимчивость к терапии также может сильно различаться (Chiorazzi, *et al.*, 2005). Большинство пациентов, особенно пожилого возраста, чаще всего имеют сопутствующие заболевания, что вызывает сложности при выборе метода лечения. Некоторые пациенты имеют длительный период жизни без каких-либо симптомов заболевания, в то время как другие будут умирать в течение нескольких лет с момента постановки диагноза даже при современной терапии (Kipps, 2010). Многие пациенты попадают в промежуточную группу, показывая медленное развитие болезни в течение многих лет, но в конечном итоге заболевание может перейти в более агрессивную форму. В последние годы, появился ряд препаратов, успешно применяемых при лечении ХЛЛ (Флударабин, Бендамустин, Циклофосфамид и Ритуксимаб). Однако

даже при эффективной терапии, у части пациентов случается рецидив и им потребуется несколько повторных курсов препаратов. Также часто наблюдается резистентность к применяемым препаратам, которая может быть как первичной, так и возникать в ходе терапии. Непредсказуемое течение болезни подтолкнуло к поиску новых прогностических маркеров (Kipps, 2010), которые были выявлены благодаря развитию методов высокопроизводительного секвенирования.

В 1999 году были опубликованы работы Damle, Hamblin, где говорилось о связи между прогнозом заболевания и мутационным статусом генов кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулина IGHV в ХЛЛ. В этих исследованиях было показано, что у пациентов с немутированными генами IGHV (60—70% больных) болезнь протекала в агрессивной форме (неблагоприятный прогноз), в то время как мутированные гены IGHV были связаны с благоприятным течением болезни. В настоящее время мутационный статус IGHV является одним из наиболее часто используемых прогностических маркеров, а также признан наиболее стабильным и надежным показателем связанным с клинической картиной пациента (Hamblin, *et al.*, 1999). Существует большое разнообразие других маркеров, которые также позволяют предсказать ХЛЛ: ZAP70, TCL1, LPL, CLLU1, TP53, NOTCH1, SF3B1. Ген NOTCH был открыт примерно 100 лет назад в работе изучавшей крылья мутантных мух (Morgan, 1917). Сейчас известно, что путь NOTCH является одним из важнейших механизмов клеточного сигналинга. Notch белок может функционировать на клеточной поверхности, принимая внеклеточные сигналы, так и регулировать экспрессию генов в ядре (Leong, 2006).

2. Хронический лимфоцитарный лейкоз

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) – болезнь, для которой характерно накопление большого числа популяций незрелых В-лимфоцитов с низкой экспрессией мембранных иммуноглобулинов в крови, печени, селезенке и лимфоузлах.

Клетки ХЛЛ, определяемые в мазках периферической крови имеют фенотип малых лимфоцитов — ядра содержат плотный глыбчатый хроматин, ядрышко не визуализируется, цитоплазма представлена узким ободком. Диагноз ставится при обнаружении лимфоцитоза (увеличение количества лимфоцитов) свыше $5 \times 10^9/\text{л}$ в периферической крови, что зачастую обнаруживается при проведении рутинных исследований крови. Клинические данные должны быть подтверждены лабораторными показателями: обнаружение абсолютного лимфоцитоза свыше $5 \times 10^9/\text{л}$ в периферической крови, доля пролимфоцитов более 10%, лимфоцитоз в костном мозге 30%. В ходе дополнительных исследований (иммунофенотипирование, проточная цитофлуориметрия) было показано, что клетки имеют иммунофенотип: $\text{CD}19^+$, $\text{CD}20^+$ и $\text{CD}20^-$ (слабая

экспрессия), CD22⁺ (умеренная экспрессия), CD79a⁺, CD23⁺, CD43⁺, CD5⁺, отмечается слабая экспрессия поверхностных иммуноглобулинов класса IgM или IgM⁺ IgD (в ряде случаев не обнаруживается), рестрикция легких цепей (κ или λ), вариабельно представлены активационные антигены CD38, CD25, CD71. В редких случаях ХЛЛ опухолевые клетки имеют фенотип CD19⁺, CD5⁻, CD23⁺, либо на них отсутствует экспрессия легких цепей иммуноглобулинов (Луговская, *et al.*, 2008).

Не существует прямых доказательств связи ХЛЛ с действием неблагоприятных факторов окружающей среды (за исключением применяющихся в сельском хозяйстве пестицидов и гербицидов) (Savli, *et al.*, 2012). В немногих публикациях указывают на повышенный риск развития ХЛЛ у работающих с органическими растворителями, у занятых в производстве нефтепродуктов и резиновых изделий (Hamblin, *et al.*, 2008). Ранее отрицалась роль ионизирующей радиации в возникновении ХЛЛ, но после аварии на Чернобыльской атомной электростанции (особенно в последние годы) изучению этого вопроса уделяется повышенное внимание (Gluzman, *et al.*, 2012). На данный момент не существует профилактики заболевания.

Также в последнее время внимание ученых сосредоточено на Моноклональном В-клеточном Лимфоцитозе (МВЛ) — состоянии, которое может предшествовать развитию ХЛЛ (Lanasa, *et al.*, 2010). МВЛ возникает у 5% здоровых лиц в возрасте старше 50 лет при отсутствии гиперплазии лимфатических узлов и спленомегалии и характеризуется более низким уровнем клональных В-лимфоцитов (<5x10⁹/л). МВЛ, при котором клетки имеют схожий с ХЛЛ иммунофенотип и хромосомные аномалии, на протяжении нескольких лет может существовать самостоятельно или прогрессировать в ХЛЛ или другие В-клеточные лимфопролиферативные заболевания. Существует тесная связь между возрастом, МВЛ и старением иммунной системы, которое может быть связано с рядом персистирующих инфекций (таких как гепатит С) или с повышенной реакцией на аутоантигены (Shanafelt, *et al.*, 2009). Новые данные послужили материалом для поиска генов, лежащих в основе хронического лимфоцитарного лейкоза.

3. Клинические стадии заболевания

Наиболее широкое применение при определении клинической стадии ХЛЛ приобрели системы стадирования, предложенные Rai и соавторами (таблица 1) (Rai, *et al.*, 1975) и Binet и соавторами (таблица 2) (Binet, *et al.*, 1981). Первая используется чаще в США, вторая получила распространение в Европе. В основе обеих систем лежит единый метод — учет массы опухоли (количество лимфоцитов, степень увеличения лимфоузлов, селезенки, печени, выраженность угнетения различных ростков гемопоэза). Выделяемые в соответствии с предложенными критериями стадии ХЛЛ имеют прогностическое

значение, коррелируют со средней продолжительностью жизни больных и используются при оценке результатов лечения (табл. 1, 2).

Стадия заболевания	Клинико-лабораторные признаки	Прогноз	Медиана выживаемости, мес
0	Только лимфоцитоз в ПК и КМ	Благоприятный	> 150
I	Лимфоцитоз и лимфаденопатия	Промежуточный	101
II	Лимфоцитоз и гепатомегалия, спленомегалия или наличие гепато- и спленомегалии одновременно; +/- лимфаденопатия	Промежуточный	> 71
III	Лимфоцитоз и анемия (гемоглобин < 110 г/л); +/- лимфаденопатия; спленомегалия, гепатомегалия	Плохой	19
IV	Лимфоцитоз и тромбоцитопения (тромбоцитов < 100 · 10 ⁹ /л); +/- анемия (гемоглобин < 110 г/л); органомегалия	Плохой	19

Таблица 1. Система стадирования хронического лимфоцитарного лейкоза по Rai.

Стадия заболевания	Клинико-лабораторные признаки	Медиана выживаемости, мес
A	Лимфоцитоз в ПК и КМ; менее 3 зон с клиническими признаками поражения (одно- и двухстороннее увеличение шейных, подмышечных, паховых ЛУ, селезенки, печени); отсутствие анемии (гемоглобин ≥ 110 г/л) и тромбоцитопении (тромбоцитов ≥ 100 · 10 ⁹ /л)	> 120
B	Лимфоцитоз в ПК и КМ; вовлечение в процесс 3 и более зон (областей); отсутствие анемии (гемоглобин ≥ 110 г/л) и тромбоцитопении (тромбоцитов ≥ 100 · 10 ⁹ /л)	61
C	Содержание гемоглобина < 110 г/л у мужчин и < 100 г/л у женщин; содержание тромбоцитов < 100 · 10 ⁹ /л или наличие анемии и тромбоцитопении одновременно (независимо от количества зон с признаками поражения)	32

Таблица 2. Система стадирования хронического лимфоцитарного лейкоза по Binet.

Работа Binet учитывает распространенность поражения лимфоузлов (увеличение менее 3 групп, например, подмышечных и шейных – А; увеличение всех групп, (подмышечных, шейных и паховых) – В и любые клинические показатели + цитопения

(пониженное содержание форменных элементов в крови) – это стадия С)). Классификация Binet не рассматривает случаи ХЛЛ с многолетним стабильным лимфоцитозом, не сопровождающиеся увеличением лимфоузлов (Binet, *et al.*, 1981). Классификация Rai гораздо шире. В ней выделяется 5 стадий, которые практически учитывают органный характер поражения. Классификация Rai – первое исследование, позволившее охарактеризовать три прогностические группы ХЛЛ, принципиально различающиеся по выживаемости (более 10 лет, 7 лет и 1,5 года). Однако существенная гетерогенность даже в пределах клинических стадий требует современных лабораторных и клинических факторов прогноза. Каждый генетический дефект имеет свою патогенетическую, клиническую и прогностическую значимость (Rai, *et al.*, 1975).

Диагностика ХЛЛ включает в себя:

1). Биохимический анализ крови: определение содержания белка, белковых фракций, билирубина, аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, глюкозы, железа, креатинина, мочевины. Стернальная пункция. Биопсия периферических лимфоузлов.

2). Иммунологический анализ крови: определение количества В- и Т-лимфоцитов (Иммуногистохимические методы – позволяют определять клеточные и тканевые антигены, благодаря их связыванию с антителам)

3). Иммунофенотипирование лимфоцитов.

4). Цитогенетический анализ клеток крови и костного мозга.

5). Основным критерием, позволяющим прогнозировать течение ХЛЛ, является мутационный статус перестроенного гена иммуноглобулина в опухолевом клоне.

4. Путь развития В-лимфоцитов

В-лимфоциты составляют 5–15% лимфоцитов крови. Выделяют три основных субпопуляции В-клеток: В-клетки маргинальной зоны (МЗВ), В1 и В2-клетки (Рис. 1). В2-клетки располагаются в селезенке, костном мозге, лимфоузлах, пейеровых бляшках и отдельных фолликулах лимфоидной ткани кишечника. Эти клетки образуют большую группу и играют важную роль в гуморальном иммунном ответе. Клетки другой субпопуляции - В1 обнаруживаются в брюшной и плевральной полостях. МЗВ-клетки располагаются преимущественно в маргинальной зоне селезенки (Ярилин А.А., 2010)

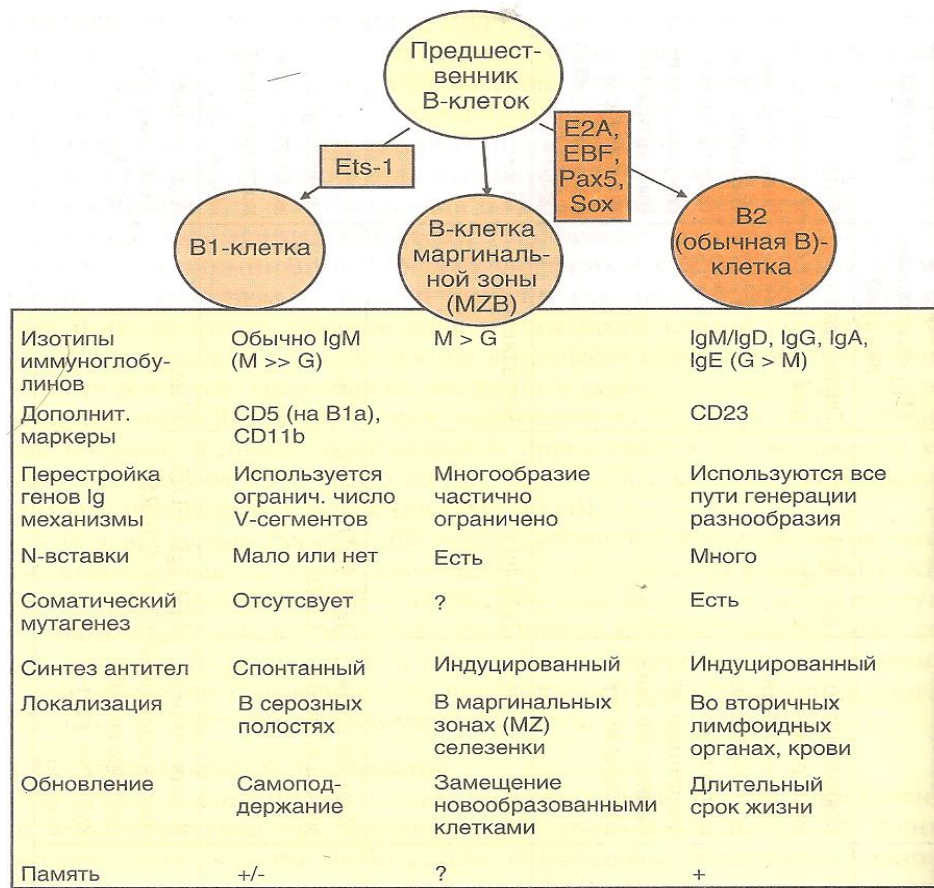


Рисунок 1. Характеристика субпопуляций В-клеток (Ярилин А.А., 2010).

У взрослого человека развитие В-лимфоцитов начинается в красном костном мозге, в период эмбрионального развития – в фетальной печени (Tiegs SL, *et al.*, 1993). Далее созревание идет во вторичных лимфоидных органах. У птиц развитие идет в бурсе Фабриция, у жвачных животных – в кишечнике. В процессе созревания на В-лимфоциты воздействуют различные факторы, которые обеспечивают их пролиферацию и жизнеспособность.

В-клетки развиваются из общего лимфоидного предшественника – CLP (*common lymphoid progenitor*), который происходит от полипотентной кроветворной клетки. Ранним признаком обособления лимфоидного предшественника считается экспрессия транскрипционного фактора Icaros, который в обеспечивает ремоделирование хроматина. В развитии В-лимфоцитов ключевую роль играют факторы E2A, EBF и Pax5 (Paired box protein 5). Так экспрессию гена PAX5 рассматривают как ключевой маркер обособления В-клеточных линий. Фактор Pax5 имеет отношение к активации реаранжировки V-генов и экспрессии CD19 (Ярилин А.А., 2010).

Отличительным признаком зрелых В-лимфоцитов от остальных является наличие мембранных иммуноглобулинов, которые выполняют роль антигенраспознающих рецепторов.

4.1 Иммуноглобулины и основы их варибельности

Молекула иммуноглобулина состоит из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками. Каждая из цепей содержит варибельный (V-variable) и константный (C-constant) участки. Варибельные участки образуют антигенсвязывающий центр. Тип тяжелых цепей различен в разных классах иммуноглобулинов. Молекула IgA представляет собой димер, молекула IgM состоит из пяти субъединиц, образующих кольцо. При действии папаина (полипептид, протеолитический растительный фермент) молекула иммуноглобулина распадается на два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Fab-фрагмент (fragment antigen binding) — это участок молекулы иммуноглобулина, который связывает антиген. Fc-фрагмент (fragment crystallizable region) — это концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая связывается с различными клеточными рецепторами и белками системы комплемента (Рис. 2). Это свойство позволяет антителам активировать иммунную систему (Хоффбранд, 2007).

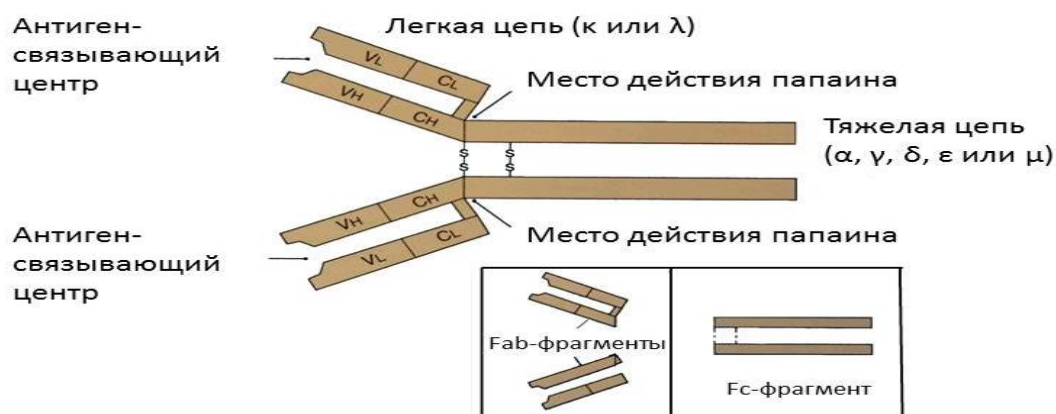


Рисунок 2. Обобщенная схема строения молекулы иммуноглобулина (Хоффбранд, 2007).

Иммуноглобулины отличаются от других белков исключительным полиморфизмом. Полиморфизм проявляется в первую очередь в разнообразии активных центров антител (идиотипов), определяющих их специфичность по отношению к антигенным детерминантам. В основе разнообразия иммуноглобулинов лежат различные механизмы, в частности механизмы реаранжировки генов иммуноглобулинов и соматической гипермутации.

Мембранные иммуноглобулины индивидуальны для каждого клона В-лимфоцитов (Stevenson, 2004). Выделяют пять классов иммуноглобулинов – IgM, IgD, IgG, IgE и IgA. Всего в молекуле иммуноглобулина различают пять типов тяжелых полипептидных цепей (α-, γ-, δ-, ε- и μ-цепи) и два типа легких полипептидных цепей (κ-цепь и λ-цепь). Тип

тяжелых цепей определяет класс иммуноглобулина. Тяжелые и легкие цепи содержат константный и переменный участки. Гены, кодирующие тяжелые цепи у человека, располагаются на 14-й хромосоме, а кодирующие легкие – на 2-й (κ) и 22-й (λ) хромосомах. В-клеточный рецептор (BCR) состоит из двух компонентов: один для распознавания молекул и второй для дальнейшей передачи сигнала, включающий корцепторы CD79a и CD79b (Рис. 3) (Tze, *et al.*, 2005).

С мембранными иммуноглобулинами нековалентно связаны гетеродимерные молекулы, содержащие полипептидные цепи $Ig\alpha$ (CB79a) и $Ig\beta$ (CD79b). Эти цепи встроены в мембрану В-лимфоцита. Их цитоплазматическая часть связывается с тирозинкиназами Fyn, Lck, Blk. Это позволяет им участвовать в передаче сигнала при связывании с антигеном (Stevenson, 2004).

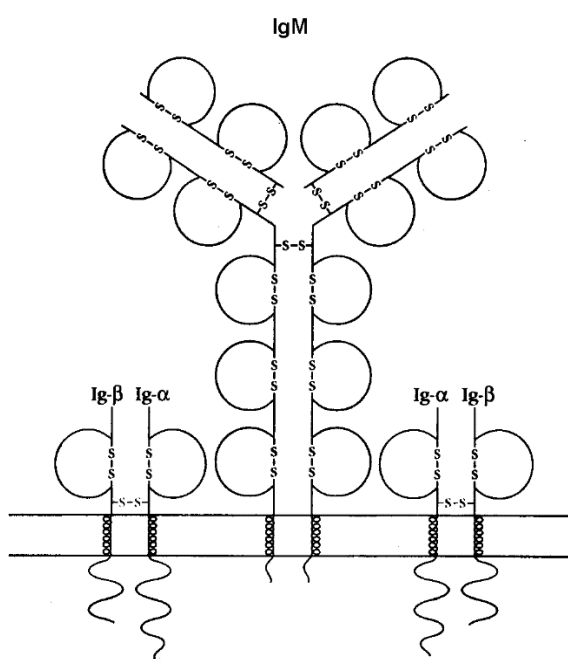


Рисунок 3. Строение В-клеточного рецептора (immunoinfo.ru).

4.2 Рееаранжировка генов иммуноглобулинов

Первый этап дифференциации В-клеток происходит в красном костном мозге (или в печени плода) и является антиген-независимым. Он состоит в сборке, перегруппировке (рееаранжировке) ДНК из V, D и J генов, кодирующих переменный домен иммуноглобулина, благодаря наличию специфических последовательностей, называемых рекомбинационным сигналом (RS) (Schatz, *et al.*, 2005).

Тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов кодируются набором нуклеотидных последовательностей, названных генными сегментами и разделенных некодирующими

участками ДНК. Генные сегменты являются предшественниками функционально активных генов. В ходе В-клеточного созревания эти генные сегменты перестраиваются и особым образом соединяются вместе, давая функционально активные гены цепей иммуноглобулинов (Рис. 4). V-домен тяжелой цепи иммуноглобулина (или VH) кодируется тремя типами генных сегментов – V (variable), D (diversity), и соединяющими J (joining). 14-я хромосома человека содержит 51 VH-сегмент, 27 DH-сегментов и 6 JH-сегментов. Сегменты расположены последовательно группами от 5' к 3' концу. V-сегмент кодирует 95—96 аминокислотных остатков, D и J сегменты — 12—14 аминокислотных остатков. К 3'-концу примыкает серия C-генных сегментов, кодирующих константные домены. V домен легкой цепи (или VL) кодируется только V и J сегментами (Schatz, *et al.*, 2005).

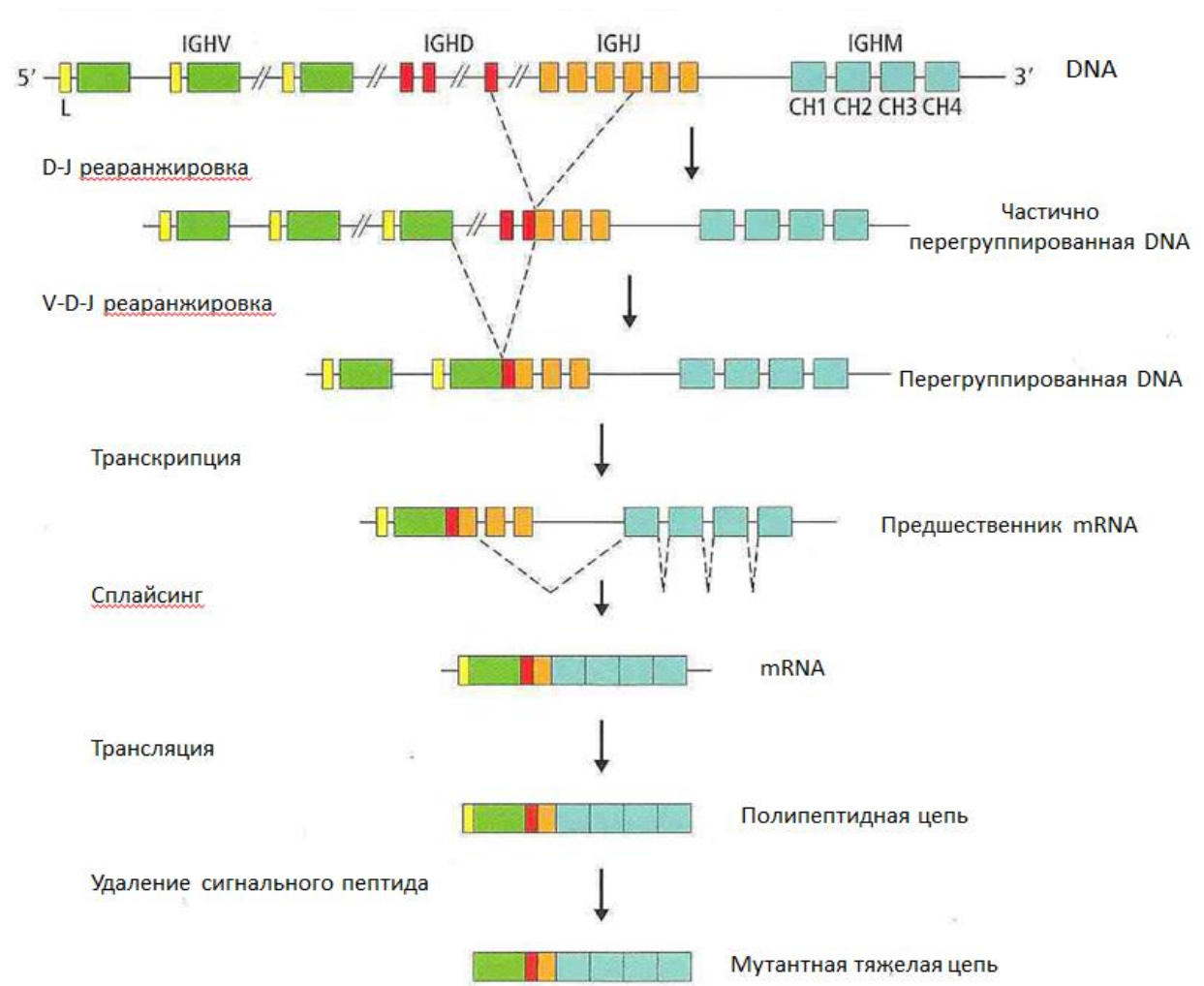


Рисунок 4. Схема реаранжировки генов тяжелой цепи иммуноглобулина (Ghia, 2009).

V-D-J реаранжировка представляет собой тонко организованный процесс, который можно разделить на 4 этапа (Рис. 5):

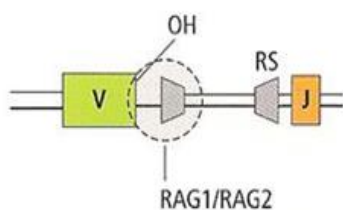
1) Формирование предшествующего комплекса RAG1-RAG2 (RAG-recombination activating gene), связанного с RS последовательностями и образование петли ДНК. RAG1-RAG2 комплекс ответственен за распознавание RS и начального расщепления ДНК. Последующие шаги контролируются белком NHEJ. Ku70 и Ku80 белки активируют каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы. Последняя активирует белок Artemis для отщепления концов шпильки ДНК, образованной RAG ферментами.

2) RAG1 делает единичный надрез нити ДНК на границе между кодирующей последовательностью и гептамером RS.

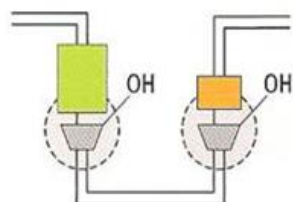
3) Образовавшиеся концы на границе RS либо лигируются напрямую, без каких-либо дальнейших изменений, либо подвергаются обширной модификации. Модификация заключается в: (а) удалении нескольких нуклеотидов экзонуклеазами, (б) добавлении палиндромного комплементарного хвоста и (с) добавление новых нуклеотидов (N). Полимеразы Pol μ и Pol λ достраивают последовательности на концах ДНК. Вставка нуклеотидов осуществляется ферментом TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*). Активность этого фермента наиболее выражена на ранних стадиях развития В-клеток, что объясняет, почему он более активен при образовании кодирующих последовательностей тяжелой цепи, а не легкой (Jung, *et al.*, 2006).

4) На завершающем этапе нити ДНК объединяются и лигируются. Этому способствует ферментативный комплекс, включающий X-RCC4 (*X-ray repair cross-complementing factor 4*) белок, ДНК-лигазу IV и белок Cernunnos. Белки XRCC4 и Cernunnos работают совместно с ДНК-зависимой протеинкиназой, выравнивают образовавшиеся концы ДНК друг с другом, и также помогают в работе фермента TdT, который случайным образом присоединяет нуклеотиды к открытым концам ДНК, что приводит к образованию липких концов. Полимеразы Pol μ и Pol λ присоединяют нуклеотиды, необходимые для комплементарности липких концов друг другу. ДНК-лигаза IV окончательно сшивает липкие концы друг с другом, завершая процесс присоединения сегментов друг к другу (Jung, *et al.*, 2006).

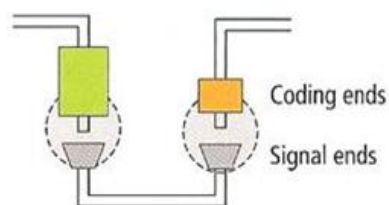
1. Связывание RAG1/2 и DNA



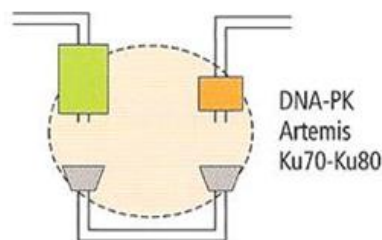
2. Односторонние надрезы ДНК



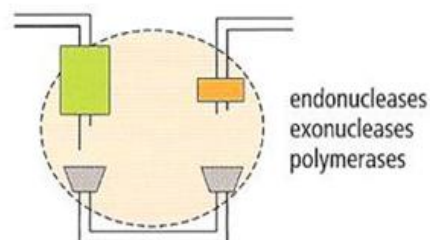
3. Полное отщепление



4. Образование шпильки



5. Достаивание DNA концов



6. Лигирование

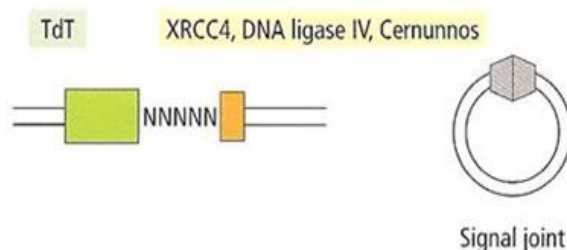


Рисунок 5. Схема основных этапов реаранжировки генов тяжелой цепи иммуноглобулина (Ghia, 2009).

В случае неудачной перестройки гена, есть еще одна попытка, которая будет проходить по второй аллели. Если и в этом случае образуется нефункциональный ген, в клетках запускаются механизмы апоптоза, и эти клетки уничтожаются в дальнейшем макрофагами (Van Zelm, *et al.*, 2005). 55–75% В-клеток, образующихся в красном костном мозге, имеют рецепторы к собственным аутоантигенам. Распознавание аутоантигенов служит сигналом для «редактирования» VCR. Этот процесс также заключается в повторной перестройке V-генов. При успешном редактировании В-клетка теряет активность к аутоантигенам, если же нет, то такие клетки идут в апоптоз.

Реаранжировка последовательностей легких цепей иммуноглобулинов (Рис. 6), кодирующих легкие цепи каппа (κ) и лямбда (λ) сходна с таковой для тяжелых цепей, за исключением того, что в легких цепях не хватает сегмента D. Другими словами, первый

шаг рекомбинации для легких цепей включает присоединение V и J генов, что дает VJ комплекс перед добавлением константных генов. (Nemazee, 2006).

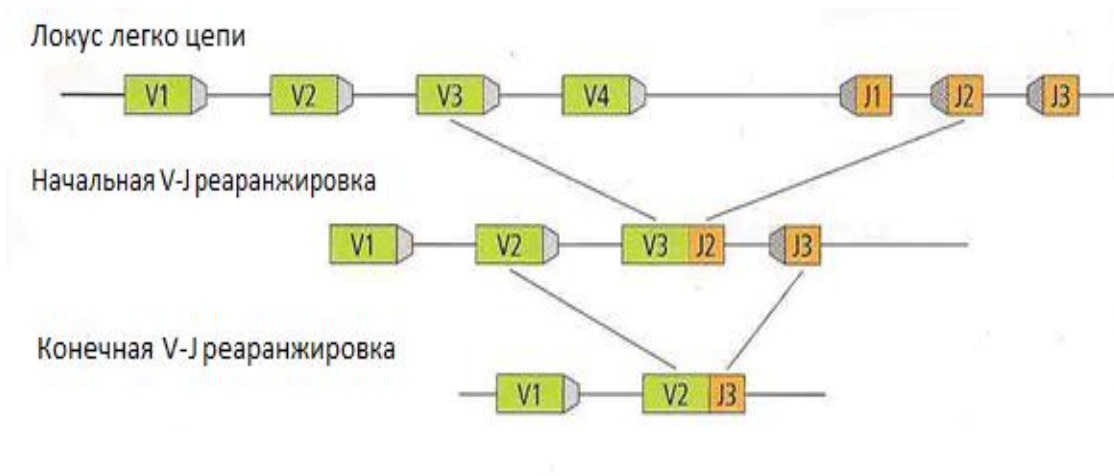


Рисунок 6. Схема прохождения реаранжировки генов легкой цепи иммуноглобулинов (Ghia, 2009).

4.3 Соматическая гипермутация (SHM)

Соматическая гипермутация происходит в популяции В-лимфоцитов в ходе иммунного ответа при воздействии антигена. Мутагенез затрагивает преимущественно V-участок, а в нем CDR3 участок. В прохождении гипермутации ключевую роль играет дезаминаза цитидина, кодируемая геном AID (Activation-induced cytidine deaminase). Этот фермент дезаминирует остатки цитидина в одноцепочечной ДНК, превращая его в дезоксиуридин, что в дальнейшем приводит к замене нуклеотида С на Т. Соматическая гипермутация характеризуется введением дополнительной модификации в гены иммуноглобулина, что увеличивает разнообразие антител и продуцирует антитела более высокой специфичности (Stavnezer, *et al.*, 2008).

Соматическая гипермутация происходит с частотой $\sim 10^{-13}$ на деление клетки, что примерно в $\sim 10^6$ раз выше, чем скорость спонтанной мутации во всех других клетках. Обе последовательности, кодирующие цепи иммуноглобулинов, могут быть подвергнуты гипермутации. Мутагенез затрагивает преимущественно V-домен, а именно – гипервариабельный участок тяжелых цепей CDR3, определяет взаимодействие с антигеном (Schlissel, 2003). Основные мутации представлены заменами А/Т пар (60%) или G/C (40%). Реже соматическая гипермутация приводит к введению нуклеотидных вставок или их удалению в генах иммуноглобулина, при этом вставки на самом деле являются

продублированной соседней последовательностью. Последовательности, несущие такие модификации, являются продуктивными, при этом сохраняется рамка считывания. Механизм генерации подобных событий остаётся неизвестным. (Klein, *et al.*, 1998).

Различия в клиническом течении ХЛЛ частично объясняются двумя отдельными молекулярными подтипами этой болезни, различаемыми по наличию или отсутствию признаков перенесенной соматической гипермутации (Hamblin, *et al.*, 1999). В ходе антигензависимого этапа развития нормальные В-лимфоциты развиваются в герминальном центре, где происходит соматическая гипермутация – физиологический процесс, смысл которого состоит в повышении аффинности антител. Мутационный механизм ограничен сравнительно небольшим участком генома. В-клетки, в которых нет мутаций VH-генов (гены тяжелой цепи иммуноглобулинов), не проходили соматической гипермутации. Это означает, что они не контактировали с антигеном и не проходили стадию развития в герминальном центре. Наоборот, В-клетки, в которых выявляются мутации VH-генов, развивались по классическому пути и проходили этап герминального центра и соматической гипермутации. ХЛЛ гетерогенен по этому признаку, и мутационный статус генов варибельного региона иммуноглобулинов отражает происхождение клеток ХЛЛ из клеток разного уровня созревания или разных путей дифференцировки и ассоциируется с различным прогнозом (Darzentas, *et al.*, 2010).

Оценка прохождения соматической гипермутации в опухолевом клоне у пациентов с ХЛЛ успешно используется для прогнозирования течения заболевания. Показано, что у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, несущих мутантные гены IGHV, заболевание развивается медленнее, чем у пациентов с немутированными IGHV. Прогностический маркер IGHV проверен в ряде масштабных исследований и в настоящее время считается одним из самых точных и независимых прогностических маркеров в ХЛЛ позволяющих оценить клинический исход течения заболевания (Hallek, *et al.*, 2008).

5. Микроокружение ХЛЛ

Микроокружение ХЛЛ представляет собой сложную систему, состоящую из многих типов клеток, которые участвуют в активном молекулярном взаимодействии, обеспечивая поддержание ХЛЛ клеток. Эти вспомогательные клетки включают эндотелиальные клетки и их предшественники, перициты, гладкомышечные клетки, фибробласты, нейтрофилы, тучные клетки, Т- и В- лимфоциты и клетки-киллеры (НК-киллеры), и антигенпрезентирующие клетки, таких как дендритные клетки и макрофаги (Burger, *et al.*, 2009).

В-клеточный рецептор является ключевым компонентом функционирования нормальных В-клеток и выживания большинства злокачественных новообразований. В-клеточный рецептор нековалентно связан с гетеродимерными молекулами CD79a и CD79b. CD79a и CD79b, которые служат в качестве рецепторов первичной сигнальной трансдукции. Первоначальное связывание антигена приводит к образованию сигнасомы, комплексу киназ и каркасных белков (Young, *et al.*, 2013). Далее инициируется фосфорилирование тирозинового мотива иммунорецептора в CD79a и CD79b семейством SRC киназ Lyn. Сигнал В-клеточного рецептора дополнительно передается SYK (Spleen tyrosine kinase) и далее на тирозинкиназу Брутона (ВТК) и фосфолипазы C (PLC). Фосфолипаза C формирует вторичные мессенджеры: инозитолтрифосфат и диацилглицерол (DAG), которые приводят к активации протеинкиназы C (PKC) (Davis, *et al.*, 2010). Протеинкиназа C дополнительно активирует ядерный фактор NF-κB. В итоге все эти сигналы регулируют пролиферацию, выживаемость В-клеток и миграцию посредством Mcl-1, циклинов и MYC. Стромальные клетки костного мозга и фолликулярные дендритные клетки (FDC) являются ключевыми регуляторами нормального В лимфопоэза (процесс развития и созревания лимфоцитов). Они синтезируют несколько цитокинов: колониестимулирующие факторы, IL-6, IL-7, IL-10 и TGFβ и фактор стволовых клеток, тем самым регулируя В-клетки ХЛЛ. Различные адгезионные интегрины, такие как VLA-4 и его лиганд VCAM-1, участвуют в адгезии стромальных клеток и В-клеток ХЛЛ. Стромальные клетки защищают клетки ХЛЛ от апоптоза с помощью CXCL12, фактора BAFF, CD31 и плексина B1. Фолликулярные дендритные клетки также защищают В-клетки ХЛЛ от апоптоза *in vitro* путем повышения уровня антиапоптотического белка Bcl-2 семейства Mcl1 (Quiroga, *et al.*, 2009).

Наибольший вклад в выживание клеток ХЛЛ вносят Т-хелперы, с помощью межклеточных контактов с В-клетками. При нормальном развитии В-клетки мигрируют к Т-хелперам путем хемотаксиса. Затем происходит соединение и передача сигналов через CD40 (находятся на В-клетках) и CD40L (CD154 экспрессируется на Т-хелперах) (Herman, *et al.*, 2011). Это взаимодействие имеет решающее значение для индукции и поддержания пролиферации В-клеток. Различные цитокины высвобождаются во время взаимодействия Т и В-клеток. В-клетки продуцируют и экспрессируют лиганды и рецепторы для многих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-8, TNFα, IFNα и VEGF. Это способствует их дальнейшему выживанию. Несмотря на все достижения в области биологии, остаются несколько вопросов без ответа: природа связывания антигена, запускающего весь процесс, причины низкой экспрессии В-клеточного рецептора, причины соматических мутаций ХЛЛ и различные механизмы взаимодействия (Рис. 7) (Herishanu *et al.*, 2011).

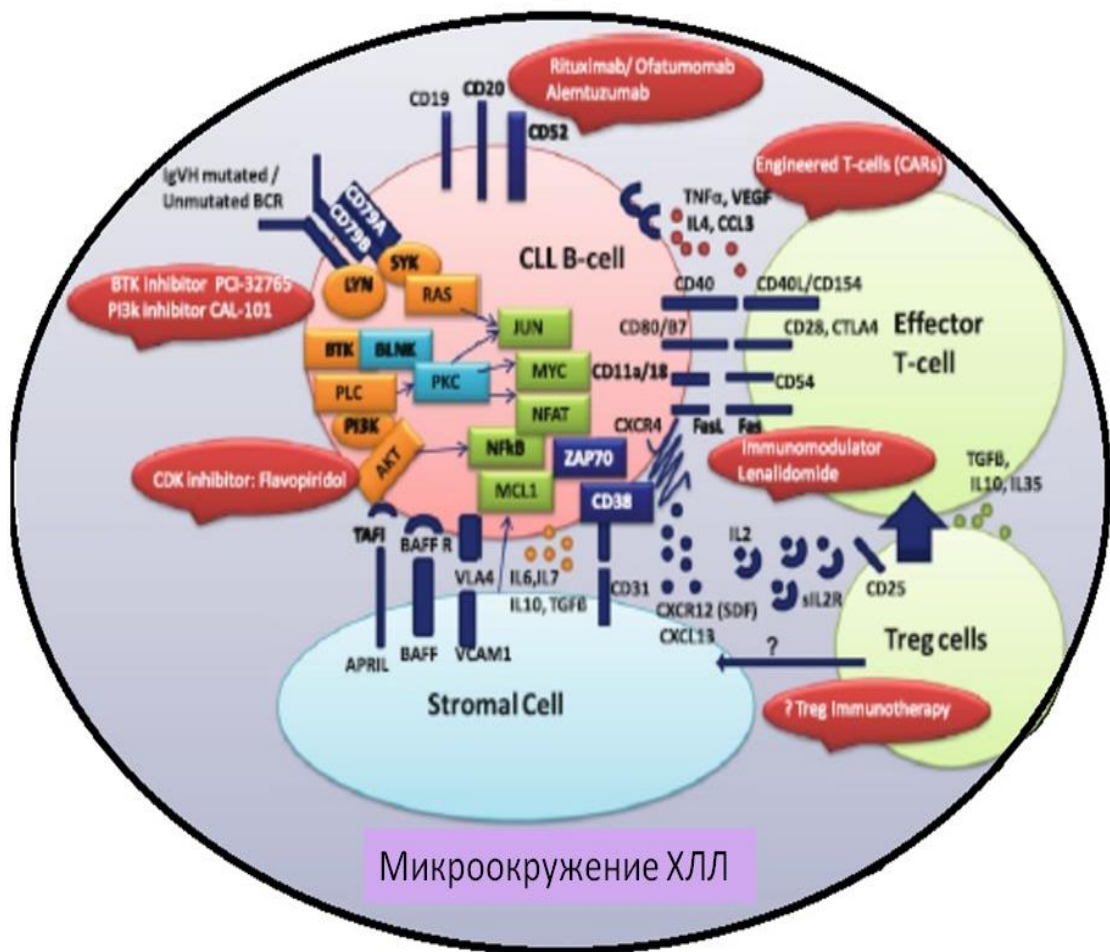


Рисунок 7. Микроокружение хронического лимфоцитарного лейкоза. Различные цитокины высвобождаются во время взаимодействия Т и В-клеток. В-клетки продуцируют и экспрессируют лиганды и рецепторы для многих цитокинов: IL-2, IL-4, IL-8, TNF α , IFN α и VEGF (Deepesh, *et al.*, 2013).

6. Молекулярные маркеры ХЛЛ

Впечатляющие достижения в области технологий высокопроизводительного секвенирования, предоставили новую возможность понять молекулярную генетику хронического лимфоцитарного лейкоза на основе комплексного обнаружения генетических повреждений.

За последнее время было идентифицировано несколько генов-кандидатов, которые могут служить в качестве новых прогностических маркеров в дополнение к IGVH – это гены SF3B1, NOTCH1, TP53 и BIRC3 (Quesada, *et al.*, 2012).

У 80% больных ХЛЛ выявляются приобретенные соматические хромосомные aberrации (Dohner, *et al.*, 2014). К ним относят трисомию хромосомы 12, делеции хромосом 13 – del(13q14), 11 – del(11q23), 17 del(17p) (Malek, *et al.*, 2013). Частота этих хромосомных aberrаций неравномерно распределена между вариантами ХЛЛ с разным

мутационным статусом VH-генов (таблица 3). Хромосомные нарушения, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом – del(11q23) и del(17p), – выявляются преимущественно при варианте ХЛЛ без мутаций VH-генов. Тип и контекст мутаций согласуются с частыми ошибками, совершаемыми ДНК-полимеразой η (eta), в норме обеспечивающей репарацию разрывов ДНК. ДНК-полимераза η сильно экспрессируется в фолликулярных клетках герминального центра и ее активность необходима. Различия, наблюдаемые при ХЛЛ с разным мутационным статусом VH-генов, могут быть связаны с влиянием микроокружения герминальных центров, что согласуется с клеточным происхождением этих двух вариантов ХЛЛ (Puente, *et al.*, 2011).

Аберрация	Вариант с мутациями генов иммуноглобулинов	Вариант без мутаций генов иммуноглобулинов
Делеция 13q	50	26
Трисомия 12	15	19
Делеция 11q	4	27
Делеция 17p	3	10

Таблица 3. Частота хромосомных аберраций при мутированном и немутированном вариантах VH-генов

Существуют корреляционные связи между некоторыми хромосомными и генными мутациями: например, мутация NOTCH1 часто встречается при трисомии 12 хромосомы, а мутация MYD88 – при делеции 13q14. И, наконец, хромосомные аберрации могут затрагивать и многие другие критические гены и, следовательно, сигнальные пути с их участием, что осложняет понимание патобиологических механизмов развития В-ХЛЛ (Malek, *et al.*, 2013).

Более обширные исследования генома ХЛЛ начали проводить недавно, но уже идентифицировали семь основных сигнальных путей, преимущественно повреждаемых в клетках ХЛЛ (Pleasance, *et al.*, 2013). Идентификация некоторых из них неувидительна; критическая роль других путей в патогенезе ХЛЛ оказалась совершенной неожиданностью. К этим путям относятся:

- сигнальный путь NOTCH1 (NOTCH1, FBXW7);
- процессинг и транспорт мРНК (SF3B1XPO1, DDX3X);
- врожденный воспалительный ответ (MYD88, RIPK1, DDX3X);
- ответ на повреждения ДНК, контроль клеточного цикла (ATM, TP53, POT1);
- гены сигнального пути Wnt (MED12);

- путь передачи сигнала через В-клеточный рецептор (ITPKB, KRAS, NRAS);
- модификации хроматина (HIST1H1E, CHD2, ZMYM3).

Как и в случае с хромосомными нарушениями, мутации генов этих сигнальных путей неодинаково распределены при двух молекулярных подтипах ХЛЛ. Мутации генов NOTCH1, пути транспорта мРНК и пути повреждения ДНК чаще выявляются при ХЛЛ без мутаций VH-генов. Мутации пути врожденного воспалительного ответа происходят преимущественно при ХЛЛ с мутациями VH-генов. Это свидетельствует о различном патогенезе двух вариантов ХЛЛ и отражает активацию различных молекулярных механизмов (Pleasance, *et al.*, 2013).

7. Ген NOTCH1, его функции и роль в развитии ХЛЛ

Ген NOTCH1, кодирует трансмембранный белок, функционирующий как рецептор и регулятор транскрипции. Белок Notch1 участвует в передаче сигналов, регулирующих отношения с соседствующими клетками, а также при дифференцировке клеток, их пролиферации и апоптозе (Leong, 2006).

Notch1,2,3,4 представляют собой семейство трансмембранных белков (Рис. 7), которые функционируют как рецепторы на клеточной поверхности и как регуляторы транскрипции. Исследование Rosati показали, что Notch1 и Notch2 вместе с их лигандами Jagged1 и Jagged2 функционируют в В-клетках ХЛЛ, но не в нормальных В-клетках. Предполагается, что сигнальный путь Notch обеспечивает выживание и устойчивость клеток ХЛЛ к апоптозу (Leong, 2006).

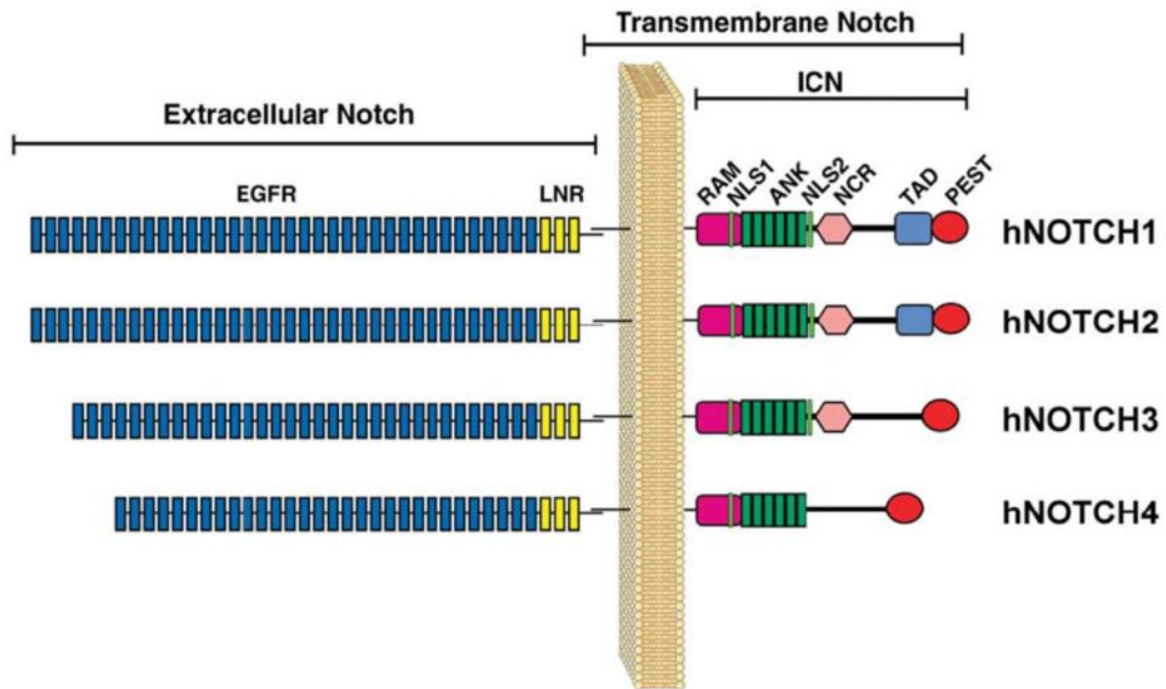


Рисунок 7. Строение человеческих рецепторов группы Notch (Allenspach, *et al.*, 2002).

При прохождении сигнала внеклеточный домен (NEXT – *Notch1 Extracellular Truncation*) Notch контактирует с лигандами, как правило, находящимися на поверхности другой клетки. При взаимодействии с лигандом происходит его протеолитическое расщепление, в результате которого высвобождается внутриклеточный домен (NCID – *Notch Intra-Cellular Domain*). Далее NCID-домен идет в ядро и активирует транскрипционный комплекс CBF1/RBP-J κ , что приводит к активации CBF1-зависимых генов (Рис. 8) (Fortini, 2009).

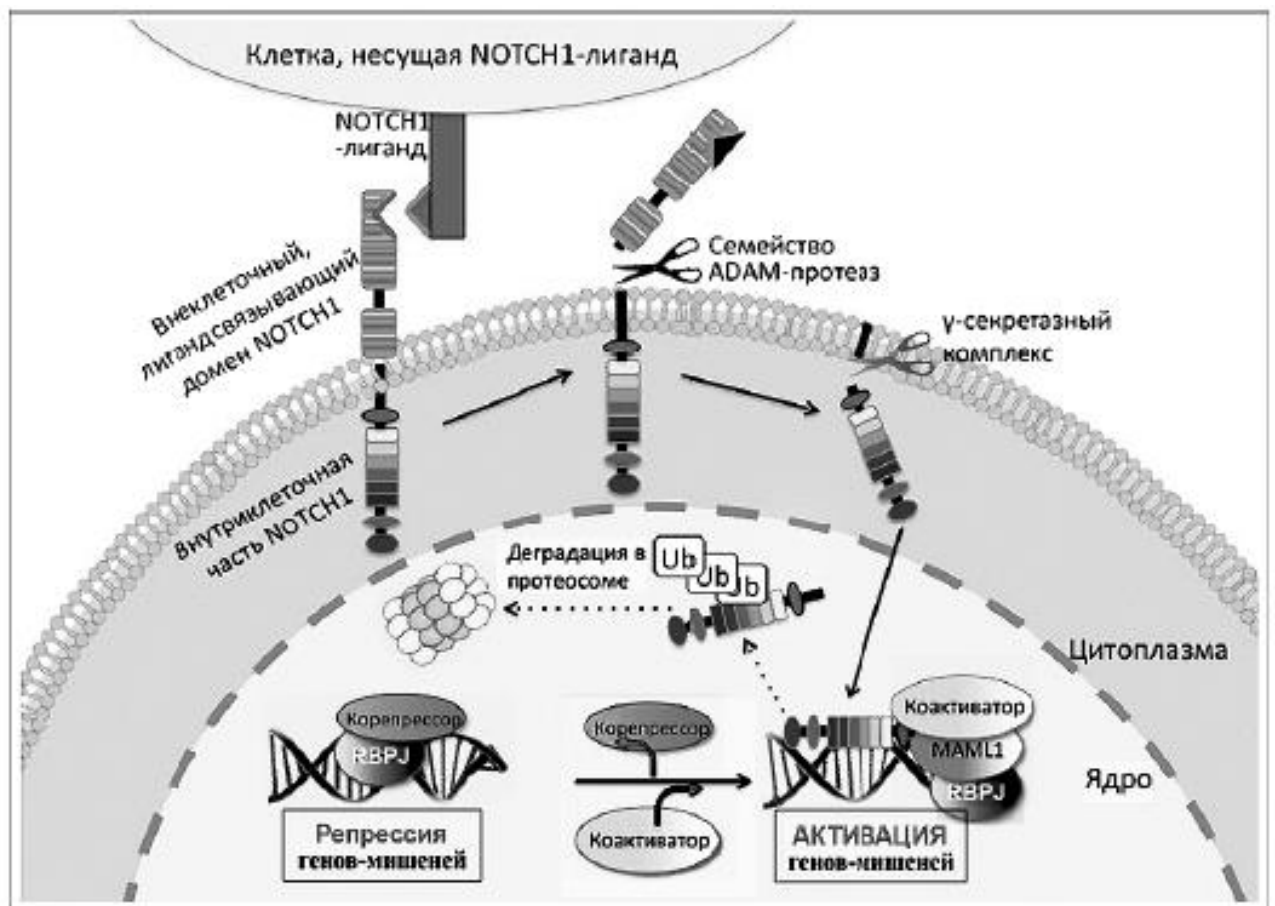


Рисунок 8. Сигнальный путь NOTCH1. При связывании внеклеточной части NOTCH1 с его лигандом происходит протеолитическое отщепление внутриклеточного домена NOTCH1 и перемещение в ядро, где он связывается с кофакторными молекулами и активирует транскрипцию генов-мишеней. После взаимодействия с ДНК внутриклеточная часть NOTCH1 подвергается деградации в протеосоме (Северина, *et al.*, 2014).

Сигнальный путь Notch в норме активирует антиапоптотический механизм за счёт действия ядерного фактора NF- κ B (Sceranti, *et al.*, 2003), который позитивно регулирует экспрессию антиапоптотических белков (Рис. 9). Повышенная регуляция транскрипционного фактора c-мус (Palomero, *et al.*, 2006) в ответ на активацию Notch, является возможным объяснением связи мутаций в гене NOTCH1 и развития ХЛЛ. Сигналинг Notch также активирует ключевую протеинкиназу Akt, целью которой является блокировка апоптоза (Palomero T, *et al.*, 2008).

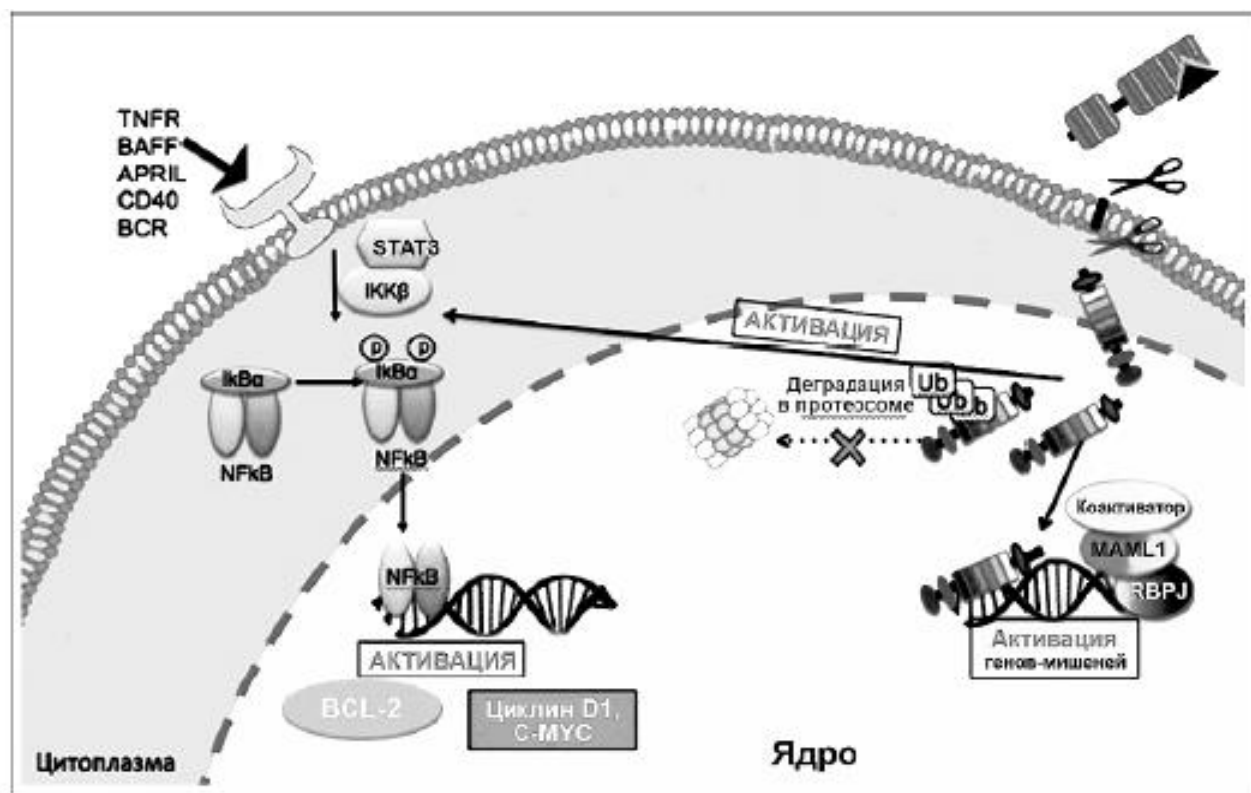


Рисунок 9. Активация сигнального пути NF-κB, который позитивно регулирует экспрессию антиапоптотических белков. Более стабильный за счет мутации домен NOTCH1 поддерживает активацию сигнального пути NF-κB, что увеличивает выживаемость клеток ХЛЛ (Северина, *et al.*, 2014).

Частота мутаций в гене NOTCH1 у пациентов с ХЛЛ по разным данным составляет от 11 до 20%, что зависит от выбранного метода исследования. В гене 80% мутаций представлено делецией CT7544-7545 в С-концевой части домена PEST. Эта мутация приводит к усечению белка Notch, нарушению его дальнейшей деградации и конститутивной активации сигнального пути (Fabbri G, *et al.*, 2011). Идентифицированные на данный момент мутации в гене NOTCH1 при ХЛЛ представлены в таблице 4. С-концевая часть внутриклеточного домена PEST важна для протеосомной деградации рецептора Notch путем связывания с FBXW7 (убиквитин-лигаза, которая связывает с убиквитином несколько онкопротеинов, включая NOTCH1, предвывая их деградацию в протеосомах.).

NOTCH1 nucleotide change (DNA/cDNA)	Amino acid change	Domain
c.7544-7545delCT ⁺	P2515fsX4	PEST
c.G5164A ⁺	V1722M	HD *
c. C7510T ⁺	Q2504X	PEST
c.7295-7344dupl50bps ⁺	R2434fs	PEST
c.7446delC ⁺	F2482fs	PEST
c.7392delC ⁺	A2464fsX14	PEST
c.7247-7274del 28nts ⁺	P2415fsX82	PEST
c.7023-7024ins CCCC ⁺	S2342fsX13	TAD
c.C7321T ⁺	Q2441X	PEST
Not reported	Q2503X	PEST
c.6485-6847del363bp	P2162del122	TAD
c.6544-6878del335bp ⁺	K2182fsX61	TAD
c.7411-7429del19bp ⁺	S2471fsX1	PEST
c.7433delC ⁺	T2478fsX6	PEST
c.7006-7007insC ⁺	L2336fsX19	TAD
c.6802-6803delGA ⁺	E2268fsX86	TAD
c.6987-6988insG ⁺	S2330fsX25	TAD
c.7250-7251insCAC ⁺	Q2417insP	PEST
c.7389-7390CG>T ⁺	P2463fsX15	PEST
Not reported	Q2409X	PEST
Not reported	L2457V	PEST
c.C7375T ⁺⁺	G2459X	PEST
c.7444delC ⁺⁺	L2482X	PEST
c.C7507T ⁺⁺	G2503X	PEST
c.6825insA ⁺⁺	S2274fs	TAD
c.C7330T ⁺⁺	G2444X	PEST
c.7410delC ⁺⁺	S2470fs	PEST
c.6431-6443delGCTAC CTGGGCAG ⁺⁺	N2143fs	TAD
c.7371delG ⁺⁺	P2458fs	PEST

Таблица 4. Основные мутации в гене NOTCH1 при ХЛЛ (Gianfelici, 2012).

Последствия мутаций NOTCH1 в клетках ХЛЛ не до конца изучены. Измененный белок NOTCH1 не имеет полного онкогенного потенциала, в частности показано, что он не может полностью трансформировать Т-клетки в моделях у мышей. Для полной активации NOTCH1, необходимы другие онкогенные события (Ferrando, *et al.*, 2011). Сигнальные пути NOTCH1 и NOTCH2 постоянно активны в клетках ХЛЛ по сравнению с нормальными В-лимфоцитами (Rosati, *et al.*, 2009). Более стабильная за счет мутации внутриклеточная часть NOTCH1 поддерживает активацию сигнального пути ядерного фактора κВ (NF-κВ) и как следствие BCL-2, с-мус, что увеличивает выживаемость клеток. NOTCH1 играет важную роль в обеспечении жизнеспособности клеток ХЛЛ (Rosati, *et al.*, 2009). При анализе профиля экспрессии генов установлено, что в клетках ХЛЛ с мутациями NOTCH1 повышена экспрессия генов нескольких метаболических путей, включая окислительное фосфорилирование, гликолиз и глюконеогенез (Puente, *et al.*,

2011). Мутации NOTCH1 чаще выявлялись при ХЛЛ без мутаций IGVH генов, с высокой экспрессией ZAP70 и CD38 (Fabbri, *et al.*, 2011), на поздних стадиях болезни. Они ассоциируются с другими факторами неблагоприятного прогноза – это высокий уровень лактатдегидрогеназы и β 2-микроглобулина. У больных ХЛЛ с мутациями NOTCH1 реже выявляется делеция 13q; при этом трисомия хромосомы 12 выявляется статистически значимо чаще. Ассоциация с трисомией хромосомы 12 показана не во всех исследованиях (Mansouri, *et al.*, 2013). При мутациях NOTCH1 показатели общей выживаемости ниже, короче период до начала терапии, беспрогрессивной (при использовании разных режимов химиотерапии) выживаемости (Рис. 10). У больных с мутациями NOTCH1 чаще выявляется рефрактерность к терапии (Villamor, *et al.*, 2013). С другой стороны, мутации NOTCH1 не коррелируют с частотой полных или частичных ремиссий. Однако больные, у которых выявляются эти мутации, реже достигают полного молекулярного ответа с негативной минимальной остаточной болезнью. Также важное наблюдение состоит в том, что мутации NOTCH1 ассоциируются с трансформацией в синдром Рихтера (развитие диффузной крупноклеточной лимфомы, встречается примерно у 2–6% больных ХЛЛ) (Rosati, *et al.*, 2009). У больных с мутациями NOTCH1 синдром Рихтера развивается статистически значимо чаще и быстрее (Villamor, *et al.*, 2013).

Исследования значимости мутаций гена NOTCH1 при ХЛЛ в дальнейшем позволит лучше изучить патогенез болезни, также даст возможность для улучшения терапевтических стратегий на агрессивных стадиях. Так была показана возможность сочетания ингибиторов гена NOTCH1 с химиотерапией в качестве нового подхода для лечения пациентов с мутациями Notch1 (Moellering, *et al.*, 2009).

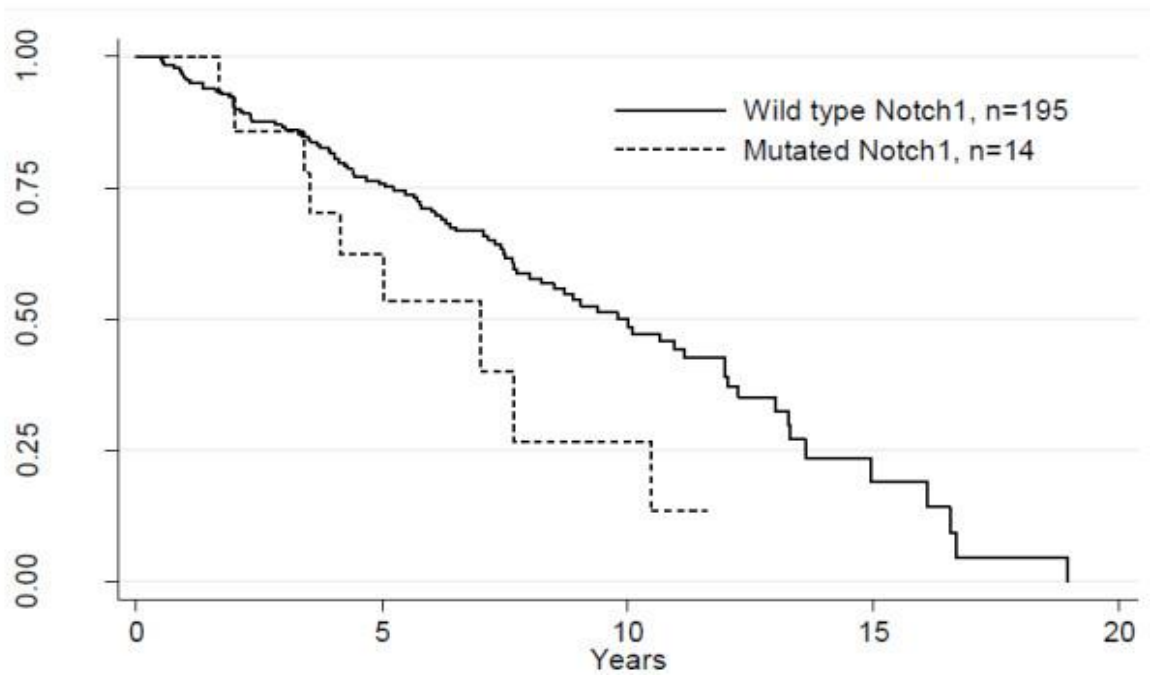


Рисунок 10. Кривые выживаемости Каплана-Мейера показывает существенное различие в выживаемости между пациентами с мутированным NOTCH1 мутации и NOTCH1 дикого типа (n = 195) (Willander, *et al.*, 2013).

8. Цели и задачи работы

Цель работы – исследование мутаций в гене NOTCH1 у больных с хроническим лимфоцитарным лейкозом.

Задачи работы:

- исследовать мутационный статус гена NOTCH1 в выборке пациентов с ХЛЛ,
- с помощью метода ПЦР-РВ оценить представленность мутированных копий гена NOTCH1 в выборке пациентов с ХЛЛ,
- клонировать последовательности, кодирующие мутированные варианты NICD, и получить конструкции для экспрессии этих фрагментов,
- получить клеточные линии, экспрессирующие мутированные варианты фрагментов гена NOTCH1.

9. Материалы и методы

Олигонуклеотиды

Группа праймеров	Последовательности праймеров	Ссылка
Framework-1 primers	1. VH1-FR1 GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG 2. VH2-FR1 GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC 3. VH3-FR1 CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG 4. VH4-FR1 CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG 5. VH5-FR1 CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT 6. VH6-FR1 TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG 7. JH consensus CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC	BIOMED-2, VanDongen et al., 2003
Notch1-34a	Forward AACCCACCTGCCTGGGATG Reverse CGCATTGACCATTCAAACTG	
Notch1-34b	Forward GCCCTCCCCGTTCCAGGAGAGTCT Reverse GCCTGGCTCGGCTCTCCACTCA	
Notch1-34c	Forward AGCCGCACCTTGGCGGTGAGC Reverse TGGTCGGCCCTGGCATCCAC	
ForC	CCCCGTCCCGAGTCCCCTGACCAGTGG	
ForR	AGGGGACTCGGGAGGGGTGAGGAAGG	
ForMut	TCCTCACCCCGTCCCGA	
Зонд	CCAGCCCTCCCACCAGCATGCAG	
NICD-F1	ATTTTCATGTACAATGGTGCTGCTGTCCCGCAAGC	
NICD-R1	ATTGAATCCACCGAAGGCTTGGGAAAGGAAG	

Таблица 5. Использованные в работе праймеры и зонды.

Методы

Выделение геномной ДНК осуществляется с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit, производства фирмы Qiagen, а так же GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit производства фирмы Thermo Scientific. В основе работы данных наборов лежит метод адсорбции ДНК на мембрану в буфере с высокой ионной силой с последующей очисткой от примесей и элюцией буфером с низкой ионной силой.

При выделении тотальной РНК использовали набор для выделения РНК QIAamp RNA Blood Mini Kit производства фирмы Qiagen.

Синтез кДНК методом обратной транскрипции осуществляли с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit фирмы Thermo Scientific. При этом использовали олигоdT праймер, комплиментарный полиА последовательностям мРНК.

Анализ концентрации и качества полученных образцов нуклеиновых кислот производится с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000 производства фирмы Thermo Scientific.

При проведении ПЦР использовали геномную ДНК или кДНК в качестве исходной матрицы. При анализе генов IGHV проводили мультиплексную полимеразной цепной реакции (ПЦР) с набором праймеров BIOMED-2. Параметры реакции: 3 минуты 95°C, затем 30 циклов: 1 минута - 95°C, 1 минута - 58°C, 1 минута - 72°C. При амплификации последовательности гена NOTCH1 для секвенирования использовали праймеры 34aF, 34aR, 34bF, 34bR, 34cF и 34cR. Параметры реакции: 3 минуты 95°C, затем 35 циклов: 30 секунд - 95°C, 1 минута, 20 секунд - 57°C, 3 минуты - 72°C. В состав каждой пробы, объемом 50 мкл, входили: ДНК (около 500 нг) или кДНК, 10x буфер для ПЦР (5мкл), 10x 2мМ раствор дезоксирибонуклеотидов (5мкл), по 0,2 мкл (20 пкмоль) прямого и обратного праймеров, вода, 0,2 мкл полимеразы Taq (5 ед/мкл) или 0,5 мкл полимеразы Pfu (2,5 ед/мкл) (Thermo Scientific).

При анализе гена NOTCH1 **методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени** использовали праймеры ForC, ForR и ForMut, а так же зонд NOTCH1P, меченый флуорофором. Параметры реакции: 5 минуты 95°C, затем 40 циклов: 30 секунд - 95°C, 30 секунд - 60°C. Для проведения реакции использовали 5xqPCRmixHS-ROX производства фирмы Евроген (Москва).

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 1,5% агарозном геле в буфере ТАЕ (TRIS - HCl, ледяная уксусная кислота, 0,5М ЭДТА pH 8,0). Для окрашивания препаратов

ДНК добавляли 8 мкл раствора бромистого этидия (EtBr) на 100 мл раствора. Электрофорез проводили при напряжённости поля 6-7 В/см². (Маниатис *и др.*, 1984).

Выделение фрагментов ДНК из геля проводили набором Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва) с помощью реактивов и по рекомендациям, предложенным фирмой-производителем.

Переосаждение ДНК. К пробе добавлялся NaAc (1/15 от объёма пробы) и 96% этанол (2 объёма пробы с учетом добавленного NaAc). Осаждение проводили при -20 °С (ночь) или на -70 °С (20 минут), далее пробу центрифугировали 15 мин при 13 тыс. об/мин. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в деионизированной воде.

Постановка сиквенсной реакции. Очищенный ПЦР-продукт используется в качестве матрицы для проведения предсиквенсной реакции с использованием терминирующих элонгацию флуоресцентных дидезоксинуклеотидов. При этом использовали BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit производства фирмы Applied Biosystems. Реакцию проводили со следующими параметрами: 1 минута - 96°С, затем 25 циклов: 10 секунд - 96°С, 5 секунд - 50°С, 4 минуты - 60°С. Продукты реакции переосаждали, растворяли в формамиде и обрабатывали с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3130. **Анализ полученных хроматограмм** проводили с помощью программ Ugene.

Сравнение полученных последовательностей генов IGHV с последовательностями герминальных (немутированных) генов иммуноглобулинов, депонированных в базе данных IMGT с помощью интерфейса IgBlast NCBI. Выравнивание последовательностей проводили с помощью интерфейса ClustalOmega.

Клонирование последовательностей, кодирующих мутированные варианты NICD. Ставили ПЦР с праймерами к делеции и фланкирующими праймерами. Параметры реакции: 3 минуты 95°С, затем 35 циклов: 1 минута - 95°С, 1 минута - 60°С, 3 минута - 72°С. Затем электрофорез фрагментов NICD. Далее ПЦР фрагментов NICD с фланкирующими праймерами (BamH1, EcoR1) для формирования последовательности с delCT. После ставилась ПЦР с праймерами, направленными на делецию (ForMut, ForRev), для контроля. Лигирование последовательностей в плазмиду pTZ57R.

Создание векторов для экспрессии фрагментов NICD. Рестрикция вектора pTZ57R по BamH1 и EcoR1. Электрофорез фрагментов в агарозном геле, очистка фрагментов. Лигирование в дефосфариллированный вектора LeGO – 1xT/BSD. Секвенирование экспрессируемых плазмид LeGO.

10. Результаты и обсуждение

10.1 Поиск мутаций в гене NOTCH1

Для поиска мутаций в гене NOTCH1 использовали аллель-специфичную ПЦР в реальном времени, а так же метод секвенирования. Краткая схема проведения исследований мутаций в гене NOTCH1 для каждого пациента представлена на рисунке 11.



Рисунок 11. Краткая схема проведения исследований мутаций гена NOTCH1 для каждого пациента.

Аллель-специфичная ПЦР в реальном времени. Большинство мутаций в гене NOTCH1 представлены в районе 34 экзона, соответствующего PEST домену белка Notch1. Большая часть мутаций более 80% представлена двунуклеотидной делецией delCT (с.7544_7545delCT). Для поиска данной мутации в ряде работ используется метод аллель-специфичной ПЦР.

Проводили выделение геномной ДНК из образцов периферической крови от пациентов. ДНК использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР. Для каждого образца проводили две реакции. В качестве контроля использовали пару праймеров (ForC и ForR), комплементарных последовательности дикого типа. В опытной пробе использовалась пара праймеров ForMut и ForR, в которой праймер ForMut комплементарен последовательности, содержащей делецию. В каждой серии реакции присутствовал отрицательный контроль (Рис. 12).

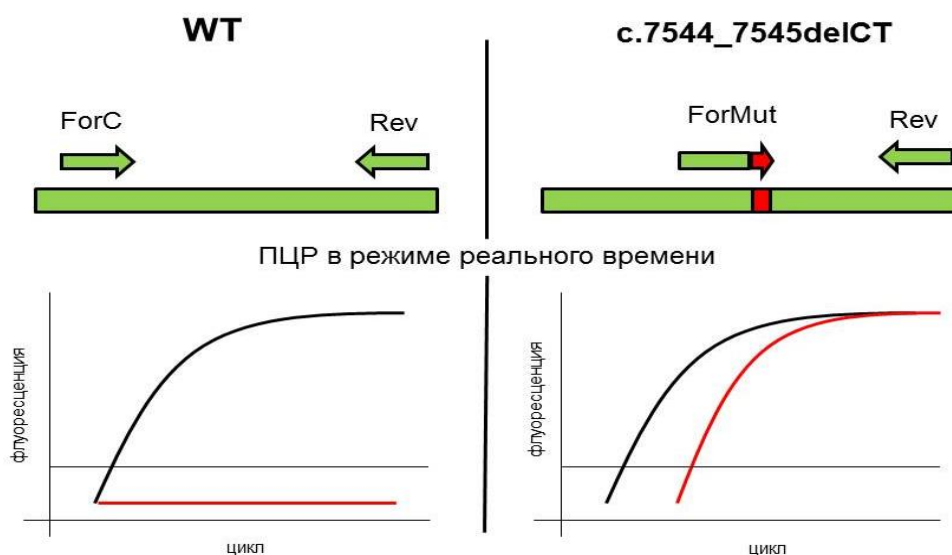


Рисунок 12. Схема определения делеции delCT (с.7544_7545delCT) в гене NOTCH1 с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Фрагменты, амплифицированные в ходе реакции так же проверяли методом электрофореза в агарозном геле. В контрольной реакции амплифицируется продукт размером 285 пар оснований. В случае наличия мутации синтезируется продукт размером 185 пар оснований. Результаты электрофореза образцов от различных пациентов представлены на рисунке 13.

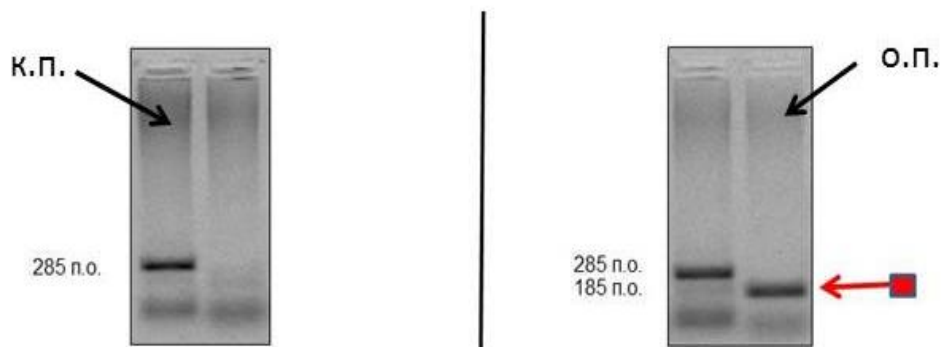


Рисунок 13. Электрофореграмма продуктов ПЦР по матрице ДНК. Слева – выявлен только дикий тип гена NOTCH1 (WT). Справа - выявлено наличие мутации (delCT). К.п.- контрольная проба (праймеры ForC и ForR), о.п. – опытная проба (праймеры ForMut и ForR).

В ходе данной работы образцы от 133 пациентов были исследованы на наличие мутации delCT (с.7544_7545delCT) с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. При этом данная мутация была обнаружена у 17 пациентов (13%).

Секвенирование последовательности 34 экзона гена NOTCH1. Для секвенирования гена NOTCH1 использовали выделенную ранее ДНК в качестве матрицы. Проводили 3 отдельных ПЦР реакции с использованием 3-х групп праймеров для участков а, b и с в экзоне 34 гена NOTCH1, соответствующих PEST домену (Рис. 14).

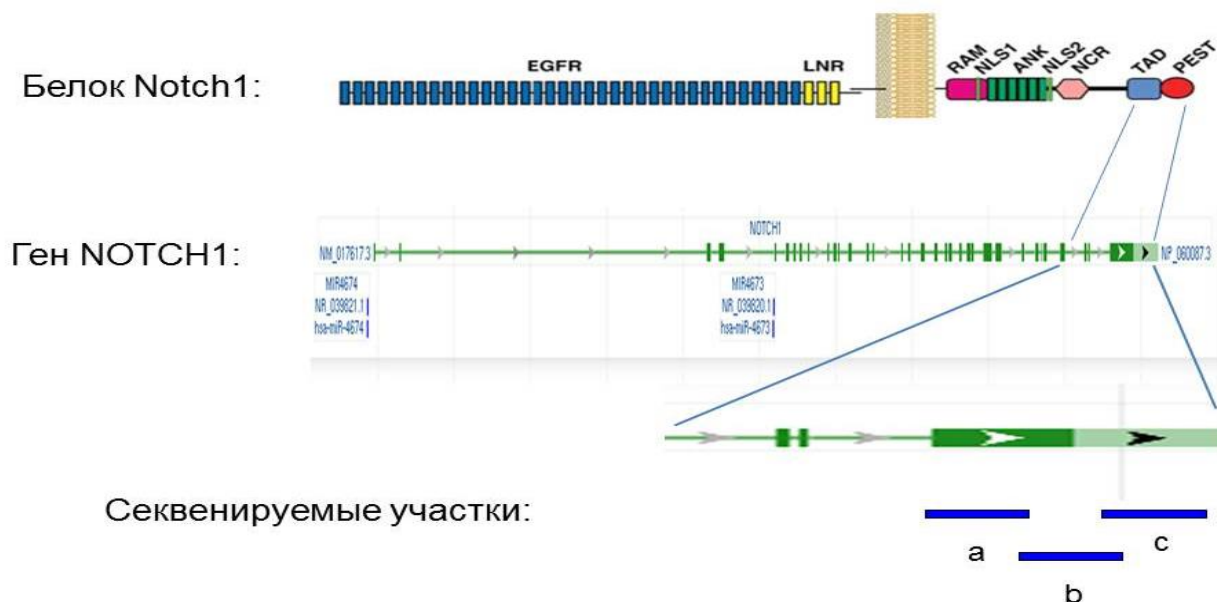


Рисунок 14. Схема расположения секвенируемых участков гена NOTCH1.

Фрагменты, амплифицированные в ходе реакции, проверяли и очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Размер участка “а” составлял 585 пар оснований, участка “b” - 663 пар оснований, участка “с” - 479 пар оснований. Выделяли соответствующие фрагменты из геля. Проводили секвенирование обеих цепей. Полученные хроматограммы анализировали на наличие мутаций (Рис. 15).

С помощью секвенирования были исследованы все образцы, в которых с помощью аллель-специфичной ПЦР было выявлено наличие делеции СТ. Секвенирование по Сэнгеру позволило выявить мутации в гене NOTCH1 у 7% пациентов (n=9). В 8 случаях - с.7544-7545delCT, в одном случае 1 - с.7298delT. Интересно, что ПЦР-детекция с.7544-7545delCT подтвердила результаты секвенирования, но при этом позволила выявить мутацию с.7544-7545delCT ещё у 8 пациентов (6%). Возможно, это связано с большей чувствительностью метода аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени. Из анализа литературы по теме было выяснено, что при использовании методов секвенирования частота выявления мутаций в гене NOTCH1 была около 11% (Sportoletti P, 2013). В то время как при использовании аллель-специфичной ПЦР эта частота была гораздо выше и составляла до 20% (Balatti V, 2012). При этом в данной работе секвенирование позволило выявить у одного из пациентов наличие редкой мутации

c.7298delT. Поэтому для более надежного и точного определения мутаций в данном гене желательнее сочетать данные методы.

В целом при сочетании этих двух методов мутации в гене NOTCH1 были выявлены у 17 пациентов из 133, что составляет 13%.

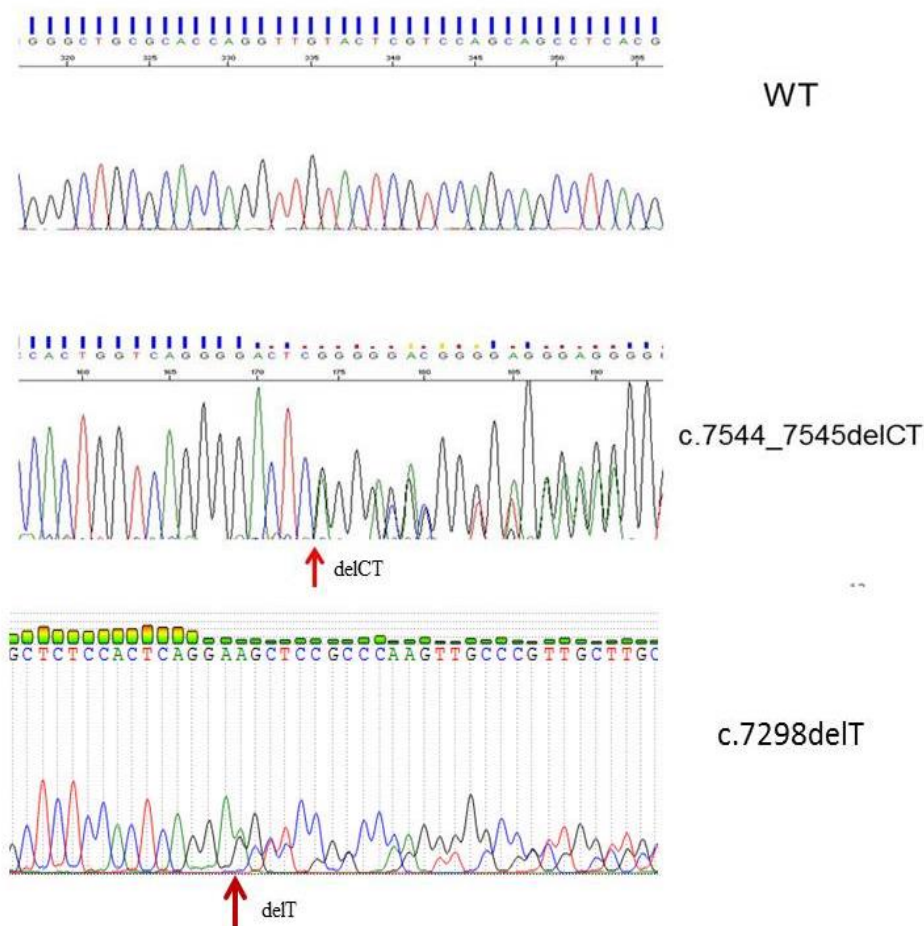


Рисунок 15. Примеры полученных при секвенировании хроматограмм. WT – результаты секвенирования образца от пациента 5-13, не содержащего мутации в гене NOTCH1. c.7544-7545delCT – результаты секвенирования образца от пациента 4-7, для которого выявлено наличие делеции CT. c.7298delT – результаты секвенирования образца от пациента 1-20, у которого выявлена редкая делеция c.7298delT.

10.2 Исследование мутационного статуса генов IGHV

Помимо мутаций в гене NOTCH1 при ХЛЛ исследуют ряд других молекулярных маркеров. В настоящее время мутационный статус IGHV является одним из наиболее часто используемых прогностических маркеров, а также признан наиболее стабильным и надежным показателем связанным с клинической картиной пациента.

В качестве исходного материала использовали периферическую кровь. На первом

этапе выделяли ДНК, в сложных случаях в качестве матрицы использовали кДНК. Для этого выделяли РНК и проводили реакцию обратной транскрипции. По матрице полученной ДНК ставили мультиплексную ПЦР с праймерами BIOMED-2. Проводили электрофорез полученных фрагментов в агарозном геле. Далее проводили выделение нужного фрагмента из геля. Полученный продукт использовали при постановке секвенсной реакции. Секвенирование проводили с применением обратного праймера JHConst. Продукты пересаждали и обрабатывали с помощью генетического анализатора. С помощью программы Ugene анализировали полученные хроматограммы.

Полученные последовательности генов IGHV исследовали на предмет наличия сдвигов рамок считывания и образования стоп-кодона и сравнивали с последовательностями герминальных (немутированных) генов иммуноглобулинов, депонированных в базе данных IMGT. Сравнительный анализ показывает процент дивергенции последовательности от исходной герминальной последовательности, депонированной в базе. При этом в случае, если различия между анализируемой последовательностью и представленной в базе данных исходной немутированной последовательностью больше 2%, то ген IGHV принимается за мутированный (М). А если различие было меньше 2%, то за немутированный (UM). Немутированный гаплотип является маркером неблагоприятного прогноза (Рис. 16).

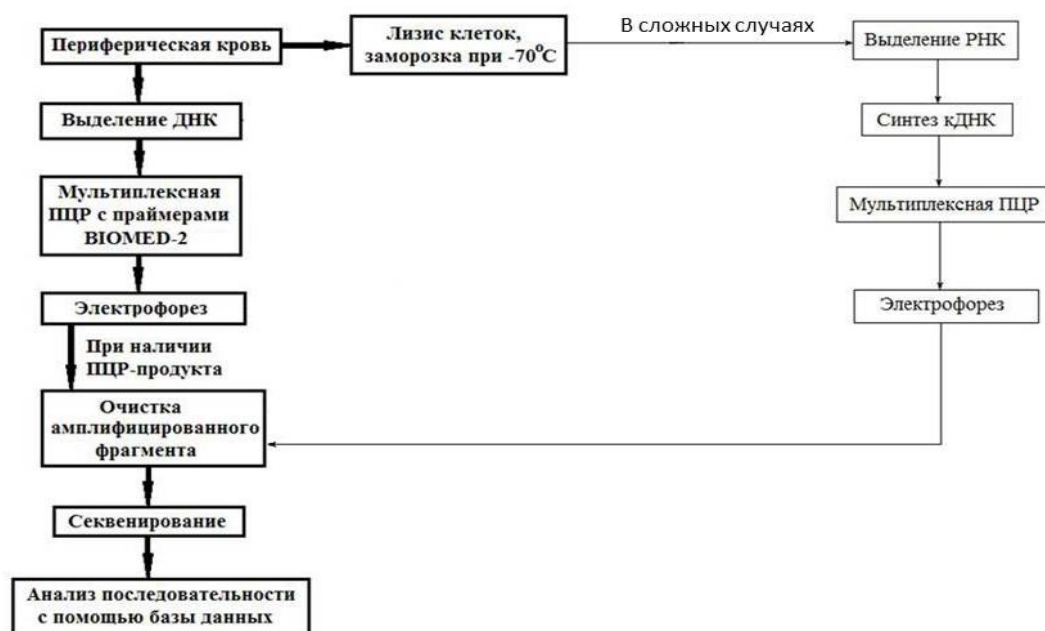


Рисунок 16. Краткая схема проведения исследований мутационного статуса генов IGHV для каждого пациента.

В ходе данной работы мутационный статус генов IGHV был исследован у всех 133 пациентов. Для каждого из них были определены последовательности V, D и J генов, составляющих продуктивные реаранжировки IGHV и установлен мутационный статус. Немутированные последовательности, свидетельствующие о неблагоприятном прогнозе течения заболевания выявлены у 91 пациента (68%). Мутированные, соответствующие благоприятному прогнозу – у 42 пациентов (32%). Полученные данные прекрасно сочетаются с результатами других исследований.

Особый интерес вызывает выявление взаимосвязей между результатами определения мутационного статуса генов IGHV, их стереотипии и наличием мутаций в гене NOTCH1 при ХЛЛ. Это важно для оценки прогностической эффективности данных маркеров и построении четкой иерархии их использования в клинической практике. Поэтому проанализировали мутационный статус генов IGHV отдельно для 17 пациентов, у которых нами были выявлены мутации в гене NOTCH1. Немутированные последовательности, свидетельствующие о неблагоприятном прогнозе течения заболевания выявлены у 11 пациентов (65%). Мутированные, соответствующие благоприятному прогнозу – у 6 пациентов (32%). В ряде работ было показано наличие корреляции между мутационным статусом генов IGHV и наличием мутаций в гене NOTCH1 – при наличии немутированных вариантов генов IGHV мутации в гене NOTCH1 выявлялись чаще. В нашем исследовании мы не наблюдаем статистически значимого увеличения числа мутации в гене NOTCH1 среди пациентов с немутированными вариантами генов IGHV. Возможно это связано с малым размером выборки (Рис. 17).

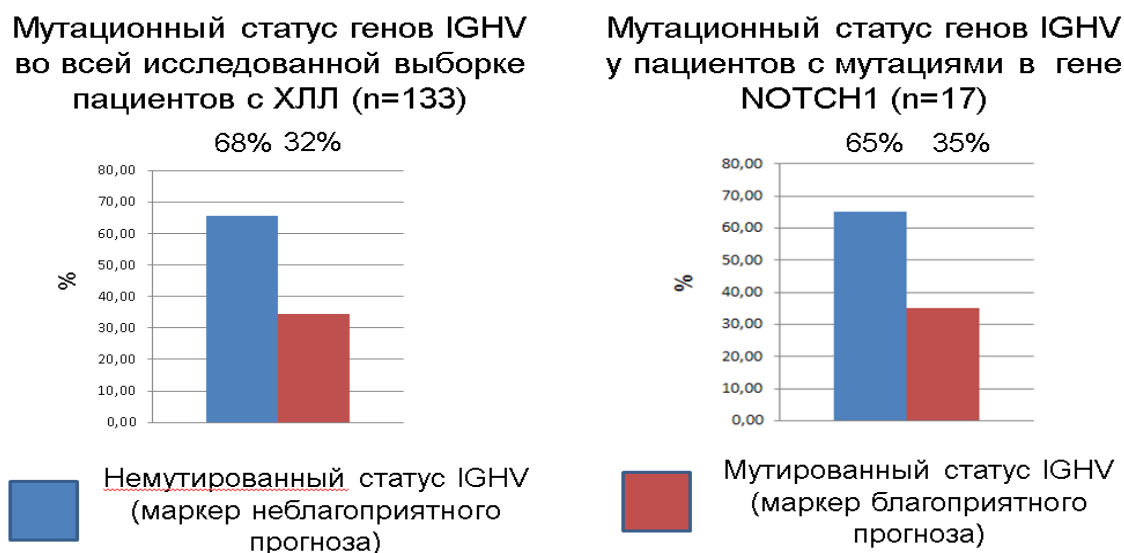


Рисунок 17. Мутационный статус генов IGHV и NOTCH1 у пациентов с ХЛЛ (n=133).

Анализ последовательностей IGHV так же позволяет отнести ряд пациентов к определённым кластерам стереотипии. В ходе данной работы мутация в гене NOTCH1

выявлена у 2 пациентов с последовательностью IGHV, относящейся к кластеру стереотипии 8. Известно, что пациенты, относящиеся к данному кластеру, характеризуются повышенной частотой мутаций в гене NOTCH1 (Stamatopoulos, *et al.*, 2007).

10.3 Получение плазмид, содержащих фрагменты, кодирующие NICD домен гена NOTCH1

На следующем этапе работы были сконструированы плазмиды, содержащие фрагменты гена NOTCH1, кодирующие внутриклеточный домен NICD. Для этого амплифицировали последовательность NICD методом ПЦР. Использовали праймеры NICD-F1 и NICD-R1, кДНК в качестве матрицы и полимеразу *Pfu*. Полученный ПЦР-продукт очищали из геля. Очищенный фрагмент лигировали с линейаризованной плазмидой pJET1.2/blunt по “тупым” концам. Лигазной смесью трансформировали бактериальный штамм DH5alpha и отбирали трансформантов на среде с ампициллином. Из полученных трансформантов выделяли плазмиду и анализировали её методом секвенирования. Полученная плазида pJET1.2-NICDwt содержит последовательность, кодирующую NICD домен гена NOTCH1, соответствующую дикому типу.

Плазмиду pJET1.2-NICDwt использовали для получения последовательности NICD, содержащей делецию СТ. Для этого использовали метод сайт-направленного мутагенеза. Схема конструирования представлена на рисунке . Амплифицировали отдельно фрагменты последовательности с помощью праймеров NICD-F1 и 7544_7545delCT_rev2, а так же NICD-R1 и 7544_7545delCT_fwd2. Полученные фрагменты очищали в агарозном геле. Их смесь использовали в качестве матрицы для проведения второго раунда ПЦР с фланкирующими праймерами NICD-F1 и NICD-R1. Очищали полученный продукт и лигировали в вектор pJET1.2/blunt. Лигазной смесью трансформировали бактериальный штамм DH5alpha и отбирали трансформантов на среде с ампициллином. Из полученных трансформантов выделяли плазмиду pJET1.2/blunt-NICDdelCT и анализировали её методом секвенирования, а так же с помощью метода аллель-специфичной ПЦР, использованного нами ранее для анализа образцов от пациентов (Рис. 18).

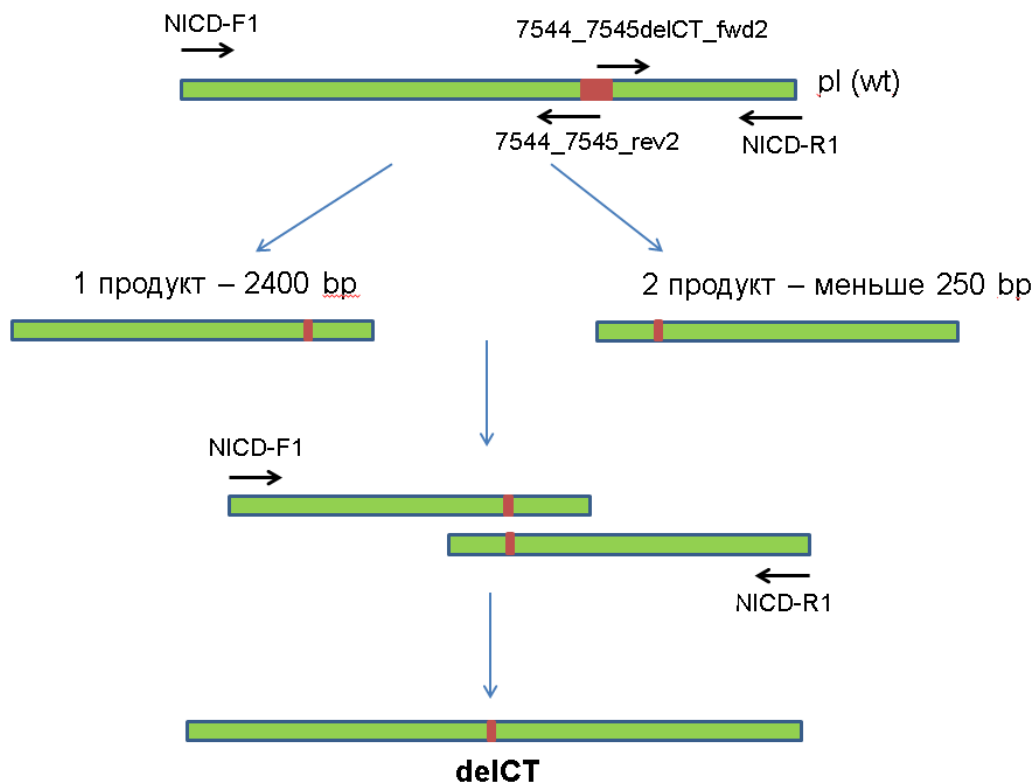


Рисунок 18. Схема получения плазмиды рJET1.2/blunt-NICDdelCT с последовательностью кодирующей NICD домен, содержащий делецию СТ.

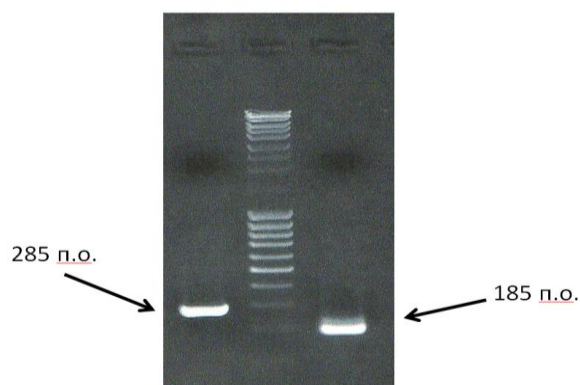


Рисунок 19. Электрофорез результатов аллель-специфичной ПЦР для проверки плазмиды плазмиды рJET1.2/blunt-NICDdelCT. Первая дорожка - контрольная проба (праймеры ForC и ForR). Вторая дорожка – маркер длин фрагментов ДНК MassRuler Mix. Третья дорожка – опытная проба (праймеры ForMut и ForR). Выявили наличие требуемой делеции.

10.4 Исследование представленности мутаций в гене NOTCH1

Последние исследования, проведённые с помощью методов секвенирования нового поколения, показали, что представленность клеток с мутацией NOTCH1 может сильно варьировать у разных пациентов (Рис. 20).

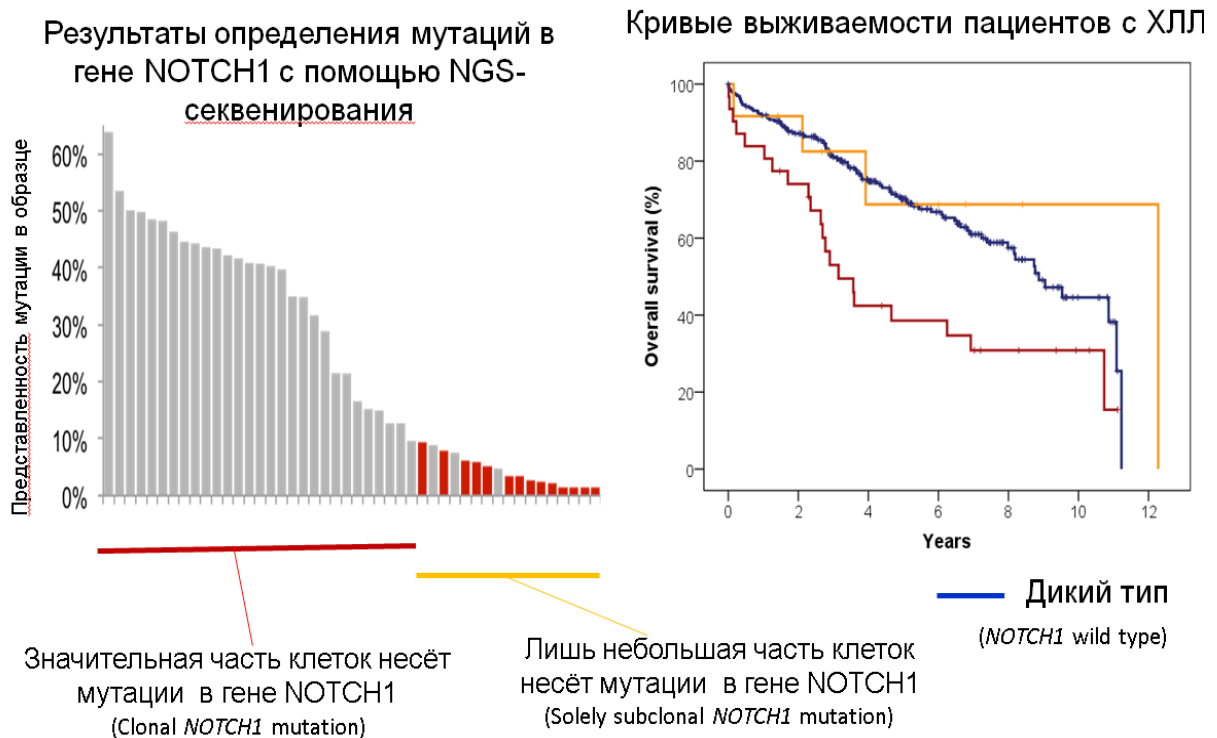


Рисунок 20. Различная представленность мутаций в гене NOTCH1 у пациентов (по Robin, 2014).

Для исследования представленности мутаций у пациентов из исследованной выборки проводили количественную оценку мутаций NOTCH1 с помощью ПЦР в режиме реального времени. Для этого использовали раствор полученной ранее плазмиды pJET1.2/blunt-NICDdelCT с известной концентрацией. Исходя из концентрации и размера плазмиды pJET1.2/blunt-NICDdelCT рассчитывали количество её копий, а следовательно количество копий фрагмента NICDdelCT в растворе. Делали десятикратные разведения раствора плазмиды и использовали их в качестве образцов для построения калибровочной кривой при проведении ПЦР (от 10^9 до 10^2 копий на пробу). Исходя из полученных результатов строили калибровочную кривую, позволяющую по значению порогового цикла определить число копий исходной матрицы.

Далее проводили ПЦР с образцами 16 пациентов, для которых было ранее показано наличие делеции c.7544-7545delCT. При этом для каждого образца проводили амплификацию и с праймерами ForC и Rev, комплементарные всем копиям гена

NOTCH1 в пробе и с праймерами ForMut и Rev, где ForMut комплиментарен только последовательностям, несущим делецию. Для каждого варианта делали две повторности. С помощью калибровочных кривых рассчитывали количество исходной матрицы. Далее рассчитывали представленность мутации в образце как отношение количества мутантных копий гена NOTCH1 к общему числу копий (Рис. 21).



Рисунок 21. Количественная оценка представленности мутации с.7544-7545delCT в гене NOTCH1 с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Показано, что та часть образцов с мутациями NOTCH1 что были выявлены секвенированием по Сэнгеру имеет наибольшую представленность мутаций (более 15%). ПЦР детекция позволила выявить мутацию в тех образцах, где она была представлена заметно меньше (менее 15%).

10.5 Создание конструкций для экспрессии фрагментов гена NOTCH1

Первый этап работы по созданию клеточных линий подразумевает клонирование последовательности гена NOTCH1 в вектор для экспрессии (Рис. 22). Для этого использовали вектор LeGO-1xT/BSD. Последовательности, кодирующие фрагменты NICD домена, были вырезаны из плазмид pJET1.2blunt-NICDwt и pJET1.2blunt-NICDdelCT с помощью эндонуклеаз рестрикции BsrGI и EcoRI. Этими же рестриктазами был обработан вектор LeGO-1xT/BSD, который затем обработали фосфатазой FastAP.

Полученные фрагменты очищали в агарозном геле и лигировали. Лигазной смесью трансформировали бактериальный штамм DH5alpha и отбирали трансформантов на среде с ампициллином. Из полученных трансформантов выделяли плазмиду и анализировали её методом секвенирования. Таким образом были получены вектора LeGO-1xT- NICDwt и LeGO-1xT-NICDdelCT, содержащие мутированную и немутированную последовательности гена NOTCH1, соответствующие NICD домену, встроенные в рамку считывания с последовательностью гена флуоресцентного белка dTomato.

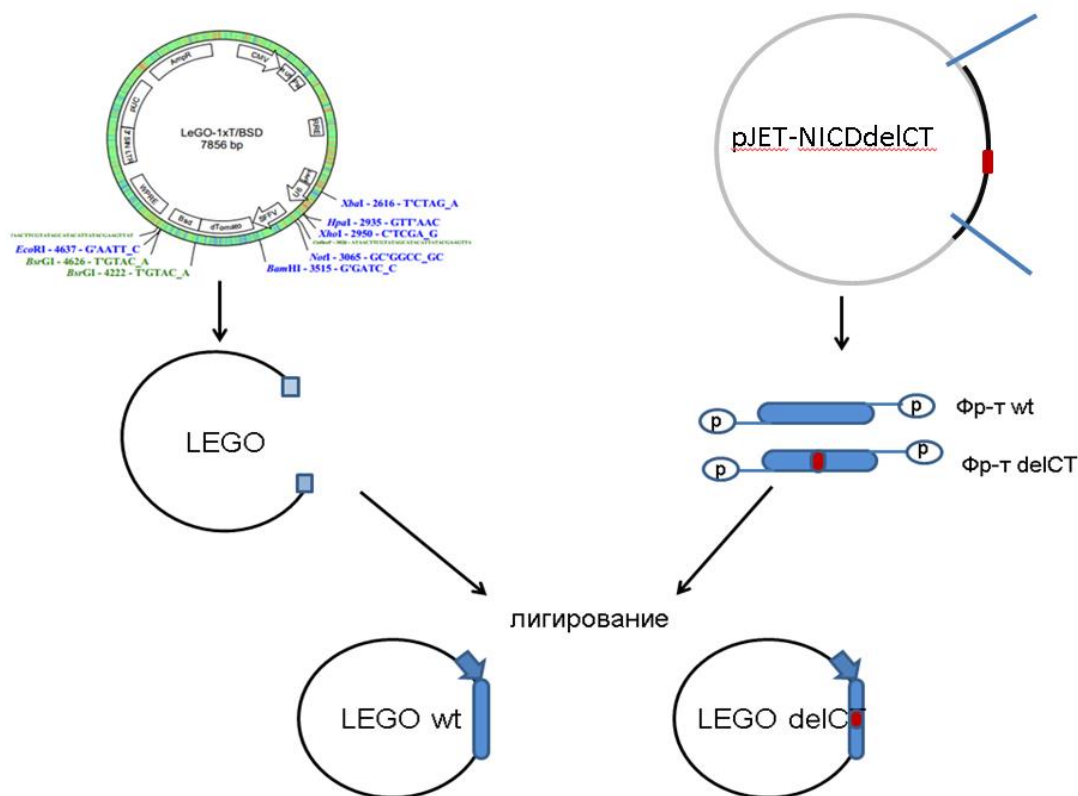


Рисунок 22. Схема конструирования векторов для экспрессии фрагментов гена NOTCH1, кодирующих NICD.

10.6 Получение клеточных линий экспрессирующих фрагменты гена NOTCH1

Полученные вектора LeGO-1xT- NICDwt и LeGO-1xT-NICDdelCT использовали для трансдукции клеточной линии CLL-HG3.

За день до трансфекции клетки НЕК293Т рассеивались на чашки Петри (10 см) по 2.5×10^6 на чашку. Среда использовалась DMEM, 10% FBS, 2мМ L-глутамин, пенициллина 50МЕ/мл, стрептомицина 50 мкг/мл). На следующий день осуществляли трансфекцию (процесс введения последовательностей нуклеиновых кислот в клетки эукариот). В пробирке смешивали 3 плазмиды: psPAX2 (9,75 мкг), pMD2G (5,27 мкг),

LeGO (15 мкг); плазмиды в ТЕ (1мМ Трис-НСl, 1мМ ЭДТА, рН 7,4) добавили 73,5 мкл СаСl (2.5 М) и стерильную воду до конечного объема 760 мкл. Полученную смесь по каплям вливали в пробирку с HSB (280 мМ NaCl, 1,5 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ HEPES, рН 7,13), перемешивая на вортексе. Инкубировали 15 минут при комнатной температуре, затем добавляли по каплям в чашку Петри с 7 мл полной среды.

Наутро следующего дня меняли среду на свежую объемом 6 мл. Спустя 48 часов собирали среду и фильтровали через PES мембрану 0.45 мкм. Вирус концентрировали на ультрацентрифуге avanti beckman 72 000 g, 4°C, 2 часа. Осадок растворяли в течении 4 часов на льду в 300 мкл PBS. После концентрированный вирус замораживали и хранили при температуре -80°C. Титр вируса определяли заражая клеточную линию HELA объемами 10, 5, 1, 2, 3, 0.5 мкл концентрированного вируса (50 000 клеток на лунку 12-ти луночного планшета). Титр определяли по формуле $T = 50\ 000 * 0.12 / 0.001\text{ml} = 6 \times 10^6/\text{ml}$

Трансдукция клеточной линии CLL-HG3 осуществлялась в условиях множественного заражения MOI 10 (10 вирусных частиц на одну клетку), добавляя в среду для заражения (RPMI1640 с 10% FBS, 2мМ L-глутамина, пенициллина 50МЕ/мл и стрептомицина 50 мкг/мл, необходимый объем концентрированного вируса, 6 мкг/мл polibrane). На следующий день среду для заражения меняли на среду на культивирование RPMI1640 с 10% FBS, 2мМ L-глутамина, пенициллина 50МЕ/мл и стрептомицина 50 мкг/мл.

Флаконы с CLL-HG3 помещают в CO₂-инкубатор, в котором поддерживаются оптимальные условия – температура 37°C, концентрация CO₂ – 5 %, относительная влажность – 95 %. После 48 часов культивирования наливают новую питательную среду. В дальнейшем, смена питательной среды осуществляется раз в 2 –3 дня.

В последующих работах будет рассмотрена зависимость экспрессии гена NOTCH1 и NOTCH1-регулируемых генов в созданной клеточной линии CLL-HG3 (Рис. 23).

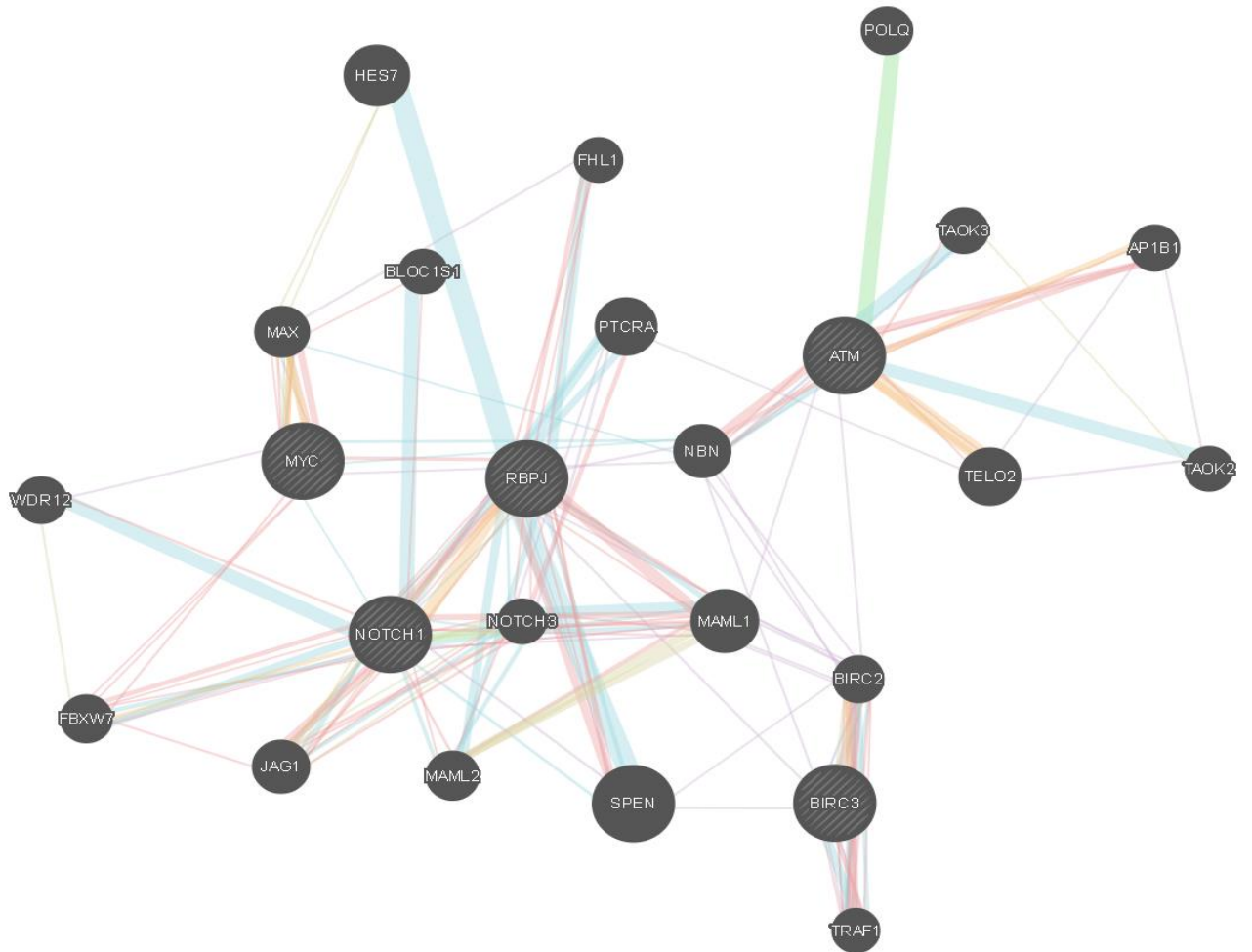


Рисунок 23. Связь NOTCH1 с другими генами.

11. Выводы

1. В исследованной выборке мутации в гене NOTCH1 обнаружены у 13% пациентов.
2. У исследованных пациентов наблюдаются значимые различия в представленности мутаций в гене NOTCH1.
3. Получены линии, характеризующиеся сверхэкспрессией участков гена NOTCH1, кодирующих NICD домен.

12. Список литературы

1. Клиническая онкогематология: руководство для врачей / под ред. проф. М. А. Волковой (2-е изд.). М.: ОАО Изд-во Медицина. 2007. 1120с.
2. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас, Москва, 2008, стр. 140-142.
3. Никитин Е.А., Н.М., Байков В.В., Бакиров Б.А., Бессмельцев С.С., Загоскина Т.П., Ковригина А.М. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического лимфолейкоза (версия 2012 г). Современная онкология, 2012(4): р. 10 - 14.
4. Хоффбранд В., Петтит Дж., Справочник гематология, 2007; 211-226.
5. Ярилин А.А., Иммунология, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010-752 с.
6. Allenspach E.J., Maillard I., Aster J.C., Pear W.S., Notch signaling in cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2002:466-76.
7. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48 (1): 198–206.
8. Burger J.A., Ghia P., Rosenwald A., Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009; 114:3367-3375.
9. Chiorazzi N., Ferrarini M., Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011; 117(6):1781–91. .
10. Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M., Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 352 (8):804–15.
11. Darzentas N., Hadzidimitriou A., Murray F., Hatzi K., Josefsson P., Laoutaris N., et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. 2010; 24(1): 125–32.
12. Davis R., Ngo V., Lenz G., Tolar P., Young R.M., Romesser P.B., et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010; 463:88-92.
13. Deepesh P., Pankaj M., Subhash V., Chronic Lymphocytic Leukemia: Inception to Cure: Are We There? *Blood*. 2013.
14. Dighiero G., Hamblin T.Y., Chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 2008; 371: 1017–29.
15. Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343(26): 1910–6.
16. Fabbri G., Rasi S., Rossi D., Trifonov V., Khiabani H., Ma J., et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011; 208(7):1389-401.

17. Fabbri G., Rasi S., Rossi D., Trifonov V., Khiabani H., Ma J., et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational active. *J. Exp. Med.* 2011; 208(7): 1389–401. doi: 10.1084/jem.20110921
18. Ferrando A.A., The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2009; 353–61. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.353.
19. Fortini M.E., Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* 2009; 16: 633–647.
20. Ghia P., Stamatopoulos K., Belessi C., et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105(4): 1678-85.
21. Gianfelici V., Activation of the NOTCH1 pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Editorials and Perspectives.* 2012.
22. Gluzman D.F., Sklyarenko L.M., Zavelevich M.R., et al. Hematological malignancies in Chernobyl clean-up workers (1996– 2010). *J Hematol Malignancies* 2012; 2 (4): 43–50.
23. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111: 5446-56, 2008.
24. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D.G., Stevenson F.K., Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999; 94(6):1848–54.
25. Hamblin T.Y., Have we been wrong about ionizing radiation and chronic lymphocytic leukemia? *Leuk Res* 2008; 32: 523–25.
26. Herishanu Y., Perez-Galan P., Liu D., Biancotto A., Pittaluga S., Vire B., et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117:563–74.
27. Herman S.E., Gordon A.L., Hertlein E., Ramanunni A., Zhang X., Jaglowski S., et al. Bruton's tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011; 117:6287-6296.
28. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., Garshell J., Miller D., Altekruse S.F., et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, April 2014.
29. Jemal A., Siegel R., Ward E., et al. *Cancer Statistics, 2008.* *CA Cancer J Clin* 2008; 58 (2): 71–96.
30. Jung D., Giallourakis C., Mostoslavsky R., et al. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:541-70.
31. Klein U., Goossens T., Fischer M., et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 1998; 162: 261-80.

32. Lanasa M.C., Allgood S.D., Weinberg J.B., Monoclonal B cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* 2010; 51 (8): 1386–88.
33. Leong K.G., Karsan A., Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*. 2006; 107(6):2223-33.
34. Malek S.N., The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013; 32(23):2805–17.
35. Mansouri L., Cahill N., Gunnarsson R., Smedby K.E., Tjønnfjord E., Hjalgrim H., et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27(2): 512–4. doi: 10.1038/leu.2012.307.
36. Moeller R.E., Cornejo M., Davis T.N., Del Bianco C., Aster J.C., Blacklow S.C., et al. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature*. 2009; 462(7270):182-8.
37. Nemazee D., Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 728-40.
38. Palomero T., Dominguez M., Ferrando A.A., The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle* 2008; 7: 965–970.
39. Palomero T., Lim W.K., Odom D.T., Sulis M.L., Real P.J., Margolin A., et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feedforward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18261–18266.
40. Pleasance E.D., Stephens P.J., O’Meara S., McBride D.J., Meynert A., Jones D., et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*. 2010; 463(7278): 184–90. doi: 10.1038/nature08629.
41. Puente X.S., Pinyol M., Quesada V., Conde L., Ordóñez G.R., Villamor N., et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011; 475(7354): 101–5. doi: 10.1038/nature10113.
42. Puente X.S., Pinyol M., Quesada V., Conde L., Ordóñez G.R., Villamor N., et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011; 475(7354): 101–5. doi: 10.1038/nature10113.
43. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012; 44:47–52.
44. Quiroga M.P., Balakrishnan K., Kurtova A.V., Sivina M., Keating M.J., Wierda W.G., et al. B cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel Syk inhibitor, R406. *Blood*. 2009; 114:1029-1037.
45. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46 (2): 219–34.

46. Rosati E., Sabatini R., Rampino G., Tabilio A., Di Ianni M., Fettucciari K., et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009; 113(4): 856–65. doi: 10.1182/blood-2008-02-139725.
47. Savli H., Sunnetci D., Cine N., et al. Gene expression profiling of B-CLL in Ukrainian patients in post-Chernobyl period. *Exp Oncol* 2012; 34: 57–63.
48. Schatz D.G., Spanopoulou E., Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 290: 49-85.
49. Schlissel M.S., Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol*, 3: 890-9, 2003.
50. Screpanti I., Bellavia D., Campese A.F., Frati L., Gulino A., Notch, a unifying target in T-cell acute lymphoblastic leukemia? *Trends MolMed* 2003; 9: 30–35.
51. Shanafelt T.D., Kay N.E., Rabe K.G., et al. Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27 (24): 3959–63.
52. Shumacher H.R., Cotelingham J.D., Chronic leukemia. Approach to diagnosis. New York, Tokyo: IgakuShoi Med Publ1993; 354 p.
53. Stavnezer J., Guikema J.E., Schrader C.E., Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*, 26: 261-92, 2008.
54. Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F., Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389-95.
55. Tiegs S.L., Russell D.M., Nernazee D., Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1009-20.
56. Tze L.E., Schram B.R., Lam K.P., et al. Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol* 2005; 3: e82.
57. Van Zelm M.C., Van der Burg M., De Ridder D., et al. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol* 2005; 175: 5912-22.
58. Villamor N., Conde L., Martínez-Trillos A., Cazorla M., Navarro A., Beà S., et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013; 27(5): 1100 – 6.
59. Willander K., Dutta R., Ungerback J., Gunnarsson R., Juliusson G., Fredrikson M., Linderholm M. and Söderkvist P., NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer* 2013, 13:274.
60. Young R.M., Staudt L.M., et al. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013; 12:229-243.
61. Zenz T., Mertens D., Kuppers R., Dohner H., Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 10(1): 37 - 50.