

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

**ЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЙ ГЕНА *NOTCH1* ДЛЯ ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОЇ
ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ**

(методичні рекомендації)

Київ – 2019

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ



«ЗАТВЕРДЖЕНО»

Начальник
лікувально-організаційного
управління НАМН України

І. Д. Шкробанець
2019 р.

**ЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЙ ГЕНА *NOTCH1* ДЛЯ ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ ХРОНІЧНОЇ
ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ**

(методичні рекомендації)

Київ – 2019

Установа-розробник:

ДУ „Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України” (ННЦРМ)

Укладачі:

Чумак Анатолій Андрійович, д.м.н., проф., засл. діяч науки і техніки України	(044) 452-00-24;
Абраменко Ірина Вікторівна, д.м.н., проф.	(044) 451-82-63;
Дягіль Ірина Сергіївна, д.м.н., ст.н.с. засл.лікар України	(044) 450-23-29;
Білоус Надія Іванівна, к.б.н., ст.н.с.	(044) 451-82-63;
Мартіна Зоя Володимирівна, к.м.н.	(044) 451-82-12.

Рецензент: завідувач н/д відділення хіміотерапії гемобластозів та ад’ювантних методів лікування Національного інституту раку, д.м.н., професор І.А. Крячок

Рішення проблемної комісії «Гематологія та трансфузіологія», протокол № 4 від 12 грудня 2019 р.

Голова проблемної комісії «Гематологія та трансфузіологія» МОЗ та НАМН України
чл-кор. НАМН України, д-р мед.наук, проф. В.Г.Бешко

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, скорочень і термінів	5
Вступ	6
1 Визначення мутацій гена <i>NOTCH1</i>	7
2 Значення мутацій гена <i>NOTCH1</i> для прогнозу перебігу хронічної лімфоцитарної лейкемії	12
3 Підходи до терапії хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію за умов наявності мутацій гена <i>NOTCH1</i>	13
Висновки	14
Перелік рекомендованої літератури	15

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ЕДТА	- етилендіамінотетраоцтова кислота
мкАТ	- моноклональні антитіла
п.н.	- пари нуклеотидів
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
ХЛЛ	- хронічна лімфоцитарна лейкемія
ΔCt	- дельта Ct, різниця між показником Ct гена <i>NOTCH1</i> і Ct референтного гена
В2М	- β-мікроглобулін (β-microglobulin)
Ct	- пороговий цикл
ForMUT	прямий праймер до мутованої алелі гена <i>NOTCH1</i>
<i>IGHV</i> гени	- гени варіабельних ділянок важких ланцюгів імуноглобулінів (immunoglobulin heavy chain variable region)
KHCO ₃	- калію бікарбонат
OS	- загальне виживання (overall survival)
PEST послідовності	- послідовність, збагачена проліном (P), глутаміновою кислотою (E), серіном (S) та треоніном (T)
PFS	- безрецидивне виживання (progression free survival)
Rev	- зворотний праймер при визначенні мутацій гена <i>NOTCH1</i>
SD	- стандартне відхилення

ВСТУП

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) В-клітинного походження належить до найпоширеніших злоякісних новоутворень кровотворної системи дорослого населення України. Механізми, які призводять до появи клону трансформованих клітин, остаточно невідомі. Описані мутації низки генів, зокрема, гена *NOTCH1*, регулятора сплайсингу мРНК гена *SF3B1*, генів-супресорів пухлинного росту *TP53* та *ATM*, регуляторів передачі сигналу через В-клітинний рецептор (*MYD88*, *BIRC3*, *NFKBIE*).

Мутації гена *NOTCH1* відносяться до таких, що виявляються вже на ранніх стадіях розвитку злоякісно трансформованих лімфоцитів при ХЛЛ, зокрема в $CD34^+CD19^-$ клітинах-попередниках, у хворих на моноклональний В-лімфоцитоз. Тому їх появу можна вважати одним з пускових механізмів розвитку пухлинного клону.

Активуючі мутації гена *NOTCH1* у хворих на В-ХЛЛ були виявлені вперше у 2011 р. (Fabbri et al., 2011). Переважна більшість мутацій розташована у 34-му екзоні, що кодує PEST послідовність [пролін (P), глутамінова кислота (E), серін (S) та треонін (T) збагачена послідовність] С-термінальної частини внутрішньоклітинного домену Notch рецептора, і представлена делецією с.7544_7545delCT. З послідовністю PEST зв'язується SEL-10 білок E3 родини убіквітин-протеїн лігаз, що є необхідною умовою для наступної деградації в протеосомах вільної частини Notch рецептора, переміщеної до ядра клітин, та припинення Notch-індукованої транскрипції генів. Мутації PEST послідовності призводять до зсуву рамки зчитування та часткової або повної делеції PEST ділянки у складі білка, що збільшує період напіврозпаду білка Notch, підвищує його транскрипційну активність і сприяє проліферації пухлинного клону клітин.

За даними Fabbri et al. (2013) частота мутацій гена *NOTCH1* у 34-му екзоні становила 8,3 % у хворих, обстежених на момент встановлення діагнозу, 20,8 % – серед хворих, резистентних до терапії пуриновими аналогами, і 31 % у пацієнтів з синдромом Ріхтера.

В дослідженні Puente et al. (2015) у хворих на ХЛЛ виявлений новий тип мутацій – у 3'UTR некодуючому регіоні гена *NOTCH1*, які реалізуються у появі сайту альтернативного сплайсингу мРНК і делеції кодуючої ділянки PEST домена. Частота таких мутацій незначна (0,9 – 2,6 %), а прогностичне значення не відрізняється від прогностичного значення делеції с.7544_7545delCT.

В методичних рекомендаціях, котрі базуються на результатах власних досліджень мутацій гена *NOTCH1* у 237 хворих на ХЛЛ, в тому числі і пацієнтів, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, які лікувались в

гематологічному відділенні ДУ «ННЦРМ НАМН України», представлені нові підходи до визначення мутацій, проаналізовано їх значення для прогнозу безрецидивного і загального виживання хворих на ХЛЛ, охарактеризовані підходи до терапії хворих з наявністю зазначених мутацій.

Робота була виконана в рамках НДР „Дослідити роль *c-MYC* онкогенного шляху в розвитку хронічної лімфоцитарної лейкемії в постчорнобильській період”, № держреєстрації 0117U000623.

Методичні рекомендації призначені для використання лікарями-гематологами, онкологами, трансплантологами обласних медичних установ і науково-дослідних інститутів, які займаються діагностикою та лікуванням зазначеної групи хворих, а також для спеціалістів з молекулярної біології діагностичних лабораторій медичних установ України. Дані, викладені в методичних рекомендаціях, опубліковані вперше.

1. Визначення мутацій гена *NOTCH1*

Матеріалом для дослідження являються зразки венозної крові (2 – 3 мл), відібрані в пробірки, що містять антикоагулянт – етилендіамінотетраоцтову кислоту (ЕДТА) в концентрації 1,2 – 2 мг на 1 мл зразка крові або гепаринат натрію (10 – 20 ОД на 1 мл зразка крові). Час з моменту взяття крові до початку молекулярно-генетичних досліджень не повинен перевищувати 24 год. В цей період зразок крові повинен зберігатись при температурі 3 – 8⁰ С.

До 1 мл зразка крові додають 5 мл лізуючого розчину, який складається з амонію хлориду (NH₄Cl) – 8,26 г; калію бікарбонату (KHCO₃) – 1 г; трилону Б (Na₂ЕДТА) —0,037 г та дистильованої води – до 1 л, ретельно перемішують, проводять інкубацію протягом 30 хв. при кімнатній температурі та центрифугують 10 хв. при 1500 об/хв. Отриманий осад клітин використовують для виділення ДНК або заморожують при -20⁰ С та зберігають для подальшого дослідження.

Отримання ДНК проводять за допомогою колонкового методу, використовуючи відповідні набори реагентів (Qiagen, Macherey-Nagel та ін.), згідно інструкції виробників наборів.

Для визначення найпоширенішої мутації гена *NOTCH1*, а саме делеції *c.7544_7545delCT*, що призводить до втрати PEST домену, нами запропонований метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі з використанням оригінальних праймерів:

- прямий до мутованої алелі (ForMUT): 5`– TCCTCACCCCGTCCCGA – 3`;

- зворотний (Rev): 5` – AAGGCTTGGGAAAGGAAGC – 3`

В якості референтного гену доцільно використовувати визначення β -мікроглобуліну (β -microglobulin, B2M), ефективність ампліфікації якого співпадає, за нашими даними, з ефективністю ампліфікації мутованого гену *NOTCH1*.

Праймери для визначення гену B2M наступні:

- прямий: 5` – CGGGCATTCCTGAAGCTGA – 3`;

- зворотний: 5` – GGATGGATGAAACCCAGACACATAG – 3`

Суміш для ПЛР готують на основі реакційної суміші Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix x2 (Thermo Scientific, USA), що включає барвник SYBR Green I, ДНК полімераза, дезоксинуклеозидтрифосфати, іони магнію, реакційний буфер. До 12,5 мкл реакційної суміші додається матриця ДНК (50 нг на пробу), 0,175 мкл кожного праймера та деіонізована вода до фінального об'єму 25 мкл. Всі проби ДНК слід аналізувати у дуплеті.

Негативним контролем є проби, в яких матриця ДНК відсутня.

ПЛР проводиться на ампліфаторах з детекцією результатів реакції у реальному часі (ABI 7500, Applied BioSystem; CFX96 Touch, Bio-Rad MyQ2, BioRad; Rotor Gene Q, Qiagen та інші). Умови проведення ПЛР наступні: первинна денатурація ДНК (95° С 15 хв.) та 40 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій: (денатурація, 95° С 15 сек.; відпалювання праймерів, 60° С 30 сек.; елонгація, 72° С 30 сек.).

Оцінку результатів реакції проводять за визначення порогового циклу C_t , який вказує на перехід графіка ампліфікації з лінійної до експоненційної фази (рис.1).

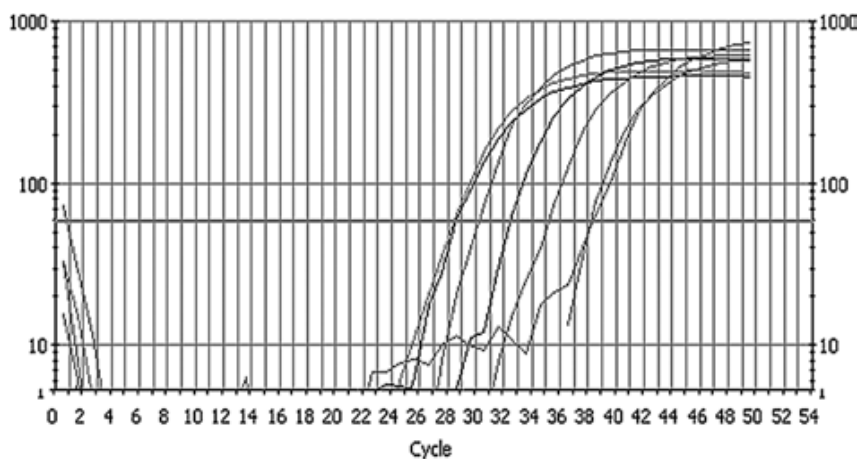


Рисунок 1 – Результати полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі визначення делеції с.7544_7545delCT у гені *NOTCH1*. По осі абсцис – кількість циклів ампліфікації; по осі ординат – відносна інтенсивність флуоресценції (десятичний логарифм різниці між флуоресценцією зразків та фоновим значення)

Рівень експресії мутованого гена *NOTCH1* визначають за показником дельта Ct (ΔC_t), який дорівнює різниці між показником Ct мутованого гена *NOTCH1* і Ct гена B2M.

Після закінчення ампліфікації доцільно проводити аналіз кривої плавлення. З цією метою після закінчення ПЛР реакційну суміш нагрівають, безперервно вимірюючи флуоресценцію. За досягнення температури плавлення продукту ампліфікації флуоресценція різко знижується. Амплікони, які містять делецію c.7544_7545delCT, плавляться при температурі 91 °C у вигляді одного піку (рис. 2).

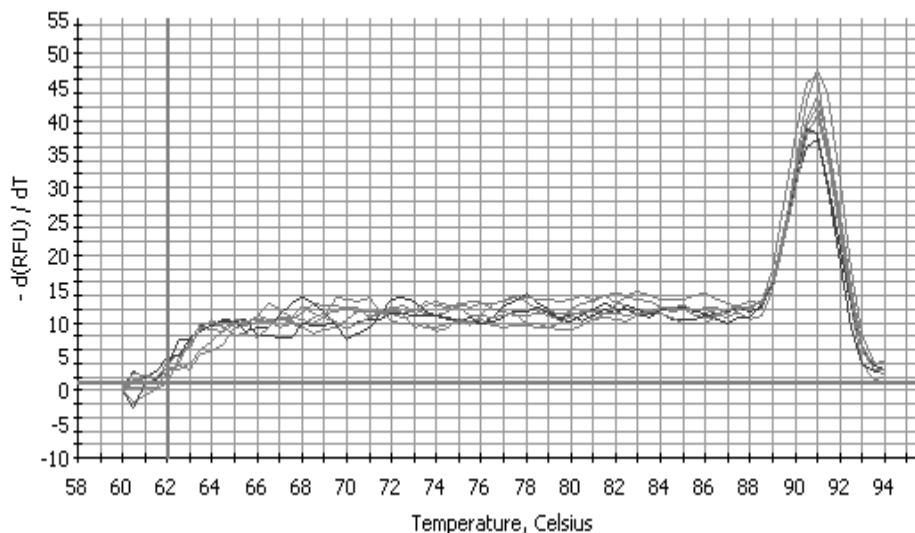


Рисунок 2 – Результати плавлення ампліконів, які містять делецію c.7544_7545delCT у гені *NOTCH1*. По осі абсцис – температура плавлення; по осі ординат – співвідношення відносної флуоресценції до температури плавлення

Вказаний метод дозволяє не тільки визначити наявність делеції c.7544_7545delCT, але і оцінити величину пухлинного клону. За відсутності можливості провести ПЛР у реальному часі, можливо проводити визначення делеції c.7544_7545delCT методом алей-специфічної ПЛР з подальшим поділом продуктів реакції у гель-електрофорезі (прилади для горизонтального електрофорезу виробництва Bio Rad, Invitrogen та інші).

З цією метою готують суміш для ПЛР, до складу якої входять: матриця ДНК (50 нг на пробу), 15 мкл концентрованої вдвічі реакційної ПЛР суміш Master Mix (Fermentas, Литва), вищенаведені праймери ForMUT (0,4 мкМ), Rev (0,5 мкМ), вода деіонізована до фінального об'єму 30 мкл, а також 0,1 мкМ праймера до немутованої алелі гена *NOTCH1*:
5' – GTGACCGCAGCCCAGTT – 3'

Для ампліфікації використовують прилади для ПЛР у класичному варіанті (Bio Rad, Invitrogen та інші). Умови проведення ПЛР наступні: первинна денатурація ДНК (95°

С 15 хв.); 30 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій: (денатурація, 95° С 30 сек.; відпалювання праймерів, 59° С 40 сек.; елонгація, 72° С 40 сек.); фінальна елонгація 72° С 40 сек.

Ампліфіковані алелі сепарують у 2 % агарозному гелі та візуалізують за забарвленням етидієм бромідом. В зразках повинна були присутня смуга 283 пар нуклеотидів (п.н.), яка відповідає ампліфікованому немутуваному гену *NOTCH1*. У випадках мутацій гена *NOTCH1* додатково також виявляється смуга 183 п.н. (рис. 3).

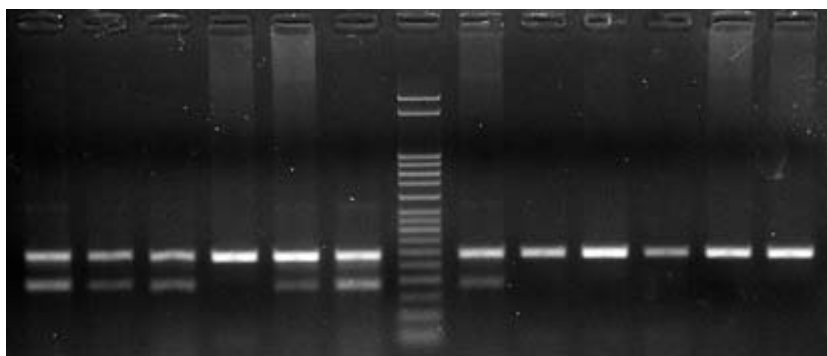


Рисунок 3 – Результати визначення делеції с.7544_7545delCT у гені *NOTCH1* методом полімеразної ланцюгової реакції з рестрикцією продуктів реакції

Визначення мутацій в 3'UTR некодуючому регіону гена *NOTCH1* доцільно проводити методом прямого секвенування (рис. 4). Для дослідження нами були розроблені оригінальні праймери:

- прямиий праймер 5' – CCGACCAGAGGAGCCTTTT – 3'
- зворотний праймер 5' – TCTGGGAAGGGACAGAAG ATGAC – 3'.

Ампліфікацію проводимо з 50 нг ДНК в суміші для ПЛР загальним об'ємом 25 мкл, що включає 200 нМ кожного праймера і суміш для ампліфікації PCR MasterMix (Fermentas, Литва). Режим ампліфікації наступний: ініціація - 95°С, 3 хв., потім 35 циклів ампліфікації (95 °С – 30 сек., 61 °С – 30 сек., 72 °С – 40 сек.), фінальна елонгація 72 °С – 40 сек. Проводять електрофорез у 3 % агарозному гелі для контролю ефективності ампліфікації. В усіх випадках утворюється продукт довжиною 441 п. н.

У випадку неможливості провести секвенування продуктів реакції можливо використати рестрикційний аналіз. Отриманий продукт реакції обробляють рестриктазою PfiI (TfiI) (Thermo Fisher Scientific) протягом 6 годин при температурі 37 °С. Після рестрикції повторно проводять електрофорез у 3 % агарозному гелі.

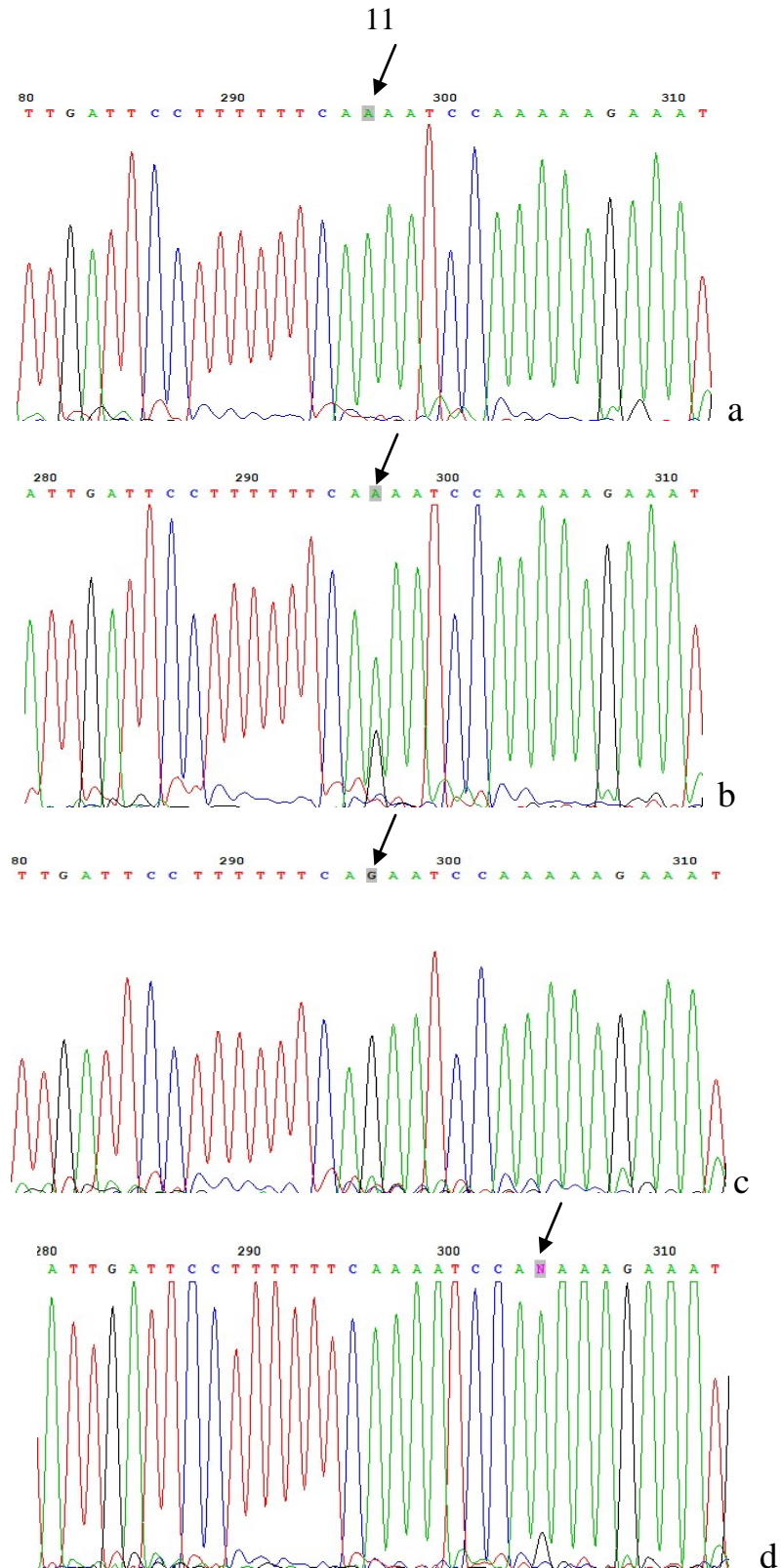


Рисунок 4 – Результати прямого секвенування за Sanger методом ділянки 3'UTR гена *NOTCH1*. а) нормальна послідовність, б) мутація A>G, g.139390152, в) біалельна мутація A>G, g.139390152, д) мутація A>G, g.139390145

За відсутності мутацій утворюються фрагменти з молекулярною масою 219 і 159 п. н. За умов утворення фрагментів 219, 145 і 14 п. н., результати реакції розцінюються як

позитивні і свідчать про наявність мутацій гена *NOTCH1* у 3'UTR некодуючому регіоні (патент України на корисну модель UA 123082. Спосіб визначення мутацій гена *NOTCH1* у 3'UTR некодуючому регіоні. Автори: Білоус Н.І., Абраменко І.В., Чумак А.А. Дата публікації 12.02.2018, бюл.№3).

2. Значення визначення мутацій гена *NOTCH1* для прогнозу перебігу хронічної лімфоцитарної лейкемії

Мутації гена *NOTCH1* відносяться до прогностично несприятливих мутацій і дозволяють ідентифікувати хворих на ХЛЛ по групам ризику. Запропоновано включити наявність мутацій гена *NOTCH1* в систему факторів негативного прогнозу ХЛЛ як незалежний чинник, додатково до визначення делецій 11q, мутацій генів *SF3B1*, *TP53* та трисомії 12 хромосоми (Mansouri et al., 2013). За даними зазначеної групи дослідників хворі з мутаціями гена *NOTCH1* відносяться до групи проміжного ризику з показником 10-річного виживання 37 %.

Аналіз власних і літературних даних показав, що мутації гена *NOTCH1* асоційовані з наступними біологічними і клінічними характеристиками ХЛЛ:

- при постановці діагнозу: із стадіями захворювання В II і С III – С IV за Rai et al., Binet et al., вищим ініціальним лейкоцитозом, більш вираженою лімфаденопатією, іншими маркерами несприятливого перебігу (немутований статус генів імуноглобулінів, *IGHV*; висока експресія антигенів CD38 і ZAP-70);
- коротшими періодами до початку терапії та безрецидивного виживання (PFS);
- підвищеною частотою трансформації Ріхтера.

Серед обстежених нами 237 хворих на ХЛЛ мутації гена *NOTCH1* були виявлені у 33 пацієнтів (13,9 %). Переважна більшість з них (30 випадків) була представлена делецією c.7544_7545delCT, у трьох хворих ідентифіковано мутації 3'UTR регіону гена. При постановці діагнозу хворі з мутаціями гена *NOTCH1* порівняно з хворими без мутацій частіше були у стадії ВII за класифікаціями Binet та Rai (53,3 % та 39,3 %, відповідно; $p = 0,011$), мали вищий ініціальний лейкоцитоз ($39,69 \pm 3,36$ проти $62,15 \pm 14,85$ Г/л; $p = 0,042$), а в лейкемічних клітинах практично в усіх випадках експресувались немутовані *IGHV* гени (96,7 % проти 65,1 %; $p = 0,001$).

Медіана PFS становила 43 міс. у хворих з мутаціями гена *NOTCH1* та 49 міс. у хворих без мутацій гена *NOTCH1*, $p = 0,036$. Крім того, тривалість PFS залежала від рівня експресії мутованого *NOTCH1*. За показниками ΔC_T обстежені хворі були розділені на три підгрупи залежно від рівня експресії:

$\Delta C_T <$ середнього значення – стандартне відхилення (SD);

$\Delta C_T >$ середнього значення + SD;

$\Delta C_T >$ середнього значення – SD, але $<$ середнього значення + SD.

Медіана PFS склала 16 міс. для хворих з високим рівнем експресії *NOTCH1* ($\Delta C_T <$ 2,52; середнє значення - SD), 36 міс. для хворих з проміжними показниками ΔC_T та 49 міс. для хворих з низьким рівнем експресії *NOTCH1* ($\Delta C_T >$ 5,34; середнє значення + SD); $p = 0,022$.

Водночас, у нашому дослідженні впливу мутацій гена *NOTCH1* на тривалість загального виживання (OS) не виявлено: медіана OS склала 79 міс. у разі відсутності *NOTCH1* мутацій та 55 міс. за їх наявності; $p = 0,101$.

3. Обґрунтування підходів до терапії хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію за умов наявності мутацій гена *NOTCH1*

Важливим наслідком наявності в лейкоцитних клітинах мутацій гена *NOTCH1* є зниження рівня експресії на поверхневих мембранах клітин антигену CD20. Це пов'язано з особливостями функціонування транскрипційних комплексів за умов персистенції фактору транскрипції Notch1 при наявності мутацій.

Низька експресія CD20 за наявності мутацій гена *NOTCH1* пояснює знижену чутливість лейкоцитних клітин до загибелі, опосередкованої анти-CD20 моноклональними антитілами (мкАТ), та відсутність ефекту у хворих від призначення анти-CD20 мкАТ (ритуксимаб) як доповнення схеми флударабін-циклофосфамід або терапії хлорамбуцилом (за даними Во et al., 2014; Pozzo et al., 2016). За застосування анти-CD20 мкАТ нового покоління (офатумумаб і обінутузумаб) у дослідженні RESONATE, результати лікування хворих з мутаціями гена *NOTCH1* також були достовірно гіршими (Brown et al., 2018).

Такі результати спонукали дослідників до розробки нових підходів до терапії хворих на ХЛЛ з мутаціями гена *NOTCH1*. Одним з них є використання інгібіторів γ -секретази, яка необхідна для утворення транскрипційно активного внутрішньоклітинного домену білка Notch1 (Lopez-Guerra et al., 2015). Інші механізми вірогідного впливу: порушення дозрівання Notch1 рецептора у ендоплазматичному ретикулумі (застосування інгібіторів Ca^{2+} -АТФаз сарко/ендоплазматичного ретикулума); пригнічення активності металопротеїнази ADAM10, що видаляє зовнішньоклітинний домен Notch1 при зв'язуванні з лігандом; пряме інгібування активності Notch1-опосередкованого транскрипційного комплексу за допомогою високоспецифічного пептиду SAHM1 (Rosati

et al., 2018). Отримані гуманізовані мкАТ, які пригнічують активність Notch1-опосередкованих шляхів передачі внутрішньоклітинних сигналів (Aste-Amézaga et al., 2010).

Більшість з вказаних препаратів проходять доклінічне випробування. На теперішньому етапі рекомендовано при лікуванні хворих з мутаціями гена *NOTCH1* у разі відсутності бажаного ефекту від терапії використовувати ібрутиніб. Оскільки Notch1-опосередковані шляхи передачі внутрішньоклітинних сигналів тісно асоційовані з В-клітинним рецептором та зниженим співвідношенням про- і антиапоптичних білків Вах/Vcl-2, пропонується підвищити ефективність ібрутинібу, включаючи в схему терапії інгібітор Vcl-2 венетоксакс (Del Poeta et al., 2017) або інгібітори секретази (Arruga et al., 2019).

ВИСНОВКИ

В методичних рекомендаціях представлено нові і адаптовані підходи до визначення мутацій гена *NOTCH1* у хворих на ХЛЛ і, на основі власних досліджень, підтверджено значення мутацій як негативного фактору прогнозу перебігу захворювання. Вперше в Україні проведено визначення мутацій у некодуючому регіоні цього гена.

Підсумовані основні напрямки доцільності визначення мутаційного статусу гена *NOTCH1* при ХЛЛ як:

- прогностичного маркера;
- предикативного маркера відповіді на терапевтичні схеми з застосуванням анти-CD20 моноклональних антитіл;
- ідентифікації пацієнтів, в терапії яких можуть бути застосовані інгібітори *NOTCH1*-залежного шляху.

Економічна ефективність впровадження обґрунтована виділенням групи хворих на ХЛЛ, які не мають переваг у використанні анти-CD20 мкАТ і яким показано призначення інших протипухлинних препаратів. Методичні рекомендації можуть бути впровадженні за умов наявності приладів для проведення полімеразної ланцюгової реакції з режимом детекції у реальному часі (бажано) або у класичному варіанті.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Arruga F., Bracciamà V., Vitale N., Vaisitti T., Gizzi K., Yeomans A., Coscia M., D'Arena G., Gaidano G., Allan J. N., Furman R. R., Packham G., Forconi F., Deaglio S. Bidirectional linkage between the B-cell receptor and NOTCH1 in chronic lymphocytic leukemia and in Richter's syndrome: therapeutic implications. *Leukemia*. 2019. doi: 10.1038/s41375-019-0571-0.
2. Aste-Amézaga M., Zhang N., Lineberger J. E., Arnold B. A., Toner T. J., Gu M. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *PLoS One*. 2010. Vol. 5, N 2. e9094. doi: 10.1371/journal.pone.0009094.
3. Bo M. D., Del Principe M. I., Pozzo F., Ragusa D., Bulian P., Rossi D., Capelli G., Rossi F. M., Niscola P., Buccisano F., Bomben R., Zucchetto A., Maurillo L., de Fabritiis P., Amadori S., Gaidano G., Gattei V., Del Poeta G. NOTCH1 mutations identify a chronic lymphocytic leukemia patient subset with worse prognosis in the setting of a rituximab-based induction and consolidation treatment. *Ann. Hematol.* 2014. Vol. 93, N 10. P. 1765–1774. doi: 10.1007/s00277-014-2117-x.
4. Brown J. R., Hillmen P., O'Brien S., Barrientos J. C., Reddy N. M., Coutre S. E. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia*. 2018. Vol. 32, N 1. P. 83–91. doi: 10.1038/leu.2017.175.
5. Del Poeta G., Del Principe M. I., Postorino M., Bomben R., Iannella E., Buccisano F. Apoptosis resistance and *NOTCH1* mutations impair clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients treated with ibrutinib. *Blood*. 2017. Vol. 130, suppl. 1. P. 261.
6. Fabbri G., Khiabani H., Holmes A. B., Wang J., Messina M., Mullighan C. G., Pasqualucci L., Rabadan R., Dalla-Favera R. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J. Exp. Med.* 2013. Vol. 210, N 11. P. 2273–2288. doi: 10.1084/jem.20131448.
7. Fabbri G., Rasi S., Rossi D., Trifonov V., Khiabani H., Ma J., Grunn A., Fangazio M., Capello D., Monti S., Cresta S., Gargiulo E., Forconi F., Guarini A., Arcaini L., Paulli M., Laurenti L., Larocca L. M., Marasca R., Gattei V., Oscier D., Bertoni F., Mullighan C. G., Foá R., Pasqualucci L., Rabadan R., Dalla-Favera R., Gaidano G. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208, N 7. P. 1389–1401. doi: 10.1084/jem.20110921.

8. López-Guerra M., Xargay-Torrent S., Rosich L., Montraveta A., Roldán J., Matas-Céspedes A., Villamor N., Aymerich M., López-Otín C., Pérez-Galán P., Roué G., Campo E., Colomer D. The γ -secretase inhibitor PF-03084014 combined with fludarabine antagonizes migration, invasion, and angiogenesis in NOTCH1-mutated CLL cells. *Leukemia*. 2015. Vol. 29, N 1. P. 96–106. doi: 10.1038/leu.2014.143.
9. Mansouri L., Cahill N., Gunnarsson R., Smedby K. E., Tjønnefjord E., Hjalgrim H., Juliusson G., Geisler C., Rosenquist R. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013. Vol. 27, N 2. P. 512–514. doi: 10.1038/leu.2012.307.
10. Pozzo F., Bittolo T., Arruga F., Bulian P., Macor P., Tissino E., Gizdic B., Rossi F. M., Bomben R., Zucchetto A., Benedetti D., Degan M., D'Arena G., Chiarenza A., Zaja F., Pozzato G., Rossi D., Gaidano G., Del Poeta G., Deaglio S., Gattei V., Dal Bo M. NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia*. 2016. Vol. 30, N 1. P. 182–189. doi: 10.1038/leu.2015.182.
11. Puente X.S., Beà S., Valdés-Mas R., Villamor N., Gutiérrez-Abril J., Martín-Subero J. I., Munar M., Rubio-Pérez C., Jares P., Aymerich M., Baumann T., Beekman R., Belver L., Carrio A., Castellano G., Clot G., Colado E., Colomer D., Costa D., Delgado J., Enjuanes A., Estivill X., Ferrando A. A., Gelpí J. L., González B., González S., González M., Gut M., Hernández-Rivas J. M., López-Guerra M., Martín-García D., Navarro A., Nicolás P., Orozco M., Payer Á. R., Pinyol M., Pisano D. G., Puente D. A., Queirós A. C., Quesada V., Romeo-Casabona C. M., Royo C., Royo R., Rozman M., Russiñol N., Salaverría I., Stamatopoulos K., Stunnenberg H. G., Tamborero D., Terol M. J., Valencia A., López-Bigas N., Torrents D., Gut I., López-Guillermo A., López-Otín C., Campo E. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Nature*. 2015. Vol. 526, N 7574. P. 519–524. doi: 10.1038/nature14666.
12. Rosati E., Baldoni S., De Falco F., Del Papa B., Dorillo E., Rompietti C., Albi E., Falzetti F., Di Ianni M., Sportoletti P. NOTCH1 aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Front. Oncol.* 2018. Vol. 8. e229. doi: 10.3389/fonc.2018.00229.