

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, virologie a genetika



RNDr. Kristina Forsterová

**MOLEKULÁRNÍ HODNOCENÍ REZIDUÁLNÍHO  
ONEMOCNĚNÍ U CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ  
LEUKÉMIE**

MOLECULAR MONITORING OF RESIDUAL DISEASE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC  
LEUKEMIA

**Dizertační práce**

Vedoucí dizertační práce: MUDr. Jiří Schwarz, CSc.

Praha 2010

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že dizertační práci jsem zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním depozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

Souhlasím – Nesouhlasím

V Praze, 25.5.2010

Kristina Forsterová

## **Identifikační záznam:**

FORSTEROVÁ, Kristina. *Molekulární hodnocení reziduálního onemocnění u chronické lymfocytární leukémie. [Molecular monitoring of residual disease in chronic lymphocytic leukemia]*. Praha, 2010. 88 stran, 1 příloha. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 1. interní klinika. Vedoucí práce Schwarz, Jiří.

## **Souhrn**

Tato práce se zabývá detekcí reziduální choroby (MRD) u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Vzhledem k absenci specifického molekulárního markeru není detekce MRD u pacientů s CLL jednoduchá.

U souboru 29 pacientů byl s využitím „consensus“ PCR a komparativní PCR vyhodnocen efekt (z hlediska dosažení/ nedosažení molekulární remise) terapie fludarabin, cyklofosfamid, rituximab (FCR). Šestnáct pacientů následně podstoupilo autologní transplantaci (ASCT), která zřejmě neprodloužila délku molekulární remise těmto pacientům ve srovnání s pacienty netransplantovanými. Na délku remise transplantovaných pacientů neměla vliv kontaminace progenitorových buněk buňkami leukemickými, zatímco detekovatelná přítomnost maligních buněk v kostní dřeni v době ASCT měla vliv na délku dosažené molekulární remise.

Vzhledem k nedostatečné citlivosti „consensus“ PCR pro detekci reziduální choroby u CLL byla za tímto účelem analyzována využitelnost metylace DNA. Na původním souboru pacientů byl analyzován metylační status 5 genů (DLC1, SHP1, p15, p16 a lamin A/C). Metylace genu DLC1 byla detekována u většiny pacientů, proto byly pomocí PCR v reálném čase sledovány změny hladiny metylace tohoto genu v závislosti na vývoji choroby. Bylo zjištěno, že DLC1 je potenciálním alternativním markerem pro detekci reziduální choroby u CLL.

Statistická analýza navíc prokázala korelaci mezi vyšším klinickým stádiem CLL dle Raie a současnou metylací alespoň 2 genů. Výsledky této analýzy byly ověřeny (a potvrzeny) na souboru 82 pacientů. Dále bylo zjištěno, že metylace SHP1 a p15 může hrát roli v progresi CLL.

**Klíčová slova:** chronická lymfocytární leukémie, metylace DNA, minimální reziduální choroba, tumor-supresorový gen, polymerázová řetězová reakce

## Summary

The detection of residual tumor cells in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) was the goal of this study. Since there is no CLL-specific molecular marker, minimal residual disease detection (MRD) is not simple.

The outcome of 29 patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) was monitored using PCR with “consensus” primers and comparative PCR. 16 patients subsequently underwent autologous stem cell transplantation (ASCT) which did not significantly prolong the length of molecular remission reached by these patients in comparison to patients treated with FCR only. However, it seems that the length of molecular remission of transplanted patients was not affected by eventual contamination of progenitor cells with leukemic cells while it was affected by the presence of detectable CLL cells in their bone marrow at the time of ASCT.

Since “consensus” PCR is not a method sufficiently sensitive for MRD detection in CLL the usefulness of detection of DNA methylation was explored for this purpose. Methylation status of 5 genes (DLC1, SHP1, p15, p16 and lamin A/C) was analyzed in the tested group of patients. DLC1 methylation was detected in the majority of patients so changes in its methylation levels in relation to disease evolution were further analyzed using real time PCR. DLC1 was found to be a putative surrogate marker for quantitative detection of CLL cells.

In addition, statistical analysis revealed a correlation between simultaneous methylation of at least 2 genes and high Rai stage. Results of this analysis were verified (and confirmed) on a cohort of 82 patients. Furthermore, it was found that methylation of SHP1 and p15 genes might be involved in progression of CLL.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, DNA methylation, minimal residual disease, tumor suppressor gene, polymerase chain reaction

Ráda bych poděkovala zejména svému školiteli MUDr. Jiřímu Schwarzovi, CSc. za obětavou pomoc a nesmírnou trpělivost.

Dále děkuji RNDr. Aleně Slavičkové, CSc. za pomoc v počátcích mé práce, kolektivu laboratoře molekulární biologie 1. interní kliniky VFN za vytvoření příjemného pracovního prostředí a lékařům této kliniky za cenné rady.

Tato práce byla podpořena z Výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT 0021620808).

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	9
1.1. Chronická lymfocytární leukémie.....	9
1.1.1. Epidemiologie, etiologie.....	9
1.1.2. Prognostické faktory.....	10
1.1.2.1. Klinické stádium.....	10
1.1.2.2. Mutační stav variabilního segmentu těžkého řetězce imunoglobulinů.....	11
1.1.2.3. Další prognostické faktory: ZAP-70 a CD38.....	13
1.1.2.4. Cytogenetické aberace.....	14
1.1.3. Monoklonální B lymfocytóza.....	15
1.1.4. Léčba CLL.....	16
1.1.5. Detekce minimální reziduální choroby.....	16
1.1.5.1. Metody detekce MRD.....	17
1.2. Metylace DNA.....	18
1.2.1. Epigenetické změny chromatinu.....	18
1.2.2. Metylace DNA.....	18
1.2.3. Význam metylace DNA.....	19
1.2.4. Represe transkripce metylací DNA.....	20
1.2.5. Aberantní metylace DNA.....	21
1.2.5.1. Hypomethylace.....	22
1.2.5.2. Hypermethylace.....	22
1.2.6. Hypermetylom nádorové buňky.....	23
1.2.7. Metylace v hematologii.....	25
1.2.8. Metylace u chronické lymfocytární leukémie.....	26
1.2.9. Potenciálně zajímavé geny u pacientů s CLL.....	28
1.2.10. Využití metylace DNA v nádorové diagnostice.....	29
1.2.10.1. DNA metylace jako marker nádorových buněk.....	30
1.2.10.2. DNA metylace jako marker klinické odpovědi.....	30
1.2.10.3. DNA metylace jako prognostický faktor.....	31
1.2.11. Detekce DNA metylace.....	31
2. CÍLE.....	35
3. MATERIÁL A METODY.....	36

3.1. Pacienti .....	36
3.2. Izolace DNA .....	37
3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) s „consensus“ primery .....	37
3.4. Komparativní duplexní PCR: CDR3/ras PCR .....	38
3.5. Bisulfitová modifikace DNA .....	38
3.6. Metylačně specifická polymerázová řetězová reakce (MSP) .....	39
3.7. PCR v reálném čase (MethyLight) .....	40
3.8. Příprava pozitivní kontroly - <i>in vitro</i> metylace DNA .....	40
3.9. Analýza mutačního stavu IgVH .....	41
3.10. Detekce cytogenetických aberací .....	41
3.11. Průtoková cytometrie – analýza exprese ZAP-70 a CD38 .....	42
3.12. Statistická analýza .....	42
4. VÝSLEDKY .....	45
4.1. Molekulární monitoring efektu léčby FCR a FCR+ASCT užitím komparativní PCR a „consensus“ PCR .....	45
4.2. Analýza metylace vybraných tumor-supresorových genů .....	49
4.2.1. Optimalizace metodiky .....	49
4.2.2. Frekvence metylace vybraných genů .....	49
4.2.3. Korelace výsledků metylační analýzy a klinicko-patologických charakteristik pacientů ...	50
4.2.4. Ověření výsledků metylační analýzy na větším souboru pacientů .....	53
4.2.5. Analýza doby přežití .....	54
4.2.6. Analýza metylace DNA jako potenciálního markeru pro detekci MRD – srovnání s „consensus“ PCR .....	57
4.2.7. Kvantitativní MSP – MethyLight – pro gen DLC1 .....	59
4.2.8. Kazuistiky .....	61
5. DISKUSE .....	64
6. ZÁVĚR .....	70
LITERATURA .....	71
PŘÍLOHA – SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA .....	85

## SEZNAM ZKRATEK

<b>ASCT</b>	autologní transplantace
<b>CDR3</b>	complementarity determining region 3
<b>CLL</b>	chronická lymfocytární leukémie
<b>CpG</b>	cytosin - guanin dinukleotid
<b>CR</b>	kompletní remise
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>DNMT</b>	DNA metyltransferáza
<b>FACS</b>	průtoková cytometrie
<b>FCR</b>	fludarabin, cyklofosfamid a rituximab
<b>IgVH</b>	variabilní oblast těžkého imunoglobulinového řetězce
<b>MBD protein</b>	methyl-CpG-binding domain protein
<b>MBL</b>	monoklonální B lymfocytóza
<b>MRD</b>	minimální reziduální nemoc
<b>MSP</b>	metylačně specifická PCR
<b>nPR</b>	nodulární parciální remise
<b>OS</b>	doba celkového přežití
<b>PBSC</b>	periferní kmenové buňky
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PR</b>	parciální remise

# 1. ÚVOD

## 1.1. Chronická lymfocytární leukémie

### 1.1.1. Epidemiologie, etiologie

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je charakterizována progresivní kumulací funkčně nekompetentních monoklonálních B lymfocytů, které mají specifický imunofenotyp. Jedná se o nejčastější formu leukémie dospělých v Severní Americe a v západní Evropě, s incidencí 3/100 000 ročně. Naopak ve východní Asii je incidence CLL výrazně nižší ve srovnání se západním světem [1,2]. CLL postihuje častěji muže, poměr muži/ženy se pohybuje v rozmezí 1,4 (Švýcarsko) až 3,2 (Čína) [2]. CLL je velmi vzácná u mladých lidí do třiceti let, její incidence však strmě stoupá se vzrůstajícím věkem počínaje čtvrtou dekádou života.

Etiologie CLL je neznámá, žádná z dosud provedených studií nenalezla přímou souvislost mezi rizikem vzniku CLL a expozicí nějaké chemické látky, záření či předcházejícím proděláním určité nemoci. Jednotlivé práce však popisují vyšší riziko CLL u některých profesních skupin, hlavně těch, u kterých dochází k expozici elektromagnetickému poli (např. opraváři rádií a televizí, elektrikáři, pracovníci elektráren). Z profesí více ohrožených CLL možno uvést ještě krejčí, nábytkáře a tiskárenské pracovníky – chybí však ověření větším počtem studií [3]. Jinou profesní skupinou s vyšším výskytem CLL jsou pracovníci v gumárenském průmyslu a opraváři pneumatik [4]. U farmářů, alespoň v některých oblastech, je též výskyt CLL vyšší [5]. Roli může hrát používání pesticidů, zejména fenoxi-herbicidů [3,6]. Častější může být CLL u farmářů pěstujících sójové boby a chovajících dobytek [4]. Nejsou známy žádné lékové vlivy na výskyt CLL, nebyla zatím prokázána ani virová etiologie. V dalším výkladu však bude vysvětleno, že antigenní stimulace může hrát významnou úlohu v rozvoji onemocnění. U imunodeficitů, ať již vrozených, nebo navozených léčbou (např. potransplantačních), bývá vyšší riziko různých malignit včetně lymfomů, nikoli však CLL.

Jedním z nejsilnějších rizikových faktorů vzniku CLL je rodinná anamnéza s CLL či jiným lymfoproliferativním onemocněním [7-9]. Zajímavým jevem u CLL je anticipace, tedy časnější nástup onemocnění v následujících generacích, a to průměrně o patnáct až dvacet let

[10]. Doposud nebyl identifikován žádný „CLL gen“, molekulární patogeneze této choroby je prakticky neznámá.

### 1.1.2. Prognostické faktory

Chronická lymfocytární leukémie je heterogenní onemocnění – část pacientů již při stanovení diagnózy či brzy poté progreduje k symptomatické chorobě (organomegalie, anémie či B – symptomy), zatímco jiní pacienti jsou dlouhodobě asymptomatictí a jejich doba přežití je obdobná jako u jejich zdravých vrstevníků [11]. Bylo identifikováno několik klinických a biologických markerů, které mají prognostický význam. Mezi tyto faktory patří věk, stádium choroby, pohlaví, performance status, laboratorní parametry odrážející nálož nádorového postižení či aktivitu choroby (počet lymfocytů, hodnota laktátdehydrogenázy, typ infiltrace kostní dřeně, zdvojovací čas lymfocytů) [12-14], sérové parametry (rozpustný CD23,  $\beta$ 2-mikroglobulin, thymidinkináza) [15,16]. Nejsilnějšími prediktory jsou však cytogenetické aberace a mutační stav variabilního segmentu imunoglobulinového těžkého řetězce, případně jejich zastupující markery (zejména ZAP-70 a CD38) [12,17-26]. Výhodou genetických prognostických faktorů je jejich působnost již v iniciálních stádiích onemocnění.

#### *1.1.2.1. Klinické stádium*

V roce 1975 navrhli Rai a kolegové systém, který podle stupně lymfadenopatie, organomegalie a přítomnosti cytopenií rozlišuje 5 prognosticky různých klinických stádií (0 až IV – tab. 1) [27]. O několik let později Binet et al. vypracovali třístupňový systém (stádium A, B, C) založený na přítomnosti cytopenií a počtu postižených oblastí uzlin [28]. V současnosti se používají oba tyto systémy. Nicméně i pacienti z jedné skupiny mohou mít různou prognózu. Tyto systémy tak bohužel neumožňují předpovídat rychlost progresu u pacienta diagnostikovaného v raném stádiu choroby, ani pravděpodobnost léčebné odpovědi u pacienta ve vyšším stádiu nemoci [11].

**Tab. 1. Klinické stádium dle Raie [27].**

Stádium	Riziko	Charakteristika	Medián přežití (roky)
0	nízké	lymfocytóza	nad 13
I	střední	lymfocytóza+ adenopatie	8
II		lymfocytóza + splenomegalie	5
III	vysoké	lymfocytóza + hemoglobin pod 110g/l	2
IV		lymfocytóza + trombocyty pod $100 \times 10^9/l$	1

#### 1.1.2.2. Mutační stav variabilního segmentu těžkého řetězce imunoglobulinů

Geny kódující těžký imunoglobulinový řetězec se nacházejí na 14. chromosomu a skládají se z několika druhů tzv. genových segmentů. Na 5'konci jsou lokalizované segmenty pro variabilní doménu těžkého řetězce a na 3'konci se nacházejí segmenty pro konstantní část těžkého řetězce. Segmenty pro variabilní doménu jsou tvořeny třemi typy úseků, a to úseky typu V („variable“), krátkými úseky typu D („diversity“) a krátkými úseky typu J („joining“). Při diferenciaci B lymfocytů dochází k přeskupování těchto úseků, a to v přesně stanoveném pořadí. Nejprve se vybere náhodný subgen D a J, přičemž DNA ležící mezi nimi se vyštěpí. Následuje výběr jednoho (z cca 129) subgenů V a jeho spojení s již vzniklou DJ sekvencí, opět za současné delece V subgenů v oblasti mezi vybraným V subgenem a DJ geny. Růzností kombinací VDJ genů je dána individuální variabilita imunoglobulinových molekul, jež je potencována vymezením náhodných nukleotidů do D-J a V-DJ spojení. Podobné procesy probíhají při rekombinaci genových segmentů pro lehký imunoglobulinový řetězec, které se nacházejí na chromosomech 2 (kappa řetězec) a 22 (lambda řetězec). Imunoglobulinový receptor B buněk (BCR) tak sestává z určitého těžkého a určitého lehkého řetězce, jejichž V oblasti tvoří tzv. antigenní kapsu. Výběr 1 určitého těžkého a 1 lehkého řetězce dále zvyšuje diverzitu BCR, čekajících na „svůj“ antigen. Výše popsané procesy probíhají v počátečních fázích zrání lymfocytu v kostní dřeni. Druhý krok diversifikace variabilní oblasti probíhá v rámci tzv. somatické hypermutace, tj. procesu, který je zahájen až po setkání zralého B lymfocytu s antigenem na povrchu folikulárních dendritických buněk v lymfatických folikulech. Ke zvýšení afinity BCR k antigenu dochází při somatické hypermutaci, když vznikají bodové mutace ve variabilních oblastech přestavěných těžkých a lehkých řetězců za tvorby definitivního receptoru na povrchu zralých

B buněk. Po dalším styku s antigenem dochází k proliferaci B lymfocytů s příslušným BCR. Tyto buňky posléze dozrávají v buňky secernující protilátky.

Na základě kvantifikace somatických mutací variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinového (IgVH) genu exprimovaného klonem CLL buněk lze pacienty rozdělit do dvou odlišných skupin:

- a) Pacienti s nemutovanou sekvencí IgVH;
- b) Pacienti s mutovanou sekvencí IgVH.

Cut-off hodnota pro rozdělení pacientů do těchto dvou skupin byla stanovena jako 98 % homologie s nejpodobnější zárodečnou linií subgenu IgVH. Z klinického hlediska má toto rozdělení prognostický význam – pacienti s nemutovanou IgVH sekvencí vykazují agresivnější průběh choroby s rychlejší progresí, zatímco pacienti s mutovanou IgVH sekvencí progredují pomalu a přežívají déle [18,21,29]. Na základě tohoto rozdělení byla CLL považována za dvě různé choroby:

- a) CLL pocházející z naivních pregerminálních buněk (u pacientů s nemutovanou IgVH sekvencí), které se ještě nesetkaly s antigenem a
- b) CLL pocházející z postgerminálních paměťových buněk (u pacientů s mutovanou IgVH sekvencí), které se již s antigenem setkaly.

Na základě novějších poznatků se nicméně zdá, že nemutované případy nelze automaticky považovat za pocházející z naivních B buněk, a to z několika důvodů:

- mutované i nemutované případy mají stejný povrchový fenotyp, který je významně aktivován (CD23, CD25, CD69, CD71) a podobný fenotypu B buněk, jež se setkaly s antigenem (CD27) [30]
- analýza genové exprese pomocí čipu ukázala, že oba typy CLL jsou si velmi podobné a podobají se navíc tzv. paměťovým buňkám [31,32]
- nemutované případy vykazují nerovnoměrné užívání IgVH genů, např. nadužívání IgVH 1-69 [21,33-35]. Tento nepoměr nesouvisí se zúžením používaného repertoáru genů v rámci stárnutí [36], ale zdá se být daný touto chorobou, což by ukazovalo na

vliv specifických antigenů nebo antigenů podobných elementů v patogenezi také těchto případů [37]

- vlastnosti receptoru B buňky (B-cell receptor, BCR) CLL buňky připomínají vlastnosti receptorů v normálních B lymfocytech po interakci s antigenem [38,39]
- na základě studia délky telomer naivních B buněk se zjistilo, že prošly díky opakovanému styku s antigenem několika desítkami buněčných dělení – paradoxně mnohem větším počtem dělení než CLL buňky typicky postgerminálního typu s hypermutací oblasti IgVH [40-42].

Na základě těchto údajů se zdá velmi pravděpodobné, že nezávisle na mutačním stavu CLL vzniká z buněk, které se již setkaly s antigenem [37]. Domněnka, že v patogenezi CLL může hrát roli antigen nebo antigenů podobný prvek byla navíc posílena zjištěním, že nepříbuzní pacienti z různých částí světa exprimují velmi podobné BCR. Vzhledem k obrovskému množství možných kombinací genů je pravděpodobnost, že při VDJ rekombinaci probíhající v kostní dřeni u prekurzorových B lymfocytů vzniknou dvě téměř identické sekvence, velmi nízká. Přitom zhruba u 20 % pacientů byly nalezeny téměř shodné sekvence BCR [33]. Tyto „stereotypní“ sekvence byly identifikovány u mutovaných i nemutovaných případů, z čehož vyplývá, že selekce antigenem může probíhat v obou podskupinách této choroby. V některých případech vykazují pacienti se stereotypními kombinacemi V, D, J subgenů těžkých a lehkých řetězců agresivnější průběh choroby s nutností časnějšího zahájení léčby a kratší celkovou dobou přežití. To platí např. pro pacienty užívající subgen IgVH3-21 [43,44]. Navíc, některé molekuly, které modifikují BCR signalizaci, jako je např. ZAP-70 nebo CD38, mají důležitý prognostický význam [45]. Tato skutečnost též podporuje předpoklad, že BCR hraje důležitou roli v patofyziologii CLL.

### *1.1.2.3. Další prognostické faktory: ZAP-70 a CD38*

ZAP-70 je tyrosinkináza, která je zapojená do přenosu informace přes membránu T lymfocytu po navázání antigenu na jeho receptor. Tento protein je aberantně exprimován

u některých pacientů s CLL a jeho zvýšená exprese velmi často (i když ne vždy) koinciduje s přítomností dalších rizikových faktorů, jako je nemutovaná sekvence IgVH a zvýšená exprese CD38 [46,47]. Vysoká exprese ZAP-70 v CLL buňkách je spjata s agresivnější chorobou.

Povrchový antigen CD38 je molekula ovlivňující proliferaci a životnost maligních lymfocytů [48]. Vysoký podíl CD38 pozitivních CLL buněk v krvi pacientů je spojen s horší prognózou [12,18,49].

#### *1.1.2.4. Cytogenetické aberace*

Fluorescenční *in situ* hybridizací jsou u zhruba 80 % pacientů s CLL detekovány chromosomální aberace [20]. Mutované i nemutované případy mají stejné typy aberací, ale u nemutovaných je incidence vysoce rizikových mutací vyšší [50]. (Nicméně v sestavě pacientů ÚHKT a 1. interní kliniky VFN byl u 10/12 pacientů s delecí 17p nalezen mutovaný IgVH gen (nepublikováno).)

- Delece 13q14

Delece 13q14 je nejčastější strukturální aberací u pacientů s CLL, je detekována u zhruba poloviny případů [20]. Pokud se jedná o jedinou chromosomální aberaci, je považována za prognosticky příznivou [20]. Deletovaná oblast vždy zahrnuje lokus kódující dvě mikroRNA, a to miR-15a a miR-16-1 [51].

- Delece 11q22-q23

Delece 11q22-q23 představují druhou nejčastější genetickou aberaci a jsou spjata s pokročilým stádiem choroby (extenzivní lymfadenopatie), nižším věkem a rychlou progresí choroby [52-57]. Tyto delece se vyskytují častěji u pacientů s nemutovanou IgVH sekvencí a pozitivitou ZAP-70 a CD38. V deletované oblasti se nachází gen ATM, který je zapojen v reparaci poškozené DNA.

- Trisomie 12

Trisomie chromosomu 12 se nachází u 10-20 % pacientů a prognosticky znamená střední riziko. Dosud nebyly identifikovány geny zapojené v patogenezi CLL s trisomií 12.

- Delece 17p13

Delece krátkého raménka chromosomu 17 se nachází jen u malého procenta pacientů v době stanovení diagnózy a mezi všemi genetickými lézemi představuje největší riziko pro postiženého pacienta [20]. V deletované oblasti se nachází tumor-supresorový gen TP53. Většina pacientů s monoalelickou delecí 17p má mutaci TP53 v druhé alele, zatímco mutace TP53 u pacientů bez delece 17p jsou daleko vzácnější [58,59].

### 1.1.3. Monoklonální B lymfocytóza

Klonální populace B buněk s CLL imunofenotypem byly detekovány u zhruba 3,5 % zdravých jedinců, kteří měli normální nebo mírně zvýšený počet lymfocytů (= monoklonální B lymfocytóza, MBL) [60]. Výskyt takovýchto klonů stoupá s věkem (8 % lidí starších 70 let) [60]. Při užití citlivější mnohobarevné průtokové cytometrie byla MBL detekována dokonce u 12 % zdravých jedinců starších 40 let [61]. Ve většině případů mají tyto klony podobné CLL buňkám mutované IgVH sekvence [50], což implikuje, že MBL s nemutovanými IgVH geny rychleji progreduje do CLL. Buňky s imunofenotypem CLL se vyskytují s vyšší frekvencí u příbuzných pacientů s CLL, což naznačuje společnou genetickou predispozici pro tuto klonální expanzi [62]. Navíc, MBL předchází prakticky všechny případy CLL [63]. MBL klony mají často genetické aberace typické pro CLL, jako je např. delece 13q14 [64]. Z toho vyplývá, že MBL není jen vzrůstajícím věkem daná expanze normálních B lymfocytů, ale že klonální buňky již získaly iniciální genetická poškození, která jsou charakteristickým znakem pro premaligní prekurzorovou buňku. Navíc se u jedinců s MBL vyskytují IgVH geny typické pro CLL [63,64].

#### 1.1.4. Léčba CLL

Až donedávna byli symptomatictí CLL pacienti léčeni alkylačními látkami (zejm. chlorambucilem), nicméně jen malé procento takto léčených pacientů dosáhlo kompletní remise. Po zavedení nových léčebných schémat, konkrétně kombinací obsahujících purinová analoga (hlavně fludarabin) a monoklonální protilátky (především rituximab) se výrazně zvýšil podíl pacientů, u nichž léčba navodila kompletní remisi, a to z cca 5 % až na 70 % [65,66]. Volba léčebného režimu závisí na stavu pacienta a jeho prognóze. V současnosti jsou k první linii léčby u dříve neléčených CLL pacientů velmi často používány imunochemoterapeutické kombinace fludarabin, rituximab (FR), fludarabin, cyklofosfamid, rituximab (FCR), fludarabin, cyklofosfamid, mitoxantron, rituximab (FCM-R). Některé z těchto režimů jsou podávány i pacientům v dalších liniích léčby; pacientům v relapsu, rezistentním na fludarabin či jako konsolidační terapie je často aplikována monoklonální protilátka alemtuzumab. Alogenní transplantace je jediným známým kurativním prostředkem pro pacienty s CLL, nicméně ji může podstoupit jen omezený počet pacientů. Důvodem je relativně indolentní charakter onemocnění u velkého procenta pacientů, vysoký věk nemocných apod. [67]. Autologní transplantace pro vysokou míru relapsů u případů s nemutovanými IgVH geny [68] se již přestává užívat.

#### 1.1.5. Detekce minimální reziduální choroby

Minimální reziduální chorobu (minimal residual disease - MRD) lze definovat jako malý počet maligních buněk přítomných v organismu během léčby nebo po ní, kdy je pacient podle konvenčních kritérií v remisi onemocnění. Hranice MRD negativity u CLL byla skupinou laboratoří European Research Initiative on CLL stanovena konsensuálně jako méně než jedna CLL buňka v 10 000 buňkách/ $\mu$ l krve, jelikož toto je hladina spolehlivě detekovatelná nejcitlivějšími moderními metodami. U ostatních hematologických malignit je hladina MRD důležitým faktorem, který je zohledňován při rozhodování o dalších terapeutických intervencích nebo je považován za silného prediktora celkové doby přežití či doby přežití bez relapsu [69,70]. U CLL je koncept eradikace MRD relativně nový, jelikož konvenční terapie alkylačními látkami byla poměrně neefektivní a i pacienti odpovídající na léčbu měli po jejím skončení výrazné množství nádorových buněk. S příchodem nových

terapeutických možností, jako jsou purinová analoga či monoklonální protilátky, se však eradikace MRD stala aktuální i u této diagnózy.

#### *1.1.5.1. Metody detekce MRD*

K detekci MRD u CLL se v současnosti používají dvě techniky, a to polymerázová řetězová reakce (PCR) a průtoková cytometrie.

PCR identifikuje CLL buňky na základě jejich přestavby genu pro těžký imunoglobulinový řetězec. Přeskupenou variabilní oblast těžkého imunoglobulinového genu lze podle stupně variability rozdělit do sedmi specifických oblastí: na tři vysoce variabilní CDR1, CDR2 a CDR3 (complementarity determining region), které jsou vmezeřeny mezi čtyři méně variabilní FR1, FR2, FR3 a FR4 (framework region). CDR3 oblast vykazuje nejvyšší stupeň variability, je unikátní pro každé VDJ přeskupení a identifikuje normální B buňku, nebo u CLL její nahromaděný maligní klon.

K detekci MRD se využívají v zásadě dvě PCR strategie: PCR s tzv. „consensus“ primery a alelově specifická PCR (ASO-PCR). Principem PCR s „consensus“ primery je amplifikace CDR3 oblasti s použitím standardního setu universálních oligonukleotidových primerů: primer rozeznávající konzervovanou sekvenci v J oblasti a primer přisedající k jedné „framework region“ [71,72]. „Consensus“ PCR je kvalitativní metoda s variabilní citlivostí, je schopna detekovat 1 CLL buňku v  $10^2 - 10^4$  normálních buněk [73,74].

ASO-PCR vyžaduje navržení primerů specifických pro konkrétního pacienta, resp. pro klon jeho maligních buněk. Tento přístup výrazně zvyšuje citlivost detekce. ASO-PCR je v současnosti nejcitlivější metodou pro detekci MRD u CLL, s udávanou citlivostí 1 CLL buňka v  $10^6$  leukocytů [75]. Pro ASO-PCR je v současnosti používána technika real-time PCR [76].

V roce 2001 popsali Rawstron et al. mnohobarevnou průtokovou cytometrickou techniku schopnou odlišit maligní CLL buňky od normálních buněk na základě jejich exprese CD19/CD5/CD20/CD79b [77]. Výhodou této metody je její vysoká citlivost (1 CLL buňka v  $10^4 - 10^5$  leukocytů) a rychlost. Posléze byly popsány i další kombinace protilátek. Na základě analýzy různých kombinací protilátek a jejich srovnání s ASO-PCR u 728 párových vzorků kostní dřeně a periferní krve navrhla European Research Initiative on CLL (ERIC)

v roce 2007 doporučení týkající se efektivního monitoringu MRD u pacientů s CLL pomocí průtokové cytometrie, přičemž kombinaci protilátek CD5/CD19 s CD20/CD38, CD81/CD22 a CD79b/CD43 vyhodnotila jako nejlepší panel pro detekci MRD s nízkou interlaboratorní variabilitou, nízkým počtem falešných detekcí a s přesností 95,7 % [78].

## **1.2. Metylace DNA**

### 1.2.1. Epigenetické změny chromatinu

Pojem „epigenetický“ se vztahuje k dědičné změně profilu genové exprese, která je zprostředkována mechanismy jinými, než jsou změny v primární nukleotidové sekvenci [79].

Mezi základní epigenetické mechanismy patří:

- Posttranslační modifikace histonů – např. acetylace, fosforylace, metylace. Acetylace lysinových zbytků histonů způsobí ztrátu pozitivního náboje s následným oslabením vazby DNA-histon a DNA pak může zaujmout konformaci, v níž je přístupná transkripčním faktorům. Naopak, po deacetylaci lysinových zbytků je chromatin kompaktní a transkripce je inhibována [80].
- MikroRNA. Tyto nekódující malé molekuly RNA, 19-25 nukleotidů dlouhé, zajišťují posttranskripční negativní kontrolu genové exprese svých cílových genů. MikroRNA se vážou k 3' nepřekládané oblasti svých cílových mRNA a inhibují jejich translaci, případně urychlují deadenylaci mRNA, a tím jejich časnější degradaci [81].
- Methylace DNA.

### 1.2.2. Methylace DNA

Methylace cytosinu je jediná známá endogenní modifikace DNA u savců a spočívá v adici metylové skupiny na 5'uhlík cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu (5mC) [82]. Většina 5mC v savčí DNA je přítomna v rámci CpG dinukleotidů [83].

CpG dinukleotidy jsou v genomu rozmístěny nerovnoměrně, v 98 % genomu se nacházejí zhruba jednou za 80 nukleotidů, zatímco v rámci tzv. CpG ostrůvků jsou přítomny s až pětkrát vyšší frekvencí. CpG ostrůvky, které tvoří 1-2 % genomu, jsou sekvence dlouhé 0,4-5 kb a nalézají se zejména v promotorech či v jejich okolí, případně v prvních exonech genů [84]. Odhaduje se, že v genomu je zhruba 45 000 CpG ostrůvků a že cca 50-60 % genů obsahuje ve svých promotorech CpG ostrůvky [85]. CpG dinukleotidy rozptýlené v genomu jsou většinou metylovány, zatímco CpG v CpG ostrůvcích jsou převážně nemetylovány, vyjma imprintovaných genů a genů na inaktivním chromosomu X [86,87].

DNA metylace je důležitý proces v savčí embryogenezi, metylační profily jsou ustanoveny v definovaných fázích vývoje. Obecně jsou ženské pohlavní buňky méně metylovány než mužské, nicméně ve fázi blastocysty dochází k iniciální celkové demethylaci genomu [88,89]. Po implantaci dochází k *de novo* metylaci [88,89]. U dospělého člověka je množství a profil metylace specifický pro jednotlivé typy buněk a tkání, přičemž v rámci stárnutí organismu se metylační profily promotorů některých genů mění [90].

V savčích buňkách byly doposud identifikovány tři typy metyltransferáz, a to DNMT1, DNMT3A a DNMT3B [91,92]. Všechny tři metyltransferázy zajišťují metylaci DNA *de novo* a udržují ji.

### 1.2.3. Význam metylace DNA

Methylace DNA v regulačních oblastech genů (promotory, enhancery, represory) je důležitý mechanismus pro stálé a dědičné umlčení genové transkripce, uplatňuje se zejména v rámci imprintingu, při inaktivaci chromosomu X u žen a jako ochrana proti parazitickým sekvencím [93,94].

V průběhu embryogeneze dochází u žen k inaktivaci jednoho X chromosomu, zřejmě v důsledku kompenzace dávky. CpG ostrůvky v promotorech většiny genů na inaktivním chromosomu X jsou metylovány a transkripčně neaktivní.

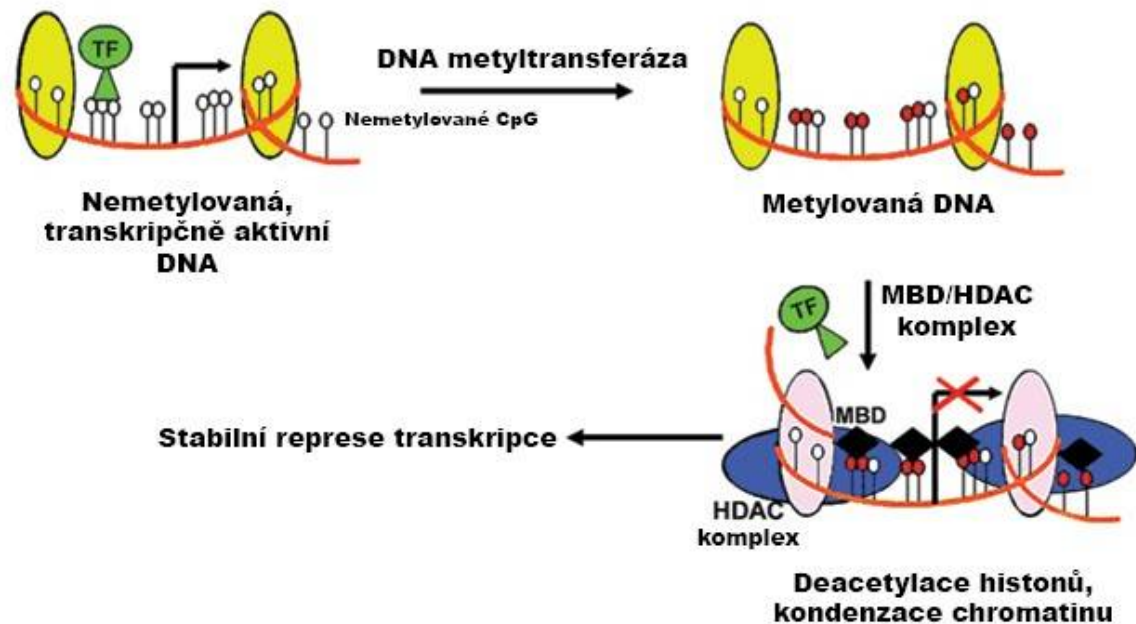
Methylace je také důležitá pro expresi imprintovaných genů. Většina genů je exprimována z paternální i maternální alely, nicméně u několika „imprintovaných“ genů dochází ke specifické expresi pouze z maternální, nebo paternální alely [95].

Metylace je zřejmě také možným mechanismem obrany genomu proti mobilním genetickým elementům. CpG dinukleotidy nacházející se mimo CpG ostrůvky jsou většinou metylovány a mnoho z nich se nachází uvnitř repetitivních DNA sekvencí nebo retrotranspozonů, jako jsou endogenní retroviry, L1 a Alu sekvence [96,97]. Jelikož tyto repetitivní sekvence zaujímají skoro 40 % lidského genomu, předpokládá se, že DNA metylace se vyvinula jako obranný systém genomu k potlačení těchto sekvencí a k zabránění jejich rozšíření v genomu [97]. Mobilita retrotranspozonů závisí na expresi genů, které kódují. Transkripce těchto genů je potlačena metylací promotorů retrotranspozonů. Aktivní retrotranspozony totiž představují vážnou hrozbu pro genom, jelikož se mohou integrovat do genů, a tak je narušit [97].

#### 1.2.4. Represe transkripce metylací DNA

Existuje několik mechanismů, jak metylace DNA může bránit transkripci:

1. Metylace DNA stericky brání vazbě aktivačních transkripčních faktorů na promotory genů [98,99].
2. K metylované DNA se váží tzv. metyl-CpG oblast vázající (MBD) proteiny, které následně brání vazbě transkripčních faktorů. K některým MBD proteinům se navíc ještě vážou transkripční korepresory, např. histondeacetylázy [100-102] (obr. 1).



**Obr. 1. Potlačení genové exprese v důsledku DNA metylace.** DNA metyltransferázy zajišťují metylaci CpG dinukleotidů, což vede k umlčení genové exprese vazbou proteinů vázajících metylované oblasti (MBD proteiny) a histondeacetyláz (HDAC) k metylované DNA. Následně dochází k deacetylaci histonů, kondenzaci chromatinu, transkripční faktory se nemohou vázat k promotoru a transkripce je reprimována [103].

### 1.2.5. Aberantní metylace DNA

Aberantní metylace DNA je spjata s celou řadou onemocnění. Mutace v genu, který kóduje metyltransferázu DNMT3B, jsou nalézány u pacientů s ICF (Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies) syndromem [104-106], mutace v genu pro MeCP2 (jeden z MBD proteinů) zase u pacientů s Rettovým syndromem [107-110], poruchy v imprintingu jsou jednou z příčin Beckwith-Wiedemannova syndromu, Angelmanova či Prader-Williho syndromu [111]. Aberantní metylace může hrát zřejmě roli i v komplexních chorobách s nemendelovskou dědičností jako je schizofrenie či afektivní poruchy [112,113].

Aberantní metylace DNA byla nalezena i v maligních buňkách různých typů nádorů. V nádorových buňkách dochází k následujícím změnám metylačního profilu:

1. Globální hypometylace genomu (ztráta metylace na běžně metylovaných sekvencích).
2. Lokalizovaná hypermetylace běžně nemetylovaných CpG ostrůvků [94,114].

Obě tyto anomálie mohou být nalezeny v jednom tumoru, nicméně celkově dochází většinou ke snížení míry metylace.

#### *1.2.5.1. Hypometylace*

Maligní buňky mohou mít o 20-60 % méně 5mC než jejich zdravé protějšky [115,116]. DNA hypometylace byla detekována skoro v každém typu malignity. Ke ztrátě metylace dochází většinou v repetitivních elementech lokalizovaných v satelitních sekvencích nebo centromerických oblastech, které jsou normálně metylovány. V některých typech nádorů (např. nádorech prsu, ovariálních, cervikálních a mozkových nádorech) hypometylace stoupá progresivně se vzrůstající agresivitou nádoru [111,116].

Ztráta metylace může přispět k onkogenezi několika způsoby:

- Hypometylace může oslabit transkripční represi těch oblastí genomu, které jsou za normálních okolností umlčeny. To v důsledku může vést k abnormální expresi imprintovaných genů a genů na inaktivním chromosomu X, ale i ke zhoubné aktivaci původně reprimovaných transpozonů [93,96].
- Hypometylace může ovlivnit stabilitu chromosomů - DNA metylace pericentromerických oblastí je totiž důležitá pro stabilitu a správnou replikaci DNA [117]. Ve zdravých somatických buňkách jsou heterochromatinové pericentromerické oblasti chromosomů 1 a 16 silně metylovány. V prsních adenokarcinomech, ovariálních epiteliálních tumorech a sporadických Wilmsových tumorech jsou tyto oblasti významně hypometylovány a často nestabilní [118,119].

#### *1.2.5.2. Hypermetylace*

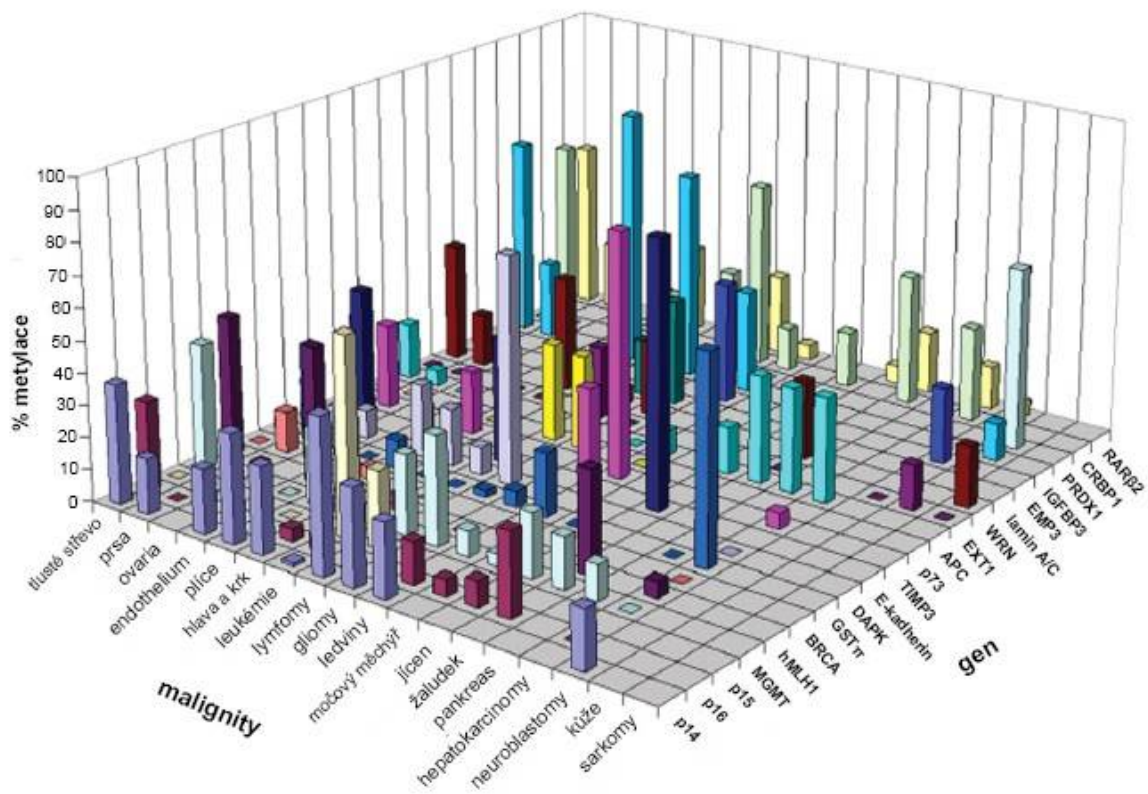
Hypermetylace CpG ostrůvků promotorových oblastí genů je spojená s aberantním umlčením transkripce a je jedním z mechanismů inaktivace tumor-supresorových genů. Hypermetylace těchto promotorových CpG ostrůvků může inaktivovat obě alely tumor-

supresorového genu, nebo inaktivuje jednu alelu, zatímco exprese druhé alely je potlačena mutací či delecí. Počet tumor supresorových genů inaktivovaných epigeneticky je stejný nebo dokonce větší než počet genů inaktivovaných mutacemi [94,114,120-122].

#### 1.2.6. Hypermetylom nádorové buňky

Profil metylace CpG tumor-supresorových genů je vesměs tumor-specifický, i když některé geny jsou metylovány v různých typech nádorů [123,124]. Tumor-specifický způsob metylace promotorů byl detekován nejen u sporadických, ale i u dědičných nádorových syndromů [125]. Počet metylovaných tumor-supresorových genů je rozdílný v závislosti na typu nádoru – např. mezi nejvíce metylované patří nádory gastrointestinálního traktu, zatímco výrazně méně metylovaných genů bylo popsáno u ovariálních nádorů a sarkomů [126]. Je otázka, zda je to proto, že metylované geny těchto nádorů zatím nebyly popsány, nebo proto, že k hypermetylacii dochází v první řadě u tkání více exponovaných zevním karcinogenům [126]. Profil metylace u různých nádorů ukazuje obr. 2.

Metylovány jsou tumor-supresorové geny účastníci se různých buněčných dějů – jde o geny působící v rámci buněčného cyklu, apoptosy, oprav poškozené DNA, metabolismu karcinogenů, buněčné adherence...(tab. 2).



Obr. 2 Profil metylace tumor-supresorových genů v různých typech nádorů [126].

**Tab. 2 Buněčné dráhy narušené metylací tumor-supresorových genů [126].**

Buněčné dráhy	Vybrané hypermetylované geny
Oprava DNA	hMLH1, MGMT, WRN, BRCA1
Hormonální odpověď	Estrogen, progesteron, androgen, receptory prolaktinu a thyreotropinu
Metabolismus vitamínů	CRBP1, RAR $\beta$ 2
Ras- signalizace	RASSF1A, NORE1A
Buněčný cyklus	p16INK4a, p15INK4b, Rb
P53	p14ARF, p73, HIC-1
Buněčná adherence a invaze	E-kadherin, H-kadherin, FAT kadherin, EXT-1, SLIT2, EMP3
Apoptosa	TMS1, DAPK1, WIF-1, SFRP1
Wnt-signalizace	APC, DKK-1, IGFBP-3
Tyrosin- kinázové kaskády	SOCS-1, SOCS-3, SYK
Transkripční faktory	GATA-4, GATA-5, ID4
Homeobox geny	PAX6, HOXA9
Další dráhy	GST $\pi$ , LKB1/STK11, THBS-14, COX-2, SRBC, RIZ1, TPEF/HPP1, SLC5A8, Lamin A/C
MikroRNA	miR-127, miR-124a

### 1.2.7. Metylace v hematologii

Metylační profil hematologických malignit je jiný než profil solidních nádorů, nicméně celé spektrum buněčných drah může být narušeno [127,128]. Nejčastěji metylovanými geny u ne Hodgkinových lymfomů jsou DAPK1 (death associated protein kinase 1), p57, p16, MGMT (methylguanosinmethyltransferáza), GST $\pi$  (glutathion S transferáza), RAR $\beta$ 2 (retinoic acid receptor beta 2), CRBP1 (cellular retinol binding protein 1) [127,129-132]. U pacientů s mnohočetným myelomem byla detekována nejčastěji metylace

p16, SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling 1), E-kadherinu, p73 a DAPK1 [133-139]. Geny p15 a ABL jsou velmi často metylovány u chronické myeloidní leukémie [140,141], zatímco u dalších myeloproliferací (myelofibróza, polycythemia vera, trombocytémie) je to zejména SOCS-1 [142]. U pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií dochází často k metylaci promotorů genů pro p15, E-kadherinu, p73, DAPK-1 a MGMT [143,144], u pacientů s akutní myeloidní leukémií jsou metylovány geny pro SOCS-1, p15, E-kadherin, p73, DAPK1, RARβ2, HIC-1 (hypermethylated in cancer 1) a CRBP1 [145-149].

#### 1.2.8. Metylace u chronické lymfocytární leukémie

Stejně jako u jiných typů malignit byla i u pacientů s CLL popsána aberantní metylace DNA. V roce 1992 zjistili Wahlfors et al pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, že u pacientů s CLL dochází k hypometylaci genomu [150]. Tato informace byla později potvrzena dalšími studii, v níž autoři pomocí imunoznačení a monoklonálních anti-5mC protilátek zjistili, že v lymfocytech CLL pacientů dochází k významné demetylaci euchromatinu i heterochromatinu [151]. Výrazná demetylace euchromatinu naznačuje, že ztráta fyziologické metylace DNA postihuje nejen nekódující oblasti, nýbrž i oblasti aktivně se účastnící transkripce [152]. CLL buňky exprimují ve srovnání se zdravými B lymfocyty 1,2- až 25-násobně vyšší hladinu antiapoptotického proteinu Bcl-2, což částečně vysvětluje jejich rezistenci k apoptose. Bylo zjištěno, že tato zvýšená exprese Bcl-2 je následkem hypometylace promotoru [153]. Kromě Bcl-2 jsou u CLL demetylovány promotory i dalších genů, jako je MDR1 (multidrug resistance) a TCL1 [154,155]. Postupné zvýšení exprese genu odpovědného za rezistenci na léčbu cytostatiky může částečně vysvětlovat, proč pacienti s CLL často dobře odpovídají na iniciační léčbu, ale po čase se stávají k chemoterapii rezistentní [152]. TCL1 je součástí PI3-kináza-dependenční AKT dráhy, v níž interaguje s AKT kinázou a podporuje její translokaci do jádra [156]. Význam TCL1 v B lymfocytech nicméně zatím není zcela jasný. Transgenní myši, u nichž B lymfocyty nadměrně exprimují TCL1, onemocní chorobou podobnou CLL. Fakt, že v CLL buňkách dochází v důsledku hypometylace ke zvýšené expresi TCL1, podporuje teorii, že epigenetické modifikace mohou hrát v rozvoji CLL důležitou roli [157].

Kromě hypometylace byla u CLL pacientů pozorována i hypermetylace promotorů některých genů. V roce 2004 analyzovala Rushová et al. pomocí tzv. restriction landmark genomic scanning (RLGS) metody více než 3000 CpG ostrůvků u pacientů s CLL, z nichž průměrně 4,8 % bylo aberantně metylovaných. Kromě toho identifikovala 193 aberantně metylovaných sekvencí, z nichž 93 % mělo charakter CpG ostrůvků a 90 % bylo homologních s geny nebo exprimovanými sekvencemi [158]. Mezi aberantně metylovanými geny byla řada transkripčních faktorů (např. TWIST2, FOXE1), genů zapojených v signalizačních drahách (PAK7, IRAK3), apoptose (GRM7, TWIST2), metabolismu léků (CYP1B1, SULT4A1), mezibuněčné adhezi (CDH4) a regulaci mikroRNA (DGCR8) [158]. Globální metylační profil pacientů s CLL analyzovala i další studie. Využitím tzv. high resolution methylation microarrays bylo zjištěno, že prognosticky příznivá skupina CLL pacientů (s mutovaným IgVH genem) má částečně jiný profil metylovaných genů než skupina prognosticky nepříznivá (s nemutovaným IgVH genem). U pacientů s nemutovaným IgVH genem bylo identifikováno 7 metylovaných tumor-supresorových genů a 8 nemetylovaných genů, které se účastní buněčné proliferace a nádorové progresi (např. ADORA3 a PRF1). Naopak u pacientů s mutovaným IgVH genem byly promotory těchto proliferaci podporujících genů metylovány [159]. Dalším genem metylovaným zejména u pacientů s mutovaným IgVH genem je TWIST2, který reguluje p19arf/MDM2/p53 dráhu a má antiapoptotickou aktivitu [160]. U pacientů s Richterovým syndromem, což je transformace CLL do agresivnějšího difúzního velkobuněčného lymfomu, která z neznámých důvodů postihuje 5-10 % pacientů, byla detekována aberantní metylace genu pro reparaci DNA hMLH1 a mikrosatelitová nestabilita [161]. Dalším často metylovaným genem u CLL je E-kadherin [162]. E-kadherin se účastní mezibuněčné adheze a jeho snížená exprese podporuje maligní transformaci [152].

Příčiny chybné funkce metyltransferáz u CLL (ani u jiných neoplázií) nejsou známy. Expres DNMT1 a DNMT3A je v CLL buňkách stejná jako v lymfocytech zdravých jedinců, zatímco exprese DNMT3B je snižena a koreluje se vzrůstající závažností choroby [163]. Na druhou stranu byl pozorován mnohonásobný nárůst exprese histonmethyltransferáz a MBD proteinů, který rovněž koreloval se závažností tohoto onemocnění.

Rovněž není jasné, proč jsou některé sekvence preferenčně metylovány ve srovnání s jinými. Sekvenční specifita metyltransferáz zatím nebyla zjištěna. Jedním z možných důvodů specifické metylace DNA může být aktivace onkogenů, které zacílí DNMT k určitému promotoru. Příkladem je onkogenní fúzní protein PML-RAR $\alpha$  u akutní

promyelocytární leukémie. Tento aberantní protein s transkripční aktivitou nasměřuje DNMT1 a DNMT3a k promotorům cílových genů kyseliny retinové [164].

### 1.2.9. Potenciálně zajímavé geny u pacientů s CLL

#### DLC1

Deleted in liver cancer 1 (DLC1) byl původně identifikován jako potenciální tumor - supresorový gen často deletovaný u hepatocelulárního karcinomu [165]. DLC1 je exprimován v různých tkáních včetně mozku, srdce, ledvin, jater, plic, kůže, sleziny a varlat [166]. Exprese DLC1 je více či méně snížena u různých typů nádorů, včetně nádorů jater, prsu, plic, mozku, žaludku, střev a prostaty, a to v důsledku delece či aberantní DNA metylace [165,167-177]. Obnovená exprese DLC1 v nádorových buněčných liniích jater, prsu a plic inhibuje růst nádorových buněk, což je v souladu s předpokládanou tumor-supresorovou aktivitou tohoto genu [177-181]. DLC1 má různé regulační funkce, jako je regulace aktinového cytoskeletonu či buněčného tvaru [182], navíc je zřejmě zapojen v insulinové signalizaci [183].

#### SHP1

SHP1 gen je lokalizován na 12. chromosomu a kóduje nonreceptorovou tyrosin-fosfatázu [184]. SHP1 je primárně exprimován specificky v hematopoetických buňkách [185]. SHP1 asociuje s mnoha signálními molekulami, včetně ZAP-70 [186], CD3 $\epsilon$  [187,188], CD5 [188] a IL-2R [189] v T buňkách, s CD22 [190], BCR [191], SLP76 [192,193] a CD72 [194,195] v B buňkách a s „killer cell inhibitory“ receptorem [196] v NK buňkách. Tyto interakce mají následně inhibiční efekt na příslušné signalizační kaskády [197]. Je tedy pravděpodobné, že dysfunkce SHP1 v lymfocytech je spojena se vznikem lymfomů, leukémií a dalších příbuzných chorob [198]. Exprese SHP1 byla snížena či úplně absentovala ve většině zkoumaných nádorových liniích a tkáních [185,199-203]. A naopak, růst maligních buněk byl potlačen po vnesení SHP1 genu do příslušné nádorové linie [204,205]. Tato fakta potvrzují hypotézu, že SHP1 má tumor-supresorovou funkci.

p16 a p15

p15 a p16 jsou dva úzce spjaté tumor-supresorové geny lokalizované na 9p21 [206,207]. Tyto proteiny soutěží s cyklinem D o vazbu k cyklin-dependentním kinázám 4 a 6 s následným zastavením buněčného cyklu v G<sub>1</sub>S- kontrolním bodě [208]. p16 bývá často homozygotně deletován v různých solidních nádorech, zatímco intragenní mutace jsou vzácné [209]. p15 bývá často homozygotně deletován společně s homozygotní delecí p16.

## Lamin A/C

Laminy jsou proteiny zajišťující strukturální podporu pro jadernou membránu pomocí sítě filament, které jsou připojeny k její vnitřní vrstvě a tvoří tzv. laminu [210]. Laminy lze rozdělit do dvou skupin, a to A typ (exprimovaný ve většině diferencovaných somatických buněk) a typ B (exprimovaný prakticky ve všech buňkách a je nezbytný pro jejich životaschopnost) [211]. Lamin A/C kóduje dva laminy typu A, a to A a C, což jsou izoformy vzniklé alternativním RNA sestřihem. Laminy typu A hrají důležitou roli nejen v udržování stability laminy, ale zřejmě mají významnou úlohu i při regulaci transkripce [211]. Mutace v laminu A/C způsobují různá dědičná onemocnění, jako je Emeryho-Dreyfusova muskulární dystrofie, familiární parciální lipodystrofie Dunniganova typu, Hutchinsonova-Gilfordova progerie a atypické Wernerovy syndromy [212]. Navíc, exprese laminů typu A je redukována nebo chybí v některých buňkách s nízkým stupněm diferenciace a/nebo ve vysoce proliferujících buňkách [213,214], včetně buněk maligních [211], zejména leukemických a lymfomových [215,216].

### 1.2.10. Využití metylace DNA v nádorové diagnostice

Aberantní DNA metylace může být využita dvěma způsoby:

- 1) Pokud je aberantní metylace DNA specificky přítomna pouze v nádorových buňkách, pak může být využita k detekci nádorových buněk v bioptovaných vzorcích či jako v plazmě volná cirkulující DNA pocházející z nádorových buněk.
- 2) Pokud je aberantní metylace DNA určitých CpG ostrůvků spjata s fenotypem choroby, jako je prognóza, léčebná odpověď nebo výskyt nežádoucích účinků, může být použita jako marker predikce fenotypu [217].

### *1.2.10.1. DNA metylace jako marker nádorových buněk*

K analýze lze využít různé zdroje DNA: moč, plasmu, nádorovou tkáň, sliny, bronchoalveolární laváž, stolici, sputum... Např. metylace p16, MGMT, RAR $\beta$ 2, DAPK1, hMLH1, E-kadherinu, APC a RASSF1A byla analyzována ve sputu a bronchoalveolární laváži k detekci plicních nádorů [218-227], metylace GST $\pi$  byla analyzována v moči a ejakulátu k detekci karcinomu prostaty [228-230], metylace cyklinu D2, RAR $\beta$ 2, TWIST, GST $\pi$ , p16, p14, RASSF1A a DAPK1 byla analyzována v aspirátech z prsu k detekci karcinomu prsu [231,232], metylace SFRP2 byla analyzována ve stolici k detekci kolorektálního karcinomu [233], metylace p16, DAPK1 a MGMT byla analyzována ve slinách k detekci nádorů hlavy a krku [234].

### *1.2.10.2. DNA metylace jako marker klinické odpovědi*

Nejnámějšími metylačními markery klinické odpovědi na léčbu jsou metylace MGMT a hMLH1 genů [235]. MGMT je metyltransferáza účastnící se opravy O<sup>6</sup>-metylguaninu. Ztráta exprese tohoto genu v raných fázích neoplastické transformace brání buňkám v obraně proti karcinogenním DNA alkylačním látkám, ačkoli metylace MGMT u karcinomů určuje reakci nádorových buněk na alkylační činidla. Methylace MGMT je užitečným prediktorem léčebné odpovědi na alkylátory u pacientů s gliomy s delším přežitím a nižším rizikem rekurence [236].

Ztráta tzv. „mismatch repair“ hypermetylací promotoru hMLH1 se často vyskytuje u velkého počtu nádorů a je spjata s rezistencí k celé řadě klinicky důležitých cytostatik. Demethylace tohoto genu je spjata s citlivostí k cisplatině [237].

### *1.2.10.3. DNA metylace jako prognostický faktor*

Methylace E-kadherinu bývá spojena s časnou rekurencí choroby u žaludečních tumorů [238], a spolu s metylací H-kadherinu predikuje riziko relapsu u pacientek s cervikálním

karcinomem [239]. Negativní prognostický význam má současná metylace genu APC a E-kadherinu v séru pacientů s nádory žaludku [240]. Negativní prognostický význam měla také aberantní metylace laminin-5 genů, a to u pacientů s nádory prostaty [241] a močového měchýře [242].

Methylace p16 a/nebo p15 je markerem špatné prognózy u pacientů s akutní promyelocytární leukémií [243]. Hypermethylace kalcitoninu byla spojena se zvýšeným rizikem relapsu [244] a hypermethylace p21 přinášela pacientům s akutní lymfoblastickou leukémií horší prognózu [245].

### 1.2.11. Detekce DNA metylace

Existuje celá řada kvalitativních i kvantitativních metod k analýze metylace celého genomu i jednotlivých genů. Celogenomové techniky DNA analýzy ovšem vyžadují velké množství DNA, takže jejich využití k analýze biomarkerů není výhodné, nicméně tyto techniky byly s úspěchem využity k odhalení nových tumor-supresorových genů a k monitoraci globálních změn v metylaci DNA v různých patologických procesech [123,246-248].

Nejčastěji užívanými metodami k detekci metylace v jednotlivých genech jsou metylačně specifická polymerázová řetězová reakce (MSP), bisulfitové sekvenování, metylačně specifická jednonukleotidová extenze primerů (MS-SNuPE), polymerázová řetězová reakce (PCR) s využitím metyl-senzitivních restričních endonukleáz a kombinovaná bisulfitová restriční analýza (COBRA) [249-253].

Prvním krokem mnoha DNA metylačních technik je bisulfitová reakce. Různé DNA metylační analýzy totiž zahrnují jeden či více PCR kroků, avšak při klasické PCR nelze zachytit v PCR produktu metylové skupiny přítomné na DNA templátu. Řešením je právě bisulfitová reakce, při níž za vhodných podmínek hydrogensířičitan sodný indukuje deaminaci cytosinu na uracil, zatímco 5mC zůstává nezměněn. Výsledkem reakce je DNA, v níž jsou zachovány pouze metylované cytosiny, zatímco nemetylované jsou přeměněny na uracil. Během PCR je pak za každý uracil přítomný v templátu ošetřeném hydrogensířičitanem sodným inkorporován thymin a za každý 5mC je inkorporován cytosin. Výstupem bisulfitové

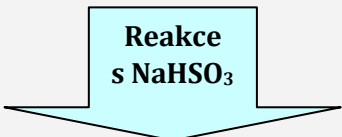
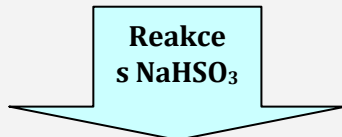


reakce následované PCR je identifikace 5mC v templátu na základě přítomnosti nebo absence cytosinových zbytků v PCR produktu [254].

Metylačně specifická PCR je rychlá, vysoce citlivá, poměrně jednoduchá, levná a široce využívaná metoda k analýze DNA metylace. MSP vyžaduje dva páry primerů, které jsou navrženy k rozlišení metylované a nemetylované sekvence (obr. 3). MSP je schopna identifikovat s vysokou citlivostí malá množství metylovaných alel v klinických vzorcích, jako je plasma, sérum, krevní buňky, lymfatické uzliny, biopsie a tkáně zalité v parafínu [255-257].

MSP má svou kvantitativní variantu, tzv. MethyLight [258]. Jedná se o PCR v reálném čase využívající metylačně specifické primery v kombinaci s metylačně specifickými sondami [258-262] (obr. 4).

## Princip PCR s metylačně specifickými primery

<b>1.</b>	<b>1. možnost:</b> DNA <b>N</b> emetylována	<b>2. možnost:</b> DNA <b>M</b> etylována
-----------	--	--

<b>Modifikace DNA reakcí s NaHSO<sub>3</sub></b>  (Sledovaná sekvence: 5'..GCGATACTCGCATCG.. 3')	5'...GCGATACTCGCATCG...3'  <div style="text-align: center;">  <p><b>Reakce s NaHSO<sub>3</sub></b></p> </div> 5'...GUGATAUTUGUATUG...3'	5'...GC <sup>m</sup> GATACTC <sup>m</sup> GCATC <sup>m</sup> G... 3'  <div style="text-align: center;">  <p><b>Reakce s NaHSO<sub>3</sub></b></p> </div> 5'...GC <sup>m</sup> GATAUTC <sup>m</sup> GUATC <sup>m</sup> G... 3'
<b>2. PCR s metylačně specifickými primery</b>	<b>Zkumavka A</b>  Bisulfitem modifikovaná DNA + "N" primery  (nasedají k nemetylované DNA sekvenci)	<b>Zkumavka B</b>  Bisulfitem modifikovaná DNA + "M" primery  (nasedají k metylované DNA sekvenci)
<b>3. Elektroforéza</b>  (polyakrylamidový gel obarvený ethidium bromidem)	<b>1. možnost: DNA Nemetylována</b> Primer "N" Primer "M"  Jamky   PCR produkty	<b>2. možnost: DNA Metylována</b> Primer "N" Primer "M"  Jamky   PCR produkty

### Obr. 3 Princip MSP.

#### 1.krok – Modifikace DNA reakcí s NaHSO<sub>3</sub>

Při reakci dochází ke konverzi nemetylovaných cytosinů na uracil, zatímco metylovaný cytosin zůstává cytosinem. Sekvence DNA se tedy změní v závislosti na původním metylačním statutu DNA.

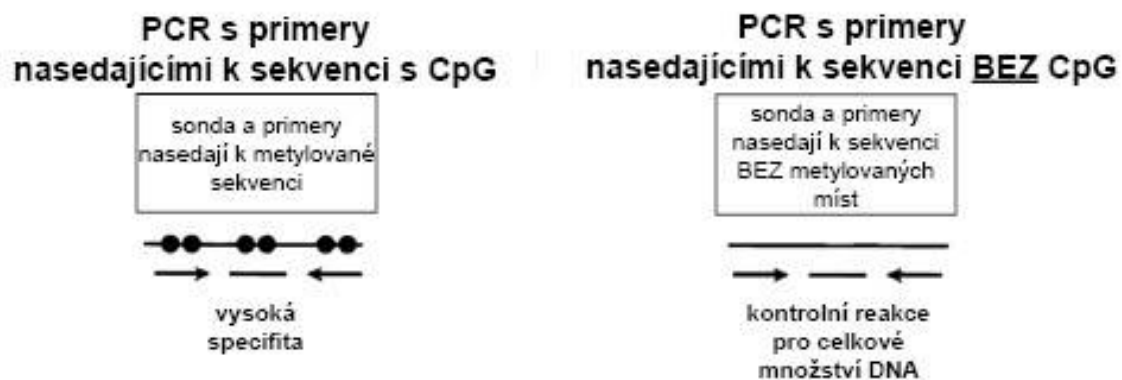
#### 2. krok – PCR reakce s metylačně specifickými primery

Modifikovaná DNA je amplifikována metylačně specifickou PCR (MSP), a to ve dvou reakcích pro každý vzorek DNA: jedna reakce je specifická pro DNA původně metylovanou v dané oblasti, druhá je specifická pro DNA původně nemetylovanou.

#### 3. krok – Elektroforéza

PCR produkty jsou rozděleny na 10 % polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením ethidium bromidem. Pokud byl vzorek DNA před modifikací nemetylovaný, PCR produkt vznikne pouze v reakci s „N“ primery. V případě původně metylované DNA sekvence vznikne amplifikační produkt jen v reakci s „M“ primery.

(<http://www.millipore.com/cellbiology/cb3/cpgenome>)



**Obr. 4. Princip MethyLight.** Při kvantifikaci metylace DNA se pro každý vzorek využívají dva typy reakcí, v obou případech je templátem bisulfitem ošetřená DNA. V první reakci jsou primery i sonda specifické pro metylovanou a bisulfitem ošetřenou sekvenci DNA. Druhá reakce je kontrolní – měří celkové množství bisulfitem konvertované DNA. Tato reakce není metylačně specifická (sonda ani primery neobsahují ve své sekvenci žádné CpG), ale je specifická pro bisulfitem konvertovanou DNA [260].

## 2.CÍLE

Cíle této práce byly následující:

1. Sestavit co největší soubor pacientů léčených imunochemoterapeutickou kombinací fludarabin, cyklofosfamid a rituximab a s využitím „consensus“ PCR a komparativní

PCR vyhodnotit efekt této léčby z hlediska dosažení a délky molekulární remise či molekulární regrese.

2. Vybrat geny, jejichž metylace v promotorové oblasti by mohla být využitelná z hlediska detekce minimální reziduální choroby.
3. Zavést metodu vhodnou pro detekci metylace DNA.
4. Analyzovat frekvenci metylace vybraných genů u testovaného souboru pacientů a vyhodnotit případný prognostický význam a eventuální klinické souvislosti metylace těchto genů.
5. V případě nalezení genů metylovaných u většiny nemocných ověřit jejich vhodnost pro detekci maligních buněk.

## **3. MATERIÁL A METODY**

### **3.1. Pacienti**

#### Soubor 1

Diagnóza CLL byla stanovena dle NCI kritérií [263]. V souboru bylo 29 pacientů s CLL (20 mužů a 9 žen, medián věku 55,7 let, rozpětí 44-69 roků). Z hlediska klinického stádia dle Raie byli 3 pacienti (10,3 %) ve stádiu 0, 12 (41,4 %) bylo ve stádiu I, 8 (27,6 %) ve stádiu II, 5 (17,2 %) ve stádiu III a 1 pacient (3,5 %) byl ve stádiu IV. Z 23 pacientů se známým mutačním stavem IgVH genu mělo 22 pacientů nemutovaný IgVH. Tento nepoměr v mutačním stavu byl dán výběrem pacientů, u kterých bylo nutné zahájit léčbu imunochemoterapií. Cytogenetické aberace byly vyšetřeny pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace a konvenční cytogenetiky u 26/29 nemocných. U 15 pacientů byla detekována delece 13q, u 1 pacienta trisomie 12, u 3 pacientů delece 17p a u 10 pacientů delece 11q. Expresí CD38 byla pozitivní u 21 pacienta. Expresí ZAP-70 nebyla u většiny pacientů vyšetřována.

Všem pacientům byly podány 4 cykly imunochemoterapeutické kombinace: rituximab (375 mg/m<sup>2</sup> – den 1), fludarabin (25 mg/m<sup>2</sup> – den 2 až 4) a cyklofosfamid (300 mg/m<sup>2</sup> – den 2 až 4). Cykly byly aplikovány v závislosti na reparaci hodnot krevního obrazu, obvykle po 4 týdnech. Sedm pacientů dostalo cytostatickou léčbu již před imunochemoterapií: 6 pacientům byl podáván chlorambucil a 1 pacientovi cyklofosfamid p.o.

## Soubor 2

V souboru bylo 82 pacientů (52 mužů a 30 žen, medián věku 61 let, rozpětí 32 až 78 let). Z hlediska klinického stádia dle Raie bylo 18 pacientů (22 %) ve stádiu 0, 22 pacientů (26,8 %) ve stádiu I, 21 pacientů (25,6 %) ve stádiu II, 8 pacientů (9,8 %) ve stádiu III a 13 pacientů (15,8 %) bylo ve stádiu IV. Cytogenetické aberace byly vyšetřeny u 75/82 nemocných. U 43 pacientů (57,3 %) byla detekována delece 13q, u 10 pacientů (13,3 %) trisomie 12, u 11 pacientů (14,7 %) delece 17p a u 13 pacientů (17,3 %) byla detekována delece 11q. U 41 pacientů byla detekována pozitivita exprese CD38 a u 36/72 pacientů byla detekována pozitivita exprese ZAP-70.

## **3.2. Izolace DNA**

DNA byla izolována vysolovací metodou [264] z kostní dřeně pacientů a z periferní krve 30 zdravých dárců. Materiál byl odebraný do K<sub>3</sub>EDTA. Nejdříve byly lyzovány červené krvinky neobsahující DNA a centrifugací odděleny bílé krvinky. Leukocyty byly následně

lyzovány pomocí anionického detergentu za současné denaturace proteinů proteinázou K. Proteiny byly posléze odstraněny precipitací pomocí koncentrovaného solného roztoku (sulfát amonný). DNA rozpuštěná v supernatantu byla vysrážena 96 % ethanolom, promyta 70 % ethanolom, vysušena a poté rozpuštěna v pufru se stabilizátorem DNA. Vzorčky DNA byly dlouhodobě uchovávány při 4 °C.

Výtěžek a kvalita DNA závisela na kvalitě výchozího materiálu a množství buněk přítomných ve vzorku. Kvalita DNA byla posouzena na spektrofotometru Helios, kde byla sledována především její koncentrace a čistota (poměr absorbcí při vlnových délkách 260/280 nm). Čistá DNA bez kontaminace proteiny měla hodnotu tohoto poměru kolem 1,8.

### **3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) s „consensus“ primery**

Metoda byla použita k průkazu klonální přestavby oblasti CDR3 těžkého imunoglobulinového řetězce, markeru klonální proliferace B buněk. DNA byla naředěna a předem zdenaturována. PCR probíhala v reakčním objemu 30 µl za přítomnosti 5 µl DNA, 0,2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 nM každého primeru, 1x PCR buffer II a 1,5 U AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems, Praha) v termocykleru Biometra (Biometra, Biotech, Praha). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3. Cyklační podmínky byly následující: denaturace 5 minut při 95 °C, následovalo 35 cyklů: 30 s při 95 °C, nasedání primerů 30 s při 58 °C, 90 s při 72 °C, a prodlužování primerů 5 min při 72 °C. Všechny reakce byly prováděny v duplikátech. Společně se vzorčky byla v každé reakci amplifikována také pozitivní kontrola (DNA pacienta s pozitivním CDR3) a negativní kontrola (DNA získaná z periferní krve zdravých dárců).

PCR produkty byly separovány na 10 % nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu (elektroforéza Biometra (Biometra, Biotech, Praha), 120 V) a po obarvení ethidium bromidem vizualizovány pod UV lampou (transiluminátor Ultra-Lum, Carson, USA). Byl pořízen digitalizovaný záznam výsledků.

Citlivost reakce byla stanovena pomocí ředící řady a byla  $1 \times 10^{-3}$ . Výsledky vyšetření byly hodnoceny pouze kvalitativně jako pozitivní či negativní.

### **3.4. Komparativní duplexní PCR: CDR3/ras PCR**

Diagnostické vzorky od téhož pacienta z různých období léčby byly kvantifikovány vždy v rámci jedné PCR. Jako referenční marker byl užíván úsek 2. exonu Harvey ras protoonkogenu. Do reakce bylo použito několik koncentrací každého diagnostického vzorku DNA, obvykle 4 až 6. DNA byla naředěna a předem denaturována. PCR probíhala v reakčním objemu 30  $\mu$ l za přítomnosti 5  $\mu$ l DNA, 0,4 mM dNTP, 2 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ M primerů FR3A a J<sub>H</sub>, 0,5  $\mu$ M primerů HA-61 a HB-61, 1x PCR buffer II a 2,5 U AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems, Praha) v termocykleru Biometra (Biometra, Biotech, Praha). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3. Cyklační program i elektroforetické podmínky byly identické s podmínkami pro „consensus“ PCR. Množství PCR produktů bylo vyhodnoceno denzitometricky pomocí softwaru pro gelovou analýzu (GelPro, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) [265]. Hodnoty získané ze sub-plateau fáze obou amplifikací byly dále analyzovány: množství specifického produktu bylo vztaženo k množství příslušného kontrolního genu a rozdíly v množství specifického markeru mezi konsekutivními vzorky byly použity ke stanovení molekulární regrese (pokles množství specifického markeru ve druhém z konsekutivních vzorků) a molekulární progrese (zvýšení množství specifického markeru).

### **3.5. Bisulfitová modifikace DNA**

K modifikaci DNA byly použity dva komerčně dodávané kity: EpiTect Bisulfite Modification Kit (Qiagen, Bio-Consult, Praha) a EZ-DNA Methylation Kit (Zymo Research, Exbio, Praha). Modifikace byla prováděna dle instrukcí výrobce. Kromě komerčních souprav byla použita i klasická metoda modifikace [249]. DNA byla denaturována hydroxidem sodným, poté byl přidán hydrochinon (Sigma Aldrich, Praha) a hydrogensířičitan sodný (Sigma Aldrich, Praha), následovala inkubace (16 h). Modifikovaná DNA byla přečištěna kitem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Eastport, Praha) dle instrukcí výrobce a eluována vodou. Modifikace byla zakončena reakcí s hydroxidem sodným, následovanou precipitací etanolem. DNA byla resuspendována ve vodě a uchovávána při -20 °C.

### 3.6. Metylačně specifická polymerázová řetězová reakce (MSP)

MSP následovala po bisulfitové modifikaci DNA. Každý vzorek byl amplifikován ve dvou oddělených reakcích se dvěma různými sety primerů, které jsou specifické pro metylovanou nebo nemetylovanou sekvenci. Primery pro MSP jsou navrženy tak, aby odlišily metylované a nemetylované alely po bisulfitové modifikaci a aby nasedaly jen k bisulfitem konvertované DNA. Sekvence primerů pro testované geny (DLC1 [175], SHP1 [197], p15 [249], p16 [249] a lamin A/C [266] ) jsou uvedeny v tabulce 3.

PCR probíhala v objemu 30  $\mu$ l za přítomnosti 2  $\mu$ l modifikované DNA, 0,2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 nM každého primeru, 1x PCR buffer II a 1,5 U AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems, Praha) v termocykleru Biometra (Biometra, Biotech, Praha). Amplifikační podmínky byly následující: denaturace 5 minut při 95 °C, následovalo 35 cyklů: 30 s při 95 °C, nasedání primerů 30 s (teploty specifické pro jednotlivé páry primerů jsou specifikovány v tabulce 3), 90 s při 72 °C, a prodlužování primerů 5 min při 72 °C. PCR produkty byly separovány na 10 % nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu (elektroforéza Biometra (Biotech, Praha), 120 V) a po obarvení ethidium bromidem vizualizovány pod UV lampou (transiluminátor Ultra-Lum, Carson, USA). Byl pořízen digitalizovaný záznam výsledků.

Všechny reakce byly prováděny v duplikátech. Společně se vzorky byla v každé MSP reakci amplifikována také pozitivní kontrola (*in vitro* metylovaná DNA), negativní kontrola (směsná DNA získaná z periferní krve 30 zdravých dárců) a voda. Citlivost MSP byla stanovena pomocí ředící řady a byla  $1 \times 10^{-3}$  pro DLC1, p16 a SHP1, a  $1 \times 10^{-4}$  pro p15.

### 3.7. PCR v reálném čase (MethyLight)

Metoda PCR v reálném čase byla použita pro kvantitativní stanovení metylované DNA. Každý vzorek (bisulfitem modifikovaná DNA) byl amplifikován ve dvou reakcích: v první reakci byly primery i sonda specifické pro metylovanou a bisulfitem ošetřenou sekvenci DNA, druhá reakce byla kontrolní – měřila celkové množství bisulfitem

konvertované DNA. Tato reakce není metylačně specifická (sonda ani primery neobsahují ve své sekvenci žádné CpG), ale je specifická pro bisulfitem konvertovanou DNA [260].

Reakce probíhala ve 20  $\mu$ l za přítomnosti 2  $\mu$ l modifikované DNA, komerčně dodávaného master mixu (EpiTect MethyLight PCR Kit, Qiagen, Bio-Consult, Praha), 0,4  $\mu$ M každého primeru (Sigma Aldrich, Praha) a 0,4  $\mu$ M sondy (Sigma Aldrich, Praha) v termocykleru Stratagene Mx3000p (Stratagene, Chemos CZ, Praha). Sekvence primerů a sondy pro DLC1 (sekvence navrženy v Sigma Aldrich, Praha) a ACTB [267] (kontrolní gen) jsou uvedeny v tab. 4. Sondy byly duálně značeny fluorochromy FAM-BHQ1. Reakční podmínky byly následující: denaturace 5 min při 95 °C, následovalo 45 cyklů 15 s při 95 °C, 60 s při 60 °C. Všechny reakce byly provedeny v duplikátech.

Relativní změny v míře metylace konsektivních vzorků byly vyhodnoceny pomocí softwaru Stratagene Mx3000p (Stratagene, Chemos CZ, Praha).

### **3.8. Příprava pozitivní kontroly - *in vitro* metylace DNA**

*In vitro* metylovaná DNA byla připravena inkubací směsné DNA izolované z periferní krve 30 zdravých dárců se SssI metylázou (New England Biolabs, Biotech, Praha) v přítomnosti S-adenosylmethioninu (SAM), který slouží jako donor metylové skupiny. Inkubace probíhala dle instrukcí výrobce SssI metylázy. Směsná DNA od zdravých dárců byla kvůli zajištění co největšího stupně metylace podrobena opakovaným cyklům (celkem 3 cykly) *in vitro* metylace.

Pro reakce MethyLight byla používána komerčně dostupná 100 % metylovaná DNA (Qiagen, Bio Consult, Praha).

### **3.9. Analýza mutačního stavu IgVH**

Analýza mutačního stavu IgVH byla provedena v ÚHKT (Praha 2) podle publikované metodiky [76]. Výsledky byly poskytnuty MUDr. J.Schwarzem z uvedené laboratoře.

Mononukleární buňky izolované pomocí Ficoll-Paq byly lyzovány a RNA byla extrahována pomocí činidla TriZol (Invitrogen, KRD, Praha). RNA byla transkribována do cDNA pomocí Superscript II (Invitrogen, KRD, Praha) a sloužila pak jako templát pro 6 separátních PCR reakcí (v reakcích byla používána AmpliTaq Gold polymeráza, Applied Biosystems, Praha), které sloužily k detekci klonální proliferace v 7 rodinách IgVH genů. Amplifikace probíhala metodou „touch down“ RT-PCR s použitím degenerovaných primerů. Produkty této reakce byly purifikovány a sekvenovány pomocí Big Dye Terminator kit v. 3 and ABI Prism 310 Genetic Analyzer (obojí od Applied Biosystems). Sekvence IgVH genů byly srovnány s konfigurací jejich zárodečné linie pomocí BLAST program ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)). Pro rozlišení mutovaných a nemutovaných genů byla používána hodnota cut-off 2 %.

### **3.10. Detekce cytogenetických aberací**

Detekce cytogenetických aberací byla provedena v Centru nádorové cytogenetiky VFN (Praha 2) podle publikovaných postupů [268]. Výsledky byly poskytnuty MUDr. A. Berkovou z uvedeného centra.

Cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření bylo provedeno ze vzorků kostní dřeně nebo periferní krve. Vzorky kostní dřeně byly zpracovány podle standardních cytogenetických postupů po 24 hodinové kultivaci v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10 % fetálního telecího séra bez použití mitogenu (kolcemid, hypotonie – 0.075M KCl, fixace – metanol : kyselina octová 3:1). Vzorky periferní krve byly zpracovány bez kultivace. Metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) za použití kombinace jednotlivých komerčně dodávaných DNA sond (CEP12, LSI D13S319/LSI 13q34, LSI p53, LSI ATM; Abbott Molecular, Abbott Laboratories, Praha) byla analyzována přítomnost trisomie 12, delecce chromosomové oblasti 13q14.3 a delecce genů TP53 a ATM.

### **3.11. Průtoková cytometrie – analýza exprese ZAP-70 a CD38**

Detekce antigenů ZAP-70 a CD38 byla provedena v Laboratoři průtokové cytometrie VFN (Praha 2) podle publikovaných metodik [25,269]. Výsledky byly poskytnuty MUDr. J. Karbanem z uvedeného centra.

Periferní mononukleární buňky byly značeny příslušnou kombinací monoklonálních protilátek s navázanými fluorochromy: protilátkami proti CD19, CD3 a ZAP-70 v případě analýzy exprese ZAP-70 a protilátkami proti CD5, CD19 a CD38 v případě analýzy exprese CD38. Vzorky byly následně promyty a analyzovány pomocí FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) a CELLQuest™ software, version 3.3 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Hodnota cut-off pro expresi CD38 byla alespoň 30 % pozitivních B buněk, cut-off pro expresi ZAP-70 byla alespoň 20 % pozitivních B buněk.

### **3.12. Statistická analýza**

Spearmanův  $\rho$  test [270] byl použit k analýze korelace mezi metylací jednotlivých genů či jejich kombinací a klinicko-patologickými charakteristikami pacientů (klinické stádium dle Raie, věk, pohlaví, exprese CD38) u pacientů ze Souboru 1. Chí-kvadrát test byl použit k analýze statistické souvislosti mezi metylací jednotlivých genů či jejich kombinací a klinicko-patologickými charakteristikami pacientů (klinické stádium dle Raie, věk, pohlaví, exprese CD38, exprese ZAP-70, mutační stav IgVH, cytogenetické aberace: delece 17p, delece 13q, trisomie 12, delece 11q) u pacientů ze Souboru 2. Doba celkového přežití (overall survival, OS) byla analyzována Kaplanovou - Meierovou regresní metodou a statistické signifikance vyhodnoceny pomocí testu Mantela – Haenschelové. Mann-Whitneyův test (o dvoustranné alternativě) non-parametrických dat byl použit k vyhodnocení statistické významnosti rozdílu v délce molekulárních remisí u následujících tří skupin pacientů: pacienti transplantovaní vs netransplantovaní, pacienti MRD pozitivní vs MRD negativní v době autologní transplantace, pacienti transplantovaní kontaminovanými progenitorovými buňkami vs pacienti transplantovaní nekontaminovanými progenitorovými buňkami.

Všechny analýzy byly provedeny v intervalu spolehlivosti 95% (pokud není v textu uvedeno jinak), hodnoty p byly určeny pomocí softwaru GraphPad Prism version 3.03 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

**Tab. 3 Sekvence použitých primerů pro kvalitativní PCR.**

Gen	Přední primer	Reverzní primer	Teplota nasedání, °C
p15-M	GCGTTCGTATTTGCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	60
p15-U	TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT	CCATACAATAACCAAACAACCAA	60
p16-M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65
p16-U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	60
SHP1-M	GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC	TCACGCATACGAACCCAAACG	60
SHP1-U	GTG AAT GTT ATT ATA GTA TAG TGT TTG G	TTC ACA CAT ACA AAC CCA AAC AAT	59
DLC1-M	TTT AAA GAT CGA AAC GAG GGA GCG	CCC AAC GAA AAA ACC CGA CTA ACG	55
DLC1-U	TTT TTT AAA GAT TGA AAT GAG GGA GTG	AAA CCC AAC AAA AAA ACC CAA CTA ACA	58
lamin-M	TTA TTA GAG TTT TTG TTT CGG CGT C	CGC CGA CCG ACT AAC TCT CG	60
lamin-U	AGG ATT TAT TAG AGT TTT TGT TTT GGT GTT	CAA AAT ACA CCA ACC AAC TAA CTC TCA	60
Oblast CDR3	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	ACA CGG CC/TG/C TGT ATT ACT GT	58
Ras	AGA CGT GCC TGT TGG ACA TC	CGC ATG TAC TGG TCC CGCAT	58

M-metylovaná sekvence, U-nemetylovaná sekvence

**TAB. 4** Sekvence primerů a sond pro MethyLight

Gen	Sekvence
DLC1-F	CAA AAC ATA ACC ACA CCT CTC CAC
DLC1-R	TTT TCG TTA CGG TTT TAG AAA GAA AGC G
DLC1-sonda	AAA CGC CGA CTC ACG AAC TTC TCG CCC AAC TCC
ACTB-F	TGG TAG TGA GAG TTT TAA AGA TAG TTC GA
ACTB-R	AACCAA TAA AACCTA CTC CTCCT TAA
ACTB-sonda	ACC ACC ACC CAA CAC ACA ATA ACA AAC ACA

F-přední, R-reverzní

## 4. VÝSLEDKY

#### **4.1. Molekulární monitoring efektu léčby FCR a FCR+ASCT užitím komparativní PCR a „consensus“ PCR**

Bylo sledováno celkem 29 pacientů léčených čtyřmi cykly imunochemoterapeutické kombinace fludarabin, cyklofosfamid a rituximab (FCR) (Soubor 1 – viz Metody). Kompletní hematologická remise byla navozena u 14 pacientů (48,3 %), 10 pacientů (34,5 %) v kompletní remisi (CR) dosáhlo i remise molekulární. Jedenáct pacientů (37,9 %) dosáhlo parciální hematologické remise a molekulární regrese (dle výsledků komparativní PCR), 4 pacienti byli po léčbě v nodulární parciální remisi a zároveň v molekulární regresi (tab. 5).

Šestnáct pacientů, z nichž 7 bylo v parciální remisi, 4 byli v kompletní hematologické remisi a molekulární regresi, 4 byli v kompletní remisi hematologické i molekulární a 1 pacient byl v nodulární parciální remisi, následně podstoupilo autologní transplantaci (autologous stem cell transplantation, ASCT), která navodila molekulární remisi u 12 z nich (75 %), a to včetně čtyř pacientů, jejichž kostní dřeň byla PCR negativní již po imunochemoterapii.

Čtyři pacienti podstoupivší ASCT byli v době transplantace v molekulární remisi, u dvanácti byla před transplantací detekována reziduální choroba v kostní dřeni. Pacienti, jejichž kostní dřeň byla v době transplantace PCR negativní, dosáhli statisticky významně delší molekulární remise než pacienti, kteří měli před transplantací v kostní dřeni detekovatelné leukemické buňky (56 měsíců vs 16,1 měsíců,  $p = 0,009$ ) (obr. 5).

Z dvanácti dostupných vzorků periferních kmenových buněk (peripheral blood stem cells, PBSC) bylo 7 PCR-pozitivních a 5 PCR-negativních (tab. 6). Ze 7 pacientů transplantovaných PCR-pozitivními PBSC dosáhlo po ASCT 6 pacientů molekulární remise. Z těchto pacientů 5 následně zrelabovalo (průměrná délka remise 26,4 měsíců, rozpětí 8-37 měsíců), o jednom pacientovi nejsou po 74 měsících v remisi dostupné informace o aktuálním stavu. Všech 5 pacientů transplantovaných PCR-negativními PBSC bylo po ASCT v molekulární remisi. Z těchto 5 pacientů 4 následně zrelabovali (průměrná délka remise 24 měsíců, rozpětí 21-29 měsíců), 1 pacient je stále v remisi (84 měsíců). Rozdíl délky molekulární remise u těchto dvou skupin pacientů (PBSC PCR-pozitivní vs PBSC PCR-negativní) nebyl statisticky významný ( $p = 0,935$ ).

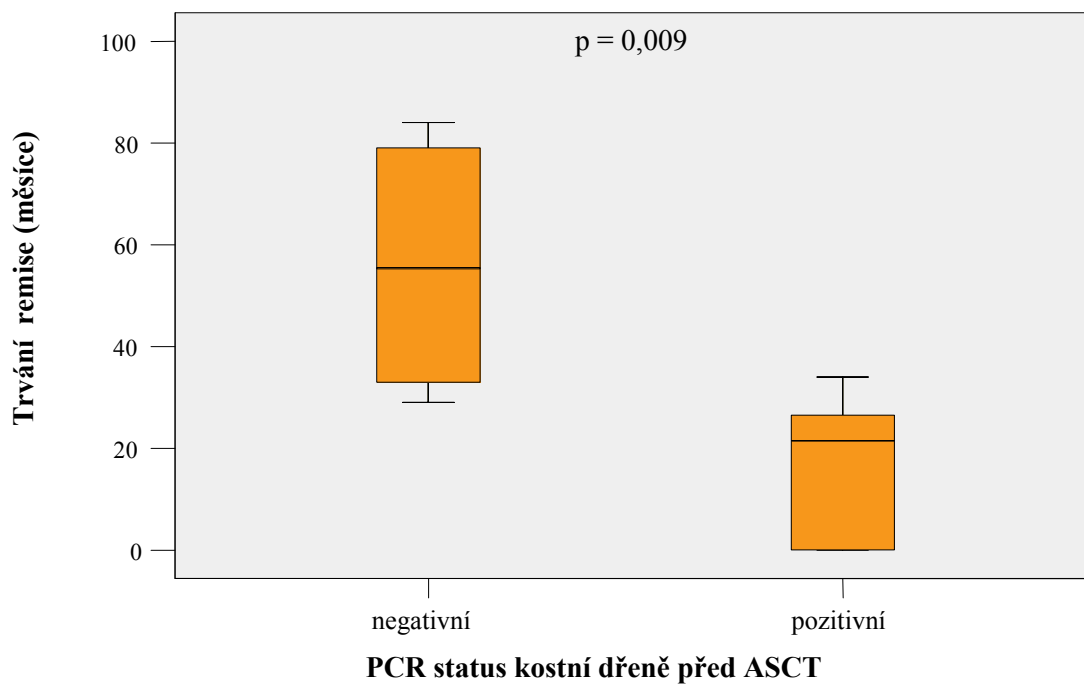
Ve skupině 13 pacientů, kteří nepodstoupili ASCT, dosáhlo molekulární remise po léčbě FCR 6 pacientů (tab. 7). U 4 z těchto 6 pacientů byl později detekován molekulární relaps, o 1 pacientovi nejsou dostupné aktuální informace a 1 pacientka je stále (již 94. měsíc) v molekulární remisi. Průměrná délka molekulární remise byla v této skupině pacientů 14,6 měsíců (rozpětí 6 – 94 měsíců).

Průměrná délka molekulární remise ve skupině transplantovaných pacientů byla 26,1 měsíců (rozpětí 8-84 měsíců) a je delší než průměrná délka molekulární remise u pacientů, kteří nepodstoupili ASCT ( $p = 0,086$ ), nicméně vzhledem k velmi rozptýleným hodnotám na hladině významnosti jen 0,1.

**Tab. 5 Léčebná odpověď na FCR (Soubor 1, n = 29).**

Klinická odpověď			Molekulární odpověď		
	Počet pacientů	%		Počet pacientů	%
CR	14	48,3	Molekulární remise	10	34,5
PR	11	37,9	Molekulární regrese	19	65,5
nPR	4	13,8			

CR, kompletní remise; PR, parciální remise; nPR, nodulární parciální remise



**Obr. 5** Porovnání délky dosažené molekulární remise u pacientů po ASCT v závislosti na přítomnosti molekulární remise před ASCT. Pacienti, kterým byly v kostní dřeni před transplantací detekovány leukemické buňky, dosáhli po ASCT statisticky významně kratší molekulární remise ve srovnání s pacienty, u nichž před transplantací nebyl maligní klon v kostní dřeni zachycen metodou „consensus“ PCR.

**Tab. 6 Přehled dosažených molekulárních remisí a regresí u pacientů léčených FCR + ASCT.**

Pacient	PCR status			molekulární remise (měsíce)	Aktuální stav	
	po FCR	PBSC+/-	po ASCT		měsíce od dg	měsíce od ASCT
1	+	+	-	8	zemřela (132)	61
2	+	NA	-	31	zemřel (95)	86
3	+	-	-	21	žije (96)	90
4	+	+	-	24	zemřel (106)	79
5	+	+	-	29	zemřela (86)	79
6	+	-	-	24	žije (133)	96
7	+	NA	+	0	zemřel (33)	25
8	+	NA	+	0	zemřel (72)	64
9	+	+	-	34	žije (86)	72
10	+	+	+	0	žije (79)	71
11	+	NA	-	0	zemřel (75)	54
12	-	-	-	84	žije (180)	84
13	-	-	-	22	žije (203)	80
14	-	+	-	74	ztracen ze sledování	60
15	-	+	-	37	zemřel (103)	80
16	-	-	-	29	zemřela (53)	47

**Tab. 7 Přehled dosažených molekulárních remisí a regresí u pacientů po léčbě FCR.**

Pacient	PCR status po FCR	Molekulární remise (měsíce)	Aktuální stav
17	-	18	žije (107 měsíců od dg)
18	-	6	zemřel (48 měsíců od dg)
19	+	0	zemřel (62 měsíců od dg)
20	+	0	zemřel (133 měsíců od dg)
21	+	0	zemřel (10 měsíců od dg)
22	+	0	žije (232 měsíců od dg)
23	-	94	stále v remisi (127 měsíců od dg)
24	+	0	zemřela (19 měsíců od dg)
25	+	0	zemřel (117 měsíců od dg)
26	-	24	ztracen ze sledování
27	-	39	žije (67 měsíců od dg)
28	-	9	zemřel (93 měsíců od dg)
29	+	0	zemřel (24 měsíců od dg)

## **4.2. Analýza metylace vybraných tumor-supresorových genů**

### 4.2.1. Optimalizace metodiky

K detekci metylace DNA byla zavedena a optimalizována metylačně specifická polymerázová řetězová reakce (MSP). Prvním krokem MSP je tzv. bisulfitová modifikace DNA. Byly použity tři způsoby modifikace DNA: klasická metoda [249] a dva komerční kity (EZ-DNA Methylation Kit od Zymo Research a EpiTect Bisulfite Kit od Qiagen). Vzhledem k tomu, že EpiTect Bisulfite Kit byl z těchto tří způsobů modifikace DNA jediný, kterým se podařilo modifikovat všechny testované vzorky, byl následně používán ve všech analýzách.

Druhým krokem MSP je vlastní polymerázová řetězová reakce (PCR). Byly porovnány dva přístupy amplifikace, a to klasická PCR a tzv. touch-down PCR, kdy anelační teplota v prvním cyklu byla vyšší, než je teplota optimální, a snižovala se každý druhý cyklus o 1°C až po dosažení určité teploty, při níž probíhaly zbylé amplifikační cykly. Výsledky obou amplifikačních přístupů byly stejné, v analýzách byla používána konvenční PCR.

### 4.2.2. Frekvence metylace vybraných genů

Metylační profil genů p15, p16, SHP1, DLC1 a lamin A/C byl analyzován metylačně specifickou PCR u 29 vzorků kostní dřeně odebrané stejnému počtu CLL pacientů (Soubor 1 – viz Metody) při stanovení diagnózy. Společně se vzorky pacientů byla analyzována také směsná DNA získaná z periferní krve od 30 zdravých dárců. U této kontrolní DNA nebyla detekována metylace žádného ze zkoumaných genů.

Četnost metylace jednotlivých genů byla velmi variabilní. Metylace alespoň jednoho genu byla detekována u 28 z 29 vzorků (96,6 %), maximálně byly detekovány čtyři současně metylované geny. U 4 vzorků byla detekována metylace 1 genu, u 6 metylace 2 genů, u 15 metylace 3 genů a u 3 vzorků byla detekována metylace 4 genů. Nejčastěji metylovaným genem byl DLC1 (89,7 % vzorků) (obr. 6), zatímco SHP1 byl metylován u 69 %, p15 u 62,1 % a p16 u 31 % vzorků. Metylace laminu A/C nebyla detekována u žádného z analyzovaných vzorků.

#### 4.2.3. Korelace výsledků metylační analýzy a klinicko-patologických charakteristik pacientů

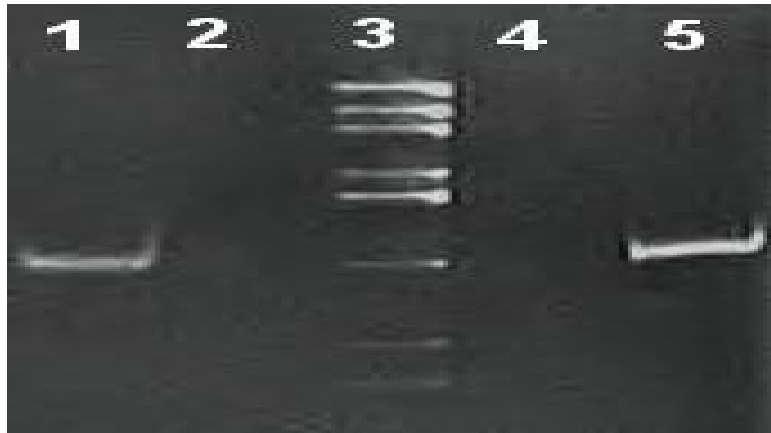
Byly porovnány zjištěné molekulární a klinicko-patologické charakteristiky CLL pacientů. Byla nalezena korelace mezi metylací genů DLC1, který byl metylován u 26/29 (89,7 %) pacientů, a p15, který byl metylován u 18/29 (62,1 %) pacientů ( $p = 0,0182$ ). Statistická analýza prokázala také korelaci mezi stádiem choroby dle Raie při stanovení diagnózy a současnou metylací dvou a více genů.

Spearmanovým  $\rho$  testem bylo analyzováno, zda metylace některého z testovaných genů či jejich různých kombinací může korelovat s klinickým stádiem choroby, v němž se pacient nachází. Bylo zjištěno, že míra korelace s klinickým stádiem dle Raie je nejvyšší při současné metylaci alespoň dvou genů. V případě paralelní metylace dvou genů byla nejvyšší míra korelace s klinickým stádiem nalezena u dvojice SHP1 a p15 ( $p = 0,0445$ ), v případě souběžné metylace tří genů byla z hlediska reflexe stádia onemocnění dle Raie optimální kombinace SHP1, p15 a p16 ( $p = 0,0165$ ). Navíc, když byli pacienti rozděleni podle klinického stádia jen do dvou skupin, a to pacienti ve stádiu Rai 0-I v jedné skupině a pacienti ve stádiu Rai II-IV ve druhé skupině, byla pozorována ještě silnější korelace mezi dichotomizovaným klinickým stádiem a dvojicí genů SHP1 a p15 ( $p = 0,0153$ ) a trojicí genů SHP1, p15 a p16 ( $p = 0,0015$ ) (tabulka 8). Nejsilnější korelace byla nalezena mezi dichotomizovaným klinickým stádiem dle Raie a paralelní metylací alespoň tří genů ( $p = 0,0004$ ), tzn., že pacienti ve vyšším klinickém stádiu měli většinou větší počet současně metylovaných genů (obr. 7).

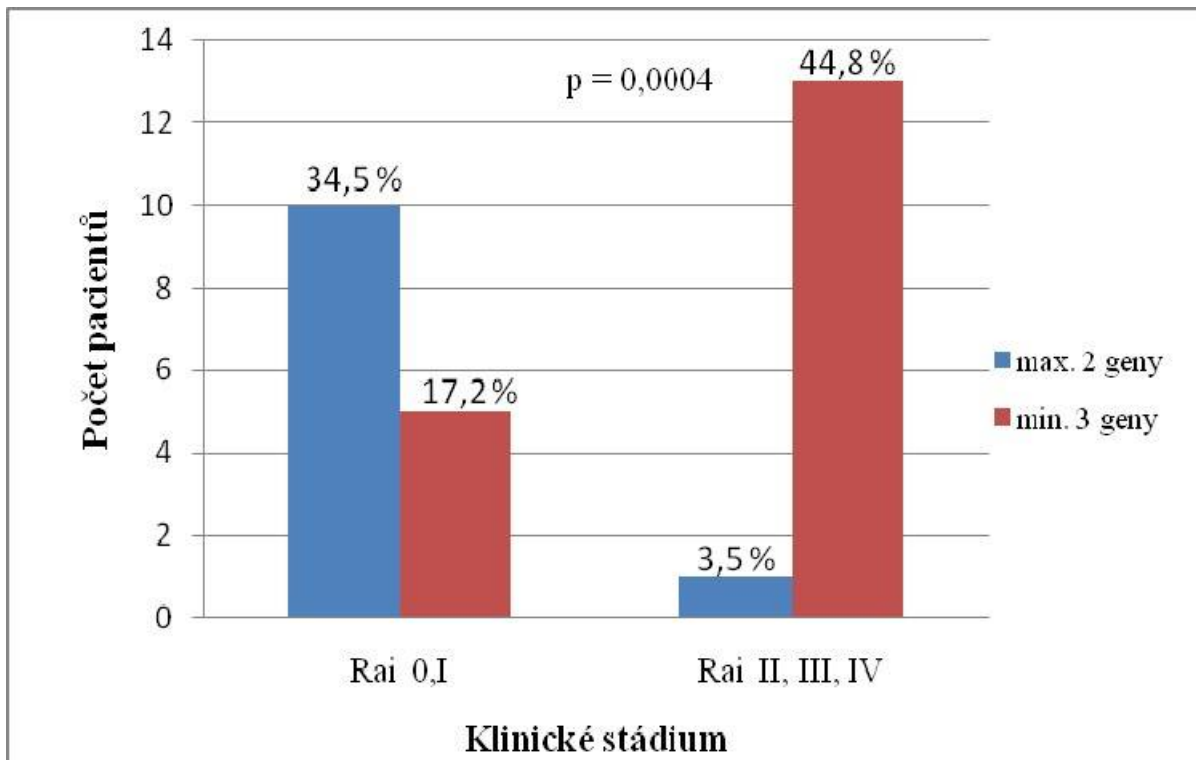
Naopak nebyla nalezena žádná souvislost mezi aberantní metylací analyzovaných genů a dalšími zkoumanými klinicko-patologickými aspekty pacientů v době diagnózy, jako je věk, pohlaví a exprese CD38. Rovněž u těchto pacientů nebyla nalezena souvislost mezi metylací testovaných genů a dobou celkového přežití (není ukázáno).

**Tab. 8** Statistická významnosť korelácie medzi dichotomizovaným klinickým štádiom dle Raie (Rai 0, I vs Rai II-IV) a počtom metylovaných genů. r- Spearmanův koeficient.

Metylovaný gen (kombinace genů)	Statistická významnost Spearmanova korelačního koeficientu	
	r	hodnota p
SHP1 (n = 20)	0,350	0,0629
DLC1 (n = 26)	0,328	0,0822
p15 (n = 18)	0,329	0,0818
p16 (n = 9)	0,247	0,1967
SHP1+DLC1 (n = 19)	0,424	0,0217
SHP1+p15 (n = 13)	0,446	0,0153
SHP1+p16 (n = 5)	0,429	0,0202
DLC1+p15 (n = 18)	0,364	0,0519
DLC1+p16 (n = 8)	0,385	0,0392
p15+p16 (n = 5)	0,439	0,0172
SHP1+DLC1+p15 (n = 13)	0,464	0,0113
SHP1+DLC1+p16 (n = 6)	0,500	0,0058
SHP1+p15+p16 (n = 3)	0,563	0,0015
DLC1+p15+p16 (n = 5)	0,479	0,0086
SHP1+DLC1+p15+p16 (n = 18)	0,568	0,0013
Alespoň 3 geny	0,613	0,0004



**Obr. 6 Metylace genu DLC1.** 1 - pozitivní vzorek, 2- negativní kontrola (směsná DNA od zdravých dárců), 3 – DNA marker pUC18 Hae III, 4 - voda, 5 - pozitivní kontrola (*in vitro* metylovaná DNA).



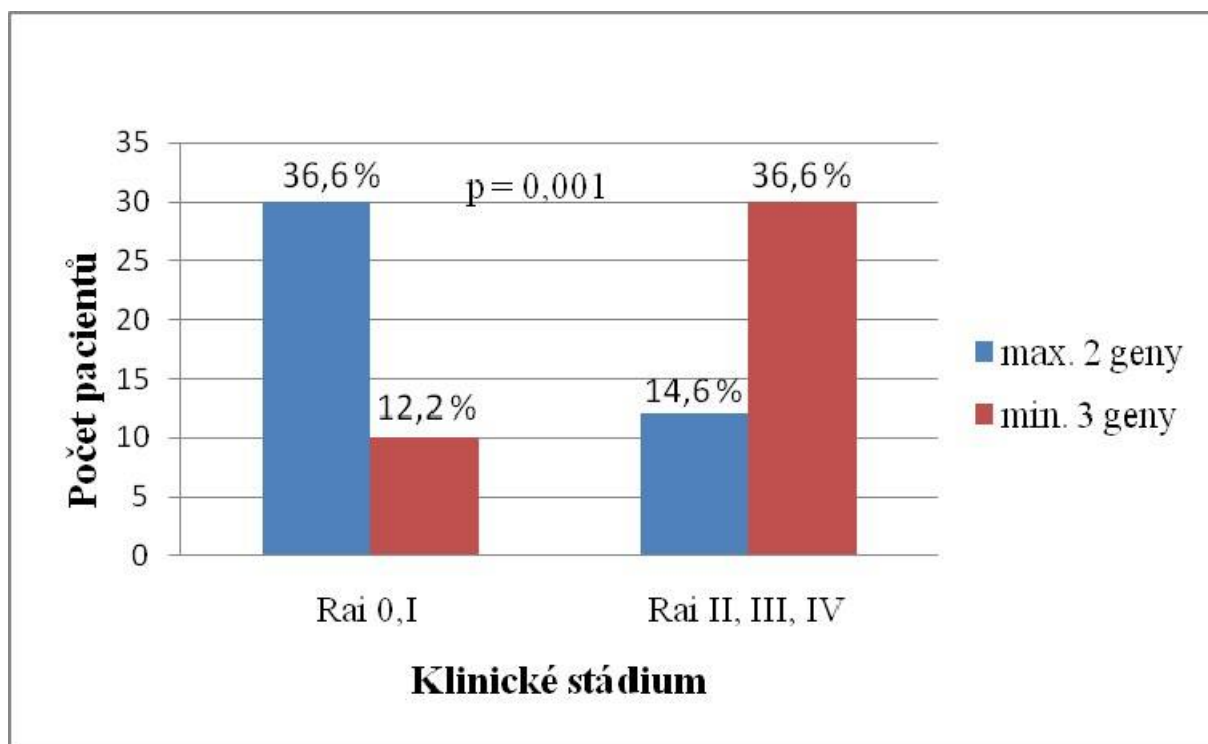
**Obr. 7 Korelace mezi dichotomizovaným stádiem nemoci dle Raie při diagnóze a počtem metylovaných genů v Souboru 1.**

#### 4.2.4. Ověření výsledků metylační analýzy na větším souboru pacientů

Vzhledem k tomu, že analýza metylace vybraných tumor-supresorových genů byla provedena na malém souboru pacientů, byl vytvořen nový soubor o 82 pacientech, na němž byly tyto výsledky ověřeny (Soubor 2 – viz Metody). Soubor 2 byl vybrán tak, aby byli pokud možno rovnoměrně zastoupeni pacienti s mutovaným i nemutovaným IgVH a pacienti v různých stádiích nemoci. Kromě mutačního stavu (Laboratoř PCR diagnostiky leukémií, ÚHKKT) byly u těchto pacientů zjištěny i cytogenetické odchylky (Centrum nádorové cytogenetiky, VFN) a exprese CD38 a ZAP-70 (Laboratoř průtokové cytometrie, VFN) (podrobně viz Metody). Následně byla provedena statistická analýza s cílem zjistit případnou souvislost mezi výše zmíněnými prognostickými faktory a metylací jednotlivých genů či jejich kombinací a s cílem ověřit předchozí výsledky.

Četnost metylace jednotlivých genů byla v tomto souboru pacientů velmi podobná frekvenci metylace těchto genů v původní skupině pacientů. Methylace alespoň jednoho genu byla detekována u 79 (96,3 %) pacientů. DLC1 byl metylován u 74 (90,2 %) pacientů, SHP1 u 57 (69,5 %), p15 u 44 (53,7 %) a p16 u 30 (36,6 %) pacientů. Vzhledem k tomu, že v původním souboru pacientů nebyla metylace laminu A/C detekována ani u jednoho vzorku, nebyl tento gen v Souboru 2 již analyzován.

Výsledky metylační analýzy byly ověřeny chí-kvadrát testem, který potvrdil statisticky významnou souvislost mezi vyšším klinickým stádiem nemoci a větším počtem současně metylovaných genů ( $p = 0,001$ , CI 99 %) (obr. 8). Kromě toho byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi metylací genu SHP1 a vyšším stádiem choroby ( $p = 0,005$ , CI 99 %), stejně tak mezi metylací genu p15 a vyšším stádiem choroby ( $p = 0,004$ , CI 99 %). Statisticky významná souvislost byla nalezena i mezi metylací genu p16 a přítomností delece 13q ( $p = 0,045$ ) a mezi metylací tohoto genu a přítomností delece 17p ( $p = 0,029$ ).



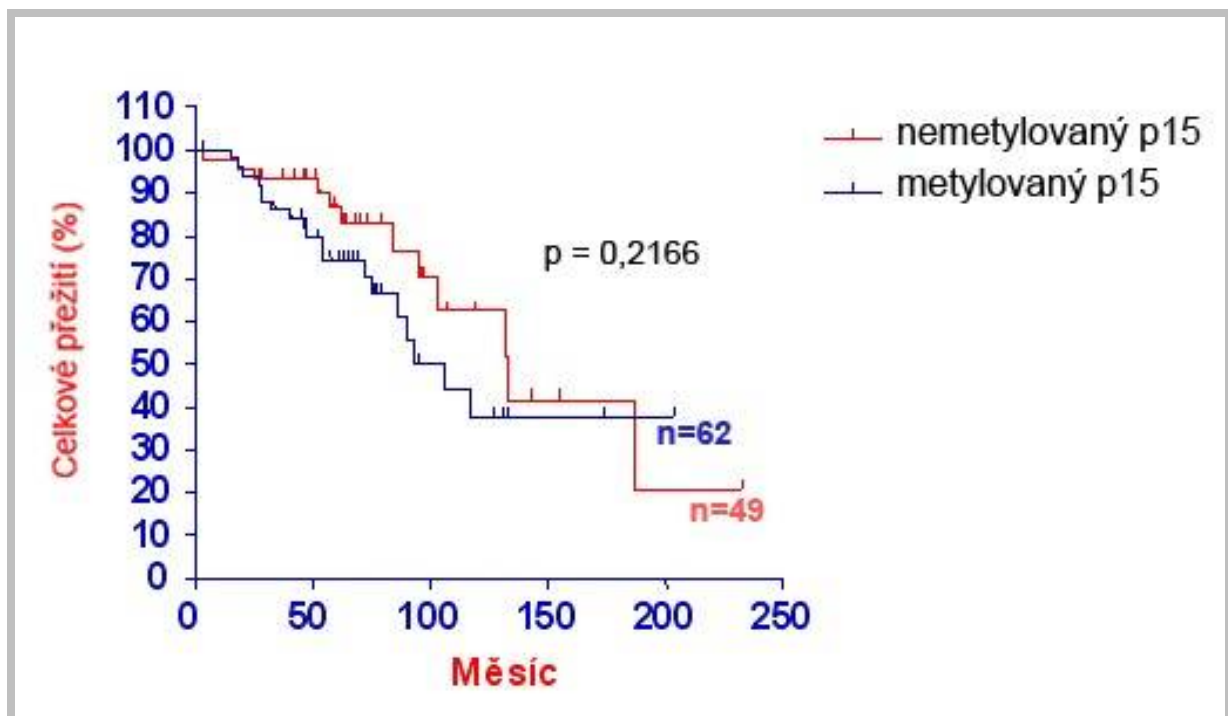
**Obr. 8** Souvislost mezi dichotomizovaným klinickým stádiem CLL dle Raie v době diagnózy a počtem současně metylovaných genů v souboru 82 pacientů (Soubor 2 – viz Metody).

#### 4.2.5. Analýza doby přežití

Pro jednotlivé analyzované geny, celkový počet současně metylovaných genů, dichotomizované klinické stádium choroby v době diagnózy, pohlaví a jednotlivé prognostické faktory byly zpracovány Kaplanovy-Meierovy křivky přežití (tabulka 9). Do této analýzy byli zavzati i pacienti z původního souboru (Soubor 1 + Soubor 2, celkem 111 pacientů). Nebyl nalezen rozdíl v délce celkového přežití u mužů/žen, ani u pacientů v nižším/vyšším stádiu CLL, ani u pacientů s metylovaným/nemetylovaným SHP1, p15 (obr. 9), p16, ani u pacientů s nižším/vyšším počtem současně metylovaných genů. Rozdíl v délce přežití nebyl zjištěn ani u pacientů, u nichž byla/nebyla zjištěna přítomnost rizikových faktorů delece 11q a exprese ZAP-70. Statisticky významně kratší doba celkového přežití (overall

survival, OS) byla zjištěna u pacientů s nemutovaným IgVH, s delecí 17p ( $p = 0,0023$ ) a se zvýšenou expresí CD38 ( $p = 0,0192$ ). Medián OS byl u IgVH nemutovaných pacientů ( $n = 59$ ) byl 106 měsíců, u pacientů s mutovaným IgVH ( $n = 42$ ) nebyl medián OS dosažen ( $p = 0,0118$ ). Medián OS pacientů s delecí 17p ( $n = 14$ ) byl 54 měsíců, medián OS pacientů bez delecce 17p ( $n = 87$ ) byl 132 měsíců ( $p = 0,0023$ ). Medián OS pacientů s vysokou expresí (hodnocenou jako pozitivitou) CD38 ( $n = 54$ ) byl 103 měsíců, medián OS pacientů s nízkou expresí CD38 ( $n = 42$ ) nebyl dosažen ( $p = 0,0192$ ).

Vzhledem k tomu, že metylace genu DLC1 byla detekována u naprosté většiny pacientů, nebyla pro tento gen analyzována křivka přežití.



**Obr. 9 Celkové přežití (OS) v závislosti na metylaci p15.** Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v celkové době přežití pacientů s metylovaným/nemetylovaným p15 ( $p = 0,2166$ ).

**Tab. 9 Přehled výsledků celkového přežití pro jednotlivé molekulární a klinicko-patologické charakteristiky.**

Analyzovaný znak	Medián celkového přežití (měsíce)		Hodnota p
	M (n = 72)	F (n = 39)	
Pohlaví	106	132	0,8015
Rai	0,I (n = 54) 133	II-IV (n = 57) 93	0,062
Delece 11q	neg (n = 77) 133	poz (n = 23) 93	0,3044
Trisomie 12	neg (n = 90) 117	poz (n = 11) 90	0,9941
Delece 17p	neg (n = 87) 132	poz (n = 14) 54	<b>0,0023</b>
Delece 13q	neg (n = 43) 93	poz (n = 58) 132	0,4947
Mutační stav IgVH	U (n = 59) 106	M (n = 42) nedosažen	<b>0,0118</b>
CD38	neg (n = 42) nedosažen	poz (n = 54) 103	<b>0,0192</b>
ZAP-70	neg (n = 41) nedosažen	poz (n = 33) 132	0,7273
počet metyl. genů	0-2 (n = 60) 132	3-4 (n = 51) 106	0,2471
metylace p15	neg (n = 49) 133	poz (n = 62) 106	0,2166
metylace SHP1	neg (n = 34) 132	poz (n = 77) 106	0,2383
metylace p16	neg (n = 72) 187	poz (n = 39) 106	0,7721

(U-nemutovaný IgVH, M-mutovaný IgVH, neg-negativní, poz-pozitivní, M-muž, F- žena). Tučným písmem statisticky signifikantní výsledky.

#### 4.2.6. Analýza metylace DNA jako potenciálního markeru pro detekci MRD – srovnání s „consensus“ PCR

Změny v metylaci jednotlivých genů v souvislosti s vývojem choroby byly analyzovány u všech 29 pacientů (Soubor 1 – viz Metody). K analýze byly použity vzorky kostní dřeně získané v době diagnózy, po léčbě FCR, příp. po transplantaci a při molekulárním relapsu choroby. Vzorky byly analyzovány metylačně specifickou PCR a výsledky byly srovnány s výsledky získanými z amplifikace CDR3 oblasti pomocí „consensus“ primerů. Srovnání pro každý gen bylo provedeno pouze u konsekutivních vzorků od těch pacientů, jejichž vzorek získaný v době diagnózy byl pro daný gen metylován, tento diagnostický vzorek nebyl do analýzy započítán.

##### SHP1

Srovnání výsledků obou metod bylo provedeno u 41 vzorků od 20 pacientů. Shodnost výsledků MSP a „consensus“ PCR byla prokázána u 24 konsekutivních vzorků (58,5 %) (tab. 10), z toho ve 22 případech šlo o shodnou pozitivitu výsledků. U 17 vzorků (41,5 %) byl detekován pozitivní metylační signál a současně CDR3 negativita, u žádného pacienta nebyla detekována CDR3 pozitivita a zároveň negativní výsledek MSP (tab. 11).

U čtyř pacientů nebyla detekována metylace SHP1 v žádném z konsekutivních vzorků. U jednoho pacienta byla metylace SHP1 prvně detekována až při molekulárním relapsu CLL, zatímco předchozí vzorky (diagnostický vzorek i vzorky po FCR a po transplantaci) byly MSP negativní. U čtyř pacientů nebyla metylace SHP1 detekována při diagnóze, ale až ve všech následných vzorcích.

##### DLC1

Srovnání výsledků obou metod bylo provedeno u 53 vzorků od 26 pacientů. U 37 vzorků (69,8 %) byl zaznamenán shodný výsledek MSP a „consensus“ PCR (28 ve smyslu positivity a 9 v negativním smyslu), 12 vzorků (22,6 %) bylo MSP pozitivních, ale CDR3 negativních a 4 vzorky (7,6 %) byly MSP negativní a CDR3 pozitivní (tab. 10, 11).

U tří pacientů nebyla detekována metylace DLC1 v žádném z konsekutivních vzorků.

p16

Srovnání výsledků obou metod bylo provedeno u 20 vzorků od 9 pacientů. MSP poskytla shodné výsledky s „consensus“ PCR u 14 vzorků (70 %) (z toho v 6 případech šlo o shodnou pozitivitu výsledků), 1 vzorek (5 %) byl MSP pozitivní a CDR3 negativní a 5 vzorků (25 %) bylo MSP negativní a CDR3 pozitivní (tab. 10, 11).

U 20 pacientů nebyla detekována metylace p16 u žádného z konsektivních vzorků.

p15

Srovnání výsledků obou metod bylo provedeno u 36 vzorků od 18 pacientů. U 22 vzorků (61,1 %) byly výsledky MSP a „consensus“ PCR shodné (z toho v 18 případech šlo o shodnost pozitivních výsledků), 10 vzorků (27,8 %) bylo MSP pozitivních a CDR3 negativních a 4 vzorky (11,1 %) byly MSP negativní a CDR3 pozitivní (tab.10, 11).

U 10 pacientů nebyla detekována metylace p15 v žádném z konsektivních vzorků. U jednoho pacienta nebyla metylace p15 detekována při diagnóze, ani po FCR a transplantaci, ale prvně až při molekulárním relapsu.

**Tab. 10 Přehled shody mezi „consensus“ PCR a MSP pro jednotlivé analyzované geny.**

<b>Gen</b>	<b>Shodné výsledky „consensus“ PCR a MSP (%)</b>	<b>„consensus“ PCR +, MSP - (%)</b>	<b>„consensus“ PCR -, MSP + (%)</b>
<b>SHP1</b>	58,5	0	41,5
<b>DLC1</b>	69,8	7,6	22,6
<b>p16</b>	70	25	5
<b>p15</b>	61,1	11,1	27,8

**Tab. 11 Počet vzorků, u nichž byla detekována pozitivita/negativita MSP jednotlivých genů a pozitivita/negativita „consensus“ PCR.**

	SHP1+	SHP1-	DLC1+	DLC1-	p16+	p16-	p15+	p15-
<b>CDR3+</b>	22	0	28	4	6	5	18	4
<b>CDR3-</b>	17	2	12	9	1	8	10	4

#### 4.2.7. Kvantitativní MSP – MethyLight – pro gen DLC1

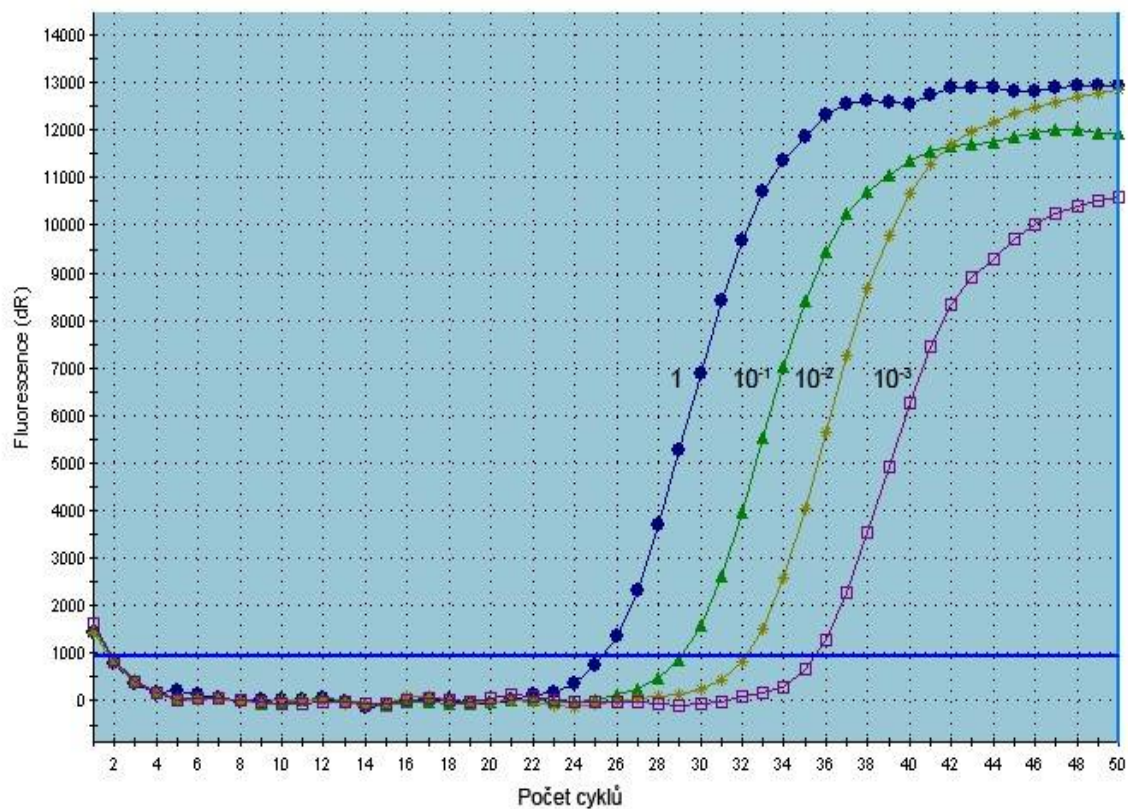
Vzhledem k poměrně vysokému procentu shody mezi MSP a „consensus“ PCR při analýze konsektivních vzorků CLL pacientů byla následně studována možnost využití metylace DNA jako markeru vhodného ke kvantitativní detekci změn množství leukemických buněk. Za tímto účelem byla zavedena kvantitativní verze MSP, tzv. MethyLight. Na základě dat získaných kvalitativní metylační analýzou byl ke kvantifikaci vybrán gen DLC1, jehož metylace byla detekována u naprosté většiny (90 %) pacientů s CLL.

K identifikaci detekčního limitu této metody byla exponenciálně naředěna komerčně dodávaná 100 % metylovaná DNA, a to až do ředění  $10^{-4}$ . Citlivost metody byla stanovena jako  $10^{-3}$  (obrázek 10).

Kvantitativní změny v metylaci DLC1 genu v závislosti na vývoji CLL byly analyzovány u 87 vzorků od 23 pacientů. Hladina metylace pro každého pacienta byla stanovena jako 1 pro primární diagnostický vzorek. Změny v míře DNA metylace byly u každého pacienta analyzovány u stejných typů vzorků (po FCR, po ASCT, při molekulárním relapsu) jako v případě kvalitativní MSP a navíc ještě u vzorků odebraných v době klinické progresse.

Kromě jednoho pacienta, u něhož zůstala hladina metylace DLC1 genu po FCR stejná, došlo u všech analyzovaných pacientů po léčbě FCR k poklesu metylace DLC1. U 9 ze 12

vzorků, u nichž byl detekován užitím „consensus“ PCR molekulární relaps onemocnění, došlo k jednoznačnému nárůstu metylace DLC1, u dalších 8 z 8 vzorků ve shodě s klinickou progresí nemoci došlo k dalšímu zvýšení míry metylace DLC1. U 3 ze 12 vzorků však nebyl pozorován nárůst metylace při molekulárním relapsu detekovaném pomocí „consensus“ PCR.

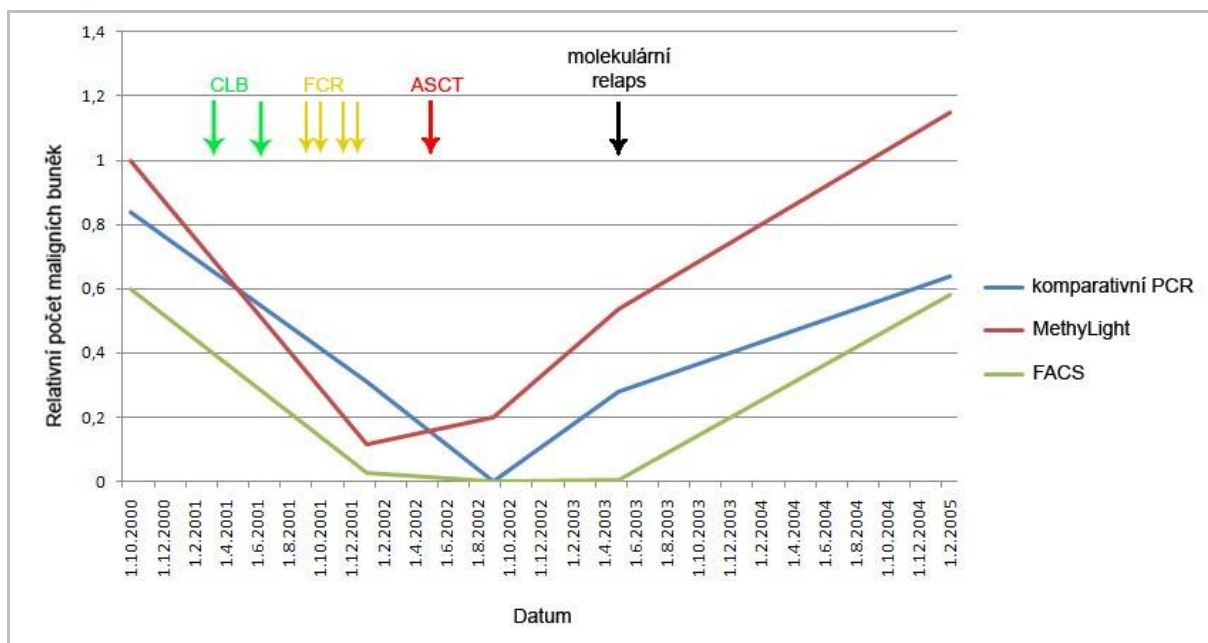


Obr. 10 Detekce citlivosti MethyLight (ředící řada pro gen DLC1).

#### 4.2.8. Kazuistiky

##### *Pacientka 1*

U 52 leté pacientky byla v roce 1996 diagnostikována CLL v klinickém stádiu I dle Raie. Pacientka byla až do konce roku 2000 bez léčby, poté došlo k vzestupu leukocytů až na hodnotu  $180 \times 10^9/l$ , objevila se periferní adenomegalie s hepatosplenomegalií, vyšší hladina  $\beta 2$ -mikroglobulinu a laktátdehydrogenázy, zdvojnásobení času lymfocytů byl 6 měsíců. Pacientka byla indikována k léčbě chlorambucilem (2 cykly, 10 mg/den) a dosáhla parciální remise. Došlo k dlouhodobému poklesu leukocytů. V srpnu 2001 došlo k progresi onemocnění do klinického stádia III dle Raie, současně byly přítomny B symptomy a rizikové faktory (nemutovaný IgVH gen a pozitivita CD38), proto byla pacientka indikována k terapii FCR, na podzim 2001 proběhly celkem 4 cykly. Výsledek léčby byl zhodnocen jako parciální remise. 6.5.2002 pacientka podstoupila autologní transplantaci po předchozí mobilizační léčbě R-ESAP a vysokodávkové chemoterapii BEAM. Restaging 100 dní (září 2002) po ASCT potvrdil kompletní remisi, včetně remise molekulární. Rok po transplantaci byl metodami PCR a průtokovou cytometrií opět zjištěn klon lymfocytů v kostní dřeni. Restaging po dvou letech od transplantace ukázal progresi infiltrace kostní dřene (obr. 11).

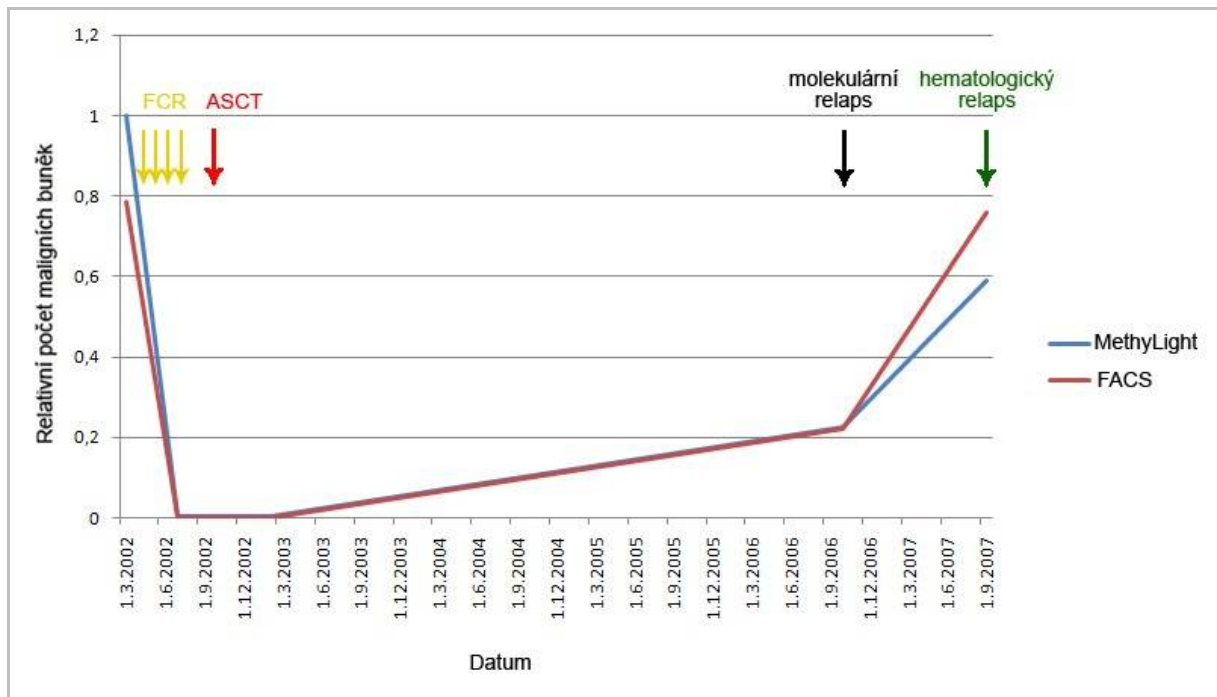


**Obr. 11 Kvantitativní monitorace maligního klonu v čase třemi různými metodami.** Změny v počtu maligních buněk byly sledovány průtokovou cytometrií (FACS, zeleně), MethyLight (červeně) a komparativní PCR (modře), která byla užívána na začátku této práce k monitoraci vývoje CLL u pacientů léčených FCR a FCR + ASCT. (Výsledky průtokové cytometrie uváděné v procentech maligních buněk byly pro potřeby grafu převedeny na relativní čísla (např. 80% na 0,8).) CLB, chlorambucil

### Pacient 2

Pacientovi byla v lednu 2002 ve věku 50 let diagnostikována CLL v klinickém stádiu II podle Raie s přítomností rizikových faktorů: masivní difúzní infiltrace kostní dřeně, vyšší hodnota  $\beta$ 2-mikroglobulinu a laktátdehydrogenázy a pozitivita CD38. Vzhledem k vysokému iniciálnímu počtu leukocytů (až  $120 \times 10^9/l$ ) proběhla v únoru 2002 cytoredukční léčba cyklofosfamidem per os, po které došlo k poklesu leukocytů na  $10-20 \times 10^9/l$ , nicméně postupně progredoval uzlinový syndrom. S přihlédnutím k věku a rizikovým faktorům byl pacient indikován k terapii FCR, která byla zahájena v dubnu 2002. Výsledek léčby byl zhodnocen jako kompletní klinická remise, zatímco přetrvávala pozitivita MRD hodnocená „consensus“ PCR. V říjnu 2002 pacient podstoupil autologní transplantaci po předchozí mobilizační léčbě ESAP a vysokodávkové chemoterapii BEAM. Restaging 100 dní po ASCT (únor 2003) potvrdil kompletní remisi, včetně remise molekulární (stanovené „consensus“

PCR). Molekulární relaps onemocnění byl detekován v říjnu 2006. O rok později došlo k hematologickému relapsu (obr. 12).



**Obr. 12 Kvantitativní monitoring změn v počtu leukemických buněk u pacienta léčeného FCR + ASCT užitím průtokové cytometrie (FACS, červeně) a MethyLight (modře). (Výsledky průtokové cytometrie uváděné v procentech maligních buněk byly pro potřeby grafu převedeny na relativní čísla (např. 80% na 0,8).)**

## 5. DISKUSE

Prvním cílem této práce bylo molekulární sledování efektu (ve své době) relativně nových léčebných režimů u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. V době zahájení této studie standardní přístup na našem pracovišti k pacientům vyžadujícím léčbu spočíval v podání čtyř cyklů kombinované imunochemoterapie rituximab, cyklofosfamid a fludaribin. Pacientům, kteří dobře zareagovali na tuto léčbu, byla následně nabídnuta autologní transplantace. Cílem práce bylo sestavit co největší soubor takto léčených pacientů a vyhodnotit efekt této léčby na úrovni dosažení či nedosažení molekulární remise.

Nejcitlivější metodou pro monitoraci minimální reziduální choroby u pacientů s CLL je alelově specifická PCR. Vzhledem k tomu, že v naší laboratoři nebyla tato technika dostupná, byla k detekci zbytkové nemoci užívána též dostatečně citlivá metoda „consensus PCR“. Kromě této kvalitativní detekce byl vývoj CLL v čase v závislosti na léčbě monitorován komparativní PCR, což je duplexní PCR využívající koamplifikace klonospecifického markeru a interního standardu. Metoda slouží ke zhodnocení relativních kvantitativních změn markeru specifického pro danou chorobu (CDR3 v případě CLL) v konsekutivních vzorcích DNA. Spolehlivost této metody byla v naší laboratoři ověřena srovnáním s výsledky získanými pomocí real time PCR [271], nicméně z dnešního pohledu se však již jedná o metodu obsoletní.

Na základě nových poznatků se ovšem později terapeutický přístup k pacientům s CLL, vyžadujících zahájení první linie léčby, na našem pracovišti změnil: byl zvýšen počet cyklů FCR ze čtyř na šest a od autologních transplantací bylo upuštěno. V důsledku této změny léčebné strategie se podařilo sestavit pouze limitovaný soubor pacientů, nicméně i v rámci omezeného počtu dat jsme získali výsledky, které podporovaly závěry větších studií.

Ve shodě se závěry, které uveřejnili Provan et al [73], se zdá, že pro další vývoj choroby, resp. budoucí relaps, není rozhodující, zda byly pacientovi transplantovány kontaminované či nekontaminované progenitorové buňky, ale dle výsledků předkládané práce je vysoce pravděpodobné, že jedním z určujících faktorů délky dosažené molekulární remise je stav kostní dřeně před transplantací.

V roce 2004 publikovali Dreger et al [272] výsledky retrospektivní studie, jež naznačovaly jednoznačnou výhodu pro pacienty, kteří podstoupili ASCT, ve srovnání s pacienty léčenými konvenční terapií. Navzdory prvotním optimistickým závěrům se ovšem

na podkladě dalších studií nepodařil prokázat kurativní efekt autologních transplantací, ani výrazné prodloužení doby přežití pro transplantované pacienty. Proti autologním transplantacím hovoří i zřejmě posttransplantačně zvýšené riziko rozvoje sekundárního myelodysplastického syndromu. Náš soubor transplantovaných pacientů sice vykazoval po ASCT statisticky významně delší molekulární remisi ve srovnání s pacienty, kteří tuto léčbu nepodstoupili, ale vzhledem k velmi rozptýleným hodnotám délek těchto remisí se statistická významnost tohoto výsledku pohybovala pouze na hladině 0,1. Navíc je nutno vzít v úvahu možný pozitivní nepoměr v selekci pacientů, kteří podstoupili autologní transplantaci. Ritgen et al [68] ukázali, že po ASCT dříve nebo později relabují všichni pacienti s nemutovanými IgVH geny – tedy ti, u kterých je indikována vysokodávková chemoterapie především.

Vzhledem k tomu, že „consensus“ PCR poskytuje pouze kvalitativní údaje s citlivostí nevyhovující standardům detekce minimální reziduální choroby u pacientů s CLL [74], bylo dalším cílem této práce pokusit se najít vhodný alternativní marker pro detekci MRD, resp. marker pro kvantitativní vyhodnocení změn množství leukemických buněk v čase. Jako potenciálně využitelná v detekci maligních buněk se jeví metylace DNA. Pokud by se takový epigenetický marker podařilo nalézt a zavést jeho detekci do praxe, znamenalo by to určitou časovou, finanční a technickou úsporu ve srovnání se stávající ASO PCR. Marker založený na detekci metylace DNA by byl totiž univerzální pro všechny pacienty s CLL (případně využitelný i u dalších diagnóz), takže by již nebyla nutná sekvenace klonu každého jednotlivého pacienta a návrh pacient-specifických primerů, jak to vyžaduje alelově specifická PCR.

Za tímto účelem bylo na základě studia literatury vybráno pět tumor supresorových genů a byla analyzována frekvence jejich metylace u pacientů s CLL. Navíc byl statisticky vyhodnocen i případný prognostický význam metylace těchto genů. Bylo zjištěno, že geny DLC1, SHP1 a p15 jsou u pacientů s CLL velmi často metylovány, zatímco metylace genu p16 byla detekována s nižší frekvencí a metylace laminy A/C nebyla detekována u žádného ze zkoumaných vzorků.

Mezi testovanými geny byl nejčastěji metylován DLC1. DLC1 byl identifikován jako potenciální tumor supresorový gen, jehož exprese byla snížena či úplně potlačena u různých typů nádorů v důsledku delece či aberantní metylace DNA [165,167-177]. Aberantní metylace tohoto genu byla detekována také u 60-90 % různých typů non-hodgkinských lymfomů [273,274]. V současnosti nejsou dostupná žádná publikovaná data týkající se metylace DLC1

u pacientů s CLL. V našem souboru byla metylace tohoto genu detekována u zhruba 90 %, což by mohlo implikovat jeho roli v leukemogenezi.

SHP1 byl dalším genem, jehož metylace byla detekována u velkého procenta pacientů. Snížená exprese tohoto genu byla nalezena u pacientů s různými typy leukémií, lymfomů a u pacientů s mnohočetným myelomem [197,275], nicméně zatím žádná studie nesledovala metylaci tohoto genu u CLL. V našem pilotním souboru pacientů byl promotor SHP1 metylován v 70 % případů. Tato frekvence je srovnatelná s dříve publikovanými výsledky, které uvádějí metylaci SHP1 u 94 % pacientů s leukémií [276] a u 75-100 % pacientů s non-hodgkinskými lymfomy [276,277].

p15 a p16 jsou dva úzce spjaté tumor supresorové geny lokalizované na 9p21 [206,207]. V nádorech je p16 inaktivován homozygotní delecí, bodovou mutací či metylací promotoru [278,279]. p15 bývá často homozygotně deletován spolu s homozygotní delecí p16 [280]. U hematologických malignit byla metylace p15 často detekována u leukémií a zřídka u lymfomů, zatímco v případě metylace p16 byl pozorován opačný jev, tedy častá metylace u lymfomů a sporadická u leukémií [281]. U CLL byla metylace obou genů detekována s nižší frekvencí, než tomu bylo v našem souboru. Methylace p15 byla nalezena u 12-35 % [282,283] pacientů a metylace p16 u méně než 20 % pacientů s CLL [283-285]. V našem pilotním souboru pacientů byla metylace p15 detekována u 62 % pacientů a metylace p16 u 31 % z nich.

Lamin A/C kóduje laminy A a C. Byla popsána snížená či chybějící exprese laminů A v některých buňkách s nízkým stupněm diferenciací a ve vysoce proliferujících buňkách [213,214], včetně buněk leukemických a lymfomových [215,216]. U pacientů s difúzním velkobuněčným lymfomem byla metylace laminu A/C spojená se špatnou prognózou [266]. Nicméně, v pilotním souboru CLL pacientů nebyla detekována metylace u žádného vzorku. Naše výsledky patrně odrážejí fakt, že CLL buňky jsou relativně dosti diferencované a málo proliferující.

Získané výsledky aberantní metylace výše uvedených genů byly následně korelovány s různými klinicko-patologickými charakteristikami pacientů, jako je věk, pohlaví, exprese CD38, klinické stádium dle Raie v době diagnózy a doba celkového přežití. Byla nalezena korelace mezi metylací genů DLC1 a p15. Statistická analýza dále prokázala, že současná metylace alespoň dvou genů koreluje s klinickým stádiem CLL dle Raie v době stanovení

diagnózy. Mezi analyzovanými geny byla také nalezena optimální kombinace dvojice genů (SHP1, p15) a trojice genů (SHP1, p15 a p16) schopna tuto korelaci predikovat. Tato data tak naznačují, že progresse nemoci je spojena s epigenetickou deregulací různých buněčných drah.

Vzhledem k tomu, že výše uvedená data byla získána analýzou jen malého vzorku pacientů, bylo potřeba je ověřit na větší skupině nemocných. Byl sestaven soubor čítající 82 pacientů. Pacienti byli v rámci dostupných možností vybíráni tak, aby byl výsledný soubor vyvážený z hlediska počtu pacientů s mutovaným a nemutovaným IgVH genem i z hlediska zastoupení jednotlivých klinických stádií dle Raie. Ve spolupráci s dalšími laboratoři byly získány i další údaje charakterizující prognózu těchto pacientů, jako jsou cytogenetické aberace a exprese ZAP-70 a CD38. Následně byly vzorky tohoto souboru pacientů podrobeny stejné analýze jako vzorky souboru pilotního. Kromě confirmace původních dat poskytla tato práce i nové poznatky. Statistická analýza prokázala souvislost mezi vyšším klinickým stádiem a metylací p15, resp. metylací SHP1. Zajímavá je i statisticky významná souvislost mezi metylací genu p16 a přítomností delecí 13q a 17p. Zmíněné delece však mají opačný prognostický dopad [20], proto je obtížné tento nález interpretovat. Následná analýza však neprokázala vliv aberantní metylace kteréhokoli z testovaných genů na celkovou dobu přežití těchto pacientů.

Dalším úkolem bylo ověřit, zda by metylace některého ze zkoumaných genů mohla být využitelná v detekci minimální reziduální choroby. Za tímto účelem byla srovnána shoda mezi detekcí pozitivitu klasického markeru proliferace B buněk (klonální přestavby CDR3) a detekcí metylace testovaných genů. Přestože citlivost obou metod byla stejná ( $1 \times 10^{-3}$ ), v detekci maligních buněk došlo ke shodě jen ve zhruba 60 %. Nejvyšší míra shody byla pozorována u genů DLC1 a p16 (70 %). Je zajímavé, že u dvou pacientů, u nichž iniciálně v době diagnózy nebyla detekována metylace p15 a SHP1, došlo k metylaci těchto genů až při záchytu molekulárního relapsu. Zdá se, že metylace těchto genů může být markerem klonální progresse u těchto pacientů. Tuto domněnku podporují i výše uvedené výsledky statistické analýzy, které potvrzují souvislost mezi vyšším klinickým stádiem a metylací těchto dvou genů. Jsou to i tyto dva geny, které na úrovni dvojic ze všech možných kombinací testovaných genů nejlépe predikují vyšší klinické stádium dle Raie. Je tedy možné předpokládat, že ztráta exprese těchto dvou genů může hrát roli v progresi onemocnění.

Podobný jev pozorovali i Chim et al. [243], kteří detekovali metylaci p16 u jednoho pacienta s akutní promyelocytární leukémií prvně až při relapsu. Obdobně i v dalších studiích

byla popsána spojitost mezi nově detekovanou metylací p16 a progresí T-buněčné leukémie a dalších typů invazivních či metastazujících malignit [218,286-288]. Metylace p15 byla navíc detekována i v souvislosti s leukemickou transformací myelodysplastického syndromu [289].

Pro ověření hypotézy o využitelnosti epigenetických modifikací DNA jako molekulárních markerů k detekci maligních buněk byl na podkladě vysokého procenta metylovaných vzorků vybrán gen DLC1. Byl testován vztah mezi změnou hladiny metylace DLC1 a klinickým obrazem pacienta i případná paralela s výsledky získanými jinými metodami. Na základě získaných výsledků se tento gen zdá být nadějným adeptem pro detekci maligních buněk, resp. sledování změn v jejich počtu, nicméně je nutno vzít v úvahu několik pozorovaných diskrepancí. U jednoho pacienta nebyla pozorována změna hladiny metylace DLC1 po léčbě, přestože klinicky tento pacient dosáhl regrese. To může být zapříčiněno absencí metylace DNA maligních buněk u tohoto pacienta, takže analýza DLC1 je v tomto případě neinformativní. U tří pacientů nezachytila analýza metylace DLC1 molekulární relaps. Vzhledem k tomu, že byly sledovány pouze relativní změny hladiny metylace a míra metylace jednotlivých vzorků nebyla nijak kvantifikována, je možné, že u těchto pacientů byla iniciální úroveň metylace příliš nízká, podobně jako u výše zmiňovaného pacienta.

Vzhledem k tomu, že v popsaném uspořádání se citlivost MethyLight pohybovala mezi  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ , byla analyzována pouze schopnost metody detekovat relativní změny v počtu buněk v čase, nikoliv kvantifikace maligního klonu jako taková. Získané výsledky jsou nicméně podnětem k tomu, aby byla metodika v tomto smyslu optimalizována, např. návrhem jiného setu primerů a sondy.

V poslední době dochází k rychlému rozvoji technologií umožňujících identifikaci metylovaných promotorů. Tyto metody budou užitečné při hledání genů s vysokou prediktivní hodnotou pro detekci minimální reziduální choroby. Vzhledem k tomu, že metylace DNA byla popsána u celého spektra onkologických onemocnění, zdá se, že by po validacích v prospektivních studiích mohla detekce reziduální choroby pomocí metylace DNA být široce aplikovatelná a využitelná zejména u těch diagnóz, u nichž v současnosti nejsou dostupné vhodné markery pro detekci reziduální choroby.

## **6. ZÁVĚR**

Tato práce se zabývá detekcí reziduální choroby u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Vzhledem k tomu, že toto onemocnění na rozdíl od některých jiných

hematologických malignit nemá svůj specifický molekulární marker, je detekce MRD o něco náročnější.

Na souboru 29 pacientů byl s využitím „consensus“ PCR a komparativní PCR sledován efekt (z hlediska dosažení či nedosažení molekulární remise) imunochemoterapeutické kombinace fludarabin, cyklofosfamid a rituximab. Šestnáct pacientů následně podstoupilo autologní transplantaci. Bylo zjištěno, že autologní transplantace zřejmě zásadně neprodloužila dobu molekulární remise pacientům, kteří ji podstoupili, ve srovnání s pacienty netransplantovanými, nicméně se zdá, že délka remise transplantovaných pacientů byla ovlivněna detekovatelnou přítomností leukemických buněk, zatímco kontaminace transplantovaných progenitorových buněk buňkami leukemickými byla v tomto směru bezvýznamná.

Vzhledem k tomu, že „consensus“ PCR není dostatečně citlivou metodou pro detekci zbytkové choroby, byl hledán potenciální nový marker založený na detekci metylace DNA. Bylo vybráno 5 genů (DLC1, SHP1, p15, p16, lamin A/C) a analyzována frekvence jejich metylace u testovaného souboru pacientů, navíc byla statisticky vyhodnocena případná korelace mezi metylací těchto genů a vybranými klinicko-patologickými charakteristikami pacientů. Bylo zjištěno, že ze zkoumaného panelu genů byly nejčastěji metylovány DLC1 a SHP1, zatímco lamin A/C nebyl metylován u žádného vzorku. Byla nalezena korelace mezi vyšším klinickým stádiem dle Raie a větším počtem současně metylovaných genů. Výsledky této analýzy byly ověřeny (a potvrzeny) na souboru 82 pacientů. Dále bylo zjištěno, že metylace genů p15 a SHP1 může zřejmě hrát roli v progresi tohoto onemocnění, nicméně metylace žádného z testovaných genů neměla vliv na celkovou dobu přežití těchto pacientů. DLC1, který byl metylován u 90 % nemocných, byl testován z hlediska možného využití detekce CLL buněk a jejich kvantifikace. Na základě výsledků získaných pomocí PCR v reálném čase se zdá, že tento gen může být vhodným markerem pro kvantitativní detekci maligních buněk u pacientů s CLL.

## LITERATURA

1. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 2007;139:672-686
2. Parkin DM. *Cancer Incidence in Five Continents*. Lyon; 1997

3. Lin AY, Li, F.P. Etiology and epidemiology of chronic leukemias. In: WIERNIK PH, CANELLOS, G.P., DUTCHER, J.P., KYLE, R.A. ed, Neoplastic Diseases of the Blood. New York: Churchill-Livingstone; 1996:9-20
4. Dighiero G, Travade P, Chevret S, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* 1991;78:1901-1914
5. Blair A, Purdue MP, Weisenburger DD, Baris D. Chemical exposures and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;139:753-761
6. Caporaso N, Marti GE, Goldin L. Perspectives on familial chronic lymphocytic leukemia: genes and the environment. *Semin Hematol* 2004;41:201-206
7. Linet MS, Van Natta ML, Brookmeyer R, et al. Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia. A case-control study. *Am J Epidemiol* 1989;130:655-664
8. Cuttner J. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest* 1992;10:103-109
9. Radovanovic Z, Markovic-Denic L, Jankovic S. Cancer mortality of family members of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Epidemiol* 1994;10:211-213
10. Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet* 1996;59:990-998
11. Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:186-194
12. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410-1416
13. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986;62:567-575
14. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, et al. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984;64:642-648
15. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1989;81:181-185
16. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:1732-1737
17. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-1775
18. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847
19. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;121:287-295
20. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916
21. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854
22. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, et al. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1404-1409
23. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363:105-111
24. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-1184

25. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901
26. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:3928-3932
27. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234
28. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206
29. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;115:854-861
30. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002;99:4087-4093
31. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-1638
32. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-1647
33. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 2003;21:841-894
34. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998;102:1515-1525
35. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994;15:288-294
36. Potter KN, Orchard J, Critchley E, et al. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood* 2003;101:3082-3084
37. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:150-156
38. Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, et al. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93:2327-2335
39. Cragg MS, Chan HT, Fox MD, et al. The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood* 2002;100:3068-3076
40. Ferrarini M, Chiorazzi N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2004;41:207-223
41. Damle RN, Fais F, Ghiotto F, et al. Chronic lymphocytic leukemia: a proliferation of B cells at two distinct stages of differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;252:285-292
42. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004;103:375-382
43. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678-1685
44. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004;113:1008-1016
45. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:455-468

46. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-4951
47. Durig J, Nuckel H, Cremer M, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17:2426-2434
48. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:1135-1144
49. Damle RN, Temburni S, Calissano C, et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 2007;110:3352-3359
50. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*;10:37-50
51. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524-15529
52. Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999;77:266-281
53. Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995;9:2003-2008
54. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997;89:2516-2522
55. Neilson JR, Auer R, White D, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 1997;11:1929-1932
56. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11837-11841
57. Starostik P, Manshouri T, O'Brien S, et al. Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1998;58:4552-4557
58. Zenz T, Krober A, Scherer K, 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;112:3322-3329
59. Malcikova J, Tichy B, Damborsky J, et al. Analysis of the DNA-binding activity of p53 mutants using functional protein microarrays and its relationship to transcriptional activation. *Biol Chem*;391:197-205
60. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002;100:635-639
61. Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009;114:33-37
62. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002;100:2289-2290
63. Landgren O, Albitar M, Ma W, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360:659-667
64. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008;359:575-583

65. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:230-239
66. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:4079-4088
67. Varghese AM, Rawstron AC, Hillmen P. Eradicating minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia: should this be the goal of treatment? *Curr Hematol Malig Rep*;5:35-44
68. Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, et al. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;101:2049-2053
69. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-1751
70. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20:1783-1789
71. Owen RG, Johnson RJ, Rawstron AC, et al. Assessment of IgH PCR strategies in multiple myeloma. *J Clin Pathol* 1996;49:672-675
72. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317
73. Provan D, Bartlett-Pandite L, Zwicky C, et al. Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 1996;88:2228-2235
74. Bottcher S, Ritgen M, Pott C, et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2004;18:1637-1645
75. Voena C, Ladetto M, Astolfi M, et al. A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia* 1997;11:1793-1798
76. Pekova S, Markova J, Pajer P, et al. Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgV(H) rearrangement and Sybr-Green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn* 2005;9:23-34
77. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 2001;98:29-35
78. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007;21:956-964
79. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21
80. Annunziato AT, Hansen JC. Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. *Gene Expr* 2000;9:37-61
81. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769-773
82. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 1983;52:93-124
83. Riggs AD, Jones PA. 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1983;40:1-30
84. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321:209-213
85. Antequera F, Bird A. CpG islands. *EXS* 1993;64:169-185
86. Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 1985;40:91-99
87. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8

88. Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987;99:371-382
89. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 1992;6:705-714
90. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:101-118
91. Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 1988;203:971-983
92. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-257
93. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998;20:116-117
94. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-428
95. Tycko B. DNA methylation in genomic imprinting. *Mutat Res* 1997;386:131-140
96. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;13:335-340
97. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000;1:11-19
98. Iguchi-Arigo SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 1989;3:612-619
99. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:226-231
100. Nan X, Cross S, Bird A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp* 1998;214:6-16; discussion 16-21, 46-50
101. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99:451-454
102. Karpf AR, Jones DA. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* 2002;21:5496-5503
103. Manoharan M, Ramachandran K, Soloway MS, Singal R. Epigenetic targets in the diagnosis and treatment of prostate cancer. *Int Braz J Urol* 2007;33:11-18
104. Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, et al. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 1993;2:731-735
105. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, et al. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89:121-128
106. Kondo T, Bobek MP, Kuick R, et al. Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum Mol Genet* 2000;9:597-604
107. Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, et al. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 2000;47:670-679
108. Wan M, Lee SS, Zhang X, et al. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 1999;65:1520-1529
109. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185-188
110. Webb T, Latif F. Rett syndrome and the MECP2 gene. *J Med Genet* 2001;38:217-223
111. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303
112. Petronis A. The genes for major psychosis: aberrant sequence or regulation? *Neuropsychopharmacology* 2000;23:1-12
113. Petronis A, Gottesman, II, Crow TJ, et al. Psychiatric epigenetics: a new focus for the new century. *Mol Psychiatry* 2000;5:342-346
114. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-167

115. Lapeyre JN, Becker FF. 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;87:698-705
116. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 1983;11:6883-6894
117. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054
118. Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC, Ehrlich M. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* 1999;423:91-101
119. Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:34-39
120. Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:359-367
121. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686-692
122. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9700-9704
123. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132-138
124. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-3229
125. Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001;10:3001-3007
126. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No 1:R50-59
127. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* 2003;109:80-88
128. Galm O, Esteller M. Beyond genetics--the emerging role of epigenetic changes in hematopoietic malignancies. *Int J Hematol* 2004;80:120-127
129. Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:26-32
130. Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* 1999;93:4347-4353
131. Li Y, Nagai H, Ohno T, et al. Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* 2002;100:2572-2577
132. Rossi D, Capello D, Gloghini A, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica* 2004;89:154-164
133. Ng MH, Chung YF, Lo KW, et al. Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* 1997;89:2500-2506
134. Gonzalez M, Mateos MV, Garcia-Sanz R, et al. De novo methylation of tumor suppressor gene p16/INK4a is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis. *Leukemia* 2000;14:183-187
135. Guillermin G, Gyan E, Wolowicz D, et al. p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2001;98:244-246
136. Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 2003;101:2784-2788
137. Ng MH, To KW, Lo KW, et al. Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1724-1729

138. Seidl S, Ackermann J, Kaufmann H, et al. DNA-methylation analysis identifies the E-cadherin gene as a potential marker of disease progression in patients with monoclonal gammopathies. *Cancer* 2004;100:2598-2606
139. Galm O, Wilop S, Reichelt J, et al. DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18:1687-1692
140. Nguyen TT, Mohrbacher AF, Tsai YC, et al. Quantitative measure of c-abl and p15 methylation in chronic myelogenous leukemia: biological implications. *Blood* 2000;95:2990-2992
141. Sun B, Jiang G, Zaydan MA, et al. ABL1 promoter methylation can exist independently of BCR-ABL transcription in chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Cancer Res* 2001;61:6931-6937
142. Jost E, do ON, Dahl E, et al. Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2007;21:505-510
143. Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:2217-2224
144. Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia* 2003;17:1845-1850
145. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196:1-7
146. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999;59:3730-3740
147. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, et al. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:2823-2829
148. Chen CY, Tsay W, Tang JL, et al. SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:300-305
149. Galm O, Wilop S, Luders C, et al. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 2005;84 Suppl 1:39-46
150. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, et al. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1992;80:2074-2080
151. de Capoa A, Grappelli C, Febbo FR, et al. Methylation levels of normal and chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes: computer-assisted quantitative analysis of anti-5-methylcytosine antibody binding to individual nuclei. *Cytometry* 1999;36:157-159
152. Raval A, Byrd JC, Plass C. Epigenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:157-166
153. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820-1828
154. Kantharidis P, El-Osta A, deSilva M, et al. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res* 1997;3:2025-2032
155. Yuille MR, Condie A, Stone EM, et al. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:336-341
156. Pekarsky Y, Hallas C, Croce CM. The role of TCL1 in human T-cell leukemia. *Oncogene* 2001;20:5638-5643
157. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6955-6960
158. Rush LJ, Raval A, Funchain P, et al. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. *Cancer Res* 2004;64:2424-2433
159. Kanduri M, Cahill N, Goransson H, et al. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*;115:296-305
160. Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3877-3885

161. Fulop Z, Csernus B, Timar B, Szepesi A, Matolcsy A. Microsatellite instability and hMLH1 promoter hypermethylation in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17:411-415
162. Melki JR, Vincent PC, Brown RD, Clark SJ. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood* 2000;95:3208-3213
163. Kn H, Bassal S, Tikellis C, El-Osta A. Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancer Biol Ther* 2004;3:989-994
164. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002;295:1079-1082
165. Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, et al. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res* 1998;58:2196-2199
166. Durkin ME, Yuan BZ, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap7). *Gene* 2002;288:119-127
167. Guan M, Zhou X, Soultz N, Spandidos DA, Popescu NC. Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical applications. *Clin Cancer Res* 2006;12:1412-1419
168. Kim TY, Jong HS, Song SH, et al. Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. *Oncogene* 2003;22:3943-3951
169. Kim TY, Lee JW, Kim HP, et al. DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:72-77
170. Ng IO, Liang ZD, Cao L, Lee TK. DLC-1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted DLC-1. *Cancer Res* 2000;60:6581-6584
171. Plaumann M, Seitz S, Frege R, Estevez-Schwarz L, Scherneck S. Analysis of DLC-1 expression in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:349-354
172. Seng TJ, Low JS, Li H, et al. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene* 2007;26:934-944
173. Song YF, Xu R, Zhang XH, et al. High-frequency promoter hypermethylation of the deleted in liver cancer-1 gene in multiple myeloma. *J Clin Pathol* 2006;59:947-951
174. Ullmannova V, Popescu NC. Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors. *Int J Oncol* 2006;29:1127-1132
175. Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:7646-7651
176. Yuan BZ, Durkin ME, Popescu NC. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140:113-117
177. Yuan BZ, Jefferson AM, Baldwin KT, et al. DLC-1 operates as a tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2004;23:1405-1411
178. Goodison S, Yuan J, Sloan D, et al. The RhoGAP protein DLC-1 functions as a metastasis suppressor in breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:6042-6053
179. Wong CM, Yam JW, Ching YP, et al. Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:8861-8868
180. Yuan BZ, Zhou X, Durkin ME, et al. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity. *Oncogene* 2003;22:445-450
181. Zhou X, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:1308-1313

182. Sekimata M, Kabuyama Y, Emori Y, Homma Y. Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem* 1999;274:17757-17762
183. Hers I, Wherlock M, Homma Y, Yagisawa H, Tavare JM. Identification of p122RhoGAP (deleted in liver cancer-1) Serine 322 as a substrate for protein kinase B and ribosomal S6 kinase in insulin-stimulated cells. *J Biol Chem* 2006;281:4762-4770
184. Shen SH, Bastien L, Posner BI, Chretien P. A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* 1991;352:736-739
185. Banville D, Stocco R, Shen SH. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* 1995;27:165-173
186. Healy JI, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:645-670
187. Brockdorff J, Williams S, Couture C, Mustelin T. Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1. *Eur J Immunol* 1999;29:2539-2550
188. Pani G, Fischer KD, Mlinaric-Rascan I, Siminovitch KA. Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 1996;184:839-852
189. Migone TS, Cacalano NA, Taylor N, et al. Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3845-3850
190. Blasioli J, Paust S, Thomas ML. Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22. *J Biol Chem* 1999;274:2303-2307
191. Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG. Regulation of B cell antigen receptor signaling by the Lyn/CD22/SHP1 pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;244:57-68
192. Binstadt BA, Billadeau DD, Jevremovic D, et al. SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem* 1998;273:27518-27523
193. Mizuno K, Katagiri T, Hasegawa K, Ogimoto M, Yakura H. Hematopoietic cell phosphatase, SHP-1, is constitutively associated with the SH2 domain-containing leukocyte protein, SLP-76, in B cells. *J Exp Med* 1996;184:457-463
194. Wu Y, Nadler MJ, Brennan LA, et al. The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Curr Biol* 1998;8:1009-1017
195. Fusaki N, Tomita S, Wu Y, et al. BLNK is associated with the CD72/SHP-1/Grb2 complex in the WEHI231 cell line after membrane IgM cross-linking. *Eur J Immunol* 2000;30:1326-1330
196. Wang LL, Blasioli J, Plas DR, Thomas ML, Yokoyama WM. Specificity of the SH2 domains of SHP-1 in the interaction with the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor gp49B. *J Immunol* 1999;162:1318-1323
197. Oka T, Ouchida M, Koyama M, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* 2002;62:6390-6394
198. Tabrizi M, Yang W, Jiao H, et al. Reduced Tyk2/SHP-1 interaction and lack of SHP-1 mutation in a kindred of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leukemia* 1998;12:200-206
199. Plutzky J, Neel BG, Rosenberg RD, et al. Chromosomal localization of an SH2-containing tyrosine phosphatase (PTPN6). *Genomics* 1992;13:869-872
200. Walton KM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1993;62:101-120
201. Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New variations of human SHP-1. *Immunogenetics* 1999;49:577-579
202. Oka T, Yoshino T, Hayashi K, et al. Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias : combination analysis with cDNA expression array and tissue microarray. *Am J Pathol* 2001;159:1495-1505
203. Tsui HW, Hasselblatt K, Martin A, Mok SC, Tsui FW. Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression. *Eur J Biochem* 2002;269:3057-3064

204. Bruecher-Encke B, Griffin JD, Neel BG, Lorenz U. Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation. *Leukemia* 2001;15:1424-1432
205. Zapata PD, Ropero RM, Valencia AM, et al. Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:915-926
206. Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-756
207. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440
208. Hirama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995;86:841-854
209. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998;12:845-859
210. Gruenbaum Y, Wilson KL, Harel A, Goldberg M, Cohen M. Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 2000;129:313-323
211. Hutchison CJ, Worman HJ. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol* 2004;6:1062-1067
212. Broers JL, Hutchison CJ, Ramaekers FC. Laminopathies. *J Pathol* 2004;204:478-488
213. Rober RA, Weber K, Osborn M. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 1989;105:365-378
214. Broers JL, Machiels BM, Kuijpers HJ, et al. A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 1997;107:505-517
215. Stadelmann B, Khandjian E, Hirt A, et al. Repression of nuclear lamin A and C gene expression in human acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma cells. *Leuk Res* 1990;14:815-821
216. Lin F, Worman HJ. Expression of nuclear lamins in human tissues and cancer cell lines and transcription from the promoters of the lamin A/C and B1 genes. *Exp Cell Res* 1997;236:378-384
217. Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:293-301
218. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11891-11896
219. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:332-339
220. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000;60:5954-5958
221. Kersting M, Friedl C, Kraus A, et al. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000;18:3221-3229
222. Kurakawa E, Shimamoto T, Utsumi K, et al. Hypermethylation of p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2001;19:277-281
223. Chan EC, Lam SY, Tsang KW, et al. Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage. *Clin Cancer Res* 2002;8:3741-3746
224. Ng CS, Zhang J, Wan S, et al. Tumor p16M is a possible marker of advanced stage in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2002;79:101-106
225. Wang YC, Lu YP, Tseng RC, et al. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest* 2003;111:887-895
226. Liu Y, An Q, Li L, et al. Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients: biological and clinical implications. *Carcinogenesis* 2003;24:1897-1901

227. Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, et al. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2284-2288
228. Goessl C, Krause H, Muller M, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000;60:5941-5945
229. Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2001;7:2727-2730
230. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1747-1752
231. Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 2001;357:1335-1336
232. Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2004;10:28-32
233. Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, et al. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004;363:1283-1285
234. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:939-942
235. Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenomics* 2005;5:223-232
236. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004;10:1871-1874
237. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000;60:6039-6044
238. House MG, Guo M, Efron DT, et al. Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg* 2003;7:1004-1014; discussion 1014
239. Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 2004;64:3807-3813
240. Leung WK, To KF, Chu ES, et al. Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2005;92:2190-2194
241. Sathyanarayana UG, Padar A, Suzuki M, et al. Aberrant promoter methylation of laminin-5-encoding genes in prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2003;9:6395-6400
242. Sathyanarayana UG, Maruyama R, Padar A, et al. Molecular detection of noninvasive and invasive bladder tumor tissues and exfoliated cells by aberrant promoter methylation of laminin-5 encoding genes. *Cancer Res* 2004;64:1425-1430
243. Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol* 2001;19:2033-2040
244. Roman J, Castillejo JA, Jimenez A, et al. Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome. *Br J Haematol* 2001;113:329-338
245. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2291-2296
246. Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, et al. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 2001;10:1413-1419

247. Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:39-49
248. Oakeley EJ, Schmitt F, Jost JP. Quantification of 5-methylcytosine in DNA by the chloroacetaldehyde reaction. *Biotechniques* 1999;27:744-746, 748-750, 752
249. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-9826
250. Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* 2004;333:119-127
251. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-1831
252. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2532-2534
253. Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res* 1997;25:2529-2531
254. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2990-2997
255. Wong IH, Lo YM, Zhang J, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:71-73
256. Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 2000;95:1942-1949
257. Wong IH, Lo YM, Yeo W, Lau WY, Johnson PJ. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:3516-3521
258. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32
259. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 1999;59:2302-2306
260. Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by MethyLight technology. *Methods* 2001;25:456-462
261. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 2006;8:209-217
262. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6823-6836
263. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-4997
264. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215
265. Slavickova A, Ullmannova V, Klener P. Optimized multiplex IgH/ras PCR: a tool for quantitative monitoring of B-lymphoproliferative disorders. *Biotechniques* 2000;28:716-718, 720-711
266. Agrelo R, Setien F, Espada J, et al. Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:3940-3947
267. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3410-3418

268. Berkova A, Pavlistova L, Babicka L, et al. Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 2008;55:400-408
269. Durig J, Naschar M, Schmucker U, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002;16:30-35
270. Roth Z, Jozifko, M., Malý, V., Trčka, V. *Statistické metody v experimentální medicíně*. Praha: SZN; 1962
271. Slavickova A, Forsterova K, Ivanek R, Cerny J, Klener P. The use of comparative duplex PCR in monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Folia Biol (Praha)* 2005;51:177-179
272. Dreger P, Stilgenbauer S, Benner A, et al. The prognostic impact of autologous stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia: a risk-matched analysis based on the VH gene mutational status. *Blood* 2004;103:2850-2858
273. Shi H, Guo J, Duff DJ, et al. Discovery of novel epigenetic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Carcinogenesis* 2007;28:60-70
274. Ying J, Li H, Murray P, et al. Tumor-specific methylation of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 is an epigenetic biomarker for Hodgkin, nasal NK/T-cell and other types of lymphomas. *Epigenetics* 2007;2:15-21
275. Zhang Q, Raghunath PN, Vonderheid E, Odum N, Wasik MA. Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am J Pathol* 2000;157:1137-1146
276. Reddy J, Shivapurkar N, Takahashi T, et al. Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. *Oncogene* 2005;24:732-736
277. Koyama M, Oka T, Ouchida M, et al. Activated proliferation of B-cell lymphomas/leukemias with the SHP1 gene silencing by aberrant CpG methylation. *Lab Invest* 2003;83:1849-1858
278. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 1995;11:210-212
279. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530
280. Chim CS, Liang R, Kwong YL. Hypermethylation of gene promoters in hematological neoplasia. *Hematol Oncol* 2002;20:167-176
281. Herman JG, Civin CI, Issa JP, et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:837-841
282. Papageorgiou SG, Lambropoulos S, Pappa V, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene promoter in B-chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007;82:824-825
283. Chim CS, Fung TK, Wong KF, et al. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. *J Clin Pathol* 2006;59:921-926
284. Tsirigotis P, Pappa V, Labropoulos S, et al. Mutational and methylation analysis of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16INK4A) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2006;76:230-236
285. Martel V, Guerci A, Humbert JC, et al. De novo methylation of tumour suppressor genes CDKN2A and CDKN2B is a rare finding in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;99:320-324
286. Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, et al. Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 2000;60:1043-1048
287. Maesawa C, Tamura G, Nishizuka S, et al. Inactivation of the CDKN2 gene by homozygous deletion and de novo methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3875-3878
288. Reed JA, Loganzo F, Jr., Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995;55:2713-2718

289. Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998;91:2985-2990

## **PŘÍLOHA – SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA**

### **Publikace v přímé souvislosti s tématem dizertační práce:**

1. Slavičková A, Forsterová K, Ivánek R, Černý J, Klener P.

The use of comparative duplex PCR in monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia

*Folia Biologica* 2005; 51: 177-179 (IF: 0,719)

2. Forsterová K, Votavová H, Schwarz J, Karban J, Štuka Č, Trněný M.

Advanced Rai stage in patients with chronic lymphocytic leukemia correlates with simultaneous hypermethylation of plural tumor suppressor genes

Přijato k publikaci, Folia Biologica (IF v roce 2008: 1,140)

### **Publikace v širší souvislosti s tématem dizertační práce**

1. Votavová H, Forsterová K, Stříteský J, Velenská Z, Trněný M.

Optimized protocol for gene expression analysis in formalin – fixed, paraffin – embedded tissue using real-time quantitative polymerase chain reaction

Diagn Mol Pathol 2009; 18: 176-182 (IF: 1,770)

2. Votavová H, Forsterová K, Campr V, Stříteský J, Velenská Z, Pytlík R, Kubáčková K, Procházka B, Kodet R, Špička I, Krejčová H, Trněný M, Klener P.

Distinguishing of primary mediastinal B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma using real-time quantitative polymerase chain reaction

Přijato k publikaci, Neoplasma (IF v roce 2008: 1,208)

### **Publikace bez souvislosti s tématem dizertační práce**

1. Stiborová M, Sejbal J, Borek-Dohalská L, Aimová D, Poljaková J, Forsterová K, Rupertová M, Wiesner J, Hudecek J, Wiessler M, Frei E.

The anticancer drug ellipticine forms covalent adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide

Cancer Res 2004; 64: 8374-8380 (IF: 7,4)

2. Poljaková J, Forsterová K, Šulc M, Frei E, Stiborová M.

Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases

Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2005; 149: 449-453 (bez IF)

3. Haber J, Forsterová K.

Primární antimykotická profylaxe u nemocných po autologní transplantaci kostní dřeně: ano či ne?

Mimořádná příloha Postgraduální medicíny 2009; s.10-15 (bez IF)

4. Haber J, Forsterová K.

Terminologie, definice mykotické infekce, doporučené léčebné postupy

s.144-163. In: Cetkovský P, Kouba M: Diferenciální diagnostika plicních infiltrátů a pokroky v léčbě mykotických infekcí u imunokompromitovaných pacientů, Triton, 2009, ISBN 978-80-7387-343-1

## **Postery**

### **Euromedlab Congress, Barcelona 2003**

Slavičková A, Forsterová K, Šálková J, Trněný M.

Quantitative molecular monitoring of tumor cells in chronic lymphocytic leukemia treated with combined chemo/immunotherapy

Clin Chem Lab Med 2003; suppl: S504

### **III. Mezioborová konference mladých chemiků a biologů, 2003**

Forsterová K, Pulkrábková K, Slavičková A.

Quantitative molecular monitoring of patients with B-CLL treated with anti-CD 20 antibodies and purine analog

(Chem. Listy 2003; 97: 290)

### **Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd, Špindlerův Mlýn, 5.-9.9. 2008**

Forsterová K, Votavová H, Schwarz J, Běláček J, Štuka Č, Karban J, Trněný M.

Aberantní metylace promotorů vybraných genů u chronické lymfocytární leukémie – výsledky pilotní studie

(Trans. Hemat. Dnes 2008; suppl. 2: 18)

### **European Hematology Association – 14th congress, Berlín, 4.-7.6.2009**

Votavová H, Forsterová K, Campr V, Stříteský J, Velenská Z, Pytlík R, Kubáčková K, Procházka B, Kodet R, Trněný M.

Distinguishing of primary mediastinal B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma using real-time quantitative polymerase chain reaction

(Haematologica 2009; suppl. 2: 274)

### **European Hematology Association – 15th congress, Barcelona, 10.-13.6.2010**

Votavová H, Forsterová K, Campr V, Stříteský J, Velenská Z, Pytlík R, Procházka B, Trněný M.

Limited number of genes distinguishes between germinal centre-like and nongerminal centre-like diffuse large B cell lymphoma

