

Молекулярные механизмы лейкозогенеза

Лекция № 4

Гемобластозы лимфоидного происхождения

Д.А. Домнинский

ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России, Москва

Контакты: Дмитрий Анатольевич Домнинский D7777777@yandex.ru

Molecular mechanisms of leukemogenesis 4. Lymphoid hematological malignancies

D.A. Domninskiy

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Предисловие

Ранее были рассмотрены главные клеточные процессы, нарушение которых индуцирует онкогенез в кроветворных клетках, и основные типы генов, которые особенно часто становятся мишенями лейкозогенных геномных aberrаций [1–2]. Предыдущая лекция была посвящена геномным нарушениям, которые наиболее характерны для неоплазий миелоидного происхождения [3]. Эта лекция рассказывает о генетических повреждениях, выявляемых в лимфоидных опухолевых клетках, и о свойственном им уникальном механизме превращения протоонкогенов в онкогены. В заключение будут рассмотрены условия возникновения рекуррентных хромосомных транслокаций, помогающие понять, почему эти транслокации происходят в клетках данного типа и на определенном этапе их развития, предопределяя, таким образом, фенотип опухоли.

Глава I. Классификация опухолей лимфоидного происхождения

В последней классификации лимфоидных опухолей Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в отличие от классификации миелоидных неоплазий, отсутствует выделение определенных подтипов заболевания на основе рекуррентных молекулярно-генетических изменений. Рабочая группа ВОЗ, разрабатывавшая классификацию, объяснила свое решение тем, что в настоящее время собрано недостаточно доказательств, чтобы признать опухоли, несущие специфичные геномные aberrации, отдельными заболеваниями [4]. Хотя такая позиция и вызвала некоторое недоумение [4, 5], но она имеет логичное объяснение. С одной стороны, традиционный цитоморфологический подход позволил построить очень удобную классификацию лимфом по анатомии их локализации (фолликулярная лимфо-

ма, лимфома маргинальной зоны селезенки и т. п.) или по типу опухолевых клеток (В-крупноклеточная лимфома, плазмочитома и т. п.). С другой стороны, лимфоидные клетки помимо их подразделения на 2 основных типа (В- и Т-клетки) по экспрессии иммунорецепторов разного вида (BCR/Ig и TCR) несут на своей поверхности большое число маркерных белков (CD, cluster of differentiation), многие из которых определяют статус клеточной дифференцировки. А так как трансформация лимфоидных клеток чаще всего ассоциирована с блоком («арестом») дифференцировки, то специфичная иммунофенотипическая CD-характеристика опухолевых клеток, которая соответствует стадии клеточного развития на момент малигнизации, является адекватным маркером многих типов опухолей. Но в то же время сегодня хорошо известно, что некоторые типы лимфоидных неоплазий, представленные в классификации ВОЗ, связаны со специфичными рекуррентными хромосомными aberrациями. Такие aberrации имеют явное диагностическое значение ([3], глава I), поэтому некоторые заболевания, например лимфома из клеток мантии (ЛКМ) или лимфома Беркитта (ЛБ), могут быть выделены в отдельные категории как болезни, ассоциированные с конкретными молекулярными нарушениями. Геномные aberrации, которые наиболее часто встречаются в опухолях В- и Т-клеточного происхождения, приведены в табл. 1 и 2.

Глава II. Особенности геномных aberrаций в лимфоидных опухолях

В клетках организма постоянно возникают разнообразные хромосомные aberrации, механизм генерации которых может быть различным [9]. Большинство таких модификаций носит нейтральный характер, некоторые из них приводят к гибели клетки, и совсем ничтожное количество — к опухолевой

Таблица 1. Рекуррентные хромосомные aberrации, выявляемые при ОЛЛ [6, 7]

| Хромосомные aberrации | Продукт aberrации | Тип онкогена | Частота, % | |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------|----------|
| | | | дети | взрослые |
| В-клеточный ОЛЛ (В-ОЛЛ) | | | | |
| <i>химерные гены</i> | | | | |
| t(9;22)(q34;q11) | BCR-ABL | протеинкиназы (*) | 5 | 30 |
| t(12;21)(p13;q22) | ETV6-RUNX11 | факторы транскрипции | 25 | 5 |
| t(1;19)(q23;p13) | TCF3-PBX1 | факторы транскрипции | 5 | 5–10 |
| t(4;11)(q21;q23) | MLL1-AF4 | факторы транскрипции | 90 (**) | 10 |
| <i>мутации и делеции</i> | | | | |
| 9p13 | PAX5 | фактор транскрипции | 30 | 30 |
| Т-клеточный ОЛЛ (Т-ОЛЛ) | | | | |
| <i>химерные гены</i> | | | | |
| t(10;11)(p12;q14) | CALM-AF10 | факторы транскрипции | 10 | 10 |
| 1p32 делеция | SIL-TAL1 | факторы транскрипции | 25 | 5–10 |
| TCR-транслокации (***) | | | | |
| t(10;14)(q24;q11) | HOX11-TCR α/δ | фактор транскрипции | 10 | 20–30 |
| t(5;14)(q35;q11) | HOX11L2-TCR α/δ | фактор транскрипции | 25 | 10–15 |
| t(1;14)(p32;q11) | TAL1-TCR α/δ | фактор транскрипции | 15 | 10–15 |
| t(11;14)(p13;q11) | LMO2-TCR α/δ | фактор транскрипции | 5–10 | < 5 |
| <i>мутации и делеции</i> | | | | |
| 9q34.3 | NOTCH1 | рецептор и фактор транскрипции | 50 | 50 |
| 4q31.3 | FBW7 | Е3 убиквитин-лигаза | 25–30 | 25–30 |

(*) ABL – тирозинкиназа (Т); BCR – серин-треонин протеинкиназа (S/T). (**) Указана частота встречаемости при В-ОЛЛ у младенцев, с возрастом она падает (см. [3], глава III). (***) Транслокация онкогенов может осуществляться в разные TCR-локусы, но частота рекомбинации падает в ряду: TCR α/δ – TCR β – TCR γ . При В-ОЛЛ транслокация онкогенов в BCR/Ig-локусы происходит очень редко (см. главу II).

Аббревиатуры: AF4 – ALL1-fused gene from chromosome 4 (где ALL1 – старое название гена MLL); BCR – breakpoint cluster region (S/T протеинкиназа); CALM – clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia gene; ETV6 – ETS variant gene 6 (также известен как TEL – translocation ets leukemia); FBXW7 – F-box and WD repeat domain containing protein 7; HOX11 – homeobox 11 (также известен как TLX1 – T-cell leukemia homeobox 1); HOX11L2 – homeobox 11-like 2 (также известен как TLX3); LMO2 – LIM domain only 2 protein (также известен как TTG2 – T-cell translocation gene 2); MLL – mixed lineage (myeloid/lymphoid) leukemia; PAX5 – paired box 5 (также известен как BSAP – B-cell lineage specific activator protein); PBX1 – pre-B-cell leukemia transcription factor 1; RUNX1 – runt-related transcription factor 1 (также известен как AML1 – acute myeloid leukemia 1); SIL – SCL/TAL1 interrupting locus; TAL1 – T-cell acute leukemia 1 (также известен как SCL – stem cell leukaemia); TCF3 – transcription factor 3 (также известен как E2A – transcription factor E2a); TCR – T-cell receptor.

Таблица 2. Некоторые рекуррентные хромосомные транслокации, выявляемые при лимфомах В-клеточного происхождения [8]

| Тип лимфомы | Хромосомные транслокации | Продукты транслокации | Возможный механизм (*) | Частота, % |
|-------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|------------|
| ЛКМ | t(11;14)(q13;q32) | циклин D1-IgH | V(D)J | 95 |
| ФЛ | t(14;18)(q32;q21) | IgH-Bcl-2 | V(D)J | 90 |
| | t(3;14)(q27;q32) | Bcl-6-IgH | CSR | 5 |
| ДВККЛ | t(14;18)(q32;q21) | IgH-Bcl-2 | V(D)J | 25–30 |
| | t(3;14)(q27;q32) | Bcl-6-IgH | CSR/SHM | 35 |
| | t(8;14)(q24;q32) | c-MYC-IgH | CSR/SHM | 10 |
| | t(8;22)(q24;q11) | c-MYC-Ig | SHM | 5 |
| ЛБ | t(8;14)(q24;q32) | c-MYC-IgH | CSR/SHM | 80 |
| | t(8;22)(q24;q11) | c-MYC-Ig | SHM | 15 |
| | t(2;8)(p12;q24) | c-MYC-Igk | SHM | 5 |
| ЛПЛ | t(9;14)(p13;q32) | PAX5-IgH | SHM | 50 |

(*) Хромосомные транслокации в Ig-локусах могут быть индуцированы V(D)J-рекомбинацией, рекомбинацией переключения класса (CSR) или соматическими гипермутациями (SHM).

Аббревиатуры: Bcl-2 – B-cell leukemia/lymphoma 2; c-MYC – cellular homolog v-MYC myelocytomatosis avian viral oncogene; ДВККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома; ЛПЛ – лимфома плазмочитарная лимфома; ФЛ – фолликулярная лимфома; циклин D1 (CCND1, G1/S-specific cyclin D1) – впервые был идентифицирован в локусе транслокации t(11;14) как ген Bcl-1 (B-cell leukemia/lymphoma 1).

трансформации. В предыдущей лекции мы рассмотрели хромосомные транслокации, приводящие к малигнизации миелоидных клеток, которые генерируют образование химерных генов с онкогенными свойствами. Вероятность возникновения таких транслокаций достаточно мала, так как для их осуществления требуется «прицельная» рекомбинация между 2 генами. Это связано с тем, что онкогенный гибридный продукт таких транслокаций, как правило, представляет собой уникальную комбинацию белковых доменов, кодируемых генами-партнерами [10]. Поэтому точки разрыва ДНК (breakpoints) при онкогенных транслокациях этого типа расположены достаточно «кучно» – в пределах 1 или 2 генных интронов.

В лимфоидных опухолях также были выявлены рекуррентные геномные aberrации, свойственные опухолям миелоидного происхождения. Но гораздо чаще в них реализуется особый механизм лейкозогенеза, который позволяет «эксплуатировать» большое число регуляторных элементов (промоторов и энхансеров), конститутивно активированных на многих стадиях клеточного развития и содержащихся в локусах В-клеточного (BCR/Ig) и Т-клеточного (TCR) рецепторов (см. Приложение 1). Протоонкогены, попадающие в эти локусы в результате хромосомных транслокаций, избегают строгого клеточного контроля (т. е. превращаются в онкогены) и генерируют развитие опухолеродного процесса. В отличие от возникновения химерных генов, высокая точность рекомбинации здесь не нужна, так как некоторые энхансеры генов *BCR/Ig* и *TCR* могут активировать генную экспрессию на очень большом расстоянии (см. ниже). Способствуют возникновению хромосомных транслокаций процессы V(D)J-рекомбинации, рекомбинации переключения класса (CSR) и соматические гипермутации (SHM) (см. Приложения 1 и 2), индуцируемые на некоторых стадиях развития лимфоидных клеток. Рекомбинации и гипермутации сопровождаются возникновением двунитевых разрывов (DSBs, double-strand breaks) в ДНК, которые затем «ремонтируются» клеточными системами репарации NHEJ (non-homologous end joining), соединяющими сломанные ДНК-концы. Любая неточность в работе этих систем может привести к хромосомным транслокациям (рис. 1) [11, 12].

Например, комплекс RAG1/2-нуклеаз расщепляет последовательности *BCR/Ig* и *TCR* в области небольших специфичных сигнальных участков (RSS, recombination signal sequence). Однако если другая хромосома содержит последовательность, похожую на RSS (cRSS, cryptic RSS), то ошибка RAG1/2 может привести к хромосомной транслокации. Аналогичные ошибки может совершать NHEJ-система, соединяя DSBs, созданные RAG1/2 в *BCR/Ig*- или *TCR*-локусах со случайно возникшими разрывами ДНК на других хромосомах (рис. 1А). Транслокации могут возникать и при ошибках AID (activation-induced cytidine

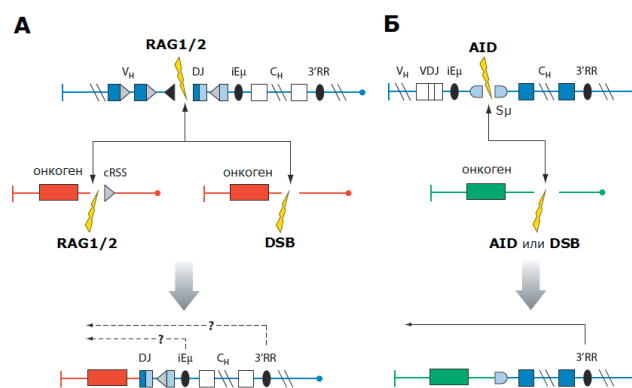


Рис. 1. Механизмы активации онкогенов, специфичные для лимфоидных клеток

Активирующие онкоген хромосомные транслокации могут индуцироваться двунитевыми разрывами ДНК (DSB), которые вносятся нуклеазами V(D)J-рекомбинации (А) или возникают в результате мутаций, опосредованных AID-активностью во время SHM или CSR (Б). Подробности см. в тексте лекции и в Приложениях 1 и 2. AID – activation-induced cytidine deaminase; CSR – class switch recombination; cRSS – cryptic RSS; DSB – double-strand break; iE_H – intronic enhancer C_H region; 3'RR – IgH 3' regulatory region (IgH3'RR); RAG1/2 – recombination activating gene 1 & 2; SHM – somatic hypermutation; S_μ – switch C_H region. Рисунок адаптирован из статьи M. Gostissa et al. [13].

deaminase), которая вносит мутации в GC-богатые области генома (рис. 1Б).

Анализируя точки разрыва ДНК при онкогенных транслокациях, можно в принципе определить, какой из приведенных выше механизмов (V(D)J, CSR или SHM) ответственен за возникновение этих aberrаций. Например, если точка разрыва находится рядом с RSS в интактной ДНК *BCR/Ig*- или *TCR*-локуса (при V(D)J сигнальные последовательности элиминируются), то это свидетельствует о V(D)J-опосредованном механизме рекомбинации. Наличие точек разрыва ДНК в CDR (complementarity determining region) области вариабельного *BCR/Ig*-локуса или в сайтах «переключения» S (switch) C_H-локуса свидетельствует об AID-опосредованной рекомбинации (см. Приложения 1 и 2). RAG1/2- и AID-активность ассоциированы с разными стадиями дифференцировки В-лимфоцитов, что позволяет определить, на какой стадии их развития произошла опухолеродная трансформация (табл. 2).

По отношению к уникальным механизмам рекомбинации, обеспечивающим разнообразие антител и Т-клеточных рецепторов, лимфоидные опухоли можно подразделить на 3 большие группы: 1) опухоли, возникшие из V(D)J-некомпетентных клеток, которые в зависимости от уровня дифференцировки и степени коммитирования располагаются в следующей последовательности: поздние мультипотентные предшественники (MPPs, multipotent progenitors), еще способные к дифференцировке как в лимфоидные, так и в миелоидные линии – общие лимфоидные предшественники (CLPs, common lymphoid progenitors) – про-В- и про-Т-клетки; 2) опухоли, возникшие из V(D)J-компетентных клеток,

Приложение 1. Рекомбинационные процессы в лимфоидных клетках

Для формирования ответа на огромное разнообразие антигенов в клетках иммунной системы происходит целый ряд индивидуальных геномных перестроек и мутационных изменений в генах, кодирующих антиген-связывающие белки. Таким модификациям в В-лимфоцитах подвергаются гены, кодирующие молекулы BCR/Ig (BCR, **B-cell receptor**, некоторые типы BCR называют «поверхностными иммуноглобулинами», **slg**), которые у человека сгруппированы в крупные локусы (размером до 2 млн пар нуклеотидов; **п. н.**) на 3 хромосомах: IgH (14q32), Igk (2p12) и Igl (22q11). Гены, кодирующие Т-клеточные рецепторы (TCR, **T-cell receptor**) и претерпевающие рекомбинации в процессе развития Т-лимфоцитов, сгруппированы в 3 локусах на 2 хромосомах: TCR α/δ (14q11.2), TCR β (7q35) и TCR γ (7p15). В каждом BCR/Ig- и TCR-локусе присутствуют области, содержащие несколько копий (от 5 до 500) генных сегментов (экзонов) разного типа, из которых в результате геномных перестроек собирается огромное число индивидуальных комбинаций активных BCR/Ig- и TCR-генов. На рис. 1А показана схема организации локуса 14q32, кодирующего гены тяжелой цепи BCR/Ig (IgH) человека. В IgH-локусе можно выделить несколько регионов – область, кодирующая 11 различных копий неизменяемой части гена (C_H), и IgV (*immunoglobulin variable*) область, которая состоит из 3 групп разных генных сегментов: 123–129 копий варибельных (V_H) сегментов, 27 копий сегментов разнообразия (D_H – diversity) и 9 копий сегментов соединения (J_H – joining). В процессе соматической V(D)J-рекомбинации в каждой В-клетке происходит соединение разных V_H , D_H и J_H -генных сегментов в произвольном сочетании, что является первым этапом формирования разнообразия Ig и BCR. Аналогично IgH устроены локусы, кодирующие легкие цепи (Igk и Igl) иммуноглобулинов, только в них отсутствуют D-сегменты.

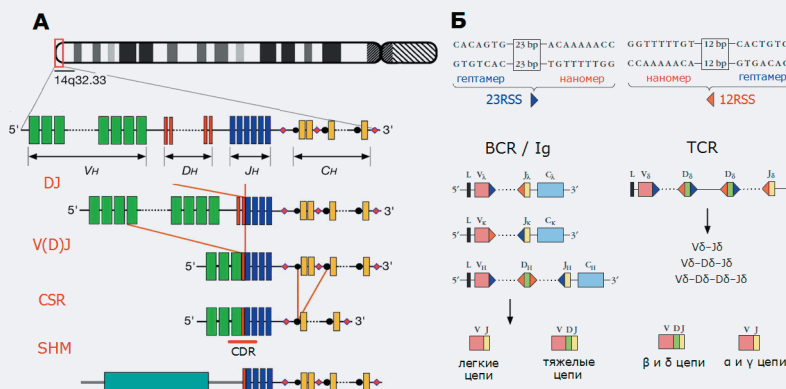


Рис. 1. Процессы рекомбинации в BCR/Ig- и TCR-локусах: (А) Схема IgH-локуса. Локус IgH человека расположен в прителомерной части q-плеча 14-й хромосомы. Он состоит из кластеров V_H (зеленый цвет), D_H (красный цвет), J_H (синий цвет) и C_H (желтый цвет) генных сегментов. Красными линиями отмечены варианты V(D)J- и CSR-рекомбинаций, горизонтальной красной чертой – гиперварибельная область (CDR), модифицируемая при SHM. Красные ромбы – энхансеры транскрипции, черные кружки – S-сигналы CSR-рекомбинации в C_H -области. Внизу показан типичный случай хромосомной транслокации, в результате которой онкоген (темно-зеленый прямоугольник) попадает в IgH-локус (см. рис. 1); (В) Сверху показана структура 12RSS и 23RSS (bp – base pairs = п. н.). В центре слева изображено расположение 12RSS и 23RSS на различных генных сегментах Igl, Igk и IgH-локусов. В результате VJ- и V(D)J-рекомбинации собираются варибельные области легких и тяжелых цепей BCR/Ig соответственно (внизу слева). В центре справа показано расположение RSSs на различных генных сегментах TCR δ -локуса. Ассиметричное расположение RSSs на $D\delta$ -сегментах приводит к возможности альтернативного соединения и возникновения различных вариантов TCR δ -цепи. Это является важным механизмом повышения разнообразия TCR, учитывая, что SHM/CSR-реакции в Т-клетках отсутствуют. Внизу приведены структуры собранных варибельных регионов области α , β , δ и γ цепей TCR. Рисунок адаптирован из статьи М. Dyer et al. [39] и монографии Т. Kindt et al. [40]

Для правильной сборки функциональных генов из различных сегментов с помощью рекомбинации необходимо, чтобы этот процесс происходил очень точно. Для этого все варибельные сегменты снабжены специальными метками – RSS (recombination signal sequences), которые представляют собой 2 очень консервативные последовательности ДНК – гептамер (7 п. н.) и наномер (9 п. н.), разделенные спейсерами размером 12 (12RSS) или 23 п. н. (23RSS) (рис. 1Б). Размеры спейсеров примерно соответствуют длине 1 (12RSS) или 2 (23RSS) витков спирали ДНК, поэтому их также называют «один виток» (one-turn) RSS и «два витка» (two-turn) RSS. То есть сигнальные последовательности (гептамер и наномер) 12RSS и 23RSS находятся на одной стороне спирали ДНК, но на расстоянии 1 или 2 витков ДНК друг от друга. Такая конфигурация позволяет ферментам V(D)J-рекомбинации различать сегменты с разными RSS, и соединять сегменты, несущие 12RSS, только с 23RSS сегментами («правило 12/23»). Рекомбинация осуществляется с помощью так называемой «V(D)J-рекомбиназы», которая на самом деле является сложным комплексом различных белков. В этот комплекс входят нуклеазы RAG1 и RAG2 (recombination activating gene), которые вносят в ДНК двунитевые разрывы (DSBs, double-strand breaks) в области сигнальной последовательности (гептамера). После этого DSBs восстанавливаются клеточной системой репарации, которая соединяет негомологичные участки разрыва ДНК (NHEJ, nonhomologous DNA end-joining) путем соединения DSBs из разных локусов. Этот процесс сопровождается потерей фрагмента ДНК, который ранее разделял сайты рекомбинации. Кроме того, в момент соединения DSBs терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) добавляет к месту стыковки DSBs несколько (N) случайных нуклеотидов, что является еще одним механизмом разнообразия репертуара молекул BCR/Ig и TCR.

Сочетание разных сегментов в BCR/Ig-локусах происходит постепенно в процессе развития В-лимфоцитов, сначала осуществляется DJ-рекомбинация, приводящая к соединению D- и J-сегментов, а затем V(D)J-рекомбинация завершает сборку варибельных VDJ-участков (рис. 1А и рис. 2). Собранные таким образом рецепторы экспрессируются на мембранах и если они функциональны, то внутриклеточные эффекторы BCR- и TCR-сигнализации подавляют рекомбинационную активность в клетке, предотвращая рекомбинации на гомологичных парах хромосом (аллельное исключение). В редких случаях (аутоиммунная активность BCR) в незрелых В-клетках может снова стимулироваться RAG1/2-активность, которая приводит к новому раунду рекомбинаций в Igk- и/или Igl-локусах гомологичных хромосом (редактирование рецептора).

в которых арест дифференцировки происходит на уровне пре-В- и пре-Т- (DN) клеток – незрелых В- (наивных) или Т- (DP) клеток; 3) опухоли, возникшие из зрелых В- или Т-клеток (рис. 2) [6]. К опухолям 1-й группы относятся почти все В-клеточные острые лимфобластные лейкозы (В-ОЛЛ), которые по спектру генетических aberrаций очень схожи с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Транслокации, связанные с *BCR/Ig*-рекомбинациями при В-ОЛЛ, не выявляются, за исключением редких случаев развития классических лимфом (например, ЛБ) по лейкозному «сценарию», с потерей привязанности к определенной анатомической локализации. Рекуррентные онкогенные транслокации, затрагивающие *BCR/Ig*-локус, происходят и в пре-В-клетках, однако их «реализация» отодвинута во времени из-за особенностей регуляторного механизма в *BCR/Ig*, который в *TCR*-локусах отсутствует.

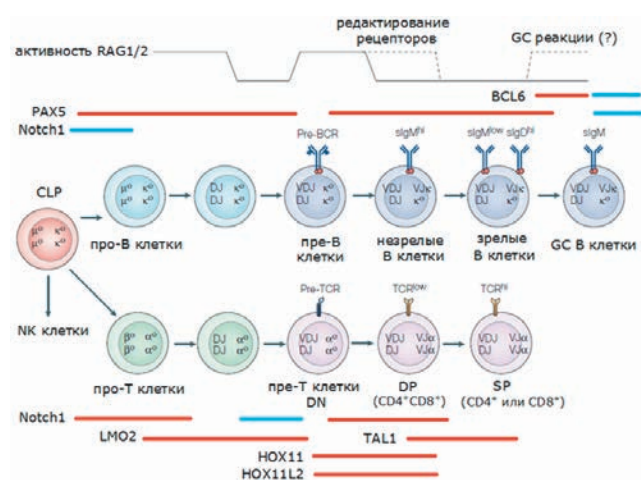


Рис. 2. Активность *V(D)J*-рекомбинации и стадии развития лимфоидных клеток

Показаны основные стадии развития В- и Т-клеток с указанием рекомбинационных процессов (*DJ*, *VDJ*, *VJ*) и экспрессирующихся на поверхности клеток *BCR*- (*sIg*) и *TCR*-рецепторов. Сверху представлен уровень активности *RAG1/2*-комплекса. Также показана экспрессия (ассоциированная со стадиями развития) некоторых протоонкогенов, которые принимают участие в дифференцировке В- (сверху) и Т-клеток (внизу) и часто становятся мишенью онкогенных aberrаций. Некоторые протоонкогены (как, например, *Notch1* или *PAX1*) экспрессируются на разных стадиях развития лимфоцитов, причем в одних случаях они могут активировать или поддерживать (красные линии), а в других – блокировать (синие линии) клеточную дифференцировку в определенном направлении [6, 14–16]. Рисунок адаптирован из статьи М. Schlissel [17].

CLPs – common lymphoid progenitors; *DN* и *DP* – двойные негативные и позитивные (по экспрессии *CD4* и *CD8*) Т-клетки соответственно; *hi* (высокий) и *low* (низкий) уровень экспрессии *BCR* (*sIg*).

Интересно, что у некоторых лимфом, имеющих хромосомные транслокации, индуцированные *V(D)J*-рекомбинацией (табл. 2) и приобретенные на стадии пре-В-клеток, манифестация опухоли происходит на более поздней стадии зрелых В-клеток. Этот феномен объясняется тем, что в *IgH*-локусе

присутствует несколько энхансеров транскрипции, участвующих в формировании комплексов активации транскрипции путем образования петель ДНК (см. [1], Приложение 2). Один из них (*iEμ*) расположен между варибельной и *C_H*-частями *IgH*-локуса, активен в пре-В- и незрелых В-клетках и действует на небольшое расстояние, образуя короткие петли ДНК. Поэтому *iEμ*-энхансер может активировать транскрипцию только после *V(D)J*-рекомбинации, которая сближает *iEμ* с промоторами *BCR/Ig*-генов, расположенными перед каждым *V*-генным сегментом (см. Приложение 1, рис. 1А). В зрелых клетках *iEμ* инактивируется или вообще удаляется в процессе *CSR*, и транскрипция *BCR/Ig* регулируется *IgH3'RR*-энхансером, который расположен в конце *C_H*-локуса и активен на значительные расстояния – до 200 тыс. п. н. (рис. 1А) [13, 15]. В пре-В-клетках уровень экспрессии онкогена, встроенного в *IgH*-локус в результате *V(D)J*-рекомбинации, без помощи энхансера (*iEμ* «не дотягивается» до промотора) будет низким, недостаточным для трансформации. Но после переключения энхансеров на более поздних стадиях развития В-клеток, сильный *IgH3'RR*-энхансер обеспечивает высокий уровень транскрипции онкогена, и происходит своего рода «отсроченная» малигнизация.

Рекуррентные aberrации, встречающиеся во многих типах лимфоидных опухолей, приводят к активации генов, которые контролируют программы клеточной дифференцировки. Чаще всего такая активация связана с перемещением этих генов в *BCR/Ig*- (В-клеточные опухоли) или *TCR*- (Т-клеточные опухоли) локусы в результате хромосомных транслокаций. Программа дифференцировки клетки состоит из сложной иерархии сменяющих друг друга в пространстве и времени каскадов транскрипционных активностей. Решение о включении программы определяется взаимодействием между внутренними и внешними сигналами (см. [1], глава II). Обычно такие транскрипционные программы запускаются и контролируются ограниченным числом ключевых факторов транскрипции («мастер-факторов») – своего рода «спусковых крючков» (триггеров), которые имеют много генов-мишеней. Гены, которые часто подвергаются атакам в лимфоидных опухолях, кодируют именно такие факторы транскрипции. После запуска программы в клетке формируется специфичный набор (паттерн) активированных генов, продукты которых определяют клеточный фенотип на данном этапе развития. Паттерны транскрипции клеток разных тканей и разного уровня дифференцировки, а также клеток при различных патологиях сегодня интенсивно изучаются с использованием технологии «микрочипов» (*microarray*), которая позволяет получить так называемый профиль геной экспрессии, выявляющий большинство активных генов.

Приложение 2. Созревание лимфоцитов в периферических лимфоидных органах и происхождение гематологических опухолей

В ранних лимфоидных клетках-предшественниках (про-В- и про-Т- клетках) процессы V(D)J-рекомбинации еще не происходят, что является одним из маркеров этих клеток. На более поздних этапах развития в клетках появляется рекомбинационная активность, и они переходят в категорию пре-В- и пре-Т-клеток. В дальнейшем незрелые В- и Т-клетки мигрируют из костного мозга в лимфатические органы и тимус соответственно, где продолжается их дифференцировка (см. рис. 2).

В «темной зоне» герминативных центров (GC, germinal centre) (рис. 11) антиген-активированные клетки (здесь они называются центробластами) стимулируются стромой к активной пролиферации. Причем каждое клеточное деление сопровождается введением большого числа мутаций (SHM, somatic hypermutation) в область контакта BCR/Ig с антигеном – гипервариабельную область (CDR, complementarity determining region) (рис. 1). Триггером SHM является цитидин-дезаминаза, индуцируемая активацией (AID, activation-induced cytidine deaminase), которая осуществляет превращение цитозина в урацил во многих местах CDR. Репарация такого рода повреждений ДНК приводит к возникновению DSBs, ликвидация которых системами репарации приводит к появлению мутаций в CDR. Механизм возникновения этих мутаций отличается от того, который наблюдается при V(D)J-рекомбинации, так как в клетках уже отсутствует TdT-активность. Центробласты мигрируют из «темной зоны» в «светлую зону» GC (теперь они называются центроцитами), где подвергаются селекции по силе связывания BCR с антигеном иммунизации. Центроциты с низкой avidностью уничтожаются цитотоксическими Т-киллерами путем индукции в них процессов апоптоза. В-клетки с высокой avidностью переживают атаки Т-киллеров, так как прочная связь BCR с антигеном приводит к устойчивой BCR-сигнализации, активирующей фактор транскрипции kB (NF-kB, nuclear factor kB), который, в свою очередь, повышает выживаемость клеток, стимулируя синтез антиапоптотических белков. Выжившие центроциты вступают в дальнейшую дифференцировку, в ходе которой они превращаются в зрелые В-клетки памяти или плазмобласты. Незрелые В-лимфоциты экспрессируют молекулы BCR/Ig, которые содержат ближайший к вариабельной области C_H генный сегмент, а именно C_{H1} (BCR/IgM). При дальнейшей дифференцировке происходит диверсификация тяжелой цепи BCR/Ig за счет замены C_{H1} -сегмента в первичных BCR/IgM-генах на другие сегменты C_H -локуса. Такой процесс сдвига изотипа осуществляется за счет рекомбинации переключения класса (CSR, class-switch recombination). Так как RAG1/2-активность на этом этапе развития В-клеток отсутствует или крайне мала, а активность AID очень высока, то именно AID индуцирует CSR-перестройки. AID модифицирует цитозины в сайтах «переключения» (S, switch), расположенных между разными сегментами в C_H -локусе (рис. 1A). Возникновение DSBs около разных C_H -сегментов индуцирует рекомбинацию, при которой удаляется участок ДНК между этими сегментами и вариабельной частью BCR/Ig-гена, что приводит к образованию BCR/Ig-генов с разными C_H -экзонами (C δ , C γ , C ϵ и C α).

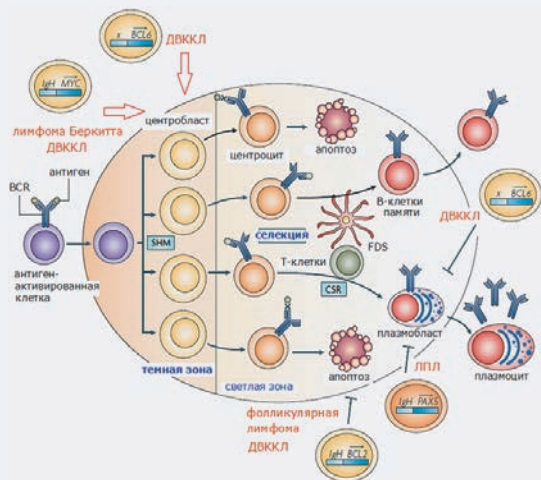


Рис. 11. Схема, показывающая основные процессы, протекающие в GC (подробности в тексте). Красным цветом выделены некоторые виды лимфом, которые могут возникать и прогрессировать в GC (см. главы II и III), внутри силуэтов опухолевых клеток показаны активируемые онкогены. Красные стрелки означают пролонгацию стадии центробласта, черные тупые стрелки – блокировку процесса (апоптоза) или клеточной дифференцировки. FDCs (follicular dendritic cells) – антиген, представляющий клетки в GC. Рисунок адаптирован из статьи U. Klein et al. [26]

Программы дифференцировки центроцитов в В-клетки памяти или плазмобласты/плазмочиты содержат важный этап «переключения» характера процессинга (созревания) мРНК BCR/Ig. В результате альтернативного сплайсинга из мРНК BCR/Ig в плазмочитах удаляется расположенный в C_H -локусе экзон, который кодирует трансмембранный (ТМ) домен белка, в результате чего плазмочиты синтезируют главным образом секретиремый продукт BCR/Ig-гена (иммуноглобулины). Сплайсинг мРНК в В-клетках памяти проходит с сохранением ТМ-эксона, что приводит к синтезу связанного с мембраной белка (BCR).

Геномные aberrации, приводящие к нарушению нормальной экспрессии ключевых регуляторов дифференцировки, блокируют нормальный ход развития лимфоцитов, не отменяя предшествующих этапов («консервация» клеток на определенной стадии развития путем поддержания специфичного паттерна экспрессии). Сами по себе эти изменения, как правило, не могут вызвать развитие злокачественной опухоли, однако «арест» дифференцировки приводит к активной клональной пролиферации (экспансии) клеток, несущих

инициирующую онкогенез aberrацию. Увеличение клеточной массы, в свою очередь, повышает вероятность возникновения дополнительных мутаций, приводящих к малигнизации первичных лейкозных клеток. Такие дополнительные aberrации могут иметь разную природу и воздействовать на различные клеточные процессы, поэтому они порождают дифференциацию опухолевой эволюции, что проявляется в существовании нескольких молекулярных подтипов опухолей с идентичной инициирующей aberrацией.

Глава III. Геномные aberrации при В-клеточных неоплазиях

В рамках данного курса лекций рассмотреть все рекуррентные онкогенные aberrации, приведенные в табл. 1 и 2, не представляется возможным, тем более что по своей сути такие aberrации при В-ОЛЛ мало чем отличаются от тех, что встречаются при ОМЛ [3]. Хромосомные транслокации с участием «мастер»-фактора *AML1* (*RUNX1*) происходят как при ОЛЛ, так и при ОМЛ. При одной из самых распространенных при В-ОЛЛ транслокаций *t*(12;21) геном-партнером *AML1* является *TEL* (*ETV6*), кодирующий репрессор транскрипции, как и *ETO* – ген-партнер *AML1* при ОМЛ. В результате оба химерных белка (*TEL-AML1* и *AML-ETO*), несущие «репрессорные» домены *TEL* или *ETO*, при связывании с промоторами генов-мишеней *AML1* вместо кофакторов активации транскрипции рекрутируют репрессирующие транскрипцию белки, что приводит к «аресту» дифференцировки клеток-предшественников и лейкозогенезу [19, 20]. Одно из вероятных объяснений того, почему при ОМЛ ген *AML1* рекомбинирует с геном *ETO*, а при В-ОЛЛ – с *TEL*, будет изложено далее. Предлагаю читателю несколько хороших обзоров по молекулярным aberrациям при В-ОЛЛ [6, 20–23], а в заключение главы кратко рассмотрим 2 интересных примера патогенеза В-клеточных лейкозов и лимфом.

«Арест» дифференцировки клеток может быть обусловлен нарушением функций активаторов или репрессоров транскрипции. Но есть такие регуляторы, которые могут одновременно действовать и как активаторы, и как репрессоры транскрипции. К таким регуляторам относится *PAX5*, родственный *НОХ*-факторам транскрипции (см. главу IV) белок, который контролирует коммитирование общих лимфоидных предшественников в В-клеточном направлении дифференцировки, и экспрессия которого необходима на многих стадиях развития В-лимфоцитов (рис. 2) [24]. Такая особенность *PAX5* связана с наличием у него доменов, которые могут связываться с коактиваторами или корепрессорами транскрипции (см. [1], Приложение 3). *PAX5* активирует транскрипцию генов, которые необходимы для В-клеточного развития (например, *CD19*, основной корецептор *BCR*-сигнализации), и подавляет активность генов, определяющих не-В-клеточную дифференцировку (например, *FLT3* и *Notch*). Поэтому инактивирующие мутации/делеции гена *PAX5* в про-В клетках приводят к аресту дифференцировки и могут инициировать развитие про-В-клеточного ОЛЛ (табл. 1). На поздних этапах созревания В-клеток *PAX5* подавляет экспрессию генов (в частности *XBP1*), индуцирующих дифференцировку плазмобластов в плазмциты. Это приводит к тому, что активация гена *PAX5* в результате его транслокации в *IgH*-локус вызывает развитие лимфоплазмочитарной лимфомы [22–24] (табл. 2).

Самая запутанная ситуация сложилась с определением диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), к которой относятся опухоли, возникшие из клеток герминативного центра (GC, см. Приложение 2). Традиционный цитоморфологический/иммунофенотипический подход свел «много разных заболеваний в одну диагностическую категорию» [23]. При ДВККЛ выявляется несколько рекуррентных хромосомных aberrаций (табл. 2), при которых активируются гены, контролирующие совершенно разные клеточные функции [23, 25]. Это отличает ДВККЛ, например, от ювенильного миеломоноцитарного лейкоза (ЮММЛ), при котором нарушения в разных генах приводят к активации одного сигнального пути [3], или от Т-ОЛЛ, где набор гетерогенных aberrаций вызывает с помощью различных механизмов активацию одного «мастер»-фактора (*Notch1*, глава IV). К ДВККЛ относят варианты опухолей, при которых в клетках с GC-фенотипом активируются гены, кодирующие разные регуляторные белки. Это может быть фактор активации транскрипции *c-MYC*, фактор репрессии транскрипции *Bcl-6* или основной антиапоптотический белок *Bcl-2*. Все эти aberrации приводят к увеличению пролиферативного потенциала (*c-MYC*) или выживаемости (*Bcl-6* и *Bcl-2*) GC-клеток. Сегодня ДВККЛ подразделяют на несколько подгрупп, но лишь одна из них (GCB, *germinal-center B-cell*), объединяющая случаи с *t*(14;18)/*IgH-Bcl-2*-транслокацией, кажется логически обоснованной. Действительно, негативная селекция В-клеток в GC (см. Приложение 2) будет способствовать отбору клеток, синтезирующих повышенный уровень *Bcl-2*. Такие клетки могут длительное время выживать и пролиферировать в агрессивном микроокружении GC до тех пор, пока не приобретут дополнительные повреждения, необходимые для малигнизации. Поэтому GCB-подгруппу ДВККЛ, вероятно, можно выделить в отдельную диагностическую категорию, имеющую специфичный молекулярный маркер.

Следует отметить, что все рекуррентные aberrации, описанные для ДВККЛ, сами по себе не могут вызвать злокачественную трансформацию В-клеток [23, 26]. Они, как правило, только создают «привилегированные условия» для существования мутантных клеток в условиях GC, способствуя их выживанию и накоплению опосредованных AID вторичных онкогенных мутаций. Именно разнообразие таких вторичных мутаций вносит существенный вклад в полиморфный, трудный для систематизации характер протекания различных молекулярных вариантов ДВККЛ. Действительно, у здоровых людей часто обнаруживают В-клетки с *t*(14;18)/*IgH-Bcl-2*-транслокацией. Эта аномалия даже получила особое определение – «В-клетки типа фолликулярной лимфомы» (*follicular lymphoma-like B cells*), которые, как правило, уже «прошли» через GC, претерпели определенные SHM/CSR-модификации и циркулируют в качестве В-клеток памяти без каких-



Приложение 3. Архитектура интерфазного клеточного ядра

ДНК отдельных хромосом в интерфазном ядре расположены не хаотически, а занимают определенные территории (chromosome territory) (рис. IIIA). Расположение территорий разных хромосом не случайно, оно может варьировать в клетках разных тканей и в клетках крови разного происхождения [44]. Различные участки ДНК имеют разную степень упаковки (конденсацию), что определяет поляризацию территорий хромосом. Участки, обедненные генами (гетерохроматин), более сильно сконденсированы и располагаются ближе к ядерной мембране. Транскрипционно активные участки, обогащенные генами (эухроматин), ориентированы внутрь ядра. Территории хромосом являются динамичными образованиями. Отдельные локусы ДНК могут передвигаться в ядре и приходить в соприкосновение с ДНК одной или нескольких хромосом («генные поцелуи», gene kissing) (рис. IIIB). Такие контакты между разными хромосомами могут происходить в специализированных компартментах интерфазного ядра, выполняющих определенные функции. Это могут быть, например, так называемые «фабрики транскрипции» (transcription factories), крупные субмолекулярные структуры, в которых повышена концентрация различных компонентов «машины» транскрипции [45, 46]. Такие зоны активной транскрипции могут формироваться с участием петель активного хроматина, принадлежащих одной или нескольким хромосомам. «Фабрики транскрипции» являются мобильными структурами, они появляются и исчезают в разных участках ядра, вовлекая в транскрипцию различные наборы генов. Паттерны «фабрик транскрипции», представляющие собой определенное отражение конфигурации активных участков генома, различаются в клетках разного происхождения и на разных стадиях их дифференцировки [13].

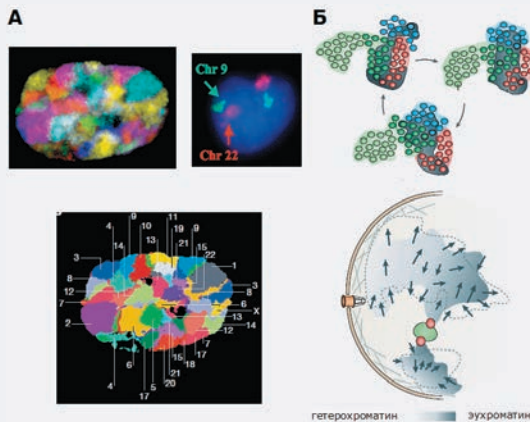


Рис. III. Территории хромосом и мобильность ДНК в ядре клетки: (А) Вверху слева показан снимок интерфазного ядра, в котором ДНК каждой хромосомы окрашена с помощью специфических для каждой хромосомы ДНК-зондов, несущих флуорофор определенного цвета. Внизу представлена расшифровка верхней фотографии с указанием положения территории каждой хромосомы. Ближайшее окружение для пар гомологичных хромосом может совпадать или различаться. Например, обе пары гомологичных хромосом 9 и 22 (участвующие в транслокации t(9;22) при ХМЛ) располагаются в соседних компартментах ядра (вверху справа на этом снимке окрашены только 9-я и 22-я хромосомы); (Б) Сверху показана реконструкция наблюдений перемещения в течение определенного времени (показано 3 позиции) отдельных участков ДНК 3 хромосом (окрашены разным цветом) в область активного хроматина (темное поле).

В хроматине можно выделить отдельные «домены» размером ≈ 1 млн п. н. (показаны кружками), которые имеют разную подвижность в ядре. Более интенсивно окрашенные кружки указывают области хромосом, обогащенные генами. Внизу представлена схема, отражающая перемещение (стрелки) отдельных локусов 2 хромосом (контуры территорий хромосом очерчены пунктирной линией). Более темные области хроматина соответствуют обогащенным генами хромосомным локусам (эухроматин). Два активных локуса разных хромосом (красные кружки) перемещаются в область «фабрики транскрипции» (зеленый цвет). Рисунок адаптирован из работ М. Speicher & N. Carter [41], А. Guffei et al. [42] и С. Lancot et al. [43]

либо морфологических признаков трансформации. Такого типа клетки (с первичными aberrациями генов *Vcl-2*, *c-MYC* или *Vcl-6*) могут быть источником недавно описанной группы лимфом зрелых В-клеток, имеющих сразу 2 рекуррентные aberrации — так называемые лимфомы с «двойным поражением» (DH, double hit) [27]. Наиболее частой комбинацией повреждений генома в DH-лимфомах является активация генов *c-MYC* и *Vcl-2*, которая приводит к увеличению онкогенного потенциала опухолевых клеток, их клональной экспансии и агрессивному, плохо поддающемуся терапии течению заболевания.

Глава IV. Геномные aberrации при Т-клеточных неоплазиях

В случае Т-ОЛЛ все рекуррентные хромосомные транслокации активируют гены (*TAL1*, *LYL1*, *LMO2*, *HOX11*, *HOX11L2*), участвующие в поддержании дифференцировки Т-лимфоцитов на определенных стадиях их развития (табл. 1, рис. 2) [14, 28]. Кроме этих изменений для Т-ОЛЛ описано множество нарушений, которые, однако, нельзя отнести к рекуррент-

ным или диагностическим из-за их раритетности или повсеместной встречаемости во многих опухолях человека, хотя была попытка как-то упорядочить эти многочисленные aberrации, разнеся их на несколько функциональных групп [29]. Из «классических», собранных в кластеры семейств *HOX*-генов (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC* и *HoxD*), отвечающих за правильное позиционирование в пространстве и времени различных частей тела во время эмбриогенеза (так называемый «HOX-код»), в патогенных aberrациях при Т-ОЛЛ крайне редко участвуют гены только *HoxA*-семейства. Зато некоторые *HOX*-гены (*HOX11* и *HOX11L2*), которые рассеяны по всему геному и не входят в кластеры *HoxA–HoxD*-семейств, часто вовлекаются в хромосомные транслокации при Т-ОЛЛ [30]. Условно к группе «HOX-aberrаций» можно отнести и многочисленные транслокации с участием гена *MLL*, так как он кодирует «мастер»-фактор, регулирующий активность *HOX*-генов [3].

Однако в последние годы было установлено, что настоящим молекулярным маркером опухолей Т-клеточного происхождения является ген,

кодирующий Notch1-рецептор [15, 31, 32]. Notch-сигнализация, вероятно, является примером древнейшего способа коммуникации между клетками в многоклеточных организмах, о чем свидетельствует функциональная универсальность Notch-белков: они одновременно являются и мембрано-связанными рецепторами и «мастер»-факторами транскрипции (рис. 3А). При очень редкой ($\approx 1\%$ случаев Т-ОЛЛ) хромосомной транслокации t(7;9)(q34;q34.3) происходит перенос части *Notch1*-гена, лишенной почти всего внеклеточного домена, в TCR β -локус. Это приводит к аномально высокому уровню экспрессии лиганд-независимого рецептора, внутриклеточная часть которого (ICN) конститутивно активирует свои гены-мишени. Наиболее часто происходят мутации в HD- и PEST-доменах, которые приводят к лиганд-независимому расщеплению рецептора и стабилизации ICN-комплексов активации транскрипции соответственно (рис. 3Б). Такие мутации встречаются в $\approx 50\%$ случаев Т-ОЛЛ. Но, кроме этого, в $\approx 30\%$ случаев наблюдаются мутации, инактивирующие негативный регулятор ICN-комплексов (FBW7). Таким образом, в 80% случаев Т-ОЛЛ наблюдается аномальная активация Notch1-сигнальной системы.

Notch1 участвует в регулировке Т-клеток на разных этапах их развития (рис. 2). В норме сила и продолжительность Notch-сигнализации полностью зависит от клеток микроокружения, несущих Notch-лиганды, поэтому уровень активности Notch1 может сильно варьировать в различных компартментах тимуса. Это важный момент, так как развитие Т-клеток во многом определяется согласованным взаимодействием TCR-сигнализации с Notch1-сигналами разной интенсивности, которое, как считается, контролирует выживание и линейное коммитирование тимоцитов [33]. Поэтому аномально высокий уровень Notch1-сигнализации может, вероятно, приводить к самым разным результатам на определенных этапах развития Т-клеток: от коммитирования тимоцитов преимущественно в каком-то одном направлении или «ареста» их дифференцировки до клеточной гибели. «Онкогенным» вариантом, по всей видимости, будет «арест» дифференцировки Т-клеток, приводящий к их избирательному выживанию и/или клональной экспансии. В случае приобретения дополнительных опухолеродных aberrаций из этих клеток могут развиваться опухоли, в которых будут обнаружены различные повреждения Notch1-сигнализации. Способность мутаций, активирующих Notch1-сигнализацию, содействовать трансформации Т-клеток на нескольких этапах их развития не позволяет Notch1 быть диагностическим маркером, выявляющим опухоли разной этиологии. Однако компоненты Notch1-сигнального пути могут быть прекрасной мишенью для разработки новых перспективных таргетных препаратов для лечения Т-клеточных гемобластозов.

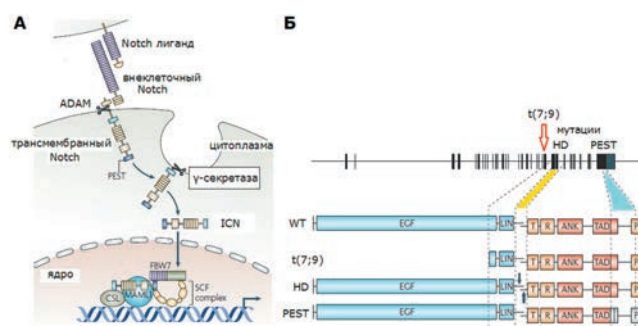


Рис. 3. *Notch1*-сигнализация (А) и ее нарушение при Т-ОЛЛ человека (Б): (А) Рецептор *Notch1* синтезируется в виде одного полипептида, который при созревании разрезается на 2 части (внеклеточную и трансмембранную), соединенные друг с другом через домены гетеродимеризации (HD). При связывании с лигандом в HD происходят конформационные изменения, что приводит к его расщеплению металлопротеазой межклеточного матрикса ADAM и γ -секретазой. Освободившаяся от мембраны внутриклеточная часть рецептора (ICN) является фактором транскрипции. ICN перемещается в ядро, где совместно с несколькими кофакторами (CSL, MAML1) формирует комплексы активации транскрипции на промоторах генов-мишеней. ICN не имеет ДНК-связывающего домена (в комплексах эту функцию выполняет CSL), но он содержит много доменов и повторов (R, ANK и TAD на рис. 3Б), через которые может осуществлять различные белок-белковые взаимодействия, необходимые для формирования комплексов активации транскрипции. E3 убиквитин-лигаза FBW7 (компонент SCF-регуляторного комплекса) связывается с PEST-доменом ICN и убиквитинирует его. После чего ICN становится мишенью для протеасомной деградации (см. [2], Приложение 3); (Б) Сверху показана схема строения гена, кодирующего *Notch1* (вертикальные черные полосы — экзоны), который состоит из 34 экзонов. Хромосомная транслокация t(7;9) приводит к удалению почти всей внеклеточной части рецептора и образованию конституционно активной внутриклеточной части *Notch1*. Мутации в HD-домене (область мутаций в экзонах 26 и 27 отмечена желтым цветом) приводят к лиганд-независимому расщеплению рецептора и освобождению ICN. Онкогенные мутации в PEST-домене (34-й экзон, область мутаций отмечена голубым цветом) приводят к нарушению его связывания с FBW7 и, следовательно, делают комплексы активации транскрипции стабильными. ADAM — a disintegrin and metalloproteinase; HD — heterodimerization domain; ICN — intracellular domains of Notch; PEST — proline- (P), glutamic-acid- (E), serine- (S) & threonine- (T) rich; WT — wild type. Рисунок адаптирован из работ I. Aifantis et al. [14] и C. Grabher et al. [15]

Глава V. Возможные механизмы генерации рекуррентных хромосомных транслокаций

Двунитевые разрывы ДНК (DSBs) являются триггерами хромосомных рекомбинаций при сборке функциональных генов BCR/Ig и TCR (см. главу II). Ошибки RAG1/2-рекомбиназ и/или чрезмерная активность AID могут приводить к возникновению DSBs в эктопических участках ДНК на других хромосомах (рис. 2). Кроме того, многие внешние и внутренние мутагенные факторы индуцируют образование DSBs. В делящейся клетке возникает ≈ 10 DSBs в день и не все они ликвидируются системой репарации ДНК надлежащим образом [34]. Расчеты показывают, что в организме каждый день ≈ 1000 В-клеток (где особенно часто индуцируются DSBs) могут генерировать случайные хромосомные транслокации [35]. К счастью, подавляющее большинство таких транслокаций носит нейтральный

характер и не дает клеткам никаких селективных преимуществ.

Но все равно остается неясным, почему в клетках одного типа с завидной постоянностью происходят определенные хромосомные транслокации, а в других их не наблюдается, зато часто встречаются другие транслокации? По всей видимости, здесь важнейшим фактором являются отличия в организации хроматина в ядрах этих клеток, способствующие физическому сближению определенных хромосомных локусов. Такие механистические факторы, повышающие вероятность возникновения специфических хромосомных транслокаций в клетках определенного вида (и даже на определенном этапе их развития), связаны с особенностями архитектуры их интерфазных ядер. К понятию «архитектура интерфазного ядра» в контексте возникновения специфичных транслокаций относятся: 1) взаиморасположение территорий хромосом, участвующих в транслокации; 2) взаиморасположение локусов этих хромосом, в которых наиболее часто происходят взаимные рекомбинации (см. Приложение 3). Конфигурация хромосомных территорий в ядре может изменяться в клетках не только разных тканей, но и в клетках, находящихся на разных ступенях своего развития. Таким образом, задействованные в транслокациях хромосомы могут находиться в непосредственной близости в клетках определенного типа дифференцировки. Сближение локусов хромосом, участвующих в транслокациях, может происходить при создании «фабрик» транскрипции, паттерн которых может существенно меняться в процессе клеточного развития. Подтверждением того, что активный хроматин, формирующий «фабрики транскрипции», может быть мишенью транслокаций, является тот факт, что белок RAG2 имеет PHD-домен, который узнает и взаимодействует с H3K4me – меткой активного хроматина (см. [1], Приложение 4) [13]. То есть RAG1/2-комплекс «работает» в области инициации транскрипции, там, где произошла модификация гистонов, приводящая к ослаблению их связи с ДНК, – в такой «открытой» форме ДНК становится доступна не только для RAG1/2, но и для мутагенных факторов, способных генерировать DSBs. Предполагается, что V(D)J-рекомбинация может осуществляться в специализированных «центрах рекомбинации» (recombination centres), существующих в рамках «фабрик транскрипции», где в условиях активного (открытого) хроматина локально сконцентрированы различные RSSs из BCR/Ig- или TCR-локусов

и ферменты комплекса рекомбинации [36]. Понятно, что если такие центры действительно формируются, то наличие в непосредственной близости от них (в той же «фабрике транскрипции») открытых локусов других хромосом существенно повышает вероятность возникновения рекуррентных транслокаций. Дискуссионным остается вопрос о существовании в ядрах клеток млекопитающих специализированных «ремонтных фабрик» (repair factories), где бы аккумуляровались и подвергались репарации DSBs (и где легко «перепутать» концы ДНК от разных хромосом, что приведет к транслокации). У дрожжей локальные структуры такого рода были обнаружены [13].

Сегодня есть ряд доказательств, подтверждающих важную роль механистических факторов (физическое сближение) и активности хроматина (доступность ДНК) в индукции рекуррентных хромосомных aberrаций. Так, например, при ЛБ с разной частотой выявляется несколько типов хромосомных транслокаций, приводящих к перемещению гена *c-MYC* в различные BCR/Ig-локусы (табл. 2). Выяснилось, что частота встречаемости каждого варианта транслокации пропорциональна расстоянию гена *c-MYC* от IgH, Igλ и Igκ-локусов в ядрах В-лимфоцитов [13]. Было также показано, что локализация и конформация BCR- и TCR-локусов изменяется на разных этапах развития В- и Т-клеток, соответственно [37], а специфичные геномные локусы (типа IgH и *c-MYC*) имеют очевидную предрасположенность к частым хромосомным перестройкам [35]. Кроме того, было установлено, что в активированных В-клетках мыши хромосомные локусы IgH и *c-MYC* локализируются в одной «фабрике транскрипции» [38].

В рамках описанных выше представлений можно предположить, почему в миелоидных клетках ген *AML1* рекомбинирует с геном *ETO*, а в лимфоидных – с *TEL* (см. главу III). Эти клетки, вероятно, могут отличаться друг от друга паттернами «фабрик транскрипции» и архитектурой хромосомных территорий. То есть, в промиелообластах ген *AML1* экспрессируется в одной (или соседней) «фабрике» с геном *ETO*, а совместная его экспрессия с геном *TEL* затруднена конфигурацией хромосомных территорий. В пролимфообластах ситуация, вероятно, повторяется «с точностью до наоборот»...

В заключительной лекции будут рассмотрены принципы выбора молекулярных мишеней для создания таргетных препаратов и современные подходы к разработке эффективных лекарств для противоопухолевой терапии.

Л и т е р а т у р а

1. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкозогенеза. Лекция № 1. Онкогематол 2010;4:49–56.
2. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкозогенеза. Лекция № 2. Механизмы реализации сигнальной трансдукции. Онкогематол 2011;1:76–84.
3. Домнинский Д.А. Молекулярные механизмы лейкозогенеза. Лекция № 3. Гемобластозы миелоидного происхождения. Онкогематол 2011;3:82–93.
4. Campo E., Swerdlow S., Harris N. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood 2011;117:5019–32.
5. Jaffe E., Harris N., Stein H., Isaacson P. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. Blood 2008;112:4384–99.
6. Asnafi V., Macintyre E. Molecular pathogenesis of acute lymphoblastic leukaemia: an immunoglobulin/T cell receptor-centric view. Hematol Education (13 Congress EHA) 2008;2:54–63.
7. Chiaretti S., Foa R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematol 2009;94:160–2.
8. Bende R., Smit L., van Noesel C. Molecular pathways in follicular lymphoma. Leukemia 2007;21:18–29.
9. Gollin C. Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. Semin Cancer Biol 2007;17:74–9.
10. De Mendibil I., Vizmanos J., Novo F. Signatures of selection in fusion transcripts resulting from chromosomal translocations in human cancer. PLoS ONE 2009;4:e4805.
11. Jung D., Giallourakis C., Mostoslavsky R., Alt F. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. Annu Rev Immunol 2006;24:541–70.
12. Nussenzweig A., Nussenzweig M. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. Cell 2010;141:27–38.
13. Gostissa M., Alt F., Chiarle R. Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. Annu Rev Immunol 2011;29:319–50.
14. Aifantis I., Raetz E., Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. Nat Rev Immunol 2008;8:380–90.
15. Grabher C., von Boehmer H., Look L. Notch1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat Rev Cancer 2006;6:347–59.
16. Seto M. Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. Cancer Sci 2004;95:704–10.
17. Schlissel M. Regulating antigen-receptor gene assembly. Nat Rev Immunol 2003;3:890–9.
18. Gostissa M., Yan C., Bianco J. Long-range oncogenic activation of IgH/c-MYC translocations by the IgH 3' regulatory region. Nature 2009;462:803–7.
19. Рулина А., Спиринов П., Прасолов В. Активированные лейкозные онкогены *AML1-ETO* и *c-KIT*: роль в развитии острого миелоидного лейкоза и современные подходы к их ингибированию. Успехи биологической химии 2010;50:349–86.
20. Pui C-H., Relling M., Downing J. Acute lymphoblastic leukemia. New Eng J Med 2004;350:1535–48.
21. Pui C-H., Robison L., Look T. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2008;371:1030–43.
22. Teitel M., Pandolfi P. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. Annu Rev Pathol Mech Dis 2009;4:175–98.
23. Shaffer A., Rosenwald A., Staudt L. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. Nat Rev Immunol 2002;2:920–33.
24. Cobaleda C., Schebesta A., Delogu A., Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. Nat Immunol 2007;8:463–70.
25. Lenz G., Staudt L. Aggressive lymphomas. New Engl J Med 2010;362:1417–29.
26. Klein U., Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol 2008;8:22–33.
27. Aukema S., Siebert R., Schuurin E. et al. Double-hit B-cell lymphomas. Blood 2011;117:2319–31.
28. Schnell S., Van Vlierberghe P., Ferrando A. The molecular basis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Hematol Education (16 Congress EHA) 2011;5:1–8.
29. Van Vlierberghe P., Pieters R., Beverloo B., Meijerink J. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Brit J Haematol 2008;143:153–68.
30. He H., Hua X., Yan J. Epigenetic regulations in hematopoietic Hox code. Oncogene 2011;30:379–88.
31. Pui C-H. T-cell acute lymphoblastic leukemia: NOTCHing the way toward a better treatment outcome. Cancer Cell 2009;15:85–7.
32. Koch U., Radtke F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. Trends in Immunol 2011;32:434–42.
33. Garbe A., von Boehmer H. TCR and Notch synergize in $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ lineage choice. Trends in Immunol 2007;28:124–31.
34. Lieber M. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem 2010;79:181–211.
35. McCord R., Dekker J. Translocation mapping exposes the risky lifestyle of B cells. Cell 2011;147:20–2.
36. Schatz D., Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. Nat Rev Immunol 2011;11:251–63.
37. Jhunjhunwala S., van Zelm M., Peak M., Murre C. Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. Cell 2009;138:435–8.
38. Osborne C., Chakalova L., Mitchell J. et al. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by IgH. PLoS Biol 2007;5:e192.
39. Dyer M., Akasaka T., Capasso M. et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? Blood 2010;115:1490–9.
40. Kindt T., Goldsby R., Osborne B. Kuby Immunology (6 ed.). Freeman & Company, 2006.
41. Speicher M., Carter N. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Nat Rev Genetics 2005;6:782–92.
42. Guffei A., Sarkar R., Klewes L. et al. Dynamic chromosomal rearrangements in Hodgkin's lymphoma are due to ongoing three-dimensional nuclear remodeling and breakage-bridge-fusion cycles. Haematol 2010;95:2038–46.
43. Lanctot C., Cheutin T., Cremer M. et al. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. Nat Rev Genetics 2007;8:104–15.
44. Parada L., McQueen P., Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. Genome Biology 2004;5:R44.1–R44.9.
45. Разин С., Гаврилов А., Яровая О. Транскрипционные фабрики и пространственная организация эукариотического генома. Биохимия 2010;75:1477–88.
46. Chakalova L., Fraser P. Organization of transcription. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:1–15.