

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской  
программы

\_\_\_\_\_ Е.И. Шишацкая  
« \_\_\_\_ »- \_\_\_\_\_ 2020 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Оптимизация условий синтеза ДНК-зонда методом DOP-ПЦР для FISH  
диагностики хромосомных нарушений у пациентов с хроническим  
лимфолейкозом

Направление подготовки 04.06.01 – Биология  
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный  
руководитель

\_\_\_\_\_

подпись, дата

профессор, д-р мед. наук  
О.В. Смирнова

Выпускник

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Д.В. Лагутинская

Рецензент

\_\_\_\_\_

подпись, дата

старший научный  
сотрудник, канд-т биол. наук  
О.Л. Москаленко

Красноярск 2020

## **Аннотация**

Хронический лимфолейкоз – это заболевание, связанное с повышенной пролиферацией В -лимфоцитов. Данный вид лейкоза является одним из самых частых среди взрослого населения, с частотой заболеваемости 4:100000 случаев в год.

Терапия данного заболевания имеет ряд особенностей. Использование терапии первой линии, включающей в себя такие препараты, как флударабин, циклофосфамин и ритуксимаб осложняется развитием резистентности к данной схеме и ее дальнейшее применение для лечения приводит к низкой общей выживаемости. Данный эффект связан с делецией короткого плеча 17 хромосомы, которое содержит ген-супрессор опухолей TP53.

Эта хромосомная aberrация может быть обнаружена при использовании флуоресцентной гибридизации *in situ*, суть которой заключается в связывании ДНК-зонда и комплементарой ему мишени в исследуемых клетках. При необходимости, ДНК-зонд для данного вида анализа может быть создан в лаборатории. Основными этапами создания зонда являются: подбор и культивирование оптимального ВАС-клона, продуцирующего таргетный ген, экстракция плазмидной ДНК из клеток, внесение флуоресцентной метки и амплификация ДНК методом DOP-ПЦР, очистка ПЦР-смеси и подготовка специальной гибридизационной смеси, содержащей ДНК-зонд. Этап внесения флуоресцентной метки и амплификации наиболее важен, поскольку выбранный для этого метод повлияет на визуализацию результатов гибридизации полученного зонда и таргетной последовательности.

Таким образом, цель работы – подбор оптимальных условий DOP-ПЦР для окрашивания полученного ДНК-зонда с целью визуализации хромосомных нарушений в лейкоцитах больных с хроническим лимфолейкозом.

Для внесения флуоресцентной метки Су3 использовался метод DOP-ПЦР, для детекции полученных результатов использовался электрофорез в агарозном геле и спектрофотометрия полученных ампликонов с контрольными образцами

без внесения в них метки. Полученный продукт имел длину от 300 до 450 п.о. А значение эмиссии для наработанного данным методом зонда составило 2 условные единицы.

Ключевые слова: ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИМФОЛЕЙКОЗ, ДЕЛЕЦИЯ 17P, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU, DOP-ПЦР, ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

## Реферат

Магистерская диссертация по теме «Оптимизация условий синтеза ДНК-зонда методом DOP-ПЦР для FISH диагностики хромосомных нарушений у пациентов с хроническим лимфолейкозом» содержит 52 страницы текстового документа, 12 иллюстраций, 6 таблиц и 75 использованных источников.

ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИМФОЛЕЙКОЗ, ДЕЛЕЦИЯ 17P,  
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU, DOP-ПЦР,  
ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Цель исследования – подобрать оптимальные условия DOP-ПЦР для окрашивания полученного ДНК-зонда с целью визуализации хромосомных нарушений в лейкоцитах больных с хроническим лимфолейкозом. Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать ВАС-клон для синтеза зонда
2. Подобрать оптимальные ПЦР-смеси для синтеза ДНК-зонда.
3. Подобрать температурные условия синтеза зонда.
4. Оценить встраивание флуоресцентной метки в синтезированный ДНК-зонд.
5. Провести FISH с полученным зондом на лейкоцитах крови человека.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что ранее для получения ДНК-зонда с целью диагностики del17p у пациентов с ХЛЛ не использовался ВАС-клон RP11-89D11 и подобранные условия DOP-ПЦР для внесения флуоресцентной метки.

В ходе работы были получены условия DOP-ПЦР позволяющие встроить флуоресцентную метку Су3 и получить зонд длиной 350-450 п.о.

## **Abstract**

The master's thesis on the topic « Optimization of the synthesis conditions of DNA probe by DOP-PCR for FISH diagnostics of chromosomal abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia» contains 52 pages of a text document, 12 illustrations, 6 tables and 75 sources used.

CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA, DELETION 17P, FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION, DOP-PCR, ONCOHEMATOLOGY

The aim of the work is to find optimal condition of DOP-PCR for DNA-probe labeling to visualize chromosomal aberrations in patient's leucocytes with chronic lymphocytic leukemia.

Based on the goal, the following tasks were formulated:

1. To find BAC clone for DNA probe synthesis;
2. To find optimal PCR mix for probe synthesis;
3. To find optimal temperature conditions for probe synthesis;
4. To estimate labeling efficiency of the obtained DNA-probe;
5. To perform FISH with obtained DNA-probe on the leucocytes.

The relevance of the thesis is that previously BAC clone RP11-89D11 and picked conditions of DOP-PCR were never used before for synthesis of the DNA probe for detecting 17p deletion in patients with chronic lymphocytic leukemia.

In the work, DOP-PCR conditions were obtained which provide with efficient labeling using Cy3 and optimal DNA probe length (350-450 bp), respectively.

## СОДЕРЖАНИЕ

Аннотация .....	2
Реферат .....	4
Abstract .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	8
1 Обзор литературы .....	10
1.1 Хронический лимфолейкоз .....	10
1.1.1 Характеристика микроокружения опухолевого клона .....	11
1.1.2 Клинические проявления и диагностика .....	13
1.2 Генетические нарушения при ХЛЛ .....	14
1.2.1 Белок p53, его функции и влияние на течение ХЛЛ .....	15
1.2.2 Другие генетические нарушения, ассоциированные с ХЛЛ .....	18
1.3 Лечение ХЛЛ .....	20
1.4 Флуоресцентная гибридизация in situ .....	21
1.5 ВАС-клоны .....	22
1.6 Способы внесения метки ДНК-зондов .....	23
1.7 Очистка ПЦР продукта .....	25
1.8 Оценка встраивания флуоресцентной метки в ДНК-зонд .....	25
2 Материалы и методы .....	26
2.1 Объект исследования .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2 Методы .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.1 Выделение ДНК .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.2 DOP-ПЦР .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.3 Проведение электрофореза .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.4 Очистка ПЦР-смеси .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.5 Оценка встраивания флуоресцентной метки в ДНК-зонд с использованием спектрофотометра .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.6 Выделение лейкоцитов из крови человека .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
2.2.7 Проведение флуоресцентной гибридизации in situ ..	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>

2.2.8 Подготовка контр красителя DAPI и оценка степени его выгорания	
.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3 Результаты.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.1 Подбор оптимальных компонентов реакционной смеси для DOP-ПЦР	
.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2 Оптимизация температурного режима DOP-ПЦР.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3 Оценка встраивания красителя в ДНК-зонд .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Проведение FISH.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.5 Оценка степени выгорания красителя DAPI под воздействием ультрафиолетового излучения .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	29

## ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – это новообразование, связанное с избыточной пролиферацией В-лимфоцитов. Это онкогематологическое заболевание является одним из самых часто возникающих видов лейкоза среди взрослых, частота заболеваемости составляет 4:100000 в год [1].

На данный момент разработаны различные схемы лечения данного заболевания, что позволило увеличить общую выживаемость больных, однако, вместе с этим, выделилась группа пациентов с рефрактерностью, для которых терапия препаратами первой линии не эффективна. Для них наблюдается низкая общая выживаемость, порядка 1-2 года, несмотря на применение других препаратов. Для данных пациентов отмечается делеция короткого плеча 17 хромосомы, содержащая ген TP53, продуктом которого является онкосупрессорный белок p53. Выявление данного нарушения с помощью секвенирования по Сэнгеру не всегда дает адекватную оценку, к тому же, использование первого требует дорогого оборудования, в отличие от флуоресцентной гибридизации *in situ*, главным преимуществом которой является возможность визуализировать нарушения в хромосомах [2].

При этом важно отметить, что зонд для проведения данного вида анализа может быть изготовлен в лаборатории. Выбор методик для его изготовления определяется в первую очередь задачей, на которую он будет направлен. Одним из ключевых этапов создания зонда для FISH является внесение флуоресцентной метки, который может быть проведен различными способами, однако самым оптимальным на данный момент является метод DOP-ПЦР. Его использование позволяет обеспечить высокий уровень флуоресценции и хорошую гибридизацию, при этом фоновый сигнал очень низок [3].

Поэтому целью данной работы явился подбор оптимальных условий DOP-ПЦР для окрашивания полученного ДНК-зонда с целью визуализации хромосомных нарушений в лейкоцитах больных с хроническим лимфолейкозом. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:



1. Подобрать ВАС-клон для синтеза зонда
2. Подобрать оптимальные компоненты ПЦР-смеси для синтеза ДНК-зонда.
3. Подобрать температурные условия синтеза зонда.
4. Оценить встраивание флуоресцентной метки в синтезированный ДНК-зонд.
5. Провести FISH с полученным зондом на лейкоцитах крови человека.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Хронический лимфолейкоз

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – новообразование, состоящее из незрелый функционально, но при этом морфологически зрелых лимфоцитов с В-клеточной дифференцировкой. Данный лейкоз проявляется накоплением этих клеток в крови в фазе G0 или G1 и кроветворных органах, образуя пролиферативные центры в тканевых инфильтратах [4].

Встречаемость данного вида лейкоза в странах Европы составляет 30%, 70% случаев – пациенты возрастом от 50 до 70 лет (средний возраст 55 лет), мужчины заболевают в 2 раза чаще женщин [5]. Одной из возможных причин развития ХЛЛ может быть длительное воздействие нефтепродуктов на организм [6].

Возможная клетка, являющаяся предшественником опухолевого клона, не найдена и это является предметом дискуссий. Опухолевая клетка экспрессирует на своей поверхности CD19, CD5, CD23 и поверхностные иммуноглобулины IgM и IgD. Прогрессия заболевания идет в соответствии с парадигмой клональной эволюции, в течение всего времени от малигнизации до преобразования Рихтера [7]. Считается, что самой ХЛЛ предшествует моноклональный В-клеточный лимфоцитоз, затем происходит стимуляция рецепторов этих клеток антигенами микроокружения. Затем, вторичные геномные аномалии приводят к клональной гетерогенности, что ведет к прогрессии ХЛЛ [8]. В конце происходит отбор и увеличение числа тех клонов, которые содержат мутации, вызванные генетической нестабильностью или же воздействием химиотерапии, что приводит к рефрактерности к терапии и синдрому Рихтера, то есть, трансформации в более агрессивную лимфому или лимфому Ходжкина. Микроокружение играет важную роль в пролиферации и выживании опухолевого клона [9].

### 1.1.1 Характеристика микроокружения опухолевого клона

В целом, роль опухолевого микроокружения как защитника опухолевого клона давно изучается, его формирование является одним из главных признаков рака. Клетки микроокружения при ХЛЛ, несмотря на особенности, способствующие пролиферации опухолевого клона, имеют значение при его выживании и распространении. Доказательством этого служит то, что опухолевые В-лимфоциты *in vivo* способны пролиферировать, однако в *in vitro* условиях они погибают даже в среде, которая способствует росту клеток В-клеточной линии [10].

Само микроокружение состоит из клеток стромы, моноцитов (клеток-няnek), НК-клеток, Т-лимфоцитов, миелоидных супрессорных клеток, эндотелиальных клеток и фолликулярных дендритных клеток [11]. Их функции и роль в микроокружении будет рассмотрена далее.

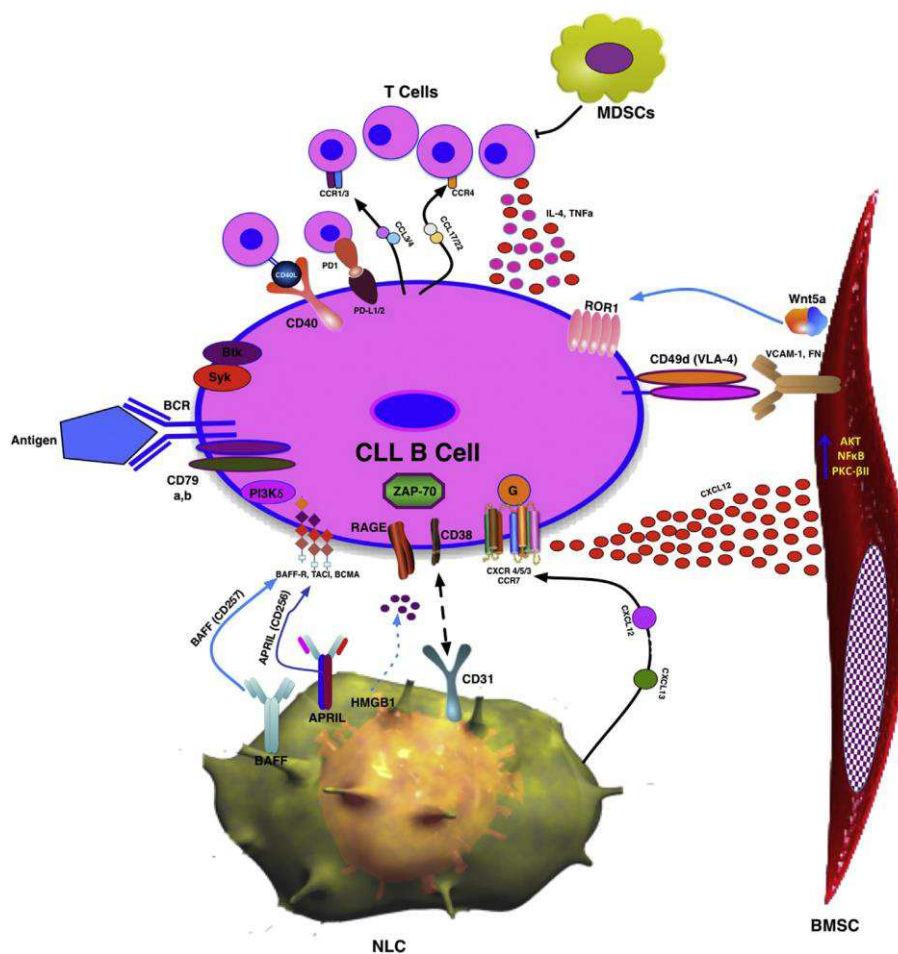


Рисунок 1 – Микроокружение опухолевого клона [10]

Клетки-няньки – это клетки, происходящие из моноцитов и имеющие сходство с опухолевыми макрофагами. Опухолевые клоны способны активировать дифференцировку моноцитов в клетки-няньки через воздействие на Toll-подобные рецепторы (TLR9) с помощью HMGB1. Клетки-няньки имеют высокий уровень экспрессии генов молекул адгезии, что позволяет им взаимодействовать с опухолевым клоном через секретируемые цитокины (BAFF, APRIL, CD14), что, в конечном итоге ведет к повышению экспрессии антиапоптотических генов (BCL2, SURVIVIN и др.). Так же, данная популяция клеток используется как модель для оценки эффективности лекарств, влияющих на микроокружение при ХЛЛ [12].

Стромальные клетки в норме находятся в костном мозге и являются трофическими клетками для гемопоэтических клеток, у пациентов с ХЛЛ они встречаются во вторичной лимфатической ткани. Они также секретируют хемокины (ZAP70 и CD38), которые, в конечном итоге положительно влияют на выживание и пролиферацию, и кроме этого, на резистентность к терапии. Этот эффект достигается за счет усиления синтеза глутатиона и гликолиза [13].

Опухолевые клетки находятся в тесном контакте с Т-лимфоцитами, которые проводят критически важные сигналы, кроме этого отмечается дефектность их функции. Отмечается хроническая активность и истощение с экспрессией соответствующих факторов CD244, CD160 и PD1. Все это приводит к нарушению цитотоксической функции, упаковки гранзимов, образования иммунного синапса с антиген-презентирующими клетками и миграции. Так же отмечается экспрессия CTLA-4, который является цитотоксическим антигеном, ассоциированным с Т-лимфоцитами, ингибирование данного рецептора может стать потенциальной мишенью для терапии, которая лишает иммунной привилегии опухолевый клон [14].

Взаимодействие опухолевых клеток с НК-клетками приводит к угнетению цитотоксической функции последних. Этот дефект может использоваться как один из маркеров степени тяжести заболевания [15].

Миелоидные супрессорные клетки имеют aberrantный фенотип, они CD14 положительные и экспрессия HLA-DR снижена, они так же участвуют в супрессии Т-лимфоцитов, как и опухолевый клон. Большое число таких клеток отмечается у пациентов, которые не получали лечения. К дополнительным клеточным элементам относятся эндотелиальные и фолликулярные дендритные клетки, которые отвечают за хоминг и задержку опухолевого клона в тканях. Они способствуют их выживанию, активации и лекарственной устойчивости [16].

В целом, можно сказать, что участие микроокружения огромно не только в процессе выживания и пролиферации опухолевых клеток, но и в развитии лекарственной устойчивости. Воздействие на отдельные клетки микроокружения терапевтическими агентами может стать перспективным методом лечения ХЛЛ.

### **1.1.2 Клинические проявления и диагностика**

Основные критерии для диагностики базируются на морфологии клеток и их иммунофенотипировании. Наличие В-клеточного лимфоцитоза является однозначным маркером, свидетельствующим о состоянии, предшествующем ХЛЛ, при этом, лимфоцитоз сочетается с абсолютным количеством лимфоцитов в пределах до  $5 \cdot 10^3$  мм<sup>3</sup>. Однако повышение абсолютного количества лимфоцитов выше данного значения является диагностическим признаком ХЛЛ. В мазке клетки маленькие, зрелые, с узкой границей цитоплазмы и плотным ядром без заметных ядрышек, с частично агрегированным хроматином. Также в мазке обнаруживаются атипичные крупные клетки или пролимфоциты, которые могут составлять до 55% клеток крови. [17].

Клональность клеток может быть определена с помощью проточной цитометрии. Использование данного анализа является одним из первых и самых важных шагов в диагностике заболевания, для которого характерен

следующий профиль антител: CD19, CD5, CD23 слабая экспрессия CD20, поверхностный иммуноглобулин. Атипичные варианты включают в себя CD19+ CD5+ фенотип с более чем одним из далее перечисленных маркеров, таких как CD23+ и CD20 со слабой экспрессией поверхностного Ig; CD23+ и CD20 со средней экспрессией поверхностного Ig или CD23– [18, 19].

Симптомы включают: абсолютный лимфоцитоз, лимфодепоницию лимфатических узлов. На поздних стадиях наблюдаются симптомы опухолевой интоксикации: потливость по ночам, похудание и т.д., кроме этого проявляются анемия, тромбоцитопения, гранулоцитопения. Так же наблюдается иммунодефицит, выражающийся в иммуноглобулинемии, и как следствие учащением простудных и герпетических заболеваний, длительному заживлению ран. Помимо этого отмечается склонность к аутоиммунным нарушениям и вторичным опухолям [20].

Стадирование заболевания проводится для определения тяжести болезни, определения выживаемости и прогноза заболевания. Основные системы стадирования – это системы Rai и Binet. Первая основана на показателях крови и костного мозга и физического состояния, выделяя стадии от 0 (низкий риск) до III (высокий риск). Система Binet выделяет 3 группы (A-C), дифференцировка которых основана на количестве пролиферирующих сайтов, показателях гемоглобина и тромбоцитах [21].

Секвенирование, цитогенетические методы, исследование сывороточных показателей используются для прогнозирования. Мутационный статус тяжелых цепей иммуноглобулина является важным маркером исхода заболевания, отсутствие мутации указывает на неблагоприятный прогноз вне зависимости от стадии заболевания. Если нет возможности определить данный показатель, используются маркеры CD38, ZAP-70, CD49 [22, 23]. Однако данный вопрос еще активно изучается, и маркеры, позволяющие на ранних стадиях сделать прогноз и скорректировать лечение, находятся в стадии поиска.

## **1.2 Генетические нарушения при ХЛЛ**

У пациентов с ХЛЛ наблюдается определенный геномный ландшафт, связанный с заболеванием. Определенные генетические нарушения связываются с вероятным наследованием ХЛЛ у пациентов. Выявлено 32 SNP из 28 локусов связанных с развитием заболевания, что составляет 19% семейного риска ХЛЛ [24]. Также, исследования, проведенные на больших выборках пациентов, показывают, что возникновение заболевания связано с потерей или удвоением генетического материала, например, к таким нарушениям относятся делеции, локализованные в 11, 13 и 17 хромосомах. Последняя из этих мутаций имеет большое значение при подборе и корректировке схемы терапии.

Важно отметить, что в течение болезни пациенты могут накапливать мутации. Они возникают в результате прогрессии заболевания, так и под воздействием терапии, эти изменения могут влиять на прогноз и на лечение [23, 25].

### **1.2.1 Белок p53, его функции и влияние на течение ХЛЛ**

Белок p53 является транскрипционным фактором, основной функцией которого является супрессия опухоли, однако данный белок вовлечен и в другие процессы в клетке, как контроль клеточного цикла, дифференциация клеток, репарация ДНК, сохранение генома, клеточное старение, апоптоз и аутофагия [26].

При этом конечную судьбу клетки в данном случае определяет ее тип, микроокружение и тип стресса, которому она была подвержена, а также форма p53 – цитоплазматическая или ядерная. Белок способен запустить как необратимый внешний и внутренний апоптоз, связанный с генами BAX, NOXA, PUMA. Влияние последнего гена таково, что он нарушает взаимодействие p53 с антиапоптотическими белками, что приводит к положительной регуляции цитоплазматического p53. Кроме этого, данный белок запускает механизмы

клеточного старения, связанные с сигнальными путями генов p21, pAI и pML [27]. В случае слабого стрессового воздействия на клетку происходит остановка клеточного цикла и репарация ДНК, также положительно регулирует экспрессию антиоксидантных генов SENS1 и 2, GPX1 и TIGAR, которые защищают геном от повреждения активными формами кислорода. Последний ген помимо этого участвует в подавлении гликолиза, чем защищает клетку от метаболического репрограммирования, приводящего к возникновению эффекта Варбурга [28]. В ряде случаев p53 может активировать аутофагию, опосредованную генами AMPK и DRAM, однако эти же пути могут способствовать выживанию клетки при недостатке питательных веществ, путем активации синтеза АТФ. Кроме этих, имеются и иные противоопухолевые механизмы, такие как подавление ангиогенеза и ингибирование метастазирования. Помимо этого, в ряде случаев p53 способен снижать экспрессию генов путем связывания с ко-репрессорами и деацетилазами гистонов [27]. Как уже было ранее сказано, особенности выполнения данных функций белка p53 напрямую связано с той формой, которую он имеет. Ядерный p53 индуцирует аутофагию, апоптоз и репарацию ДНК за счет активации соответствующих таргентных генов, тогда как цитозольная форма ингибирует аутофагию, но также индуцирует апоптоз [29].

Данный белок имеет несколько доменов, на N конце расположены два домена – TAD1 и TAD2, которые содержат 40 и 20 аминокислотных остатка соответственно. Они способны усиливать экспрессию таргентных генов, путем активации гистон-модифицирующих белков. Следом за ними идет насыщенный пролином домен (PRD), который имеет, по-видимому, структурную функцию. Следом идет ДНК-связывающий домен, который узнает два декамерных мотива (5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3') зачастую расположенные в области промотора или первого интрона таргентного гена [30]. После него идут домены NLS и тетрамеризационный домен TD, который связывает 2 димера, с образованием тетрамерной структуры. Перед C-концом расположен домен REG, богатый лизином, участвующий в регуляции связывания с ДНК, РНК и регуляторными



белками. Этот домен помогает белку сканировать ДНК, скользя по ней, когда как связывающий домен, связывается и диссоциируется с мишенью, что обеспечивает быстрый поиск необходимого участка [31].

Белок p53 имеет 12 изоформ, от канонической формы они отличаются тем, что имеют в своем составе не все домены исходного белка, а так же могут иметь дополнительные С-концевые последовательности длиной в 10 и 15 а.о. соответственно. Эти изоформы по-разному экспрессируются как в нормальных, так и в опухолевых клетках [30].

Активация и контроль обратной связи p53 имеет решающее значение для эффективного подавления опухоли. При отсутствии сигнала уровень белка поддерживается на низком уровне, что обеспечивается действием убиквитинлигазы E3 MDM2, которая, соответственно, убиквитинирует p53, что приводит к его деградации протеосомной системой. При появлении стрессового сигнала, активность MDM2 подавляется, равно как и протеосомная деградация. После этого p53 действует как транскрипционный фактор, направляя экспрессию большого количества мишеней, определяющих онкосупрессорный ответ, так же на ответ влияют посттрансляционные модификации, такие как ацетилирование и фосфорилирование. Так же, данный белок способен репрессировать транскрипцию в отсутствие стрессового сигнала, однако этот механизм все еще до конца не изучен [32].

Анализ опухолей показал важную роль данного белка в их супрессии, более 50% человеческих опухолей ассоциированы с мутациями гена TP53 [33]. Среди мутаций, связанных с нарушением функции белка встречаются миссенс- и нонсенс-мутации, вставки, делеции и мутации в сайте сплайсинга, наиболее частые мутации в участке связывания ДНК называются «hotspot»-мутации и связаны с изменением аминокислот в следующих положениях: R175, G245, R248, R249, R273 и R282, все они ассоциированы с потерей функциональности белка, что приводит к усилению инвазивности опухоли. При этом наличие одного аллеля с делецией в 60% случаев ассоциировано с одной из вышеперечисленных мутацией во втором аллеле, что в итоге приводит к

невозможности выполнения функций белком p53. На остальные 30% приходится случаи, когда мутация происходит в обоих аллелях сразу, либо на потерю гетерозиготности в процессе развития ХЛЛ, так же в этой категории находятся случаи, когда один из аллелей сохраняет свое дикое состояние, несмотря на мутацию. Подобные нарушения встречаются у 80% пациентов [27, 34].

Все это ведет к неспособности белка выполнять свою онкосупрессивную функцию и приводит к прогрессии опухоли и неэффективности лекарственной терапии первой линии.

### **1.2.2 Другие генетические нарушения, ассоциированные с ХЛЛ**

Помимо делеции короткого плеча 17 хромосомы, содержащей ген TP53, имеются и другие хромосомные aberrации, такие как делеции длинного плеча 11 и 13 хромосом и трисомия 12 хромосомы. Del(13q14.1) встречается в 55% случаев у заболевших ХЛЛ и ее изолированное наличие связывается с благоприятным исходом. Напротив, наличие del(11q23), связывается с обширной лимфоаденопатией, быстрым прогрессированием заболевания и снижением общей выживаемости. Данная aberrация встречается у 25% пациентов. Трисомия 12 хромосомы наблюдается у 10-20% с хроническим лимфолейкозом, при этом гены, расположенные на данной хромосоме и связанные с возможным участием в патогенезе данного заболевания все еще до конца не изучены. А прогностическая роль данной aberrации все еще остается предметом дискуссий [7,35].

Наиболее распространенными мутациями, ассоциированными с данным заболеванием, являются мутации в генах NOTCH1, SF3B1, ATM, BIRC3 [29].

NOTCH1 кодирует трансмембранный белок, являющийся лиганд-активируемым транскрипционным фактором. Он играет важную роль в ряде клеточных процессов в самовосстанавливающихся тканях, например, пролиферация, апоптоз, детерминация, но наиболее ярко эти функции

проявляются в лимфоидной ткани. На ранних этапах дифференцировки он опосредует развитие Т-лимфоцитов, а в зрелых В-лимфоцитах передача сигналов NOTCH1 способствует терминальной дифференцировке в клетки, продуцирующие антитела [36, 37].

Эта мутация встречается у 5-10% пациентов и связана со сдвигом рамки считывания в 34 экзоне, что нарушает структуру кодируемого белка и вызывает нарушение сигнальных путей контроля клеточного цикла. Вероятность развития данной aberrации связана с прогрессией заболевания и эволюцией опухолевого клона, что в дальнейшем приводит к преобразованию Рихтера, что делает его потенциальным маркером неблагоприятного прогноза [38].

Ген SF3B1 в норме кодирует белок, который является одним из важных компонентов рибонуклеопротеинового комплекса U2, который узнает 3' сайт сплайсинга между экзоном и интроном. SF3B1 взаимодействует с созревающей РНК рядом с сайтом ветвления. Вероятность его мутации повышается при прогрессии заболевания, имея изначальную частоту встречаемости в 4-12% случаях и связывается, в первую очередь, с переходом ХЛЛ к агрессивному протеканию, однако у пациентов с трансформацией Рихтера данная мутация почти не встречается. Данная aberrация рассматривается как возможный предиктор ухудшения состояния у тех пациентов, у которых ген TP53 имеет дикое состояние [39].

Мутация гена ATM связана с del(11q23). Этот белок является серин-треонин киназой, которая в норме является супрессором опухолей и ее активация происходит при повреждении ДНК. Миссенс-мутация ATM встречается в 12% случаев и ассоциирована с невозможностью ингибировать комплекс ATM-p53, что уменьшает количество p53 и влияет на устойчивость к терапии и развитием агрессивной формы ХЛЛ [40, 41, 42].

В норме BIRC3 в комплексе с другими белками негативно регулирует MAP3R14 серин-треониновую киназу, которая, в свою очередь, активирует неканоничный NF-κB путь. Этот сигнальный путь ведет к сопротивлению опухоли ее уничтожению иммунной системой. Возникновение данной мутации

не приводит к деактивации данного пути, напротив, он приводит к его конститутивной активации. Встречаемость данной мутации до заболевания составляет 4%, но после терапии и развития рефрактерности – в 40% случаев с диким TP53, что делает его маркером ранней диагностики развития данного состояния у такой группы пациентов [43, 44, 45].

Вышеперечисленные нарушения способны оказывать негативное влияние на течение заболевания и восприимчивость терапии и при отсутствии мутации гена белка p53, что делает их не менее важными прогностическими маркерами.

### **1.3 Лечение ХЛЛ**

Для пациентов с медленным течением заболевания выбирается выжидательная тактика, до появления соответствующих показаний. В дальнейшем, выбор терапии основывается на следующих факторах:

- характер болезни
- состояние больного
- факторы, связанные с лечением [46] .

Монотерапия ритуксимабом (эффективен как при терапии первой линии, так и второй) и применение его в комбинации, например, схема FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб) имеет наибольшую эффективность, оказывая цитостатический и цитотоксический эффект [47, 48]. Ритуксимаб (CD20 mAb) обладает цитотоксическим действием, выраженном в антитело-зависимом фагоцитозе или же в антитело-зависимой цитотоксичности [49]. Однако эффект терапии данным препаратом, снижается при повторных применениях. Это связано с тем, что использование цитостатиков в течение длительного времени приводит к развитию рефрактерности и накоплению соматических мутаций. Маркером этого является появление делеции 17p или же мутации гена TP53, при этом наблюдаются рецидив и прогрессия заболевания [50].

Терапия ХЛЛ при del 17p имеет свои особенности, например, пациенты с данным нарушением не имеют ответа на режим FCR, относящийся к препаратам первой линии. Ранее, схемы, включающие алемтузумаб, показали свою эффективность для данной группы пациентов, однако современные и более эффективные препараты вытесняют его. Например, ибрутиниб, применяемый у пациентов с рецидивом, так же хорошо показал себя у пациентов с del 17p, появившейся de novo [7, 51]. Данный препарат влияет на BCR-зависимый путь пролиферации опухолевого клона и оказывает влияние на микроокружение [52].

Кроме этих химиотерапевтических агентов, для лечения пациентов возможно применение других таргетных препаратов. Гамма и дельта изоформы PI3K в норме экспрессируются в гемопоэтических клетках, при ХЛЛ данный белок крайне активен. Использование ингибитора данной киназы иделалисиба позволяет заблокировать дельта изоформу, что ведет к ингибированию ее пути, что приводит к ингибированию BCR пути, который *in vitro* приводит апоптозу В-лимфоцитов. Так же, применяются препараты, ингибирующие определенные домены у белков из семейства Bcl-2, что приводит к апоптозу опухолевого клона, к таким агентам относится венетоклакс [5, 7, 53].

Также для данных пациентов применяется аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, что позволяет улучшить качество жизни пациентов, увеличивая их выживаемость, по сравнению с теми, к кому применялась только химиотерапия [54].

Помимо одобренных и зарекомендовавших себя схем лечения, исследователи находят новые терапевтические агенты, например, акалабрутиниб, являющийся более селективным ингибитором ВТК, кроме того, находят свое применение и передовые методы в терапии ХЛЛ, такие как CAR-T [55].

#### **1.4 Флуоресцентная гибридизация *in situ***

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) – это цитогенетический метод, позволяющий визуализировать наличие, отсутствие, а также расположение определенных генетических последовательностей. Данная методика включает в себя несколько этапов: подготовка зонда, комплиментарного искомой последовательности, затем идет подготовка среза ткани или же мазка, в котором проводится данное исследование. Подготовка включает в себя депарафинизацию (для срезов тканей) и обработку протеазами, для облегчения доступа зонда в клетку. Затем, при добавлении зонда происходит этап денатурации и гибридизации, после чего производится отмывка от несвязавшегося зонда. После этого результат может быть оценен с использованием микроскопа [56, 57, 58].

Первый из этих этапов имеет множество тонкостей и нюансов, например, подбор длины самого зонда и выбор способа окраски и ее типа.

К основным этапам подготовки зонда для флуоресцентной гибридизации *in situ* относятся: подбор оптимального ВАС-клона, культивирование *E. coli*, содержащих исследуемую последовательность нуклеотидов ВАС-клонов, продуцирующих таргетный ген и экстракция плазмидной ДНК из клеток, нанесение флуоресцентной метки и амплификация ДНК методом DOP-ПЦР, очистка ПЦР-смеси, удаление повторяющихся последовательностей ДНК и подготовка специальной гибридизационной смеси, содержащей ДНК-зонд [59, 60].

## **1.5 ВАС-клоны**

ВАС-клоны (*bacterial artificial chromosome*) – это системы, использующиеся как вектор для клонирования геномной ДНК. Также существуют и другие системы клонирования геномной ДНК, например *yeast artificial chromosome* (YAC), но по сравнению с ней ВАС имеет больше преимуществ. К ним относят: легкую очистку полученной ДНК, малую подверженность химеризму и большую стабильность. Для их создания

искомый ген вырезается с помощью рестриктаз и лигируется с бактериальной F плазмидой. Затем эта плазида помещается в бактерию методом электропорации, после чего ВАС-клон готов к дальнейшему культивированию [61, 62, 63].

## **1.6 Способы внесения метки ДНК-зондов**

Существуют различные способы внесения метки в готовый ДНК-зонд с использованием флуоресцентных и хемилюминисцентных меток или же хромогенного энзиматического субстрата. Также, различаются и методы, которые используются для внесения метки в зонд. К ним относятся: нанесение радиоактивной метки, метка гаптенами (биотин, флуоресцин, дигоксигенин), с которыми в дальнейшем связывается флуоресцентная метка и прямое энзиматическое внесение метки. Выбор типа метки и метода зависит от того, какая чувствительность и разрешение у микроскопа, используется ДНК или же РНК зонд, насколько зонд остается стабильным после процесса встраивания метки, от типа гибридизации и типа детекции сигнала от флуоресцентной метки [64, 65].

К энзиматическим способам внесения метки относятся: Nick-трансляция, ПЦР с мечеными нуклеотидами и DOP-ПЦР.

Метод Nick-трансляции основывается на замене нуклеотидов в двуцепочечной ДНК на меченый нуклеотид с помощью фермента ДНКазы I. Этот фермент способен вносить разрывы в фосфодиэфирной связи молекулы ДНК, образуя свободные 3'-ОН концы. Затем, добавляется ДНК-полимераза I, обладающая 5'-3'-эксонуклеазной активностью и способная восстанавливать места разрывов, путем добавления в цепочку меченных каким-либо образом нуклеотидов, предварительно добавленных в реакционную смесь. Этот способ используется для добавления аффинных меток, таких как биотин, при использовании данного метода так же следует соблюдать осторожность,

поскольку большое количество модификаций ДНК-зонда влияет на его связываемость с таргетной ДНК.

Встраивание метки с помощью ПЦР позволяет не только пометить зонд, но так же и амплифицировать его. В качестве метки используется меченый на 3' конце праймер. В течение реакций ПЦР, на стадии отжига, праймер связывается с ДНК, после чего происходят элонгация, и как следствие, амплификация ДНК зонда [66].

Метод DOP-ПЦР также позволяет амплифицировать зонд, помимо внесения метки. Эта методика включает в себя стадии низкотемпературного отжига в течение 5-8 циклов, при котором связывание с праймером и элонгация происходят во множестве разных сайтов, второй этап происходит в течение 25-35 циклов, при этом температура повышается и так же повышается специфичность связывания праймера с ДНК [67, 68].

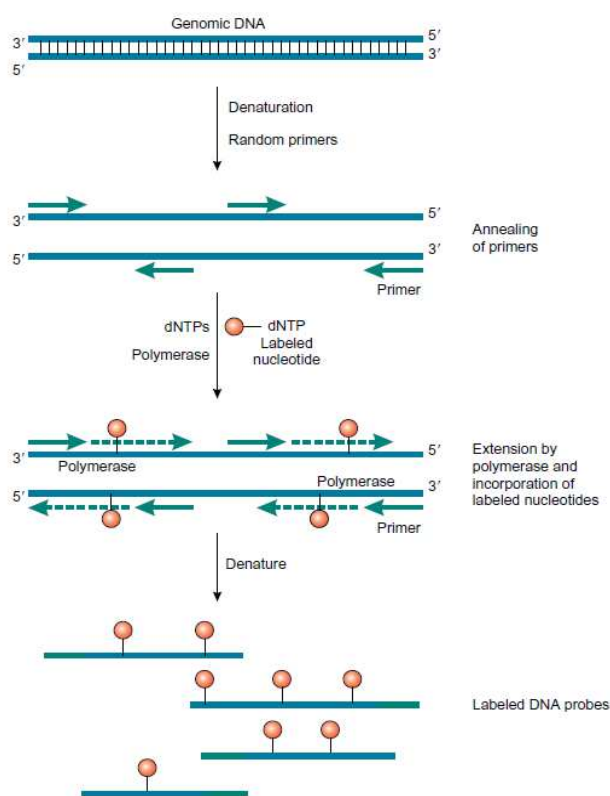


Рисунок 2 – Схема проведения DOP-ПЦР [66]

В результате образуются продукты, состоящие из фрагментов размером 200-1000 н.п. Данный метод позволяет получить хорошую гибридизацию и низкий фоновый сигнал [3, 69].



## **1.7 Очистка ПЦР продукта**

Очистка ПЦР-продукта от смеси может быть произведена несколькими способами. Первый из них – преципитация меченого зонда в этиловом спирте, таким образом, достигается удаление не связавшихся нуклеотидов с флуоресцентной меткой. Данный способ показывает наибольшую эффективность при очистке длинных зондов. Второй метод – это гель-фильтрация, как правило, в качестве сорбента используется Sephadex (GE Healthcare) G25 используется для зондов небольшой длины, а G50 – для длинных зондов. Этот метод так же включает в себя центрифугирование при 1000-1200g в течение 4 минут, что позволяет очистить смесь от 95% не связавшихся меченых нуклеотидов. Последняя группа методов включает различные способы концентрирования и очистки с использованием колонок. Эти методы быстрее и являются достойной альтернативой для предыдущих методов [64].

## **1.8 Оценка встраивания флуоресцентной метки в ДНК-зонд**

Успешное прохождение реакции, и, как следствие, встраивание метки в зонд возможно 2 способами: с помощью электрофореза и спектрофотометрии. Первый метод используется при апробации метода внесения флуоресцентного красителя, при этом мишенью становятся ампликоны с заранее известной длиной. Таким образом при детекции результатов ампликоны с меткой в своей последовательности оказываются чуть тяжелее и выглядят как полоса над небольшой полоской ампликонов без метки. Данный метод не может быть использован при внесении метки методом DOP-ПЦР, поскольку происходит наработка ампликонов разной длины, поэтому в таких случаях применяется спектрофотометрия. Для этого сравнивают пики ДНК и флуоресцентной метки, и если второй выше, то можно сказать, что метка встроилась в необходимую последовательность [70, 71].

## **2 Материалы и методы**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты, с 26 по 42 страницу, результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AMPK – 5' AMP-activated protein kinase;
- APRIL – A proliferation-inducing ligand (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13);
- ATM – Ataxia-telangiectasia mutated kinase;
- BAC – Bacterial artificial chromosome;
- BAFF – B-cell activating factor;
- BAX – 5' AMP-activated protein kinase;
- BCL2 – Apoptosis regulator B-cell lymphoma 2;
- BCR – Breakpoint cluster region protein;
- BIRC3 – Baculoviral IAP Repeat Containing 3;
- BTK – Bruton tyrosine kinase;
- CAR-T – Chimeric Antigen Receptor T-Cell;
- CD – Cluster of differentiation;
- Cy3 – Cyanine3;
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole;
- DOP-ПЦР – Degenerate oligonucleotide-primed полимеразная цепная реакция;
- DRAM – Damage-regulated autophagy modulator;
- E. coli – Escherichia coli;
- FISH – Fluorescence in situ hybridization;
- GPX1 – Glutathione peroxidase 1;
- HLA-DR – Human Leukocyte Antigens DR isotype;
- HMGB1 – High-mobility group protein B1;
- IgG – Immunoglobulin G;
- IgM – Immunoglobulin M;
- MAP3R14 – Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase (NF-kappa-B-inducing kinase);
- MDM2 – Mouse double minute 2 homolog;

NF-κB – Nuclear factor kappa B;  
NK-клетки – Natural killer клетки;  
NLS – Nuclear localization signals;  
NOTCH1 – Notch homolog 1, translocation-associated;  
NOXA – Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1;  
p21 – Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A;  
p53 – Tumor protein p53;  
PAI1 – Plasminogen activator inhibitor-1;  
PBS – Phosphate buffered saline;  
PD1 – Programmed cell death 1 protein;  
PI3K – Phosphoinositide 3-kinases;  
PML – Promyelocytic leukemia protein;  
PUMA – p53 upregulated modulator of apoptosis;  
REG – C-terminal regulatory domain;  
SENS1\2 – Sestrin 1/2;  
SF3B1 – Splicing factor 3B subunit 1;  
SSC – Saline-sodium citrate buffer;  
TAD1\TAD2 – Transcription-activation domain 1/2;  
TD – Tetramerization domain;  
TE – Tris and EDTA buffer;  
TAE – Tris, acetic acid and EDTA buffer;  
TIGAR – TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator;  
TLR9 – Toll-like receptor 9;  
TP53 – Tumor protein 53 gene;  
ZAP70 – Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70;  
АТФ – Аденозинтрифосфат;  
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота;  
ХЛЛ – Хронический лимфолейкоз;  
ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Стругов, В. В. Эффективность венетоклакса в терапии хронического лимфолейкоза (обзор литературы) / В. В. Стругов, Е. А. Стадник, А. Ю. Зарицкий // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 12, № 4. – С. 18–26.

2 Никитин, Е. А. Хронический лимфолейкоз высокого риска: история, определение, диагностика и лечение / Е. А. Никитин, А. Б. Сударииков // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 59–67.

3 Darouich, S. Use of DOP-PCR for amplification and labeling of BAC DNA for FISH / S. Darouich [и др.] // Biotechnic & Histochemistry. – 2011. – V. 87, № 2. – P. 117-121.

4 Grgurevic, S. DNA polymerase  $\gamma$  gene expression influences fludarabine resistance in chronic lymphocytic leukemia independently of p53 status / S. Grgurevic [и др.] // Haematologica. – 2018. – V. 103, № 6. – P. 1038-1046.

5 Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk, stratification, and treatment / M. Hallek // American Journal of Hematology. – 2017. – № 92. – P. 946–965.

6 Rushton, L. Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers / L. Rushton [и др.] // British Journal of Cancer. – 2014. – № 110. – P. 783–787.

7 Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk, stratification, and treatment / M. Hallek // American Journal of Hematology. – 2019. – № 94. – P. 1266–1287.

8 Puente, X. S. Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions / X. S. Puente, P. Jares, E. Campo // Blood. – 2018. – V. 131, № 21. – P. 2283–2296.

9 Cicconne, M. SnapShot: Chronic Lymphocytic Leukemia / M. Cicconne [и др.] // *Cancer Cell*. – 2014. – № 26. – P. 770–771.

10 Choi, M. Y. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor / M. Y. Choi, M. K. Kashyap, D. Kumar // *Best Practice & Research Clinical Haematology*. – 2016. – № 29. – P. 40–53.

11 Hacken, E. T. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: implications for disease pathogenesis and treatment / E. T. Hacken, J. A. Burger // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – V. 1863 № 3. – P. 403–413.

12 Jia, L. Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia / L. Jia // *Blood*. – 2014. – V. 123 – P. 1709–1719.

13 Trimarco, V. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival / V. Trimarco // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6, № 39. – P. 42130–42149.

14 Attekum, M. Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk / M. Attekum, E. Eldering, A. P. Kater // *Haematologica*. – 2017. – V. 102, № 9. – P. 1469–1476.

15 MacFarlane IV, A. W. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors / A. W. MacFarlane IV [и др.] // *OncoImmunology*. – 2017. – V. 6, № 7. – P. 1–11.

16 Hanna, B. S. Beyond bystanders: Myeloid cells in chronic lymphocytic leukemia / B. S. Hanna, S. Ozturk, M. Seiffert // *Molecular Immunology*. – 2019. – V. 110. – P. 77–87.

17 Zelenetz, A. D. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 1.2015: Clinical Practice Guidelines in Oncology / A. D. Zelenetz [и др.] // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2015. – V. 13, № 3. – P. 326–362.

18 Zalcberg, I. Multidisciplinary diagnostics of chronic lymphocytic leukemia: European Research Initiative on CLL - ERIC recommendations / I. Zalcberg [и др.] // Hematology, Transfusion and Cell Therapy. – 2019. – P. 1–6.

19 Rawstron, A. C. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) harmonisation project / A. C. Rawstron [и др.] // Cytometry Part B: Clinical Cytometry. – 2018. – V. 94, № 1. – P. 121–128.

20 Hallek, M. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL / M. Hallek [и др.] // Blood. – 2018. – V. 131, № 25. – P. 2745–2760.

21 Smolej, L. Practical approach to management of chronic lymphocytic leukemia./ L. Smolej, M. Simkovic // Archives of Medical Science. – 2016. – V. 12, № 2. – P. 448–456.

22 Mewawalla, P. Role of allogeneic transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies: a review / P. Mewawalla, S. Nathan // Therapeutic Advances in Hematology. – 2014. – V. 5, № 5. – P. 139–152.

23 Campo, E. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics / E. Campo [и др.] // Haematologica. – 2018. – V. 103, № 12. – P. 1956–1968.

24 Cerhan, J. R. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma / J. R. Cerhan, S. L. Slager // Blood Journal. – 2015. – V. 126, № 20. – P. 2265–2273.

25 Prescott, J. Chronic Lymphocytic Leukemia: An Overview of Diagnosis, Prognosis, and Treatment / J. Prescott // The American Journal of Managed Care. – 2018. – P. 8–12.

26 D'Orazi, G. Mutant p53 and Cellular Stress Pathways: A Criminal Alliance That Promotes Cancer Progression / G. D'Orazi, M. Cirone // Cancers. – 2019. – V. 11, № 614. – P. 1–17.

27 Brady, C. A. p53 at a glance / C. A. Brady, L. D. Attardi // Journal of Cell Science. – 2010. – № 123. – P. 2527–2532.

28 Blandino, G. Wild type and mutant p53 proteins in mitochondrial dysfunction: emerging insights in cancer disease / G. Blandino [и др.] // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2019. – P. 1–13.

29 Chaabane, W. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer / W. Chaabane [и др.] // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2013. – V. 61, № 1. – P. 43–58.

30 Нарыжный, С. Н. Структурно-функциональное многообразие протеоформ белка p53 / С. Н. Нарыжный, О. К. Легина // *Биомедицинская химия*. – 2019. – Т. 65, № 4. – С. 263–276.

31 Raj, N. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway/ N. Raj, L. D. Attardi // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2017. – № 7. – P. 1–18.

32 Aubrey, B. J. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway/ B. J. Aubrey, A. Strasser, G. L. Kelly // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2016. – № 6. – P. 1–16.

33 Althubiti, M Spleen Tyrosine Kinase Inhibition Modulates p53 Activity / M. Althubiti // *Journal of Cell Death*. – 2017. – V 10. – P. 1–5.

34 Beyaert, M. Reevaluation of ATR signaling in primary resting chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for pro-survival or pro-apoptotic function / M. Beyaert [и др.] // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8, № 34. – P. 56906-56920.

35 Onaindia, A. Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms / A. Onaindia, L. J. Medeiros, K. P. Patel // *Modern Pathology*. – 2017. – № 30. – P. 1338–1366.

36 Edelman, J. Genomic alterations in high-risk chronic lymphocytic leukemia frequently affect cell cycle key regulators and NOTCH1 regulated transcription / J. Edelman [и др.] // *Haematologica*. – 2019. – V. 104. – P. 1-26.

37 Parikh, S. A. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018 / S. A. Parikh // *Blood Cancer Journal*. – 2018. – V. 8, № 93. – P. 1-10.



38 Fabbri, G. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia / G. Fabbri [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – V. 114, № 14. – P. 2911-2919.

39 Rossi, D. Molecular genetics of high-risk chronic lymphocytic leukemia / D. Rossi, G. Gaidano // *Expert Reviews Hematology*. – 2012. – V. 5, № 6. – P. 593-602.

40 Lazarian, G. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia / G. Lasarian, R. Guieze, C. J. Wu // *Clinical Oncology* – 2017. – № 35. – P. 984-993.

41 Hernandez, J. A. A Low Frequency of Losses in 11q Chromosome Is Associated with Better Outcome and Lower Rate of Genomic Mutations in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia / J. A. Hernandez [и др.] // *PLOS One*. – 2015. – V. 10, № 11. – P. 1-16.

42 Kipps, T. J. Long-Term Studies Assessing Outcomes of Ibrutinib Therapy in Patients With Del(11q) Chronic Lymphocytic Leukemia / T. J. Kipps [и др.] // *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. – 2012. – V. 19, № 11. – P. 715-722.

43 Andreani, G. Tumor Suppressors in Chronic Lymphocytic Leukemia: From Lost Partners to Active Targets / G. Andreani [и др.] // *Cancers*. – 2020. – V. 12, № 629. – P. 1-16.

44 Diop, F. Biological and clinical implications of BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia / F. Diop [и др.] // *Haematologica*. – 2019. – V. 105. – P. 448-456.

45 Asslauer, D. BIRC3 Expression Predicts CLL Progression and Defines Treatment Sensitivity via Enhanced NF- $\kappa$ B Nuclear Translocation / D. Asslauer [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – V. 25. – P. 1901-1912.

46 Kuss, B. J. Management of high risk chronic lymphocytic leukaemia (CLL) patients in Australia / B. J. Kuss, C. S. Tam // *Internal Medicine Journal*. – 2017. – № 47. – P. 5–10.

47 Клинические рекомендации по обследованию и лечению больных хроническим лимфолейкозом [Электронный ресурс]: Национальный медицинский исследовательский центр гематологии. – Режим доступа: <http://blood.ru/documents/clinical%20guidelines/26.%20klinicheskie-rekomendacii-2014-xll.pdf>.

48 Клинические рекомендации "Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов" [Электронный ресурс] : утв. Минздравом России от 2019. // Справочная правовая система «КонсультантПлюс». – Режим доступа: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?rnd=C3A0AE3FD7AE40403F9A9641B8592ECA&req=doc&base=LAW&n=348167&stat=refcode%3D16876%3Bindex%3D0#3js9ihiy486>.

49 Zent, C. S. Monoclonal antibody therapy in chronic lymphocytic leukemia / C. S. Zent // *Oncology Signaling*. – 2018. – № 1. – P. 11–13.

50 Herling, C. D. Time-to-progression after front-line fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy for chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective, multicohort study / C. D. Herling // *Lancet Oncology*. – 2019. – № 20. – P. 1576–1586.

51 Rafei, H. Treatment of Del17p and/or aberrant TP53 chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies / H. Rafei, M. A. Kharfan-Dabaja // *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. – 2018. – № 11. – P. 1–12.

52 Furstenu, M. Sequential and combination treatments with novel agents in chronic lymphocytic leukemia / M. Furstenu, M. Hallek, B. Eichhorst // *Haematologica*. – 2019. – V. 104, № 11. – P. 2144–2154.

53 Al-Sawaf, O. Target therapy of CLL / O. Al-Sawaf [и др.] // *Oncology Research and Treatment*. – 2016. – № 39. – P. 768–778.

54 Furstenu, M. Influence of obesity and gender on treatment outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) undergoing rituximab-based

chemoimmunotherapy / M. Furstenau [и др.] // *Leukemia*. – 2019. – № 34 – P. 1177–1181.

55 Hallek, M. How to approach CLL in clinical practice / M. Hallek, M. Furstenau // *Hematological Oncology*. – 2019. – № 37 – P. 38–42.

56 Chen, A. Y.-Y. Fluorescence In Situ Hybridization / A. Y.-Y. Chen, A. Chen // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – V. 133. – P. 1–4.

57 Huber, D. Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? / D. Huber, L. Votin von Voithenberg, G. V. Kaigala // *Micro and Nano Engineering*. – 2018. – № 1. – P. 15–24.

58 Ratan, Z. A. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science/ Z. A. Ratan [и др.] // *Cureus*. – 2017. – V. 9, № 6. – P. 1–13.

59 Wan, T. S. K. Cancer cytogenetics / T. S. K. Wan. – New York : Humana Press, 2017. – 339 p.

60 Liehr, T. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) Application Guide / T. Liehr. – New York : Springer, 2017. – 588 p.

61 Narayanan, K. Bacterial artificial chromosome / K. Narayanan. – New York : Humana Press, 2015. – 347 p.

62 Borzecka, E. Effective BAC clone anchoring with genotyping-by-sequencing and Diversity Arrays Technology in a large genome cereal rye / E. Borzecka [и др.] // *Scientific Reports*. – 2018. – № 8 – P. 1–9.

63 Giraldo, P. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals / P. Giraldo, L. Montoliu // *Transgenic Research*. – 2001. – № 10 – P. 83–103.

64 Farrell, R. E. RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization / R. E. Farrell. – New York : Academic Press, 2010. – 688 c.

65 Morrison, L. E. Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets / L. E. Morrison. – New York : Humana Press, 2002. – 20 p.

66 Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques* / G. T. Hermanson. – New York : Academic Press, 2013. – 1200 p.

67 Telenius, H. Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: General Amplification of Target DNA by a Single Degenerate Primer / H. Telenius [и др.] // *Genomics*. – 1992. – № 13 – P. 718–725.

68 Arneson, N. Whole-Genome Amplification by Degenerate Oligonucleotide Primed PCR (DOP-PCR) / N. Arneson [и др.] // *CSH Protocols*. – 2008. – V.3, № 1 – P. 1–6.


69 Fiegler, H. DNA Microarrays for Comparative Genomic Hybridization Based on DOP-PCR Amplification of BAC and PAC Clones / H. Fiegler [и др.] // *Genes, Chromosomes & Cancer*. – 2003. – № 36 – P. 361–374.

70 McCoy, P. J. Preparation of fluorescent in situ hybridization probes without the need for optimization of fragmentation / P. J. McCoy [и др.] // *MethodsX*. – 2019. – № 6 – P. 22–34.

71 Espeli, O. *The Bacterial Nucleoid* / O. Espeli. – New York : Humana Press, 2017. – 374 p.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель магистерской  
программы

  
« 14 » - 07


Е.И. Шишацкая  
2020 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оптимизация условий синтеза ДНК-зонда методом DOP-ПЦР для FISH  
диагностики хромосомных нарушений у пациентов с хроническим  
лимфолейкозом

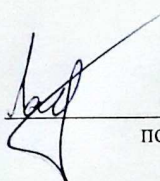
Направление подготовки 04.06.01 – Биология  
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный  
руководитель

 14.07.2020  
подпись, дата

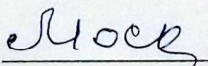
профессор, д-р мед. наук  
О.В. Смирнова

Выпускник

 14.07.2020  
подпись, дата

Д.В. Лагутинская

Рецензент

 14.07.2020  
подпись, дата

старший научный  
сотрудник, канд-т биол. наук  
О.Л. Москаленко

Красноярск 2020