

УДК 616.98 [578.825-616.155.392]: 614.876

Н. І. Білоус<sup>1</sup>✉, І. В. Абраменко<sup>1</sup>, А. А. Чумак<sup>1</sup>, І. С. Дягіль<sup>1</sup>, З. В. Мартіна<sup>1</sup>, В. Саєнко<sup>2</sup>,  
Д. А. Бази́ка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

Відділ радіаційно-молекулярної епідеміології, Інститут захворювань атомного бомбардування,

<sup>2</sup>Нагасакський університет, м. Нагасакі, Японія

## СПЕКТР МУТАЦІЙ ГЕНІВ *TP53*, *SF3B1* та *NOTCH1* У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЕННЯ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АЕС

**Мета.** Проаналізувати спектр мутацій генів *TP53*, *NOTCH1* та *SF3B1* у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ), які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, для з'ясування можливих зв'язків між іонізуючим випромінюванням (ІВ) та ХЛЛ.

**Методи.** Мутації генів *TP53*, *NOTCH1* та *SF3B1* досліджували шляхом прямого секвенування в основній групі 106 хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, а також у контрольній групі 130 неопромінених хворих на ХЛЛ.

**Результати.** Частота мутацій генів *TP53* і *SF3B1* суттєво не розрізнялась в обох групах і становила, відповідно, 11,3 % і 10,0 % у основній та 12,7 % і 11,5 % у контрольній групі. Водночас, частота мутацій гена *NOTCH1* була нижчою у пацієнтів, які зазнали впливу ІВ (6,7 % проти 17,7 % у контролі;  $p = 0,012$ ). В основній групі частота мутації гена *TP53* була однаковою у випадках з мутованими (11,1 %) і немутуваними (11,8 %) генами варіабельних ділянок важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV*), тоді як в контрольній групі виявлена тенденція до збільшення частоти мутацій *TP53* у хворих з немутуваними *IGHV* генами порівняно з мутованими *IGHV* генами (14,1 % та 5,6 %,  $p = 0,178$ ). В основній групі мутації генів *SF3B1* і *TP53* майже у половини хворих зустрічались одночасно. Навпаки, в контрольній групі існувала взаємна ексклюзивність між наявністю мутацій генів *SF3B1* і *TP53* ( $p = 0,001$ ). Серед пацієнтів з ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ, виявлено два випадки з ідентичною рідкісною мутацією гена *TP53* – заміщення с.665С>Т (Pro222Leu). Ця заміна, ймовірно, є вродженим поліморфізмом гена *TP53*, що може впливати на розвиток ХЛЛ під впливом ІВ.

**Висновок.** Наші попередні дані свідчать, що порушення гена *TP53* задіяні у розвитку ХЛЛ у хворих, опромінених під час аварії на Чорнобильській АЕС, а також про можливий зв'язок вродженої чутливості до іонізуючого випромінювання, обумовленої поліморфними варіантами *TP53*, з впливом радіаційного опромінення і розвитком ХЛЛ.

**Ключові слова:** хронічна лімфоцитарна лейкемія, мутації *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*, іонізуюче випромінювання, аварія на Чорнобильській АЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2018. Вип. 23. С. 283–301. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-283-301.

✉ Білоус Надія Іванівна, e-mail: nbilous@yahoo.com

N. I. Bilous<sup>1</sup>✉, I. V. Abramenko<sup>1</sup>, A. A. Chumak<sup>1</sup>, I. S. Dyagil<sup>1</sup>, Z. V. Martina<sup>1</sup>, V. Saenko<sup>2</sup>,  
D. A. Bazyka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>Department of Radiation Molecular Epidemiology, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

## THE SPECTRUM OF *TP53*, *SF3B1*, AND *NOTCH1* MUTATIONS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS EXPOSED TO IONIZING RADIATION DUE TO THE CHORNOBYL NPP ACCIDENT

**Objective.** to analyze *TP53*, *NOTCH1* and *SF3B1* mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients, sufferers of Chernobyl NPP accident to clarify the possible relationship between ionizing radiation (IR) and CLL.

**Methods.** Mutations of *TP53*, *NOTCH1*, and *SF3B1* genes were studied by direct sequencing in the main group of 106 CLL patients exposed to IR due to Chernobyl NPP accident and in the control group of 130 IR non-exposed CLL patients.

**Results.** We found *TP53* and *SF3B1* mutations with similar incidence in both groups – 11.3 % and 10.0 % in the main group, and 12.7 % and 11.5 % in the control group, respectively. In contrast, the frequency of *NOTCH1* mutations was lower in IR-exposed patients (6.7 % vs 17.7 %;  $p = 0.012$ ). *TP53* mutations were seen with equal frequency among mutated (11.1 %) and unmutated (11.8 %) immunoglobulin heavy-chain variable gene (IGHV) cases in IR-exposed CLL patients, while the tendency to prevalence of *TP53* mutations in unmutated compared with mutated IGHV cases was found in the control group (14.1 % and 5.6 %, correspondingly;  $p = 0.178$ ). In IR-exposed group *SF3B1* mutations were combined with mutations in *TP53* almost in half of detected cases. In opposite, in the control group there was mutual exclusivity between *SF3B1* and *TP53* lesions ( $p = 0.001$ ). Among IR-exposed CLL patients we found two different cases with identical rare mutation of *TP53* gene – c.665C>T substitution (Pro222Leu). This substitution is very likely to represent inherited *TP53* mutation, which may influence CLL development under IR exposure.

**Conclusion.** Our preliminary data suggest that *TP53* abnormalities are involved in CLL development in subjects exposed at the Chernobyl accident and also a possible connection between inherited sensitivity to ionizing radiation caused by mutation in *TP53*, radiation and CLL development.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* mutations, ionizing radiation, Chernobyl NPP accident.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2018;23:283-301. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-283-301.*

### ВСТУП

Зазвичай хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) вважається нерадіогенною формою лейкемії. Це твердження переважно базується на результатах обстеження осіб, які вижили після ядерних бомбардувань Хіросіми та Нагасакі (хоча ХЛЛ зустрічається вкрай рідко серед мешканців Азії) і хворих, пролікованих за допомогою променевої терапії [1, 2]. Крім того, останні дослідження французької когорти працівників атомної промисловості також не виявили надмірного ризику ХЛЛ [3].

В той же час епідеміологічні дані щодо аварії на Чорнобильській атомній електростанції (АЕС) України свідчать про підвищення ризику розвитку ХЛЛ за умов дії іонізуючого випромінювання (ІВ) [4–7]. Раніше нами були визначені певні клінічні та біологічні особливості ХЛЛ в групі учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС, які свідчать про несприятливий перебіг захворювання, а саме: висока частота розвитку вторинних солідних пухлин і трансформації Ріхтера,

### INTRODUCTION

Generally, chronic lymphocytic leukemia (CLL) is considered to be a non-radiogenic form of leukemia. This is based mainly on the investigation of survivors of Hiroshima and Nagasaki nuclear bombing, though CLL is very rare in Asian population, and radiotherapy patients [1, 2]. In line with these, recent study of French cohort of nuclear industry workers did not reveal an excess risk of CLL [3].

At the same time epidemiological data on Ukrainian clean-up workers of Chernobyl nuclear power plant (NPP) accident reveal radiation risks of CLL [4–7]. We previously found some clinical and biological features of CLL in group of clean-up workers of Chernobyl NPP accident indicating an unfavorable disease course, such as high frequency of secondary solid tumors and Richter transformation, main-

переважно немутований статус генів варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV*) з підвищеним використанням генів *IGHV1-69* та *IGHV3-21* [8]. Аналіз генетичних особливостей лейкозних клітин у хворих на ХЛЛ, опромінених ІВ, може надати додаткові дані про можливий причинно-наслідковий зв'язок між ХЛЛ та іонізуючою радіацією.

ІВ є відомим фактором ризику розвитку окремих онкогематологічних новоутворень, проте його канцерогенна дія остаточно не з'ясована. Вважають, що ІВ може безпосередньо індукувати мутації в онкогенах і генах-супресорах, або сприяти позитивній селекції гематопоетичних клітин-попередників з наявністю певних пре-онкогенних пошкоджень, що надають перевагу виживанню при опроміненні, зокрема аберації гена *TP53* [9, 10]. Ген пухлинного супресора *TP53* викликає особливий інтерес у вивченні канцерогенних ефектів ІВ, оскільки його продукт білок p53 служить ключовим регулятором клітинних реакцій у відповідь на генотоксичний стрес (включаючи дію ІВ), індукуючи апоптоз або зупинку клітинного циклу і репарацію ДНК, тим самим обмежуючи ріст абераційних клітин [11–13]. Інактивація білка p53 внаслідок наявності мутацій в гені *TP53* призводить до порушень цих процесів, підвищення геномної нестабільності та змін радіочутливості [14].

Мутації гена *TP53* виявляються приблизно у 5–10 % пацієнтів при діагностиці ХЛЛ. У більшості випадків (понад 80 %) вони супроводжуються делеціями у другій алелі *TP53* (del17p). Наявність мутацій гена *TP53* асоційована з резистентністю хворих до проведення хіміотерапії і зменшенням періоду загального виживання, їх частота збільшується до 40 % у хворих з прогресією захворювання та при рефрактерному перебігу ХЛЛ [15–19]. Окрім мутацій гена *TP53*, при застосуванні сучасних методів секвенування геному виявлено також порушення інших генів, задіяних в патогенез захворювання. Найбільш часто виявляються мутації генів *NOTCH1* і *SF3B1* (від 5 до 20 % пацієнтів) [19–22]. Показано, що мутації цих генів зазвичай не асоційовані між собою і також пов'язані з несприятливим перебігом захворювання [23, 24].

Більшість *NOTCH1* мутацій у хворих на ХЛЛ представлені делецією двох пар нуклеотидів (c.7544\_7545delCT), що призводить до появи стоп-кодону і делеції регуляторного PEST домену, гіперекспресії конституційно активного білка NOTCH1 та дерегуляції ряду клітинних сигнальних шляхів [20]. Мутації гена *SF3B1* (основний компонент механізму сплайсингу) представлені, в основному, missense замінами у еволюційно консервативних гарячих точках. Вважають,

ly unmutated status of heavy chain variable region (*IGHV*) genes with increased usage of *IGHV1-69* and *IGHV3-21* [8]. Analysis of genetic features of leukemic cells in IR-exposed CLL patients may provide an additional data on the possible causal relationship between CLL and ionizing radiation (IR).

IR is a well-known risk factor for several hematological malignancies, however it's carcinogenic action are still poorly understood. They have been commonly attributed to the direct induction of mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, or, as it was suggested, might be related to a positive selection of hematopoietic progenitor cells with certain preexisting oncogenic lesions, conferring survival advantage upon irradiation, in particular *TP53* aberrations [9, 10]. Tumor suppressor *TP53* is of special interest in the study of carcinogenic effects of IR, since its product p53 protein serves as a key regulator of cellular responses to genotoxic stress (including IR action), inducing apoptosis or cell cycle arrest and DNA repair, thus restricting aberrant cell growth [11–13]. Inactivation of p53 by mutations in *TP53* gene results in disruptions of these processes, increased genomic instability and alterations in radiosensitivity [14].

In CLL *TP53* mutations have been reported in approximately 5–10 % of patients at diagnosis. In the majority of cases (over 80 %) they are accompanied by deletion in the remaining *TP53* allele (del17p). *TP53* aberrations are strongly associated with chemotherapy resistance and short survival of CLL patients, their incidence rises up to 40 % in progressive and refractory CLL [15–19]. Besides *TP53* mutations, several other putative driving lesions have been identified in CLL by next generation sequencing. Among the most frequently mutated are *NOTCH1* and *SF3B1* genes (5 to 20 % of patients) [19–22]. Alterations in these genes were shown to be presented in mutually excluding fashion and were associated with unfavorable disease outcome [23, 24].

The most of *NOTCH1* mutations in CLL are represented by 2-bp deletion (c.7544\_7545delCT), which generates a premature stop codon within the negative regulatory PEST domain, leading to constitutively active NOTCH1 and deregulation of a number of cellular signaling pathways [20]. Mutations in *SF3B1* gene (a core component of the spliceosome machinery) are represented mostly by missense substitutions localized within evolution-

що їх наявність модифікує взаємодію білка SF3B1 з іншими компонентами комплексу, що реалізується у порушенні сплайсингу [25, 26]. Також встановлено, що мутації гена можуть призводити до порушення клітинної відповіді на пошкодження ДНК [27]. Нещодавно мутації генів *NOTCH1* та *SF3B1*, а також деяких інших генів, були виявлені в мультипотентних гемопоетичних клітинах-попередниках у хворих на ХЛЛ, що вказує на те, що ранні кровотворні попередники можуть бути клітинними мішенями онкогенних подій, пов'язаних з розвитком ХЛЛ [28]. Це дає нове розуміння патогенезу ХЛЛ, захворювання, яке зазвичай вважалося таким, що походить зі зрілих лімфоцитів [29].

Дослідження генетичних порушень у хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ, поодинокі [30].

## МЕТА

Метою даної роботи було проаналізувати мутації *TP53*, *NOTCH1* та *SF3B1* у хворих на ХЛЛ, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, для з'ясування можливих патогенетичних зв'язків між дією ІВ та ХЛЛ.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

**Характеристика обстежених хворих.** Досліджувана когорта включала 236 хворих на ХЛЛ (196 чоловіків та 40 жінок), які на протязі 2002-2013 рр. звернулися до ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» в м. Києві. Дослідження було схвалено місцевою етичною комісією, а всі пацієнти надали обґрунтовану згоду на участь у ньому. Діагноз ХЛЛ встановлювали на основі клініко-гематологічних критеріїв та імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові. Стадія захворювання була встановлена відповідно до класифікації Binet [31], критерії призначення лікування відповідали критеріям Національного інституту раку США [32].

Пацієнти були розподілені на дві групи залежно від впливу ІВ. Основну групу склали 106 пацієнтів з ХЛЛ та дією ІВ в анамнезі, а друга група (контрольна) складалася з 130 хворих на ХЛЛ, які не зазнали впливу ІВ.

Серед хворих, які зазнали впливу ІВ, було 83 учасники ліквідації наслідків аварії (УЛНА), 16 мешканців забруднених радіонуклідами територій та 7 евакуйованих. Інформація про дози УЛНА отримана з Державного реєстру України осіб, що потерпіли внаслідок Чорнобильської катастрофи. На основі даних про щільність забруднення ґрунту <sup>137</sup>Cs обчислено накопичені дози (з 1986 р. до діагнозу ХЛЛ) у 9 мешканців забруднених територій (0,23; 0,39; 0,54;

arily conserved hotspots. They are assumed to modify SF3B1 interaction with other elements of spliceosome complex resulting in aberrant splicing [25, 26]. It was reported also, that *SF3B1* mutations can be functionally linked with a defective DNA damage response [27]. Recently *NOTCH1* and *SF3B1* mutations as well as some other lesions have been identified in the multipotent hematopoietic progenitor cells from CLL patients indicating that early hematopoietic progenitors may be cellular targets of oncogenic events involved in CLL development [28]. This provides a new insight into pathogenesis of CLL, which is generally considered to arise from mature lymphocytes [29].

Data on genetic research in the CLL patients who had irradiation in their anamnesis are sporadic [30].

## OBJECTIVE

The objective of the study was to analyze *TP53*, *NOTCH1* and *SF3B1* mutations in CLL patients, sufferers of Chornobyl NPP accident to clarify the possible pathogenetic relationship between IR and CLL.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients and Samples.** The studied cohort included 236 CLL patients (196 males and 40 females) referred to the National Research Center for Radiation Medicine, Kyiv, during the period of 2002-2013 years. The study was approved by the local Ethics Review Committee, and all patients gave informed consent prior to participation in it. The diagnosis of CLL was based on clinical history, lymphocyte morphology, and immunophenotypic criteria. Stage of disease was established according to the Binet [31], and treatment requirement was according to National Cancer Institute (NCI) criteria [32].

Patients were divided into 2 groups according to IR exposure. The main group included 106 IR exposed CLL patients and the 2<sup>nd</sup> group (the control group) consisted of 130 IR non-exposed CLL patients.

The group of IR-exposed CLL patients included 83 clean-up workers, 16 inhabitants of radionuclide contaminated areas, and 7 evacuees. Information about doses of clean-up workers was available from the State Registry of Chornobyl Catastrophe Sufferers of Ukraine. Accumulated doses (since 1986 to the diagnosis of CLL) in 9 residents of contaminated areas (0.23; 0.39; 0.54; 0.73; 0.73; 1.24; 1.62, 1.67 and 2.12 cSv) were cal-

0,73; 0,73; 1,24; 1,62; 1,67; 2,12 сЗв) (середня вікова доза, типова для даного рівня забруднення місцевості), враховано інформацію про вимірювання радіоактивного цезію в організмі при діагностиці ХЛЛ (за наявності). Поглинуті дози для евакуйованих з Прип'яті були реконструйовані з урахуванням дати і маршруту евакуації, дати залишення забрудненої території та вживання йоду як запобіжного заходу. Пацієнти двох груп були співставними за віком, стадією захворювання, мутаційним статусом IGHV генів, CD38-позитивністю та клінічною фазою захворювання на момент проведення молекулярних досліджень (табл. 1).

Геномна ДНК для молекулярного аналізу була екстрагована з мононуклеарних клітин периферичної крові за протоколом виробника QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom).

**Аналіз мутаційного статусу IGHV.** Мутаційний статус гена IGHV оцінювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним прямим секвенуванням, як описано вище [8]. Послідовності аналізували за допомогою баз даних IgBlast та IMGT. Послідовності з гомологією > 98 % з відповідною гермінативною послідовністю гена IGHV вважалися немутуваними (UM), а випадки з < 98 % гомологією розцінювалися як мутовані (M) [33, 34].

**Аналіз мутаційного статусу генів TP53, NOTCH1 та SF3B1.** Аналіз мутацій генів TP53 був проведений у екзонах 3–10. Мутації NOTCH1 та SF3B1 проа-

culated on the basis of the data on <sup>137</sup>Cs soil contamination density (mean age dose typical for a given level of local contamination) and information on measurements of radioactive cesium in the body at the CLL diagnosis (if available). Absorbed doses for the evacuees from Prypiyat were reconstructed taking into account date and route of evacuation, date of removal from contaminated territory, and the administration of iodine as a precautionary measure. Patients of the two groups were comparable in age, stage at diagnosis, IGHV mutational status, CD38 positivity, and clinical phase of the disease at the moment of molecular studies (Table 1).

Genomic DNA for molecular analysis was extracted from peripheral blood mononuclear cells with the QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol.

**IGHV mutation status analysis.** The IGHV gene mutational status was assessed by PCR amplification followed by a direct sequencing, as described above [8]. Sequences were analyzed using the IgBlast and IMGT databases. Sequences with > 98 % homology with the corresponding germ-line IGHV gene were considered as unmutated (UM), and cases with < 98 % homology were considered to be mutated (M) [33, 34].

**Mutation analysis of TP53, NOTCH1 and SF3B1 gene.** TP53 gene mutation analysis was performed for exons 3 to 10. NOTCH1 mutations and SF3B1 muta-

**Таблиця 1**

**Клініко-гематологічні показники хворих на ХЛЛ основної та контрольної груп**

**Table 1**  
**Baseline clinical characteristics of observed CLL patients**

Показники / characteristics	Основна група / IR-exposed patients n = 106	Контрольна група / control group n = 130	p
Вік, роки; медіана (розкид) / median age, years (range)	57 (39–76)	58 (33–77)	0,714
Стать, n (%) / sex, n (%)			0,015
чоловіча / male	95 (89,6)	101 (77,7)	
жіноча / female	11 (10,4)	29 (22,2)	
Стадія за Binet, n (%) / Binet stage at diagnosis, n (%)			0,259
A	50 (47,2)	66 (50,8)	
B	49 (46,2)	49 (37,7)	
C	7 (6,6)	15 (11,5)	
Мутаційний статус IGHV генів, n (%) / IGHV mutational status, n (%)			0,345
мутовані / M	36 (34,6)	36 (28,8)	
немутувані / UM	68 (65,4)	89 (71,2)	
CD38-позитивні В-клітини, % (розкид) / CD38-positive B-cells, % (range)	26,3 (0–91,8)	19,5 (0–85,1)	0,213
Клінічна фаза ХЛЛ, n (%) / clinical phases of CLL			0,528
не потребують лікування / no first treatment required	46 (43,4)	66 (50,8)	
перед початком терапії 1-ї лінії / requiring first treatment	41 (38,7)	44 (33,8)	
рецидив хвороби / relapsed	19 (17,9)	20 (15,4)	

налізовані в так званих «гарячих точках» генів, в яких, за даними літератури, виявлено переважну більшість мутацій у хворих на ХЛЛ: в області с.7282\_7680 34-го екзона гена *NOTCH1* і в екзонах 14, 15 та 16 гена *SF3B1* [20–23, 35–37]. Аналіз мутацій здійснювали методом ПЛР з наступним прямим секвенування продукту ампліфікації. ПЛР проводили з 10 нг геномної ДНК в 25 мкл реакційної суміші, що містила 0,3 мкМ кожного праймера, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,8 мМ dNTP і 0,25 U ДНК-полімерази KOD-Plus-Neo (Тойобо, Осака, Японія) або 0,125 U ДНК-полімерази AmpliTaqGold (Applied Biosystems).

Послідовності використаних праймерів доступні за запитом. Для ампліфікації екзонів 14–16 гена *SF3B1* використані праймери, розроблені Rossi та співавт. [23], з незначною модифікацією. Умови ПЛР були оптимізовані для кожної пари праймерів. Ампліфікований продукт (10 мкл) обробляли 2 мкл ExoSAP-IT (Affymetrix) і піддавали прямому секвенуванню з набором BigDye Term v3.1 (Applied Biosystems). Секвенування проводили з 3 мкл продукту ПЛР у суміші 20 мкл, що містила 3 пмоль праймера та 2 мкл барвника Big Dye Terminator. Праймери для секвенування були такими ж, як і при проведенні ПЛР. Умови реакції секвенування: 94 °C протягом 2 хв з наступними 30 циклами при 96 °C протягом 10 с та 60 °C протягом 4 хв. Зразки аналізували на секвенаторі ДНК ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

Дані порівнювали з референтними послідовностями немутованих генів: (*TP53*: NC\_000017.10; *NOTCH1*: NM\_017617.3; *SF3B1*: NG\_032903.2). Характеристика мутацій проведена за допомогою бази даних мутації IARC TP53 (<http://p53.iarc.fr/>) та мутаційної бази даних UMD TP53 (<http://p53.fr/>) для генів *TP53* та COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) для генів *NOTCH1* та *SF3B1*.

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного пакету SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL). Дані представлені у вигляді середніх  $\pm$  стандартних відхилень та медіан. Для порівняння безперервних даних використовували Wilcoxon тест, категоріальних даних –  $\chi^2$  тест. Загальну виживаність пацієнтів визначали як час від діагностики ХЛЛ до дати смерті через будь-яку причину або дати останнього спостереження, за методом Каплан-Мейера і оцінювали за допомогою log-rank тесту. Уніваріантний та мультіваріантний Cox регресійний аналіз використовували для перевірки незалежної прогностичної сили кожного парамет-

тронів були аналізовані в так званих «гарячих точках» генів, в яких, за даними літератури, виявлено переважну більшість мутацій у хворих на ХЛЛ: в області с.7282\_7680 34-го екзона гена *NOTCH1* і в екзонах 14, 15 та 16 гена *SF3B1* [20–23, 35–37]. Аналіз мутацій здійснювали методом ПЛР з наступним прямим секвенування продукту ампліфікації. ПЛР проводили з 10 нг геномної ДНК в 25 мкл реакційної суміші, що містила 0,3 мкМ кожного праймера, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,8 мМ dNTPs, and 0.25 U of KOD-Plus-Neo DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) or 0.125 U of AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems).

Primer sequences are available by request. Primers for exons 14–16 of *SF3B1* gene were as designed by Rossi et al. [23] with little modifications. PCR conditions were optimized for each primer pair. The amplified product (10  $\mu$ L) was treated with 2  $\mu$ L of ExoSAP-IT (Affymetrix) and submitted to direct sequencing with BigDye Term v3.1 kit (Applied Biosystems). The sequencing reaction was carried out with 3  $\mu$ L of PCR product in a 20  $\mu$ L volume mixture containing 3 pmol of primer and 2  $\mu$ L of Big Dye Terminator. The primers were the same as used in the PCR. The sequencing reaction conditions were: 94 °C for 2 min followed by 30 cycles at 96 °C for 10 s and 60 °C for 4 min. The samples were then analyzed in ABI PRISM 3730 DNA sequence analyzer (Applied Biosystems).

Data were compared with reference sequences: (*TP53*: NC\_000017.10; *NOTCH1*: NM\_017617.3; *SF3B1*: NG\_032903.2). Mutations were validated using the IARC TP53 Mutation Database (<http://p53.iarc.fr/>) and UMD TP53 Mutation Database (<http://p53.fr/>) for *TP53* gene and COSMIC database (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) for *NOTCH1* and *SF3B1* genes.

Statistics were performed using the SPSS 13.0 software package (SPSS, Chicago, IL). Data shown are the means plus or minus standard deviations, and medians. The Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and chi-square test for categorical variables were used to compare characteristics between different subgroups of patients. Overall survival (OS) of patients was defined as time from diagnosis to date of death due to any cause or last follow-up time, which ever occurred first, estimated by the method of Kaplan and Meier and assessed by the log-rank test. Univariate and multivariate Cox models were used to verify independent prognostic

ра. Мінімізацію моделі виконували поетапною зворотною елімінацією. Всі значення  $p$  були двосторонніми, значення  $p < 0,05$  вважали статистично значущими.

## РЕЗУЛЬТАТИ

**Частота мутацій генів *TP53*, *SF3B1* та *NOTCH1*.** Мутації генів *TP53*, *SF3B1* та *NOTCH1* були виявлені у 12,7; 11,5 і 17,7 % пацієнтів контрольної групи (табл. 2). Ці частоти схожі з даними інших когорт хворих на ХЛЛ [35, 36, 38]. Мутації генів *TP53* та *SF3B1* були виявлені з подібною частотою в основній групі – відповідно 11,3 % та 10,0 %. Проте, частота мутацій гена *NOTCH1* у основній групі виявилась нижчою порівняно з контрольною групою (6,7 % проти 17,7 %;  $p = 0,012$ ).

Частота мутацій *TP53* збільшувалась серед пацієнтів, які потребують початкового лікування та в рецидиві захворювання в обох групах ( $p = 0,0001$  для всіх хворих на ХЛЛ,  $p = 0,001$  – у контрольній групі та  $p = 0,038$  – в основній групі). В обох групах також спостерігалась тенденція до збільшення кількості мутацій гена *SF3B1* у хворих з рецидивом захворювання порівняно з пацієнтами, які потребують початкового лікування і вперше діагностованих ( $p = 0,051$  для всіх хворих на ХЛЛ,  $p = 0,173$  – в основній групі і  $p = 0,242$  – в контрольній групі) Поширеність мутацій гена *NOTCH1* у контрольній групі в порівнянні з пацієнтами, які зазнали впливу ІВ, була більш очевидною серед пацієнтів, які потребують початкового лікування ( $p = 0,007$ ).

**Характеристика мутацій *TP53*.** У 28 з 236 хворих на ХЛЛ було виявлено 30 мутацій гена *TP53*, у двох пацієнтів контрольної групи (один – потребував лікування першої лінії і один знаходився у рецидиві захво-

power of each parameter. Model minimization was performed by stepwise backward elimination. All  $p$  values are two-sided, and  $p$  value  $< 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

**Frequency of *TP53*, *SF3B1* and *NOTCH1* mutations.** Mutations of *TP53*, *SF3B1*, and *NOTCH1* were found in 12.7 %, 11.5 %, and 17.7 % of patients in the control group (Table 2). These frequencies are comparable with data from other CLL cohorts [35, 36, 38]. *TP53* and *SF3B1* gene mutations were found with similar incidence in the main group – 11.3 % and 10.0 % correspondingly. However, the frequency of *NOTCH1* mutations in the main group was lower in comparison with the control group (6.7 % vs 17.7 %;  $p = 0.012$ ).

*TP53* mutations were enriched among patients requiring first treatment and relapsed CLL in both group ( $p = 0.0001$  for all CLL patients;  $p = 0.001$  in the control group and  $p = 0.038$  in the main group). In both groups there was also a tendency to increased number of *SF3B1* mutations in relapsed CLL patients compared with patients requiring first treatment and new diagnosed ones ( $p = 0.051$  for all CLL patients;  $p = 0.173$  in the main group and  $p = 0.242$  in the control group). The prevalence of *NOTCH1* mutations in the control group compared with IR-exposed patients was more evident among patients requiring first treatment ( $p = 0.007$ ).

**Characteristics of *TP53* mutations.** Overall, 30 *TP53* mutations were detected in 28 of 236 CLL patients, two patients of the control group (1 – requiring treatment and 1 – relapsed) had two dif-

## Таблиця 2

Частота мутацій генів *TP53*, *SF3B1* і *NOTCH1* в групах обстежених пацієнтів

Table 2

Distribution of genetic lesions in observed CLL patients

Показники / characteristics	Основна група / IR-exposed patients	Контрольна група / control group	$p$
<b><i>TP53</i> мутації, n (%) / <i>TP53</i> mutations, n (%)</b>	12 з 106 (11,3)	16 з 126 (12,7)	0,748
пацієнти patients			
не потребують лікування / no treatment required	2 з 46 (4,3)	3 з 65 (4,6)	0,947
перед терапією 1-ї лінії / requiring first treatment	5 з 41 (12,2)	6 з 42 (14,2)	0,779
рецидив хвороби / relapsed	5 з 19 (26,3)	7 з 19 (36,8)	0,485
<b><i>NOTCH1</i> мутації, n (%) / <i>NOTCH1</i> mutations, n (%)</b>	7 з 105 (6,7)	23 з 130 (17,7)	0,012
пацієнти patients			
не потребують лікування / no treatment required	2 з 46 (4,3)	6 з 66 (9,1)	0,338
перед терапією 1-ї лінії / requiring first treatment	4 з 41 (9,8)	15 з 44 (34,1)	0,007
рецидив хвороби / relapsed	1 з 18 (5,6)	2 з 20 (10,0)	0,612
<b><i>SF3B1</i> мутації, n (%) / <i>SF3B1</i> mutations, n (%)</b>	9 з 90 (10,0)	14 з 122 (11,5)	0,733
пацієнти patients			
не потребують лікування / no treatment required	2 з 39 (5,1)	6 з 59 (9,2)	0,447
перед терапією 1-ї лінії / requiring first treatment	4 з 38 (10,5)	4 з 40 (10,0)	0,939
рецидив хвороби / relapsed	3 з 13 (23,1)	4 з 17 (23,5)	0,977

рювання) були присутні одночасно дві різні мутації. Найчастіше зустрічались missense мутації (20/30, 66,7 %), які приводили до значної втрати активності білка p53. Аналіз транскрипційної активності мутантного p53 за допомогою алгоритму MUT-P53 II (<http://p53.free.fr>) показав, що у 16 з 20 (80 %) missense мутацій залишкова активність білка становила менше 25 % у порівнянні з p53 дикого типу. Крім missense мутацій також виявлені інші генетичні порушення гена *TP53*: делеції та вставки (6 випадків, 20 %), несмислові мутації (3 випадки, 10 %) і одна делеція, порушувала сплайсинг 5' регіону екзона 9 (контрольна група).

Мутації *TP53* були розподілені практично рівномірно між екзонами від 4 до 9, але найчастіше вони виявлялися в екзоні 6 (8 випадків, 26,8 %). Одну мутацію було виявлено в екзоні 3 і жодної – в екзоні 10. Переважали мутації, локалізовані у ДНК-зв'язуючому домені (залишки 102–296): 20 з 30 (66,7 %) випадків, що відповідає попереднім повідомленням [16, 17]. Більшість з виявлених мутацій гена *TP53* (25 з 30, 83,3 %) раніше були опубліковані, однак тільки дві з них локалізувались у класичних «гарячих» точках, описаних при ХЛЛ, а саме: в позиціях Arg248 (заміна p.Arg248Thr у пацієнта основної групи) та Arg282 (заміна p.Arg282Gln у хворого контрольної групи). П'ять виявлених мутацій гена *TP53* описані вперше.

Суттєвих відмінностей за типом і поширеністю мутацій гена *TP53* у хворих на ХЛЛ основної та контрольної груп не знайдено. Проте в основній групі виявлено два випадки (1,88 %), представлені ідентичною однонуклеотидною заміною c.665C>T, що призводила до заміни проліну на лейцин в положенні 222 (p.Pro222Leu) у амінокислотній послідовності і значно знижувала активність білка p53: залишкова активність становила 23,96 % порівняно з диким типом p53 за алгоритмом MUT-P53 II. Ми розцінили цю мутацію як однонуклеотидний поліморфізм (SNP), оскільки в одного пацієнта вона була також виявлена в ДНК букального епітелію (аналіз гермінативної ДНК другого пацієнта був недоступним).

**Характеристики мутацій генів *SF3B1* і *NOTCH1*.** Мутації *NOTCH1* були представлені типовою делецією двох пар нуклеотидів у 34-му екзоні c.7544\_7545delCT (P2514fs\*4) у всіх 30 хворих з виявленими мутаціями. Вважають, що ця мутація призводить до порушення деградації *NOTCH1* через втрату С-термінального PEST домену [20, 39]. У двох пацієнтів з делецією c.7544\_7545delCT (по одному з основної та контрольної груп) були виявлені додаткові мутації *NOTCH1*. В одному випадку це була делеція одного нуклеотиду c.7444delC, опублікована

ferent mutations. *TP53* mutations were represented mainly by missense substitutions (20/30, 66.7 %), which resulted in significant loss of p53 activity. Analysis of residual transcription activity of mutant p53 with MUT-P53 II predictive algorithm (<http://p53.free.fr>) showed < 25 % activity compared to wild type p53 in 16 of 20 (80 %) mutations. Beside of missense substitutions, *TP53* truncating lesions were found: frameshift deletions and insertions (6 cases, 20 %), nonsense mutations (3 cases, 10 %) and one deletion affected the 5' splicing site of exon 9 (control group case).

*TP53* mutations were distributed almost evenly between exons 4 to 9, but the most frequently were detected in exon 6 (8 cases, 26.8%). One mutation was found in exon 3 and no mutations – in exon 10. *TP53* mutations mainly affected DNA binding domain (residues 102–296) – 20 of 30 (66.7 %) cases, that is consistent with previous reports [16, 17]. The most of detected *TP53* mutations (25 of 30, 83.3 %) were previously published, but only two of them (8 %) were located in classic hot spots reported in CLL (Arg175, Arg248, Arg273, and Arg282) – p.Arg248Thr (main group case) and p.Arg282Gln (control group case). Five of detected *TP53* mutations were not reported before.

We did not reveal significant differences in type and distribution of *TP53* lesions between main and control CLL groups. However, in main group we found two different cases (1.88 %) presented by an identical single nucleotide substitution c.665C>T, which led to change proline for leucine in position 222 (p.Pro222Leu) and significantly impaired p53 activity according to the MUT-P53 II predictive algorithm (23.96 % compared to wild type p53). We considered this mutation as single nucleotide polymorphism (SNP) because in one patient it was found in DNA from the buccal mucosa also (germline DNA sample was not available for the second patient).

**Characteristics of *SF3B1* and *NOTCH1* mutations.** *NOTCH1* mutations were represented by typical two base pair deletion c.7544\_7545delCT (P2514fs\*4) in all 30 patients with revealed mutations. This mutation is predicted to result in *NOTCH1* -impaired degradation through the truncation of the C-terminal PEST domain [20, 39]. In two patients with c.7544\_7545delCT deletion (one from the main group and one from the control group) additional *NOTCH1* mutations were detected. In one case it was previously published single



раніше [37], в іншому – вставка одного нуклеотиду c.7570\_7571insC, раніш не описана. Обидві мутації змінюють рамку зчитування нуклеотидної послідовності, і, виходячи з їх локалізації, передбачається, що вони також призводять до втрати регуляторного PEST домену, що порушує деградацію білка NOTCH1.

Майже всі ідентифіковані мутації гена *SF3B1* (22/23, 95,7 %) були представлені гетерозиготними missense мутаціями, крім делеції c.2352-2360del9, яка не призводила до зсуву рамки зчитування. В жодному випадку не виявлено більш, ніж однієї мутації у одного пацієнта. Сімнадцять із 22 виявлених мутацій (77,3 %) описані раніше [22, 23, 35–38], більшість з них (13 з 17; 76,5 %) були розташовані у типових гарячих точках: Glu622 в екзоні 14 (3 випадки), Lys700 в екзоні 15 (3 випадки), Gly742 в екзоні 16 (7 випадків). Таким чином, найбільш частою мутацією гена *SF3B1* була p.Gly742Asp (7 з 22 випадків, 31,8 %). Ця заміна була другою за частотою мутацією гена *SF3B1* в дослідженні Quesada et al. [22]. П'ять виявлених у нашій когорті ХЛЛ мутацій гена *SF3B1* раніше не охарактеризовані, включаючи делецію дев'яти пар нуклеотидів c.2352-2360del9 в ділянці, що кодує кодон 784 16-го екзону, хоча про два випадки делецій трьох нуклеотидів у тому ж локусі у хворих на ХЛЛ повідомлялося раніше (COSMIC database).

**Одночасна присутність мутацій генів *TP53*, *SF3B1* та *NOTCH1*.** Мутації гена *NOTCH1* були майже взаємовиключними з мутаціями генів *TP53* та *SF3B1*. В контрольній групі хворих у одного пацієнта було виявлено одночасно мутації генів *NOTCH1* і *TP53*, а у двох хворих – генів *NOTCH1* та *SF3B1*.

Мутації генів *SF3B1* і *TP53* були взаємно виключними у контрольній групі (лише в одного з 15 пацієнтів з *TP53* мутаціями також була присутня мутація гена *SF3B1*). Водночас в основній групі у чотирьох з 10 пацієнтів з мутаціями *TP53* були виявлені також і мутації гена *SF3B1* ( $p = 0,001$  при порівнянні основної та контрольної груп).

**Розподіл мутацій *TP53*, *SF3B1* та *NOTCH1* у основній групі в залежності від радіаційного анамнезу хворих.** Не виявлено відмінностей у частотах досліджених генетичних уражень залежно від ІВ анамнезу опромінених хворих на ХЛЛ, за винятком більшої частоти мутацій гена *SF3B1* та одночасної присутності мутацій генів *TP53* і *SF3B1* серед УЛНА 1986 року (які отримали найбільші дози опромінення) і евакуйованих (табл. 3). Один з двох хворих на ХЛЛ з виявленою ідентичною мутацією *TP53* (p.Pro222Leu) був УЛНА 1986 року, інший – ева-

base pair deletion c.7444delC [37], in another – single base pair insertion c.7570\_7571insC, which was not previously reported. Both mutations causes shift in reading frame and, based on their localization along the NOTCH1 protein, are predicted to result in *NOTCH1* -impaired degradation through the truncation of regulatory PEST domain.

Almost all identified *SF3B1* mutations (22/23, 95.7 %) were heterozygous missense substitutions and only one in-frame deletion c.2352-2360del9 was detected. No patient had more than one mutation. Seventeen of twenty-two detected mutations (77.3 %) were previously reported [22, 23, 35-38] and most of them (13 of 17, 76.5 %) were located in typical hot spots: Glu622 in exon 14 (3 cases), Lys700 in exon 15 (3 cases), Gly742 in exon 16 (7 cases). Thus, the most common *SF3B1* mutation was p.Gly742Asp (7 of 22 cases, 31.8 %). This alteration was the second most frequent *SF3B1* mutation in the study by Quesada et al. [22]. Five of detected in our CLL cohort *SF3B1* mutations were not previously reported, including nine base pair deletion c.2352-2360del9 which targeted codon 784 in exon 16, though two cases with three base pair deletion in the same locus was reported earlier in CLL (COSMIC database).

**Mutual representation of *TP53*, *SF3B1* and *NOTCH1* mutations.** Mutations in the *NOTCH1* gene were almost mutually exclusive with mutations in the *TP53* gene as well as *SF3B1* mutations. Only single case harbored mutations in both *NOTCH1* and *TP53* genes and two cases – in *NOTCH1* and *SF3B1* gene (control CLL group patients).

*SF3B1* and *TP53* mutations were mutually exclusive in the control group (only one of 15 patients with *TP53* mutations had also mutation in *SF3B1* gene), while in four of 10 of IR-exposed patients with *TP53* mutations were detected *SF3B1* mutations ( $p = 0.001$  in comparison of the main and the control group).

**Distribution of *TP53*, *SF3B1* and *NOTCH1* mutations in the main group depending on radiation anamnesis.** Analysis did not reveal differences in frequencies of studied genetic lesions depend on IR anamnesis of irradiated CLL patients, except of prevalence of *SF3B1* mutations and co-existence of *TP53* and *SF3B1* mutations among clean-up workers of 1986 (exposed to the highest irradiation doses) and evacuees (Table 3). One of two CLL patients with identical *TP53* substitution (p.Pro222Leu) was the clean-up worker of 1986,

**Таблиця 3**

Частота мутацій генів *TP53*, *NOTCH1* і *SF3B1* у обстежених пацієнтів основної групи залежно від радіаційного анамнезу

**Table 3**

Association of molecular lesions in CLL patients with IR anamnesis

Групи пацієнтів Group	Середня доза опромінення, сЗв Mean dose, cSv	<i>TP53</i> мутації, n (%) <i>TP53</i> mutations, n (%)	<i>NOTCH1</i> мутації, n (%) <i>NOTCH1</i> mutations, n (%)	<i>SF3B1</i> мутації, n (%) <i>SF3B1</i> mutations, n (%)	<i>SF3B1</i> + <i>TP53</i> мутації, n (%) <i>SF3B1</i> + <i>TP53</i> mutations, n (%)
УЛНА / clean-up workers		7 з 83 (8,4)	6 з 82 (7,3)	7 з 74 (9,5)	3 з 74 (4,1)
1986 р. / year	31,76 ± 7,23 (n = 22)	6 з 71 (8,5)	5 з 70 (7,1)	7 з 62 (11,3)	3 з 62 (4,9)
1987–1989 рр. / years	5,34 ± 0,51 (n = 7)	1 з 12 (8,3)	1 з 12 (8,3)	0 з 12	0 з 12
Мешканці радіоактивно забруднених територій Contaminated area	1,13 ± 0,26 (n = 9)	1 з 16 (6,3)	1 з 16 (6,3)	0 з 10	0 з 10
Евакуйовані / evacuees	4,76 ± 0,35 (n = 4)	3 з 7 (42,9)	0 з 7	2 з 6 (33,3)	1 з 6 (16,6)

куйований із забрудненої радіонуклідами місцевості.

Асоціація мутацій та особливостей В-клітинних рецепторів (BCR). Мутаційний статус генів *IGHV* був оцінений у 104 пацієнтів основної групи та 125 пацієнтів контрольної групи (табл. 4). У обох досліджених групах мутації гена *NOTCH1* були виявлені переважно у випадках з UM *IGHV* генами. Хоча мутації гена *TP53* у контрольній групі на рівні тенденції більш часто виявлялись у випадках з UM *IGHV* генами ( $p = 0,178$ ), в основній

another one – evacuee from radionuclide contaminated area.

Association of mutations and B-cell receptor (BCR) features. Mutational status of *IGHV* genes was assessed in 104 patients of the main group and 125 patients of the control group (Table 4). In both studied groups, *NOTCH1* mutations were found mostly in UM *IGHV* cases. While *TP53* mutations in the control group had tendency to be clustered in UM *IGHV* cases ( $p = 0.178$ ), in the main group

**Таблиця 4**

Частота мутацій генів *TP53*, *NOTCH1* і *SF3B1* у обстежених пацієнтів залежно від мутаційного статусу *IGHV* генів і стереотипії BCR

**Table 4**

Distribution of molecular lesions among CLL patients with M or UM *IGHV* genes and stereotyped or unstereotyped BCR

Показники / parameters	UM <i>IGHV</i> , n (%)	M <i>IGHV</i> , n (%)	<i>p</i>
<b><i>TP53</i> мутації / <i>TP53</i> mutations</b>	20 з 153 (13,1)	6 з 72 (8,3)	0,305
основна група / the main group	8 з 68 (11,8)	4 з 36 (11,1)	0,921
контрольна група / the control group	12 з 85 (14,1)	2 з 36 (5,6)	0,178
<b><i>NOTCH1</i> мутації / <i>NOTCH1</i> mutations</b>	30 з 156 (19,2)	1 з 72 (1,4)	0,001
основна група / the main group	7 з 67 (10,4)	0 з 36	0,045
контрольна група / the control group	23 з 89 (25,8)	1 з 36 (2,8)	0,003
<b><i>SF3B1</i> мутації / <i>SF3B1</i> mutations</b>	17 з 139 (12,2)	5 з 66 (7,6)	0,314
основна група / the main group	7 з 58 (12,1)	2 з 30 (6,7)	0,428
контрольна група / the control group	10 з 81 (12,3)	3 з 36 (8,3)	0,524
	<b>Стереотипні випадки</b>	<b>Гетерогенні випадки</b>	<b><i>p</i></b>
<b><i>TP53</i> мутації / <i>TP53</i> mutations</b>	12 зі 126 (9,5)	8 з 99 (8,1)	0,706
основна група / the main group	4 з 50 (8,0)	3 з 45 (6,7)	0,475
контрольна група / the control group	8 з 76 (10,5)	5 з 54 (9,3)	0,819
<b><i>NOTCH1</i> мутації / <i>NOTCH1</i> mutations</b>	24 з 127 (18,8)	7 з 100 (7,0)	0,009
основна група / the main group	5 з 49 (10,2)	2 з 54 (3,7)	0,191
контрольна група / the control group	19 з 78 (24,4)	5 з 46 (10,6)	0,066
<b><i>SF3B1</i> мутації / <i>SF3B1</i> mutations</b>	16 з 114 (14,0)	5 з 90 (5,6)	0,048
основна група / the main group	5 з 42 (11,9)	4 з 46 (8,7)	0,620
контрольна група / the control group	11 з 72 (15,3)	1 з 44 (2,3)	0,026

групі розподіл мутацій гена *TP53* серед хворих з UM та M *IGHV* генами не відрізнявся ( $p = 0,921$ ). Стереотипія В-клітинних рецепторів (BCR) не впливала на розподіл мутацій *TP53* (частота мутацій *TP53* становила 13,5 % у випадках зі стереотипними BCR та 8,3 % у випадках з гетерогенними BCR;  $p = 0,305$ ). Серед хворих на ХЛЛ з мутаціями генів *NOTCH1* та *SF3B1* була збільшена кількість випадків зі стереотипними BCR (для мутацій гена *NOTCH1*: 18,8 % у стереотипних випадках і 7,0 % – у гетерогенних випадках,  $p = 0,009$ ; для мутацій гена *SF3B1* – 14,0 % і 5,6 % відповідно;  $p = 0,048$ ), але не було знайдено асоціації з певними кластерами стереотипних рецепторів. Слід зазначити, що кластер #8 (*IGHV4-39/HD6-13/HJ5*), асоційований з мутаціями гена *NOTCH1* за даними Rossi et al. [40], був відсутнім в нашій когорті, хоча частота гена *IGHV4-39* не відрізнялась від інших описаних когорт хворих на ХЛЛ [41]. В обох випадках в нашій когорті, що належали до кластера #2, були виявлені мутації гена *SF3B1*, що узгоджується з даними Rossi et al. [40]. На відміну від цього, лише в одному з шести (16,6 %) випадків ХЛЛ з гетерогенним BCR, побудованим з використанням гена *IGHV3-21*, були виявлені мутації гена *SF3B1*.

**Прогностична значущість мутацій генів *TP53*, *SF3B1* та *NOTCH1*.** При проведенні уніваріантного Cox регресійного аналізу впливу окремих факторів на загальне виживання пацієнтів показник співвідношення ризиків (HR) для наявності мутацій гена *TP53* становив 1,896 (95 % ДІ 1,177–3,054;  $p = 0,009$ ); HR, пов'язаний з наявністю мутацій гена *NOTCH1*, становив 1,646 (95% ДІ 1,014–2,682;  $p = 0,044$ ), а HR, асоційований з мутаціями *SF3B1*, склав 2,341 (95% ДІ 1,376–3,983,  $p = 0,002$ ). До мультиваріантного регресійного аналізу були включені такі параметри, як стадія за Binet, вік пацієнтів (старше або молодше 65 років), початковий лейкоцитоз (більше або нижче  $20 \cdot 10^9/\text{л}$ ), мутаційний статус генів *IGHV* і визначені генетичні ураження. Присутність мутацій генів *TP53* і *SF3B1*, але не мутацій гена *NOTCH1*, виявились значущими (табл. 5).

## ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення мутацій генів *TP53*, *NOTCH1* та *SF3B1* у хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ у зв'язку з аварією на Чорнобильській АЕС, проводили в порівнянні з контрольною групою хворих на ХЛЛ, подібних за віком, стадією захворювання, мутаційним статусом *IGHV*, CD38-позитивністю і клінічною фазою захворювання в момент молекулярного дослідження. Слід зазначити, що опромінені хворі на ХЛЛ були переважно чоловіками

the distribution of *TP53* mutations among UM and M *IGHV* cases did not differ ( $p = 0.921$ ). Stereotypy of B-cell receptor (BCR) did not affect the distribution of *TP53* mutations (frequency of *TP53* mutations was 13.5 % in stereotyped cases and 8.3 % in unstereotyped cases;  $p = 0.305$ ). Among CLL patients with *NOTCH1* and *SF3B1* mutations the number of cases with stereotyped BCR was increased (for *NOTCH1* mutations: 18.8 % in stereotyped cases and 7.0 % in unstereotyped cases,  $p = 0.009$ ; for *SF3B1* mutations: 14.0 % and 5.6 %, correspondingly,  $p = 0.048$ ), but no association with specific subsets was found. It is necessary to note that subset #8 (*IGHV4-39/HD6-13/HJ5*) associated with *NOTCH1* mutations according to Rossi et al. [40], was absent in our cohort, although the usage of *IGHV4-39* did not differ from that of the other series [41]. Both two cases from our cohort belonging to subset #2 had *SF3B1* mutations that is in agreement with data of Rossi et al. [40]. In contrast, *SF3B1* mutations were found only in one of 6 cases (16.6 %) of *IGHV3-21*-CLL with heterogeneous BCR.

**Prognostic relevance of *TP53*, *SF3B1* and *NOTCH1* mutations.** When conducting a univariate Cox regression analysis of the effects of individual factors on overall survival of patients, the proportional hazard ratio (HR) associated with *TP53* mutations was 1.896 (95 % CI 1.177–3.054;  $p = 0.009$ ), the HR associated with *NOTCH1* mutations was 1.646 (95 % CI 1.014–2.682;  $p = 0.044$ ), and HR associated with *SF3B1* mutations was 2.341 (95 % CI 1.376–3.983;  $p = 0.002$ ). Such parameters as Binet stage, age of patients (cut-point at 65 years), initial leukocytosis (cut-point at  $20 \cdot 10^9/\text{l}$ ), mutational status of *IGHV* genes, and studied genetic lesions were included in multivariate analysis. The impacts of *TP53* and *SF3B1* mutations, but not *NOTCH1* mutations, were significant (Table 5).

## DISCUSSION

The study of *TP53*, *NOTCH1*, and *SF3B1* mutations in CLL patients who have been exposed to IR due to Chernobyl NPP accident was carried out in comparison with the control group of CLL patients similar to age, stage of the disease, *IGHV* mutational status, CD38-positivity, and clinical phases of the disease at the moment of molecular study. It should be noted, that IR-exposed CLL patient were mainly men, group

**Таблиця 5**

**Медіана загального виживання (OS) хворих на ХЛЛ залежно від наявності генетичних порушень**

**Table 5**

**Median of overall survival in CLL patients depending on different molecular lesions**

Показники / parameters	Всі хворі All cohort	Основна група Main group	Контрольна група Control group
<i>TP53</i> мутований / <i>TP53</i> mutated	57 міс.	69 міс.	45 міс.
<i>TP53</i> немутований / <i>TP53</i> unmutated	96 міс.	112 міс.	73 міс.
<i>p</i>	0,007	0,005	0,310
<i>NOTCH1</i> мутований / <i>NOTCH1</i> mutated	55 міс.	107 міс.	43 міс.
<i>NOTCH1</i> немутований / <i>NOTCH1</i> unmutated	96 міс.	139 міс.	76 міс.
<i>p</i>	0,041	0,818	0,042
<i>SF3B1</i> мутований / <i>SF3B1</i> mutated	57 міс.	61 міс.	45 міс.
<i>SF3B1</i> немутований / <i>SF3B1</i> unmutated	98 міс.	114 міс.	73 міс.
<i>p</i>	0,001	0,0001	0,134

відносно молодого віку (медіана 57 років), з немутованим статусом *IGHV* генів (65,4% випадків) в лейкоемічних клітинах. Більшість пацієнтів обстежена перед початком терапії першої лінії.

У обох досліджених групах частоти мутацій генів *TP53* та *SF3B1* були подібними і співпадали з даними інших когорт хворих на ХЛЛ [16, 35, 36]. Частота цих мутацій збільшувалась серед пацієнтів, які потребували початкового лікування, або знаходились у рецидиві захворювання порівняно з вперше діагностованими пацієнтами, які не потребували лікування. У той же час деякі специфічні особливості були знайдені серед хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ.

Перш за все, у двох пацієнтів з ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ (1,88 %), була виявлена рідкісна ідентична мутація гена *TP53* – заміщення с.665С>Т, що призвело до зміни проліну на лейцин в кодоні 222 (Pro222Leu) у амінокислотній послідовності та порушення активності білка p53. Тільки вісім випадків такого ураження, що були розцінені як соматичні мутації в пухлинних клітинах пацієнтів з різними формами солідних новоутворень, представлені в *TP53* мутаційній базі даних IARC (версія R17, квітень 2015 р.). Крім того, описано один випадок заміщення с.665С>Т, оцінений як гермінативна мутація у пацієнта з синдромом Li-Fraumeni (LFS, рідкісний успадкований синдром множинної схильності до раку, пов'язаний з гетерозиготними мутаціями в гені *TP53*). С.665С>Т заміна була ідентифікована також як дуже рідкісний однонуклеотидний поліморфізм (rs146340390) в геномному проекті ESP6500 [42]: двоє з 4300 практично здорових осіб (0,05 %), обстежених у європейсько-американській популяції, були носіями гетерозиготної мутації с.665С>Т. Оскільки в одного з двох спостережуваних нами хворих на ХЛЛ з с.665С>Т була виявлена

characterized quite young age (median 57), mainly unmutated *IGHV* gene status (65.4 % cases). The most of patients were observed before first line therapy.

In both studied groups, the frequencies of *TP53* and *SF3B1* mutations were similar and comparable with data from other CLL cohorts [16, 35, 36]. The incidence of these mutations increased in patients requiring first treatment and relapsed ones comparing with new diagnosed patients who did not required treatment. At the same time, some specific features were found among IR-exposed CLL patients.

First of all, two of IR-exposed CLL patients (1.88 %) had rare identical mutation of *TP53* gene – с.665С>Т substitution that led to change proline for leucine at codon 222 (Pro222Leu) and impaired p53 protein activity. Eight cases of such a lesion evaluated as somatic mutation in tumor cells of patients with different types of solid cancers are represented in IARC *TP53* Mutation Database (version R17, accessed April, 2015). Beside this, one case of с.665С>Т substitution is presented evaluated as germline mutation in patient with Li-Fraumeni syndrome (LFS, rare inherited multiple cancer predisposition syndrome, associated with heterozygous mutations in the *TP53* gene). с.665С>Т substitution was identified also as very rare SNP (rs146340390) in ESP6500 Genome Project [42]: two of 4300 (0.05 %) genotypes analyzed in European American population were carriers of heterozygous с.665С>Т mutation. Since in one of two observed CLL patients with с.665С>Т the same mutation was revealed in DNA from the buccal

така ж мутація в ДНК букального епітелію, можна припустити, що це заміщення є рідкісним поліморфізмом гена *TP53*, який в цих випадках може впливати на розвиток ХЛЛ під дією ІВ.

Згідно з теоретичним обґрунтуванням, особи з мутаціями гена *TP53* характеризуються підвищеною чутливістю до дії ІВ і збільшенням ризику розвитку пухлин. Цю думку підтверджують дані щодо розвитку радіаційно-індукованих вторинних онкологічних захворювань у хворих на LFS, хоча вони й дуже обмежені внаслідок рідкості синдрому, а також певні результати, отримані *in vitro*. Так, дані Li і Fraumeni [43], так само як і інших дослідників [44-46], свідчать про більш високий ризик розвитку радіаційно-індукованих видів раку серед хворих на LFS. Результати окремих робіт свідчать про появу метахромних пухлин в опромінених ділянках у онкологічних хворих з наявністю гермінативних мутацій *TP53* [47, 48]. Boyle et al. [49] спостерігали, що після опромінення дефіцитних за *TP53* фібробластів, отриманих від хворих на LFS, пошкодження ДНК були більш виразними, ніж у фібробластах осіб з немутованим геном *TP53*. Є дані про пригнічення апоптозу опромінених фібробластів у хворого на LFS у порівнянні з контрольними фібробластами [50]. В літературі відсутні дані щодо розвитку ХЛЛ у хворих на LFS, яким отримували променеви терапію, тому наші дані можуть вперше свідчити про можливу взаємодію вродженої радіочутливості, спричиненої мутацією (поліморфізмом) гена *TP53* (який обумовлює генетичну схильність до розвитку кількох форм злоякісних пухлин), опромінення та розвитком ХЛЛ.

Мутації гена *TP53* у опромінених пацієнтів з нашої когорти були виявлені з рівною частотою серед випадків з мутованими (11,1 %) та немутованими (11,8 %) *IGHV* генами, тоді як тенденція до поширеності мутацій гена *TP53* у немутованих у порівнянні з мутованими випадками *IGHV* була виявлена в контрольній групі (відповідно 14,1 % і 5,6 %;  $p = 0,178$ ). Останнє спостереження узгоджується з даними інших авторів [24, 27]. Таким чином, мутації *TP53* у опромінених пацієнтів були виявлені також у випадках з М *IGHV* генами, що є нетиповим для хворих, які не зазнали впливу ІВ.

Взаємна винятковість між присутністю мутацій генів *SF3B1* і *TP53*, про яку повідомлялося раніше [24], спостерігалася лише у хворих на ХЛЛ контрольної групи. Навпаки, в основній групі мутації гена *SF3B1* поєднувалися з мутаціями гена *TP53* майже у половині виявлених випадків (чотири з 10, 40,0 %;  $p = 0,001$ ). Раніше висока частота одночасної присутності мутацій генів *TP53* і *SF3B1* (24 %) спостерігалася Dreger et al. [51] у клінічному дослідженні CLL3X в групі хворих

mucosa, it is very likely, from our point of view, that this substitution may represent a rare SNP in *TP53* gene, which in these cases could influence CLL development under IR exposure.

According to theoretic rationale, persons with mutant *TP53* are considered to have increased sensitivity to IR and thus cancerogenesis. The data on radiation-induced secondary cancers in LFS patients, albeit very limited because of syndrome rarity, and certain *in vitro* findings support this opinion. Thus, Li and Fraumeni [43], as well as others [44-46], have reported a higher risk of developing of radiation-induced cancers among LFS patients. Some case-reports point to the appearance of metachronous cancers in radiation-treated areas in cancer patients with *TP53* germline mutations [47, 48]. Boyle et al. [49] observed that after irradiation *TP53*-deficient fibroblasts derived from LFS patients accumulated DNA damage more significantly than fibroblasts from wild-type *TP53* persons. Reduced apoptosis in irradiated fibroblasts from LFS patient compared with fibroblasts from controls was also reported [50]. To our knowledge, no secondary CLL cases were reported in radiation-treated LFS patients, thus our data may suggest for the first time a possible interaction between inherited IR sensitivity caused by mutation in *TP53* (genetic susceptibility to multiple cancers), radiation and CLL development.

*TP53* mutations in IR-exposed patients from our cohort were seen with equal frequency among M (11.1 %) and UM (11.8 %) *IGHV* cases, while the tendency to prevalence of *TP53* mutations in UM compared with M *IGHV* cases was found in the control group (14.1 % and 5.6 %, correspondingly;  $p = 0.178$ ). The last observation was in agreement with data of others authors [24, 27]. Thus, *TP53* mutations in IR-exposed patients were found also in cases that are atypical for IR non-exposed patients.

Reported mutual exclusivity between *SF3B1* and *TP53* lesions [24] was observed only in CLL patients of the control group. On the contrary, in IR-exposed group *SF3B1* mutations were combined with mutations in *TP53* almost in half of detected cases (four of 10, 40.0 %;  $p = 0.001$ ). Earlier a high frequency of *TP53* mutations among cases with mutated *SF3B1* (24 %) was observed by Dreger et al. [51] in the group of poor-risk CLL

високого ризику ХЛЛ, які потребували трансплантації аллогенних гемопоетичних стовбурових клітин.

Найбільш очевидною відмінністю хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ, в нашому дослідженні була низька частота мутацій гена *NOTCH1*. Їх частота майже у два рази була знижена порівняно з контрольною групою ( $p = 0,012$ ) і вони були найменш частими з виявлених генетичних змін, тоді як у контрольній групі, навпаки, – найбільш частими. Ген *NOTCH1* кодує трансмембранний білок класу I, який функціонує як ліганд-активованій транскрипційний фактор. Сигнальний шлях, опосередкований *NOTCH1*, є надзвичайно важливим для визначення долі клітини та формування різних типів клітин і тканин під час ембріонального розвитку [52]. Активуючі мутації гена *NOTCH1* призводять до дерегуляції сигналів *NOTCH1* і модуляції транскрипції декількох генів-мішеней, включаючи *MYC*. Було висловлено припущення, що активація онкогенного *MYC* може бути одним з головних шляхів сигнальної трансдукції при лейкемогенезі [53].

Іншим потенційним механізмом онкогенної дії *NOTCH1* вважається супресія p53-опосередкованої активності [54, 55]. Beverly et al. [54], використовуючи трансгенну мишачу модель для розвитку *NOTCH1*-індукованої Т-клітинної лімфоми, показали, що *NOTCH1* пригнічує p53-опосередкований апоптоз, впливаючи на стабільність білка p53. Зниження експресії гена *NOTCH1* призводило до різкого збільшення концентрації білка p53, що зумовлювало регресію пухлини внаслідок розвитку апоптозу. Водночас автори продемонстрували, що p53 може бути активований після обробки  $\gamma$ -опроміненням або нутліном (низькомолекулярний негенотоксичний активатор p53), що свідчить про неушкодженість шляху p53. Відповідно до цього, Athanasakis et al. [56] показали, що обробка первинних лейкемічних клітин хворих на ХЛЛ нутліном-3 викликала транскрипцію генів-мішеней p53 без суттєвих відмінностей між *NOTCH1*-матованими та нематованими випадками, що свідчить про повне збереження транскрипційного шляху p53 при *NOTCH1*-мутантному ХЛЛ. Те Raa et al. [27] також спостерігали незмінену індукцію генів-мішеней p53 і апоптозу при *NOTCH1* -мутантних випадках ХЛЛ. Водночас у зразках з наявністю мутацій гена *SF3B1* у цьому дослідженні було виявлено часткове порушення p53-опосередкованої транскрипційної активності і апоптотичних процесів у відповідь на пошкодження ДНК різними факторами, включаючи опромінення.

Таким чином, більшість мутацій, виявлених у групі хворих на ХЛЛ, які зазнали дії ІВ, асоціюються з дисфункцією p53 (переважно зустрічаються мутації генів

patients who need allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in CLL3X trial.

The most apparent difference of the IR-exposed CLL group in our study was the low incidence of *NOTCH1* mutations. They were found more than two times less than in control group ( $p = 0.012$ ) and were the least frequent of the studied alterations, while being the most frequent in the control group. *NOTCH1* gene encodes a class I transmembrane protein which functions as a ligand-activated transcription factor. The NOTCH signaling pathway is critically important for cell fate specification and tissue patterning in different cell and tissue types during development [52]. Activating *NOTCH1* mutations result in deregulation of *NOTCH1* signaling and in modulation of transcription of several target genes, including *MYC*. It was suggested that activation of oncogenic *MYC* may be one of the main pathway of leukemic transformation [53].

Another potential mechanism of oncogenic *NOTCH1* action is considered to be the suppression of the p53-mediated activity [54, 55]. Beverly et al. [54], using transgenic mouse model for *NOTCH1*-induced T-cell lymphoma, showed, that *NOTCH1* down-regulate p53-mediated apoptosis through p53 protein stability. Attenuation of *NOTCH1* expression resulted in a dramatic increase in p53 levels that led to tumor regression by an apoptotic program. Authors have demonstrated however, that p53 could be activated following treatment with  $\gamma$ -irradiation or Nutlin (the small molecule non-genotoxic activator of p53), suggesting that the p53 pathway was intact. In line with this Athanasakis et al. [56] showed, that treatment of primary CLL cells with Nutlin-3 induced the transcription of p53 target genes without significant differences between *NOTCH1* mutated and unmutated cases suggesting, that the p53 transcriptional pathway was fully preserved in *NOTCH1* mutated CLL. Te Raa et al. [27] also observed normal responses in p53 target gene induction and apoptosis in *NOTCH1* mutated CLL. At the same time, *SF3B1* mutated samples in the study displayed partially defective p53 transcriptional and apoptotic responses to DNA-damaging regimens, including irradiation.

Thus, the most mutations found in the IR-exposed group are associated with p53 dysfunction (*TP53* and *SF3B1* mutations vs. *NOTCH1* muta-

*TP53* і *SF3B1* проти низької частоти мутацій *NOTCH1*), що вказує на можливу взаємодію між ІВ та розвитком ХЛЛ. З огляду на відносно невелику кількість обстежених пацієнтів на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ, необхідні подальші дослідження для з'ясування цих зв'язків.

Підсумовуючи результати порівняльного обстеження пацієнтів, хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ, та контрольної групи неопромінених пацієнтів, можна зробити припущення, що аномалії гена *TP53* можуть бути задіяні у розвиток ХЛЛ на тлі впливу радіаційного опромінення. Це припущення ґрунтується на відмінностях розподілу мутацій гена *TP53* між групами спостережуваних пацієнтів та виявленям двох ідентичних випадків з рідкісною мутацією *TP53* в осіб, які зазнали впливу ІВ. Це узгоджується з даними про те, що клітинні реакції на дію ІВ реалізуються переважно р53-залежним шляхом [57]. Отримані дані потребують подальшого дослідження.

#### Подяка

Робота виконана за фінансової підтримки Національної академії медичних наук України, державний реєстраційний № НДР 0117U000623.

Автори висловлюють щире вдячність п. Томасу Хармсу, президенту благодійної організації KINEV-Kinderhilfe Kiew e.V. за допомогу у придбанні реагентів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chronic lymphocytic leukemia in Hiroshima and Nagasaki, Japan / S. C. Finch, T. Hoshito, T. Itoga, M. Ichimaru, Jr. R. H. Ingram. *Blood*. 1969. Vol. 33, No. 1. P. 79–86.
2. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950–1987 / D. L. Preston, S. Kusumi, M. Tomonaga, S. Izumi et al. *Radiat. Res*. 1994. Vol. 137, Suppl. 2. S. 68–97.
3. Mortality associated with chronic external radiation exposure in the French combined cohort nuclear workers / C. Metz-Flamant, O. Laurent, E. Samson, S. Caer-Lorho et al. *Occup. Environ. Med*. 2013. Vol. 70, no. 9. P. 630–638. doi: 10.1136/oemed-2012-101149.
4. Weiss H. A., Darby S. C., Doll R. Cancer mortality following X-rays treatment for ankylosing spondylitis. *Int. J. Cancer*. 1994. Vol. 59. P. 327-738.
5. Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvis radiotherapy for benign disease / P. D. Inskip, R. A. Kleinerman, M. Stovall, D. L. Cookfair et al. *Radiat. Res*. 1993. Vol. 135. P. 108–124.
6. The Ukrainian-American study leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks / A. Y. Romanenko, S. C. Finch, M. Hatch, J. H. Lubin et al. *Radiat. Res*. 2008. Vol. 170, No. 6. P. 711–720. doi: 10.1667/RR1404.1.
7. Radiation and the risk chronic lymphocytic and other leukemias among chernobyl cleanup workers / L. B. Zablotska, D. Bazyka, J. H. Lubin, N. Gudzenko et al. *Environ. Health Perspect*. 2013. Vol. 221, no. 1. P. 59–65.

tions) indicating a possible interaction between IR and CLL development. In consideration of relatively small number of IR-exposed CLL patients analyzed, further studies on a larger cohort are necessary to ascertain this relationship.

In summary, comparative investigation of IR-exposed CLL patients and the control group of non-IR exposed CLL patients allows us to assume that *TP53* abnormalities could be involved in CLL development after radiation exposure. This assumption is based on the differences in distribution of *TP53* mutations between groups of observed patients and the finding of two identical cases with rare *TP53* lesion among IR-exposed persons. It is in accordance with data suggesting that cellular responses on IR are realized mainly through the p53-dependent pathway [57]. Of course, future research is in need.

#### Acknowledgement

The work was carried out with the financial support of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, the state registration # NDR 0117U000623.

The authors express their sincere gratitude to Mr. Thomas Harms, the president of the charitable organization KINEV-Kinderhilfe Kiew e.V. for the help in acquiring reagents.

#### REFERENCES

1. Finch SC, Hoshito T, Itoga T, Ichimaru M, Ingram Jr RH. Chronic lymphocytic leukemia in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Blood*. 1969;33:79-86.
2. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994;137(2 Suppl):68-97.
3. Metz-Flamant C, Laurent O, Samson E, Caer-Lorho S, Acker A, Hubert D, et al. Mortality associated with chronic external radiation exposure in the French combined cohort of nuclear workers. *Occup Environ Med*. 2013;70(9):630-8. doi: 10.1136/oemed-2012-101149.
4. Weiss HA, Darby SC, Doll R. Cancer mortality following X-rays treatment for ankylosing spondylitis. *Int J Cancer*. 1994;59:327-38.
5. Inskip PD, Kleinerman RA, Stovall M, Cookfair DL, Hajimichael O, Moloney WC. Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvis radiotherapy for benign disease. *Radiat Res*. 1993;135:108-24.
6. Romanenko AY, Finch SC, Hatch M, Lubin JH, Bebesko VG, Bazyka DA, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks. *Radiat Res*. 2008;170(6):711-20.

8. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident--with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis / I. Abramenko, N. Bilous, A. Chumak, E. Davidova et al. *Leuk. Res.* 2008. Vol. 32, no. 4. P. 535–545.
9. Little J. B. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000. Vol. 21, no. 3. P. 397–404.
10. Irradiation selects for p53-deficient hematopoietic progenitors / A. Marusyk, C. C. Porter, V. Zaberezhnyy, J. DeGregori. *PLoS Biology.* 2010. Vol. 8, no. 3. e1000324.
11. Levine A. J., Oren M. The first 30 years p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer.* 2009. Vol. 9. P. 749-758. doi: 10.1038/nrc2723.
12. Panganiban R. A., Snow A. L., Day R. M. Mechanisms radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, no. 8. P. 15931–15958. doi: 10.3390/ijms140815931.
13. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status / R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, Y. W. Wang, D. Murray. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. -14, no. 11. P. 22409–22435. doi: 10.3390/ijms141122409.
14. Cuddihy A. R., Bristow R. G. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer Metastasis Rev.* 2004. Vol. 23, no. 3–4. P. 237–257.
15. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up / T. Zenz, A. Krober, K. Scherer, S. Habe et al. *Blood.* 2008. Vol. 112, no. 8. P. 3322–3329. doi: 10.1182/blood-2008-04-154070.
16. The prognostic value TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness / D. Rossi, M. Cerri, C. Deambrogi, E. Sozzi et al. *Clin. Cancer Res.* 2009. Vol. 15, no. 3. P. 995–1004. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1630.
17. Mutational status the TP53 gene as a predictor response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial / D. Gonzalez, P. Martinez, R. Wade, S. Hockley et al. *J. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 29, no. 16. P. 2223–2229. doi: 10.1200/JCO.2010.32.0838.
18. Stilgenbauer S., Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2010. Vol. 2010. P. 481–488. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.481.
19. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia / X. S. Puente, M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde et al. *Nature.* 2011. Vol. 475, no. 7354. P. 101–105. doi: 10.1038/nature10113.
20. Analysis the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role NOTCH1 mutational activation / G. Fabbri, S. Rasi, D. Rossi, V. Trifonov et al. *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208. P. 1389–1401. doi: 10.1084/jem.20110921.
21. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia / L. Wang, M. S. Lawrence, Y. Wan, P. Stojanov et al. *N. Engl. J. Med.* 2011. Vol. 365. P. 2497–2506. doi: 10.1056/NEJMoa1109016.
22. Exome sequencing identifies recurrent mutations the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia / V. Quesada, L. Conde, N. Zablotska LB, Bazyka D, Lubin JH, Gudzenko N, Little MP, Hatch M, et al. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among chornobyl cleanup workers. *Environ Health Perspect.* 2013;121(1):59-65.
8. Abramenko I, Bilous N, Chumak A, Davidova E, Kryachok I, Martina Z, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident--with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis. *Leuk Res.* 2008;32(4):535-45.
9. Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):397-404.
10. Marusyk A, Porter CC, Zaberezhnyy V, DeGregori J. Irradiation Selects for p53-Deficient Hematopoietic Progenitors. *PLoS Biology.* 2010;8(3):e1000324.
11. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:749-58. doi: 10.1038/nrc2723.
12. Panganiban RA, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):15931-58. doi: 10.3390/ijms140815931.
13. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang YWm Murray D. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):22409-35. doi: 10.3390/ijms141122409.
14. Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23(3-4):237-57.
15. Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008;112(8):3322-9. doi: 10.1182/blood-2008-04-154070.
16. Rossi D, Cerri M, Deambrogi, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):995-1004. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1630.
17. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockey S, Oscier S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(16):2223-9. doi: 10.1200/JCO.2010.32.0838.
18. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:481-8. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.481.
19. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475(7354):101-5. doi: 10.1038/nature10113.
20. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome:



- Villamor, G. R. Ordonez et al. *Nat. Genet.* 2012. Vol. 44. P. 47-52. doi: 10.1038/ng.1032.
23. Mutations the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness / D. Rossi, A. Bruscaggin, V. Spina, S. Rasi et al. *Blood.* 2011. Vol. 118, No. 26. P. 6904–6908. doi: 10.1182/blood-2011-08-373159.
24. NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients / K. Willander, R. K. Dutta, J. Ungerback, R. Gunnarsson et al. *BMC Cancer.* 2013. Vol. 13. P. 274. doi: 10.1186/1471-2407-13-274.
25. Sutton L. A., Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame disease evolution. *Haematologica.* 2015. Vol. 100, no. 1. P. 7–16. doi: 10.3324/haematol.2014.115923.
26. Biologic and clinical significance somatic mutations SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms / M. Cazzola, M. Rossi, L. Malcovati; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. *Blood.* 2013. Vol. 121, no. 2. P. 260–269. doi: 10.1182/blood-2012-09-399725.
27. The impact SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response / G. D. Te Raa, I. A. Derks, V. Navrkalova, A. Skowronska et al. *Leukemia.* 2015. Vol. 29, no. 5. P. 1133–1142. doi: 10.1038/leu.2014.318.
28. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells CLL patients / F. Damm, E. Mylonas, A. Cosson, K. Yoshida et al. *Cancer Discov.* 2014. Vol. 4, no. 9. P. 1088–1101. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0104.
29. Cellular origin and pathophysiology chronic lymphocytic leukemia / M. Seifert, L. Sellmann, J. Bloehdorn, F. Wein et al. *J. Exp. Med.* 2012. Vol. 209, no. 12. P. 2183–2198. doi: 10.1084/jem.20120833.
30. Genomic characterization chronic lymphocytic leukemia (CLL) in radiation-exposed Chernobyl cleanup workers / J. Ojha, I. Dyagil, S. C. Finch, R. F. Reiss et al. *Environ. Health.* 2018. Vol. 17, no. 1. P. 43. doi: 10.1186/s12940-018-0387-9.
31. A new prognostic classification chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / J. L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang et al. *Cancer.* 1981. Vol. 48, no. 1. P. 198–205.
32. Guidelines for the diagnosis and treatment chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines / M. Hallek, B. D. Cheson, D. Catovsky, G. Caligaris Dighiero et al. *Blood.* 2008. Vol. 111. P. 5446–5456. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
33. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form chronic lymphocytic leukemia / T. J. Hamblin, Z. Davis, A. Garddiner, D. G. Oscier, F. K. Stevenson. *Blood.* 1999. Vol. 94. P. 1848–1854.
34. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia / R. N. Damle, T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto et al. *Blood.* 1999. Vol. 94. P. 1840–1847.
35. The clinical significance NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial / D. G. Oscier, M. J. Rose-Zerilli, N. Winkelmann, D. Gonzalez de Castro et al. *Blood.* 2013. Vol. 121, no. 3. P. 468–475. doi: 10.1182/blood-2012-05-429282.
36. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients / S. Jero-
- role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med.* 2011;208:1389-401. doi: 10.1084/jem.20110921.
21. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365:2497-506. doi: 10.1056/NEJMoa1109016.
22. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012;44:47-52. doi: 10.1038/ng.1032.
23. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, Rasi S, Khiabanian H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood.* 2011;118(26):6904-8. doi: 10.1182/blood-2011-08-373159.
24. Willander K, Dutta RK, Ungerback J, Gunnarsson R, Juliusson G, Fredrikson M, et al. NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer.* 2013;13:274. doi: 10.1186/1471-2407-13-274.
25. Sutton LA, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica.* 2015;100(1):7-16. doi: 10.3324/haematol.2014.115923.
26. Cazzola M, Rossi M, Malcovati L; Associazione Italiano per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood.* 2013;121(2):260-9. doi: 10.1182/blood-2012-09-399725.
27. Te Raa GD, Derk IA, Navrkalova V, Skowronska A, Moerland PD, van Laar J, et al. The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. *Leukemia.* 2015;29(5):1133-42. doi: 10.1038/leu.2014.318.
28. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1088-101. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0104.
29. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, Kuppers R. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2012;209(12):2183-98. doi: 10.1084/jem.20120833.
30. Ojha J, Dyagil I, Finch SC, Reiss RF, de Smith AJ, Gonseth S, et al. Genomic characterization of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in radiation-exposed Chernobyl cleanup workers. *Environ Health.* 2018;17(1):43. doi: 10.1186/s12940-018-0387-9.
31. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguat H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981;48(1):198-205.
32. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the

- min, S. Weissmann, C. Haferlach, F. Dicker et al. *Leukemia*. 2014. Vol. 28, no. 1. P. 108–117. doi: 10.1038/leu.2013.263.
37. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial the GCLLSG / A. Schnaiter, P. Paschka, M. Rossi, T. Zenz et al. *Blood*. 2013. Vol. 122, no. 7. P. 1266–1270. doi: 10.1182/blood-2013-03-488197.
38. Rossi D., Fangazio M., Gaidano G. The spectrum genetic defects in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2012. Vol. 4, no. 1. e2012076. doi: 10.4084/MJHID.2012.076.
39. Activating mutations NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia / A. P. Weng, A. A. Ferrando, W. Lee, J. P. 4th Morris et al. *Science*. 2004. Vol. 306, no. 5694. P. 269–271.
40. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia / D. Rossi, V. Spina, R. Bomben, S. Rasi et al. *Blood*. 2013. Vol. 121, no. 24. P. 4902–4905. doi: 10.1182/blood-2013-02-486209.
41. Molecular and clinical features chronic lymphocytic leukemia with stereotyped B-cell receptors in a Ukrainian cohort / N. Bilous, R. Bomben, M. Dal Bo, D. Capello et al. *Leuk. Lymphoma*. 2010. Vol. 51, no. 5. P. 822–838. doi: 10.3109/10428191003646002.
42. NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL:<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), accessed: April, 2015.
43. Li F. P., Fraumeni J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* 1969. Vol. 71, no. 4. P. 747–752.
44. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome / M. Hisada, J. E. Garber, C. Y. Fung, J. F. Fraumeni, F. P. Li. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. Vol. 90. P. 606–611.
45. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome / S. Heymann, S. Delaloge, A. Rahal, O. Caron et al. *Radiat. Oncol.* 2010. Vol. 5. P. 104. doi: 10.1186/1748-717X-5-104.
46. Pierce L. J., Haffty B. G. Radiotherapy in the treatment hereditary breast cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2011. Vol. 21. P. 43–50. doi: 10.1016/j.semradonc.2010.08.008.
47. Agir H., MacKinnon C., Tan S. T. Li-Fraumeni syndrome: a case with 4 separate primary sarcomas and 5 sequential free flaps in the maxillacial region. *J. Oral Maxill. Surg.* 2008. Vol. 66, no. 8. P. 1714–1719. doi: 10.1016/j.joms.2007.09.015.
48. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields a patient with Li-Fraumeni syndrome / J. M. Limacher, T. Frebourg, S. Natarajan-Ame, J. P. Bergerat. *Int. J. Cancer*. 2001. Vol. 96, No. 4. P. 238–242.
49. The relationship between radiation-induced G(1) arrest and chromosome aberrations in Li-Fraumeni fibroblasts with or without germline TP53 mutations / J. M. Boyle, A. Spreadborough, M. J. Greaves, J. M. Birch et al. *Br. J. Cancer*. 2001. Vol. 85. P. 293–296.
50. Heterozygous TP53stop146/R72P fibroblasts from a Li-Fraumeni syndrome patient with impaired response to DNA damage / J. De Moura, F. L. Kavalec, M. Doghman, R. Rosati et al. *Int. J. Oncol.* 2010. Vol. 36. P. 983–990.
51. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up the GCLLSG CLL3X International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111:5446-56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
33. Hamblin TJ, Davis Z, Garddiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1848-54.
34. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-47.
35. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, Parker H, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2013;121(3):468-75. doi: 10.1182/blood-2012-05-429282.
36. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014;28(1):108-17. doi: 10.1038/leu.2013.263.
37. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Buhler A, Winkler D, et al. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood*. 2013;122(7):1266-70. doi: 10.1182/blood-2013-03-488197.
38. Rossi D, Fangazio M, Gaidano G. The spectrum of genetic defects in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012076. doi: 10.4084/MJHID.2012.076.
39. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
40. Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Bruscaggin A, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4902-5. doi: 10.1182/blood-2013-02-486209.
41. Bilous N, Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Laurenti L, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukemia with stereotyped B-cell receptors in a Ukrainian cohort. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(5):822-38. doi: 10.3109/10428191003646002.
42. NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL:<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), accessed: April, 2015.
43. Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71(4):747-52.
44. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:606-11.
45. Heymann S, Delaloge S, Rahal A, Caron O, Frebourg T, Barreau L, et al. Radio-induced malignancies after breast cancer

- trial / P. Dreger, A. Schnaiter, T. Zenz, S. Bottcher, et al. *Blood*. 2013. Vol. 121, no.16. P. 3284–3288. doi: 10.1182/blood-2012-11-469627.
52. Paganin M., Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev*. 2011. Vol. 25, no. 2. P. 83–90. doi: 10.1016/j.blre.2010.09.004.
53. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth / T. Palomero, W. K. Lim, D. T. Odom, M. L. Sulis et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006. Vol. 103, no. 48. P. 18261–18266.
54. Beverly L. J., Felsher D. W., Capobianco A. J. Suppression p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res*. 2005. Vol. 65. P. 7159–7168.
55. Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53 / S. Licciulli, J. L. Avila, L. Hanlon, S. Troutman et al. *Cancer Res*. 2013. Vol. 73. P. 74–84. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1384.
56. The p53 transcriptional pathway is preserved in ATMmutated and NOTCH1mutated chronic lymphocytic leukemias / E. Athanasakis, E. Melloni, G. M. Rigolin, C. Agnoletto et al. *Oncotarget*. 2014. Vol. 5, no. 24. P. 12635–12645.
57. Abraham J., Spaner D., Benchimol S. Phosphorylation p53 protein in response to ionizing radiation occurs at multiple sites in both normal and DNA-PK deficient cells. *Oncogene*. 1999. Vol. 18, no. 8. P. 1521–1527.
- postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Radiat Oncol*. 2010;5:104. doi: 10.1186/1748-717X-5-104.
46. Pierce LJ, Haffty BG. Radiotherapy in the treatment of hereditary breast cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2011;21:43-50. doi: 10.1016/j.semradonc.2010.08.008.
47. Agir H, MacKinnon C, Tan ST. Li-Fraumeni syndrome: a case with 4 separate primary sarcomas and 5 sequential free flaps in the maxillofacial region. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(8):1714-9. doi: 10.1016/j.joms.2007.09.015.
48. Limacher JM, Frebourg T, Natarajan-Ame S, Bergerat JP. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Int J Cancer*. 2001;96(4):238-42.
49. Boyle JM, Spreadborough A, Greaves MJ, Birch JM, Varley JM, Scott D. The relationship between radiation-induced G(1) arrest and chromosome aberrations in Li-Fraumeni fibroblasts with or without germline TP53 mutations. *Br J Cancer*. 2001;85:293-6.
50. De Moura J, Kavalec FL, Doghman M, Rosati R, Custodio G, Lalli E, et al. Heterozygous TP53stop146/R72P fibroblasts from a Li-Fraumeni syndrome patient with impaired response to DNA damage. *Int J Oncol*. 2010;36:983-90.
51. Dreger P, Schnaiter A, Zenz T, Bottcher S, Rossi M, Paschka P, et al. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*. 2013;121(16):3284-8. doi: 10.1182/blood-2012-11-469627.
52. Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev*. 2011;25(2):83-90. doi: 10.1016/j.blre.2010.09.004.
53. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18261-6.
54. Beverly LJ, Felsher DW, Capobianco AJ. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res*. 2005;65:7159-68.
55. Licciulli S, Avila JL, Hanlon L, Troutman S, Cesaroni M, Kota S, et al. Notch1 is required for Kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53. *Cancer Res*. 2013;73:5974-84. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1384.
56. Athanasakis E, Melloni E, Rigolin GM, Agnoletto C, Voltan R, Vozzi D, et al. The p53 transcriptional pathway is preserved in ATM mutated and NOTCH1 mutated chronic lymphocytic leukemias. *Oncotarget*. 2014;5(24):12635-45.
57. Abraham J, Spaner D, Benchimol S. Phosphorylation of p53 protein in response to ionizing radiation occurs at multiple sites in both normal and DNA-PK deficient cells. *Oncogene*. 1999;18(8):1521-7.