

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Petra Tauchmanová

Význam somatických mutací u chronické lymfatické leukémie

Significance of somatic mutations in chronic lymphocytic leukemia

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karina Vargová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 5. 2016

.....
Petra Tauchmanová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce RNDr. Karině Vargové Ph.D. za vstřícnost, ochotu a čas, který mi věnovala během psaní této práce.

Mé poděkování patří také členům vědeckého týmu Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK pod vedením Prof. MUDr. Tomáše Stopky Ph.D. za milé přijetí a přínosné rady.

Abstrakt

Chronická lymfatická leukémie (CLL) je považována za nejčastěji se vyskytující leukemické onemocnění v Evropě a USA, postihující převážně osoby vyššího věku (median, 70 let). Jedná se o lymfoproliferativní onemocnění charakteristické akumulací maturovaných B-lymfocytů v krvi, kostní dřeni a lymfatických uzlinách. CLL buňky mají delší dobu přežití než zdravé B-lymfocyty v důsledku porušené regulace buněčného cyklu a apoptotické dráhy. Při onemocnění CLL je možné v leukemických buňkách detekovat velké množství chromozomálních aberací a genetických abnormalit. Díky rozšíření metod sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS) bylo objeveno mnoho somatických mutací vyskytujících se v buňkách CLL. Analýza somatických mutací u CLL napomáhá k detailnějšímu pochopení molekulární podstaty onemocnění a otevírá nové možnosti pro případnou personalizovanou léčbu.

Hlavním předmětem této práce je krátká charakteristika onemocnění a shrnutí poznatků z recentních sekvenačních studií u B-lymfocytární chronické lymfatické leukémie.

Klíčová slova

Chronická lymfatická leukémie, somatické mutace, B-lymfocyty, sekvenování druhé generace, variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) represents the most prevalent leukemia in Europe and USA. CLL affects predominately elderly people (median age, 70y). This lymphoproliferative disorder is characterised by an accumulation of mature B-cells in the peripheral blood, bone marrow and lymph nodes. The lifespan of CLL cells is longer than normal healthy B-cells due to impaired cell cycle and apoptosis. CLL cells display several chromosomal aberrations and genetic abnormalities. The next generation sequencing revealed many somatic mutations in CLL cells. Analysis of these somatic mutations in CLL facilitates detail understanding at the disease molecular basis and opens new possibilities to the personalised therapy.

The main aim of this thesis is brief description of CLL as disease and to summarise the recent knowledge in the field of next generation sequencing with attention to CLL.

Key words

Chronic lymphocytic leukemia, somatic mutations, B-lymphocytes, next generation sequencing, immunoglobulin heavy chain variable

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Chronická lymfatická leukemie (CLL).....	2
2.1	Charakteristika CLL.....	2
2.2	Etiologie CLL.....	2
2.2.1	Diagnostika CLL.....	3
2.2.2	Mutace genu <i>IGHV</i> (dříve uváděný také jako <i>IgVH</i>).....	4
2.2.3	Expresce proteinu ZAP-70.....	4
2.2.4	Detekce CD38 na povrchu CLL buněk.....	5
2.2.5	Výskyt chromozomálních aberací.....	5
2.3	Léčba CLL.....	8
3	Progrese CLL na buněčné úrovni.....	9
3.1	Klonální evoluce leukemických buněk.....	9
3.1.1	Subklonální expanze způsobující relaps.....	10
3.2	Vznik a vývoj mutací u CLL.....	11
4	Vybrané somatické mutace u CLL.....	12
4.1	Gen <i>TP53</i>	14
4.1.1	Charakteristika proteinu p53.....	14
4.1.2	Mutace <i>TP53</i> u CLL.....	15
4.2	Gen <i>SF3B1</i>	16
4.2.1	Charakteristika proteinu SF3b155.....	16
4.2.2	Mutace <i>SF3B1</i> u CLL.....	17
4.3	Gen <i>ATM</i>	18
4.3.1	Charakteristika proteinu ATM.....	18
4.3.2	Mutace <i>ATM</i> u CLL.....	19
4.4	Gen <i>NOTCH1</i>	19
4.4.1	Charakteristika Notch proteinů.....	19
4.4.2	Mutace <i>NOTCH1</i> u CLL.....	20
4.5	Gen <i>BIRC3</i>	21
4.5.1	Charakteristika proteinu c-IAP2.....	21
4.5.2	Mutace <i>BIRC3</i> genu u CLL.....	21
4.6	Gen <i>MYD88</i>	22

4.6.1	Charakteristika proteinu MyD88.....	22
4.6.2	Mutace <i>MYD88</i> u CLL.....	22
4.7	Gen <i>POT1</i>	23
4.7.1	Charakteristika proteinu <i>POT1</i>	23
4.7.2	Mutace <i>POT1</i> u CLL.....	23
4.8	Shrnutí konkrétních mutací u CLL.....	24
5	Závěr	25
	Seznam zkratk.....	26
	Seznam literatury.....	29

1 Úvod

B-lymfocytární chronická lymfatická leukémie je nejrozšířenějším onemocněním u dospělé populace v západních zemích. Při tomto onemocnění dochází ke klonální proliferaci a akumulaci nefunkčních B-lymfocytů. Tyto buňky, odpovědné za narušenou imunitní odpověď, mají specifickou morfolologii i imunofenotyp. Leukemické buňky vznikají z hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni, u kterých došlo v průběhu času k nahromadění mutací vedoucích ke vzniku onemocnění. Akumulace leukemických buněk je způsobena nejen v důsledku ovlivnění signálních drah regulujících buněčný cyklus a indukci programované buněčné smrti (apoptózy), nýbrž často také jako důsledek zvýšené schopnosti proliferace narušených hematopoetických buněk.

Projevy chronické lymfatické leukémie jsou velice heterogenní, u různých CLL pacientů se příznaky onemocnění vyskytují v odlišné míře. Někteří pacienti s CLL přežívají bez léčby mnoho let, u jiných je včasná a intenzivní léčba nepostradatelná. Zásadní význam má správné načasování počátku léčby. Doba přežití s onemocněním se u jednotlivých pacientů liší, uvádí se doba od několika desítek měsíců až po desetiletí. K předpovědi agresivity onemocnění i předpokládané doby přežití napomáhá detekce prognostických markerů u pacientů s CLL. Mezi hlavní prognostické markery využívané v diagnostice chronické lymfatické leukémie patří určování mutačního statusu *IGHV* genů, exprese genu *ZAP-70*, přítomnost povrchového markeru CD38 či detekce různých chromozomálních abnormalit (delece 13q14, 11q22,...).

V současné době jsou stále dostupnější různé metody sekvenace. Nejnovější sekvenační metody umožňují detailnější pozorování genetických změn, ovlivňujících vývoj a progresi CLL, což napomáhá lepšímu pochopení molekulární podstaty onemocnění. Geny ovlivněné mutací u CLL hrají významnou roli v mnoha buněčných procesech, např. regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy, sestřihu mRNA, remodelaci chromatinu, dále při regulaci prozánětlivé dráhy, Notch signální dráhy a mnoha dalších. V této práci se budu věnovat nejčastěji se vyskytujícím somatickým mutacím u B-lymfocytární chronické lymfatické leukémie a jejich dopadu na agresivitu a průběh onemocnění.

2 Chronická lymfatická leukémie (CLL)

2.1 Charakteristika CLL

Chronická lymfatická leukémie je nejrozšířenější leukemické onemocnění v Evropě a Severní Americe. Postihuje především starší osoby, zřídka se objeví i u lidí mladších než 50 let. Je popsána vyšší prevalence CLL u mužů než u žen (Chiorazzi et al. 2005). Dle klasifikace WHO (The World Health Organization) je CLL zařazena mezi periferní lymfoproliferace maturovaných B-lymfocytů (Campo et al. 2011). CLL je definována jako klonální proliferace a následná akumulace téměř nefunkčních B-lymfocytů v krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a ve slezině (Chiorazzi et al. 2005). Chronická lymfatická leukémie většinou zasahuje B-lymfocyty, pouze v méně než 5 % případů se jedná o onemocnění postihující T-lymfocyty (Hoyer et al. 1995). V této práci se zaměřím pouze na problematiku B-lymfocytární chronické lymfatické leukémie. B-lymfocyty monoklonálních populací u chronické lymfatické leukémie mají svůj typický imunofenotyp. Na svém povrchu ve zvýšené míře exprimují markery CD19, CD5 a CD23 (Matutes et al. 1994). Imunoglobulinů je na povrchu leukemických B-lymfocytů výrazně méně než u zdravých B-buněk, a molekuly asociované s imunoglobuliny, např. CD79b, v některých případech dokonce zcela chybí (McCarron et al. 2000; Hallek 2013).

Hromadění B-lymfocytů v krvi je způsobeno především jejich sníženou schopností zaniknout pomocí programové buněčné smrti (apoptózy). Leukemické B-buňky se nacházejí převážně ve fázi Go/G1 buněčného cyklu (Sieklucka et al. 2008; Chiorazzi 2007). Hromadění nefunkčních maturovaných B-lymfocytů je způsobeno nejen deregulací drah zodpovědných za spouštění apoptózy v buňkách, nýbrž také odlišnou mírou jejich proliferace. Míra proliferace (počet nově vzniklých B-lymfocytů za den) se u jednotlivých pacientů s CLL výrazně liší (Messmer et al. 2005).

V hematopoetických kmenových buňkách se schopností sebeobnovy se v průběhu času ukládají mutace. Mutace vzniklé již na úrovni hematopoetické kmenové buňky, pak vedou ke vzniku leukemických buněk. Bylo prokázáno, že xenotransplantací kmenových buněk od pacientů s CLL do imunodeficientních myší se rozvine CLL (Kikushige et al. 2011).

2.2 Etiologie CLL

Častým předstupněm CLL je monoklonální B-lymfocytóza (MBL). Při MBL dochází k namnožení převážně jednoho klonu (může se však jednat také o oligoklonální původ) B-lymfocytů v krvi pacienta, avšak bez příznaků typických pro CLL (zvětšení uzlin, sleziny, zvýšený počet

lymfocytů nad 5000/μL krvi). Přibližně u 5 % osob starších než 60 let v populaci je možné diagnostikovat uvedenou patologii. Frekvence výskytu MBL stoupá s přibývajícím věkem.

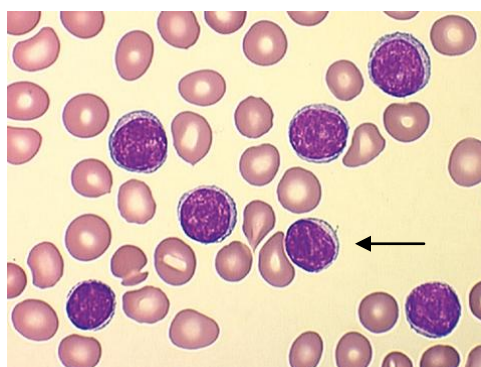
V případě, že nedochází k leukemizaci i za přítomnosti monoklonální B buněčné populace v krvi pacienta, jedná se o malobuněčný lymfom (SLL = small lymphocytic lymphoma). SLL se v mnoha případech transformuje do chronické lymfatické leukémie. U pacientů s SLL je diagnostikovaná splenomegalie (zvětšení sleziny) a lymfadenopatie (zvětšení lymfatických uzlin) v důsledku akumulace B-lymfocytů v uvedených orgánech. Tato patologie není spojená s výrazným zvýšením počtu B-lymfocytů v periferní krvi (Campo et al. 2011).

U přibližně 5 - 20 % případů CLL progreduje do tzv. Richteraova syndromu, který se nejčastěji projevuje jako difuzní B-velkobuněčný lymfom (DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma) (Tsimberidou & Keating 2005).

2.2.1 Diagnostika CLL

Chronická lymfatická leukémie je značně různorodé onemocnění. U každého pacienta se mohou vyskytovat projevy choroby v odlišné míře. Mezi hlavní příznaky chronické lymfatické leukémie patří: náhlý úbytek hmotnosti, dlouhotrvající vysoké teploty, zvýšená potivost převážně v noci, poruchy krvetvorby v kostní dřeni a následná anémie či trombocytopenie, splenomegalie, hepatomegalie, lymfadenopatie a další (Hallek 2015).

Základní diagnostické metody v případě, že je u pacienta podezření na onemocnění chronickou lymfatickou leukémií, vycházejí z analýzy periferní krve. Pacienti s CLL mají výrazně zvýšenou hladinu leukocytů v krvi. Hodnota 5000 lymfocytů v 1 μl periferní krve se pokládá za diagnostickou pro CLL. Toto zvýšení počtu B-lymfocytů musí u pacienta přetrvávat minimálně po dobu 3 měsíců. Následně se provádí krevní nátěr a pozorování buněk pod mikroskopem.



Obr. 1: Krevní nátěr pacienta s CLL.

Leukemické B-lymfocyty s jejich charakteristickou morfolofií jsou označeny černou šipkou (převzato z <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/chronic-leukemias>).

B-lymfocyty pacientů s chronickou lymfatickou leukémií mají charakteristické morfologické znaky. Na krevních nátěrech je možné pozorovat leukocyty, na jejichž okraji je vidět slabý, avšak dobře znatelný proužek cytoplasmy. Jádro bývá výrazné s částečně agregovaným chromatinem, jádérko je většinou nedetekovatelné (Obr. 1).

V současné době se k diagnostice ve velké míře používají různé imunofenotypizační metody, při kterých se využívá přítomnosti charakteristických markerů postižených B-lymfocytů. Mezi imunofenotypizační metody patří měření povrchových diagnostických a prognostických markerů CD38 a ZAP-70 či mutační status těžkého řetězce imunoglobulinu (IGHV = Immunoglobulin heavy chain) (Binet & Caligaris-Cappio 2006).

Níže se budu věnovat jednotlivým diagnostickým a prognostickým markerům, jejichž detekce u pacientů s CLL umožňuje předpovídat agresivitu a celkový průběh onemocnění, reakci na léčbu či přibližnou dobu přežití pacienta.

2.2.2 Mutace genu *IGHV* (dříve uváděný také jako *IgVH*)

Jedním z významných prognostických markerů je mutační status variabilního úseku těžkého řetězce imunoglobulinu, který je součástí receptoru pro B-buňky (BCR = B-cell receptor). Jako mutované jsou udávány takové geny pro IGHV (Immunoglobulin variable heavy chain), u kterých byla zjištěna homologie s geny germinální linie nižší než 98 % (Hamblin et al. 1999). CLL buňky s mutovanými *IGHV* geny pocházejí z paměťových B-buněk postgerminálního centra a CLL buňky bez mutací *IGHV* představují buňky marginální zóny (Dighiero 2003).

Udává se, že pacienti s nemutovanými geny pro IGHV mají znatelně horší a rychlejší průběh onemocnění a doba přežití od stanovení diagnózy je výrazně kratší v porovnání s pacienty s mutovanými geny pro IGHV. B-lymfocyty s *IGHV* bez výraznějších mutací vykazují často různé morfologické abnormality na genetické úrovni (př. u pacientů s nemutovaným *IGHV* se ve zvýšené míře vyskytuje trisómie 12. chromozomu). Pacienti s nemutovanými geny pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinů se potýkají se silnými projevy symptomů onemocnění a včasná intenzivní léčba bývá v jejich případě nevyhnutelná nevyhnutelná (Hamblin et al. 1999).

2.2.3 Exprese proteinu ZAP-70

Pomocí metody DNA mikročipů (DNA microarrays) bylo zjištěno, že buňky CLL vykazují charakteristický expresní profil. Navíc se ukázalo, že mnoho různých genů se v buňkách expri- muje s rozdílnou intenzitou v závislosti na tom, zda se jedná o buňky s mutovanými, či nemuto- vanými *IGHV* geny. Největší rozdíly v expresi byly objeveny u genu pro protein ZAP-70

(Rosenwald et al. 2001). Protein ZAP-70 (zeta-associated protein) se za normálních okolností vyskytuje u T-lymfocytů a je zodpovědný za správnou signalizaci přes T-buněčný receptor. Jedná se o tyrozin kinázu z rodiny Src o velikosti 70 kDa (Chan et al. 1992).

Důsledkem rozdílné exprese genu pro ZAP-70 v buňkách s mutovaným a nemutovaným *IGHV* genem je možné využít tento protein jako biomarker. S téměř 100% přesností se pomocí tohoto biomarkeru dá určit, zda je gen *IGHV* mutovaný, či nikoli (Rosenwald et al. 2001). Díky tomuto objevu se určování prognózy u pacientů výrazně zjednodušilo. DNA analýza (zjišťování a následné porovnávání sekvence *IGHV* genů) je nákladná a v mnoha případech i nemožná kvůli chybějícímu vybavení v laboratořích. K určení míry exprese genu či k následné detekci proteinu je možno použít několik alternativních metod, jako například Western blot, kvantitativní PCR (Polymerase Chain Reaction), imunohistochemické metody nebo průtokovou cytometrii (Montserrat 2006).

Bylo zjištěno, že v buňkách pacientů s mutací variabilní oblasti na těžkém řetězci imunoglobulinů B-buněčného receptoru se gen pro protein ZAP-70 téměř neexprimuje. Zatímco u pacientů s nemutovanými *IGHV* geny je exprese genu *ZAP-70* výrazně zvýšena. Míra exprese, tudíž i množství proteinu v buňkách, se v průběhu onemocnění téměř nemění, proto je přítomnost proteinu ZAP-70 spolehlivým prognostickým markerem CLL (Crespo et al. 2003)

2.2.4 Detekce CD38 na povrchu CLL buněk

Dalším používaným prognostickým markerem je transmembránový glykoprotein CD38. Přítomnost CD38 pravděpodobně nemá nic společného s mutací v *IGHV* genech. Dalo by se říci, že glykoprotein reflektuje buněčnou aktivitu. Pacienti s agresivnější formou nemoci a rychlejším průběhem mají na buňkách zvýšené množství CD38, zatímco buňky pacientů s pomalejším průběhem onemocnění na svůj povrch CD38 téměř neexprimují. Množství CD38 na povrchu buněk se v průběhu onemocnění může měnit. Opakovaným měřením počtu CD38+ buněk je možné sledovat vliv terapeutik na průběh onemocnění. Měření glykoproteinu CD38 na povrchu CLL buněk pomáhá nejen předpovědět prognózu a průběh onemocnění, ale také optimalizovat způsob léčby (Damle et al. 1999; Ibrahim et al. 2001).

2.2.5 Výskyt chromozomálních aberací

V genotypu pacientů s chronickou lymfatickou leukémií se ve velké míře vyskytují různé chromozomální aberace a abnormality. Bylo zjištěno, že výskyt těchto aberací může být spojen s určitou prognózou a mnohé napovídá o agresivitě onemocnění. Pro detekci chromozomálních aberací byly, a v mnoha případech stále ještě jsou, používány standardní metody karyotypizace

spojené s pruhováním chromozomů (Juliussen et al. 1990). V poslední době se v diagnostice CLL a v určování prognózy onemocnění stala nejčastěji používanou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Jako největší výhoda této metody je označována možnost detekovat chromozomální aberace i u buněk, které zrovna neprocházejí mitózou. Pomocí specificky navržených prób je možné sledovat genetické abnormality a chromozomální aberace i u buněk nacházejících se v interfázi. Pomocí metody FISH je možné u pacientů s CLL nalézt dvakrát více genetických abnormalit než při použití jiných metod (např. pruhování chromozomů). Pomocí této molekulární cytogenetické metody je možné detekovat alespoň jednu chromozomální aberaci přibližně u 80 % pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (Döhner et al. 2000).

Jako nejrozšířenější chromozomální aberace u CLL je označována delecce na dlouhém rameni 13. chromozómu. Udává se, že **delece regionu 13q14** se vyskytuje přibližně u 55 % pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Pacienti, kteří mají pouze jednu chromozomovou aberaci, a to právě delecí v úseku 13q14, mají spolu s pacienty s trisomií 12. chromozómu prokazatelně nejdelší průměrnou dobu přežití v porovnání se všemi pacienty s jinou genetickou abnormalitou (v mnoha případech delší než 15 let). Pacienti mívají lepší prognózu a mírný průběh onemocnění (Döhner et al. 2000). Delece úseku 13q14 může být homozygotní či heterozygotní. Homozygotní, neboli biialelická delecce, kdy je úsek deletován na obou homologních chromozómech, se vyskytuje u 21 % pacientů s delecí 13q. U ostatních pacientů s delecí na 13. chromozómu se jedná o delecí heterozygotní neboli monoalelickou. Také bylo zjištěno, že u většiny pacientů s touto chromozomovou aberací (~84 %) je postiženo méně než 80 % analyzovaných krevních buněk. V literatuře se uvádí, že pacienti s méně než 80 % deletovaných buněk mohou žít déle bez nutnosti zahájení terapie a také celková doba přežití je mírně delší, než u pacientů, kteří mají postiženo 80 % a více B-lymfocytů v krvi (Hernández et al. 2009).

U přibližně u 18 % pacientů s CLL je možné detekovat **deleci 11q22-23** (Döhner et al. 2000). Při nález delecce na dlouhém rameni 11. chromozómu při cytogenetickém vyšetření je pacientovi předpovězen výrazně horší průběh onemocnění a kratší doba přežití (Neilson et al. 1997). Při této delecí je také výrazně zkrácena doba, kdy pacienti přežívají bez nutnosti léčby. Udává se, že u většiny pacientů s delecí 11q je léčba zahájena mezi 9. a 13. měsícem od určení diagnózy (Döhner et al. 2000). Špatná prognóza a rychlá progresse onemocnění je dána i faktem, že se na zmíněném deletovaném úseku nachází *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated gene), významný tumor supresorový gen (Stankovic et al. 1999). Tomuto genu se budu podrobně věnovat v následujících kapitolách.

Další chromozomální aberace u chronické lymfatické leukémie je **trisomie dlouhého ramene 12. chromozómu**. Tato abnormalita se vyskytuje přibližně u 16 % pacientů. Dříve byla trisomie chromozómu 12 označována za nejčastější chromozomální aberaci vyskytující se u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií. Při modernější analýze metodou FISH je však co do čet-

nosti až na třetím místě (Döhner et al. 2000). Výsledky studií zaměřených na vliv této aberace na prognózu a dobu přežití pacientů se mírně liší. Döhner et al. ve své studii se 325 vzorky pacientů s CLL uvádí, že prognóza stejně jako doba přežití pacientů s trisomií 12q je podobná prognóze u pacientů s normálním karyotypem (Döhner et al. 2000). Ve studii Escudier et al. je však uvedeno, že pacienti s trisomií 12q trpí ve zvýšené míře splenomegálií, ve většině případů je potřeba léčbu zahájit výrazně dříve. Navíc pacienti s trisomií 12q přežívají i přes intenzivní léčbu výrazně kratší dobu (Escudier et al. 1993).

Jako méně častá, avšak nejzávažnější mutace u CLL je označována delece na krátkém rameni 17. chromozómu. Tato delece se objevuje přibližně u 7 % pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (Döhner et al. 2000). Součástí úseku 17q13, který je deletován je gen *TP53*. Tento gen kóduje protein p53, což je důležitý tumor supresor zodpovědný za správnou regulaci buněčného cyklu, indukci apoptózy, či opravu poškozené DNA (Zenz et al. 2010). Genu *TP53* a mutacím ovlivňující jeho funkci bude věnována celá kapitola. Pacienti s uvedenou delecí mají nejhorší prognózu v porovnání s ostatními chromosomálními aberacemi. I přes rychlou a cílenou léčbu pacienti přežívají krátkou dobu. Jako maximální doba přežití od diagnózy CLL s **delecí 17q13** se udává 70 měsíců (Döhner et al. 2000).

Delece na dlouhém rameni 6. chromozómu (**delece 6q-**) patří mezi vzácnější chromosomální aberace. Vyskytuje se přibližně u 6 % pacientů s CLL (Döhner et al. 2000). Bylo zjištěno, že CLL buňky pacientů s delecí 6q- vykazují odlišnou morfologii, bývají větší než běžné CLL buňky bez této aberace. Cuneo A. a kolektiv ve své studii zjistili, že buňky s delecí na chromozómu 6 exprimují na svém povrchu glykoproteiny CD38 ve zvýšené míře. Udává se, že pacienti mají průměrnou prognózu. Průběh onemocnění i délka života po diagnóze je lepší než u pacientů s delecemi 17p- či 11q-, naopak horší než u pacientů s normálním karyotypem (Cuneo et al. 2004).

U pacientů s chronickou lymfatickou leukémií je možné nalézt i další chromosomové aberace, například trisómii 8q, t(14q32), či trisómii 3q. Tyto genetické abnormality se však vyskytují pouze u malého procenta pacientů s CLL (Döhner et al. 2000).

Detekce všech výše zmíněných prognostických markerů pomáhá hematologům předpovídat agresivitu a průběh onemocnění. Po analýze těchto markerů je možné lépe přizpůsobit způsob léčby danému pacientovi. Správně načasovaná a zvolená léčba pomáhá zlepšit životní úroveň pacientů s chronickou lymfatickou leukémií a prodloužit dobu přežití s tímto onemocněním (Hallek 2015).

2.3 Léčba CLL

Jedná se o značně heterogenní onemocnění. Mnoho pacientů přežívá bez léčby i několik let, aniž by pocítili výraznější příznaky onemocnění. U jiné skupiny pacientů se i přes vysoké dávky terapeutik příznaky projevují ve značné míře (Binet et al. 1981). Při léčbě je nejdůležitější přistupovat ke každému pacientovi individuálně. Důležitou roli také hraje správné načasování počátku léčby. Pro léčbu CLL se nyní používají následující látky: inhibitory tyrozin kináz (př. Ibrutinib), monoklonální protilátky (př. Rituximab), látky indukující buněčnou smrt (př. Fludarabin), imunomodulační látky (př. Lenalidomid), inhibitory miRNA (př. Antagomirs), inhibitory cyklin-dependentních kináz (př. Flavopiridol). Jako krajní možnost léčby u mladších pacientů je uváděná transplantace kostní dřeně (Shahjehani et al. 2015).

3 Progrese CLL na buněčné úrovni

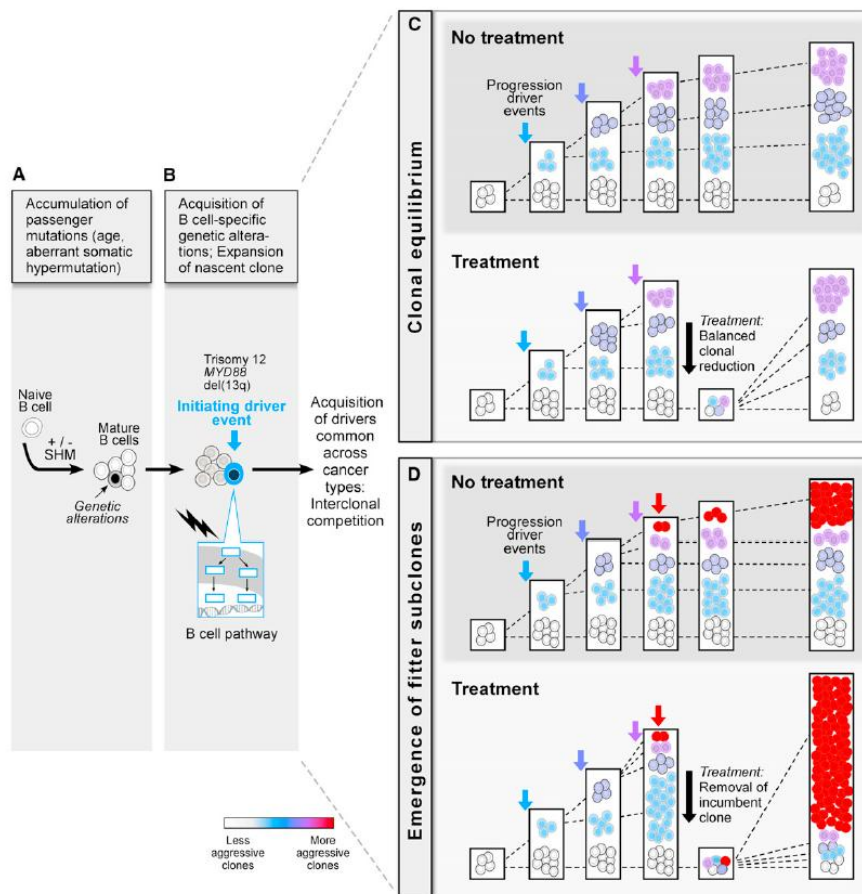
3.1 Klonální evoluce leukemických buněk

V literatuře se uvádí, že pouze z jedné abnormálně fungující kmenové buňky může vzniknout celý nádor. Buňky nádorových tkání se vyznačují vysokou genetickou nestabilitou, což má za následek zvýšení variability ve tkáni, kvůli které se zvyšuje vliv selekčního tlaku na buňky. Původní populace buněk je stále vytlačována novými, více agresivními klony. Tímto způsobem dochází u nádorů k jejich výrazné progresi. Mutageneze pod vlivem selekčního tlaku dává vznik stále novým klonům. Nádor pak není tvořen pouze jedním typem buněk, ale mozaikou různých buněčných klonů (Nowell 1976).

Obdobná klonální evoluce je pozorovaná také v případech leukémie i přes to, že nádor v pravém slova smyslu není u leukemických pacientů přítomen. Fayiaz Notta a jeho spolupracovníci publikovali v roce 2011 studii zabývající se klonální evolucí u akutní lymfatické leukémie (ALL). Notta a kolektiv zjistili, že ve vzorcích periferní krve pacientů s ALL je možné detekovat mnoho různých subklonů leukemických buněk. V některých případech se může vyvinout jeden klon s natolik selekčně zvýhodňující vlastností, že populace buněk daného klonu převládne a stane se dominantní, pacienti s jedním dominantním buněčným klonem mívají horší prognózu onemocnění (Notta et al. 2011).

U chronické lymfatické leukémie je ve většině případů pozorovaná klonální rovnováha, při které se velikosti populací jednotlivých klonů udržují v určitých hodnotách. Nicméně u části pacientů je detekován výskyt dominantního klonu jakožto následek klonální evoluce (viz. Obr. 2) (Landau et al. 2013). Ke klonální evoluci dochází přibližně u 20 % případů. Navíc bylo zjištěno, že probíhá výhradně u pacientů s nemutovaným *IGHV* genem (Stilgenbauer et al. 2007).

Klonální evoluce u CLL probíhá znatelně pomaleji než u ostatních leukémií. Pomocí FISH bylo zjištěno, že doba potřebná pro výměnu klonů s následným detekováním nové chromozomální aberace (př. rozsáhlé delece) je několik let. Medián doby od počátku FISH analýzy vzorků pacientů do objevení nové cytogenetické aberace je 8 let (Shanafelt et al. 2006). V některých případech se může stát, že vlivem klonální evoluce chromozomální aberace zcela vymizí (Stilgenbauer et al. 2007).



Obr. 2.: Model klonální transformace u CLL. S narůstajícím věkem narůstá také počet somatických mutací, panel A. Vznik raných a pozdějších mutací (t12, del13q, *MYD88*) typických pro B-buňky je znázorněn na panelu B. Mezi klonální evolucí a léčbou je popsán komplexní vztah. Většina neléčných a menšina léčných CLL buněk zůstává v stabilní klonální rovnováze po dobu několik let, panel C. V případě, že daný subklon obsahuje vedoucí mutaci, léčba může tuto klonální rovnováhu narušit a urychlit klonální evoluci, panel D (Landau et al. 2013).

3.1.1 Subklonální expanze způsobující relaps

Expanze jednoho ze subklonů obsahujícího ve svém genomu specifické mutace může způsobit náhlý relaps onemocnění (Landau et al. 2013). Relaps je pozorován u mnoha pacientů se špatnou prognózou. Jedná se o náhlý návrat příznaků onemocnění po remisi (vymizení projevů a příznaků nemoci) nastolené intenzivní léčbou (Hallek 2015). Navíc bylo dokázáno, že určité druhy léčby zvyšují rychlost klonální evoluce, kvůli specifickému selektivnímu tlaku. Zvyšuje se tudíž pravděpodobnost, že některý ze subklonů expanduje (Landau et al. 2013).

U mnoha pacientů s krátkou dobou remise bylo možno detekovat subklon se specifickou mutací ještě před zahájením léčby (Landau et al. 2015). Analýza subklonů pomocí sekvenačních

metod bude v budoucnu využívána pro lepší cílenou léčbu pacientů. Při správně zvolené léčbě bude možné zabránit expanzi daného klonu obsahující subklonální mutaci a tím zabránit relapsu pacienta. Opakované sekvenování subklonů pacienta s CLL napomáhá k lepšímu pochopení klonální evoluce a progresu onemocnění (Schuh et al. 2012; Landau et al. 2013).

3.2 Vznik a vývoj mutací u CLL

Každý klon je charakteristický výskytem odlišného počtu mutací v různých genech. Množství mutací v převažujících klonech se navíc může měnit v čase. U některých pacientů buňky podléhají tzv. klonální evoluci, jejíž průběh je individuální pro každého jedince s onemocněním CLL (Schuh et al. 2012).

Mutace vyskytující se u pacientů s CLL se mohou jednoduše rozdělit na selekčně zvýhodňující, zodpovědné za vznik nádoru, tzv. „driver“ mutace (vedoucí mutace), a na pasivní, selekčně neutrální, tzv. „passenger“ mutace (doprovodné mutace), které se objevily až následkem onemocnění, či byly přítomny v buňkách ještě před transformací, nemají však na onemocnění výrazný vliv (Greaves & Maley 2012).

Vědecký tým z USA pod vedením D. A. Landaua představil ve své studii z roku 2013 nový náhled na progresi chronické lymfatické leukémie. Vědci předpokládají, že nejdříve dochází k pozvolnému hromadění selekčně neutrálních mutací v buňkách. Některé mutace mohou způsobit transformaci, což následně vede k propuknutí onemocnění CLL. Vedoucí mutace odpovědná za vznik onemocnění se náhle stane klonální. Mezi konzistentně klonální mutace se řadí například delece 13q, trisómie 12 či mutace v genu *MYD88*. V další fázi onemocnění mohou v buňky s některou ze subklonálních mutací expandovat díky své selekční výhodě. V tomto případě mluvíme o subklonálních vedoucích mutacích. Jako příklady jsou uvedeny mutace v genech *ATM*, *TP53* či *RAS* (Landau et al. 2013).

4 Vybrané somatické mutace u CLL

Hojně používanou metodou při diagnostice je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Uvedenou metodou je možné detekovat pouze omezené množství mutací vyskytujících se u CLL. Stále častěji jsou používány metody sekvenování nové generace (NGS). Jde o velmi rychlé, přesné a finančně relativně dostupné metody sekvenování, které umožňují získat sekvenci velkého množství DNA fragmentů za krátký čas. Při detekci mutací u CLL se využívají dva rozdílné postupy, celoexomové sekvenování (WES = whole exome sequencing) (Landau DA et al, 2013) a sekvenace celého genomu buňky (WGS = whole genome sequencing) (Schuh et al. 2012). Uvedené sekvenační metody nám pomáhají zprostředkovat detailnější pohled na genetické změny CLL a umožňují nalézt nové, dříve nedetekovatelné mutace ovlivňující průběh onemocnění.

Výhodou celogenomového sekvenování WGS je možnost nalézt také mutace nacházející se v nekódujících oblastech (Schuh et al. 2012). Tyto mutace mohou mít významný vliv na progresi onemocnění (Puente et al. 2015).

V rozsáhlé vědecké studii z roku 2013 vedené D. Landauem bylo sekvenováno (sekvenování celých exomů genů) 160 vzorků (periferní krev, kostní dřeň), získaných od pacientů s CLL. Po důkladné analýze byly objeveny stovky různých mutací, vyskytujících se v exonových oblastech DNA leukemických buněk. Průměrně bylo u každého pacienta objeveno přibližně 15 různých somatických mutací. Navíc bylo zjištěno, že na množství mutací v genomu má vliv věk pacienta a mutační status genů pro *IGHV*. U pacientů s mutovaným *IGHV* úsekem, stejně jako u pacientů ve vyšším věku se vyskytuje větší množství somatických mutací (Landau et al. 2013; Víctor Quesada et al. 2012). Tento fakt je pravděpodobně dán zejména tím, že u B-buněk s mutovaným *IGHV* úsekem již proběhla mutageneze, konkrétně somatická hypermutace (probíhající také u normálních B-lymfocytů), která buňkám dává určitou predispozici pro další mutace (McCarthy et al. 2003).

V některých genech se mutace vyskytovaly s výrazně vyšší četností. V publikaci vědeckého týmu pod vedením Dr. Landaua bylo nejdříve detekováno 20 genů, ve kterých se mutace vyskytují s větší pravděpodobností (Landau et al. 2013). V pozdější práci stejného vědeckého týmu se podařilo detekovat více než dvojnásobné množství (44 genů) vedoucích somatických mutací asociovaných s CLL (Landau et al. 2015). Jde o geny *SF3B1*, *TP53*, *NOTCH1*, *MYD88*, *ATM*, *BIRC3*, *XPO1*, *CHD2*, *POT1*, *NRAS* a další (Obr. 3).

O genech se zvýšeným výskytem mutací, zodpovědných za progresi CLL, se dá obecně říci, že jsou součástí sedmi různých buněčných drah a procesů. Konkrétně se jedná o: dráhu zodpovědnou za opravy poškozené DNA a kontrolu buněčného cyklu, Notch signální dráhu, Wnt signální dráhu, prozánětlivou dráhu, dále dráhu signalizace přes B-buněčný receptor, dráhu ovliv-

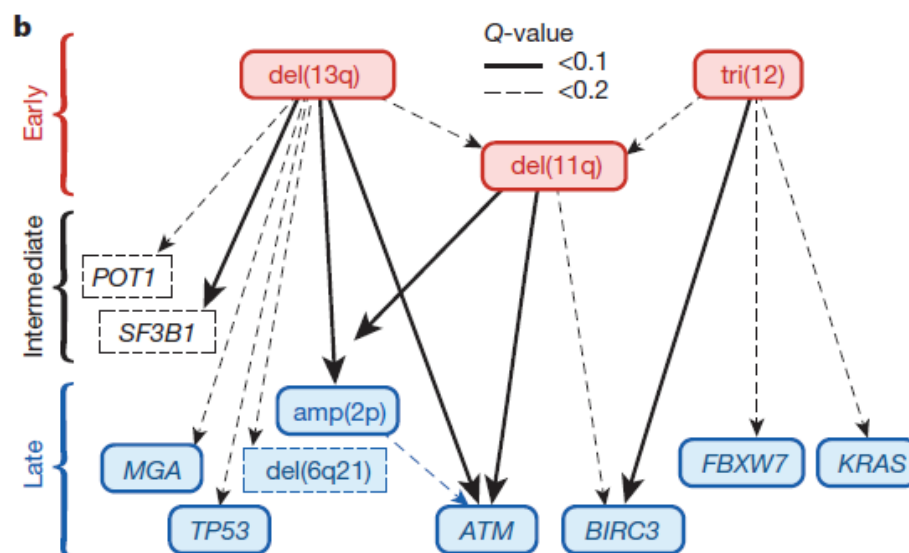
ňující modifikace chromatinu a dráhu zodpovědnou za RNA sestřih tzv. splicing (Landau et al. 2013). V novější studii bylo zjištěno, že mutace velmi často postihují i geny proteinů začleněných do MAPK-ERK signalizační dráhy. Téměř u 9 % pacientů je tato dráha ovlivněná mutací některého z genů (např. *NRAS*, *BRAF*) (Landau et al. 2015).



Obr. 3.: Přehled popsanych vedoucích somatických mutací u CLL. Ve sloupcích jsou zanesena data z jednotlivých vzorků ($n = 538$). Graf v horní části obrázku zobrazuje počet subklonálních (růžové sloupce) a klonálních (modré sloupce) mutací u každého pacienta. Počet mutací je přepočten na 1 Mb. V řádce nazvaném „Data set“ (soubor vzorků) jsou barevně rozlišeny vzorky získané z různých zdravotnických institucí. V levé části hlavního obrázku je seznam všech dosud objevených vedoucích genů a chromozomálních aberací asociovaných s CLL. Různě barevné proužky označují výskyt dané mutace či chromozomální aberace v konkrétním vzorku pacienta. Barevně jsou rozlišeny typy mutací. V pravé části obrázku je možné vyčíst procentuální zastoupení dané mutace u pacientů s CLL. Ve spodní části obrázku se nachází informace o jednotlivých vzorcích ve vztahu k léčbě a mutačnímu stavu *IGHV* (černá: pacient léčen/mutovaný *IGHV*; bílá: bez léčby/nemutovaný *IGHV*; červená: není známo) (převzato, modifikováno z Landau et al. 2015).

Mutace i chromozomální aberace detekované u CLL je možné rozdělit podle času jejich vytvoření v průběhu progresu nemoci. Vzniklé mutace bychom mohli zařadit do tří hlavních skupin: **časné**, mutace vyskytující se ihned po transformaci; **střední**, mutace vznikající vzápětí po začátku onemocnění, a **pozdní**, mutace vznikající až v průběhu onemocnění, delší dobu od jeho začátku.

Mezi časné mutace, které se u pacientů dají detekovat ihned po nádorové transformaci, můžeme řadit delecí 13q14, trisomii 12 či mutaci v genu *NOTCH1* (Wang et al. 2014; Landau et al. 2015). Mutace v genech *TP53*, *BIRC3* a *SF3B1* se u pacientů objevují déle po vzniku onemocnění. Navíc se udává, že mutace *TP53* se vyskytuje většinou u pacientů s trisomií 12 (Wang et al. 2014), zatímco u pacientů s delecí 13q14 se v průběhu času s velkou pravděpodobností objeví mutace v genu *SF3B1* (Obr. 4) (Landau et al. 2015).



Obr. 4.: Průběh vzniku mutací u CLL. Na základě sekvenační analýzy (WES) klonálních a subklonálních mutací vzorků pacientů s CLL bylo možné stanovit předpokládaný evoluční strom mutací u chronické lymfatické leukémie a rozdělit jednotlivé mutace na časné (označené růžově), střední (označené černě) a pozdní (označené modře) (převzato, modifikováno z Landau et al. 2015).

4.1 Gen *TP53*

4.1.1 Charakteristika proteinu p53

Na konci 80. let byl objasněn význam proteinu p53 a jeho nezastupitelná role při ochraně organismu před vznikem nádorů. Následovalo nespočetné množství studií, ve kterých se vědci snažili objasnit mechanismus funkce nově objeveného tzv. „strážce genomu“, proteinu p53 (Lane

1992). V roce 1986 bylo zjištěno, že gen pro protein p53 se v lidském genomu nachází na chromozomu 17 (Miller et al. 1986). Vědeckému týmu pod vedením Michaela B. Kastana se dále podařilo objasnit fakt, že hladina proteinu p53 v buňkách výrazně vzroste při poškození DNA. Zvýšené množství proteinu p53 způsobí, že buňka pozastaví svůj buněčný cyklus těsně před syntetickou fází. Tímto se zabrání replikaci poškozené DNA a následnému dělení buňky, která by mohla dát vznik potencionálně nádorové tkáni (Kastan et al. 1991).

V dnešní době je již role proteinu p53 dobře známá, stejně jako struktura signalizačních drah, které ovlivňují jeho funkci. p53 je významný tumor supresorový protein. Mutace v genu *TP53* nebo delece úseku na chromozomu 17 ovlivňující funkci proteinu p53 se projeví zvýšenou náchylností buněk ke vzniku různých forem nádorů a maligních onemocnění (Vousden & Lane 2007).

Jedním z hlavních mechanismů, kterým p53 řídí správný průběh základních procesů v buňce a udržuje integritu genomu, je regulace transkripce. Protein p53 je označován jako sekvenčně specifický transkripční regulátor, který pomocí svých koaktivátorů a korepresorů reguluje expresi velkého množství genů. Proteiny, jejichž exprese je regulována mimo jiné i proteinem p53, jsou součástí různých signalizačních drah. Jedná se například o proteiny regulující buněčný cyklus (např. p21). V případě, že dojde k poškození DNA, pod vlivem proteinu p53 se pozastaví buněčný cyklus, čímž dojde k zadržení „podezřelé - geneticky pozměněné“ buňky v Go fázi buněčného cyklu, případně k indukovaní apoptózy. Regulace buněčného cyklu a indukce apoptózy jsou označovány jako nejvýznamnější děje, na jejichž regulaci se podílí protein p53. V desítkách studií bylo zjištěno, že regulace transkripce proteinem p53 má dalekosáhlý význam také v jiných metabolických či signalizačních drahách a buněčných dějích. Bylo prokázáno, že protein p53 hraje roli také v regulaci glykolýzy, autofáгии, opravě poškozených DNA molekul, v reakci buněk na různé druhy stresu (například oxidativního). Protein p53 také ovlivňuje buněčnou diferenciaci, citlivost buněk k vnějším vlivům; u specializovaných buněk je zodpovědný i za jejich pohyb a invazivitu. Velké množství informací o proteinu p53 bylo shrnuto v následujících review (Vousden & Lane 2007; Vogelstein et al. 2000).

4.1.2 Mutace *TP53* u CLL

Mutace v genu *TP53* se vyskytují přibližně u 8 - 15 % pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (Zenz et al. 2009; Wang et al. 2011). Ve většině případů je tato mutace spojena s delecí 17q13, to znamená, že jedna alela genu *TP53* je postižena delecí a druhá je mutována. Jsou však zaznamenány i případy pacientů, u kterých není při vyšetření karyotypu nalezena delece na 17. chromozomu a mutace se vyskytuje v obou alelách genu *TP53* (Zenz et al. 2010). Thorsten Zenz ve své studii dále zmiňuje fakt, že v případě pacientů s mutací na obou alelách se ve více jak po-

lovině případů jedná o uniparentální disómii, což znamená, že pacient má obě alely původem od jednoho rodiče (Zenz et al. 2009).

Je prokázáno, že pacienti s mutací genu *TP53* bez delece 17q13 mají špatnou prognózu onemocnění, sníženou dobu přežití a obdobné příznaky jako pacienti s deletovaným úsekem na chromosomu 17. Díky tomuto zjištění poukazují autoři studie na fakt, že by se testování mutací genu *TP53* mělo zahrnout mezi základní genetické testy při diagnostice chronické lymfatické leukémie (Zenz et al. 2010).

V genu *TP53* se mohou vyskytovat různé druhy mutací. Nejčastěji bývají detekovány „missense“ mutace zpravidla v exonech 5 až 8 (Zenz et al. 2010), přičemž tranzice bývá častější než transverze, tranzice v CpG (cytosin-fosfát-guanosin) se vyskytuje pouze zřídka (Zenz et al. 2009). U pacientů s CLL je možné nalézt také různé inserce, delece, mutace na exon-intronovém rozhraní, ovlivňující správný sestřih transkriptu, dále mutace ovlivňující čtecí rámec, tzv. „frameshift“ mutace. Missense a frameshift mutace jsou velice často lokalizovány v úseku pro DNA-vazebnou doménu proteinu p53, což může způsobit nestabilní vazbu proteinu, nebo dokonce úplně znemožnit jeho navázání na molekulu DNA (Zenz et al. 2010). V sekvenci genu *TP53* se vyskytují tzv. „hot-spot“ místa se zvýšenou frekvencí mutací. Za zmínku stojí především kodon v pozici 220, v němž se může vyskytnout p.Y220C „missense“ mutace (Zenz et al. 2009). Mutace v uvedeném místě způsobuje sníženou stabilitu proteinu, který pak snadněji denaturuje a neplní svou funkci. Frank Boeckler a jeho spolupracovníci publikovali v roce 2008 studii, ve které navrhli možnost použít triplet 220 s „missense“ mutací jako cílovou sekvenci pro vazbu terapeutik. Po navázání terapeutické látky se protein stane stabilnějším a zvýší se jeho poločas rozpadu. V budoucnu by se mohlo jednat o účinnou terapii pro pacienty s touto mutací v genu *TP53* (Boeckler et al. 2008).

U pacientů s mutací *TP53* je ve zvýšené míře pozorována rezistence na určitý typ léčby, konkrétně na alkylační činidla či analogy purinů (Rossi et al. 2009). Navíc se udává, že při náhlém relapsu po léčbě je u pacientů detekován zvýšený počet buněk s mutací v genu *TP53*. Předpokládá se, že buňky s touto mutací mají jistou selekční výhodu, která jim pomáhá přežít při selekčním tlaku způsobeným terapií (Landau et al. 2015).

4.2 Gen *SF3B1*

4.2.1 Charakteristika proteinu SF3b155

Gen *SF3B1* (v některých publikacích označován též jako *SF3B155*) kóduje subjednotku 1 sestřihového (splicing) faktoru B3. Protein SF3b155 (označován též jako SAP155) tvoří společně s dalšími komponenty SF3b komplex, který je asociován s malým jaderným ribonukleoprotei-

nem (snRNP) U2 (Wahl et al. 2009). Tento ribonukleoprotein je jednou z hlavních částí spliceozomu, organely zodpovědné za správný sestřih „messengerové“ RNA (mRNA). Během sestřihu dochází k odstraňování intronů (nekódující oblast) z prekurzorové-mRNA (Wang et al. 1998).

SF3b155 protein je lokalizován ve středu spliceozomu a je zodpovědný za vazbu pre-mRNA v místě větvení. Můžeme říci, že protein SF3b155 či SAP155 je jednou z důležitých částí aktivního místa spliceozomu. Protein SF3b155 je během procesu sestřihu fosforylován, což má pravděpodobně za následek konformační změnu, nutnou k provedení střihu (Wang et al. 1998).

Na C-terminální části proteinu SF3b155 se nachází HEAT doména s 22 repeticemi, která zaujímá přibližně 70 % délky proteinu a dává proteinu specifickou helikální strukturu. Tato struktura je nepostradatelná při správném procesu sestřihu (Golas et al. 2003). N-terminální doména je daleko méně strukturovaná a pravděpodobně se podílí na vazbě RNA a dalších proteinů asociovaných se spliceozomem (Cass & Berglund 2006).

Navíc bylo zjištěno, že protein SF3b155 hraje také významnou roli při represí Hox genů v organismu (Isono et al. 2005).

4.2.2 Mutace *SF3B1* u CLL

U chronické lymfatické leukémie se mutace v genu *SF3B1* vyskytují s poměrně vysokou frekvencí. Uvádí se, že gen *SF3B1* je mutován u 10 - 15 % pacientů s CLL (Wang et al. 2011; Víctor Quesada et al. 2012). Mutace v genu *SF3B1* se navíc vyskytují přibližně v 17 % případů pacientů s rezistencí na léčbu alkylačními činidly, například Fludarabinem (Rossi et al. 2011). U CLL pacientů s nemutovanými *IGHV* geny jsou pozorovány mutace v genu *SF3B1* častěji než u pacientů s mutovanými *IGHV* geny (Wang et al. 2011; Víctor Quesada et al. 2012).

Přibližně u 36 % případů jsou mutace v genu *SF3B1* asociovány s delecí 11q chromosomu (Wang et al. 2011). Převážně se jedná o subklonální vedoucí mutace. Klonální mutace *SF3B1* se vyskytují méně často (Landau et al. 2013).

Většina mutací v genu *SF3B1* je lokalizována v místě pro C-terminální doménu proteinu (Wang et al. 2011). Jedná se výhradně o „missense“ mutace, které se vyskytují v některé z repetitivních HEAT domény (Rossi et al. 2011). Lili Wang et al. ve své studii z roku 2011 předpokládá, že mutace v genu *SF3B1* je zodpovědná za nesprávnou funkci spliceozomu, čímž vznikají špatně sestřižené transkripty dalších specifických genů. Chyba v sestřihu se následně může projevit na funkci vzniklých proteinů, což může vést ke zvýšené agresivitě CLL (Wang et al. 2011). Není však vyloučeno, že chybná represe Hox genů nemá vliv na progresi onemocnění. Za zvýšenou agresivitu CLL mohou být zodpovědné taktéž faktory nezávislé na sestřihu RNA (Quesada et al. 2013).

Pacienti s mutací v genu *SF3B1* mají výrazně horší průběh onemocnění. Ve většině případů je nutné zahájit léčbu dříve ve srovnání se skupinou pacientů bez uvedené mutace. Celková doba

přežití pacientů s uvedenou mutací je ve většině případů kratší než 10 let (Wang et al. 2011; Rossi et al. 2011; Víctor Quesada et al. 2012).

4.3 Gen *ATM*

4.3.1 Charakteristika proteinu ATM

Gen *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated) je v lidském genomu lokalizován na 11q22-23 chromosomu (Gatti et al. 1988). Tento gen nese název podle onemocnění Ataxia telangiectasia. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, při kterém dochází k degeneraci mozečku a k výrazné imunodeficienci (Uziel et al. 1996). Bylo objeveno, že pacienti s tímto onemocněním nesou mutaci v genu *ATM* (Savitsky et al. 1995).

Jedná se o poměrně dlouhý gen (150 kb), ze kterého se přepisuje transkript o délce přibližně 13 kb a je tvořen 66 exony. Následnou translací vzniká protein o velikosti 350 kDa (Uziel et al. 1996). Při detailnějším zkoumání proteinu ATM bylo zjištěno, že se na C-terminálním konci nachází vysoce konzervovaná doména, zodpovědná za katalyzační funkci u všech fosfatidyinositol-3-kináz. Vzhledem k tomuto faktu lze předpokládat, že protein ATM má kinázovou aktivitu, jedná se o serin/treonin kinázu (Savitsky et al. 1995).

Protein ATM je v buňce zodpovědný za správnou regulaci buněčného cyklu, opravy poškozené DNA a správný průběh homologní rekombinace (Kastan & Lim 2000). Protein ATM při reakci na poškození DNA úzce kooperuje s proteinem p53. Společně tvoří ATM/p53 dráhu, zodpovědnou za opravu poškozené DNA, převážně dvouvláknových zlomů. V případě rozsáhlého poškození DNA může buňka díky působení ATM/p53 dráhy zastavit svůj buněčný cyklus a případně iniciovat apoptózu (Stankovic et al. 2004). Díky této dráze jsou v organismu eliminovány buňky, jejichž přítomnost by mohla vést k nádorové transformaci a následně vzniku maligního onemocnění. Protein ATM je v rámci výše zmíněné regulační dráhy nadřazený nad p53. ATM fosforyluje protein p53 na aminokyselině serin v pozici 20, čímž se zvyšuje stabilita p53. Protein následně působí jako důležitý regulátor exprese genů (Kastan & Lim 2000).

Mutace v obou alelách genu *ATM* způsobuje imunodeficienci, chromozomální nestabilitu, rychlejší zkracování konců telomer či větší senzitivitu k radiaci. Pacienti, kteří nemají funkční ani jednu alelu genu *ATM*, mají výrazně vyšší pravděpodobnost výskytu maligního onemocnění (Kastan & Lim 2000; Savitsky et al. 1995).

4.3.2 Mutace ATM u CLL

Mutovaný gen *ATM* je možné detekovat přibližně u 6 - 14 % pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (Bullrich et al. 1999; Austen et al. 2005; Guarini et al. 2012). Bylo dokázáno, že mutace v genu *ATM* se mohou ojediněle vyskytovat již v germinálních buňkách. V těchto případech je možné detekovat mutaci *ATM* i v ostatních buňkách těla, nesouvisejících s onemocněním CLL (Stankovic et al. 1999).

Vyšší procento mutací *ATM* genu se nachází ve skupině pacientů s nemutovaným *IGHV* úsekem (Austen et al. 2005). Navíc bylo zjištěno, že mutace *ATM* genu je zodpovědná za zvýšený výskyt různých chromozomálních aberací (př. delece 13q14,...) u pacientů s CLL (Guarini et al. 2012).

U chronické lymfatické leukémie se v genu *ATM* vyskytují různé mutace. Byly zaznamenány intragenní delece i inzerce či „missense“ mutace, ovlivňující například správný sestřih pre-mRNA (Stankovic et al. 1999; Bullrich et al. 1999); „nonsense“ či „frameshift“ mutace se vyskytují zřídka (Guarini et al. 2012). Při mutaci v genu *ATM* často vzniká protein zkrácený na C-konci, je tudíž postižena konzervovaná PI3K doména, což může mít výrazný vliv na správnou funkci proteinu (Bullrich et al. 1999). Při mutaci *ATM* je značně ovlivněn expresní profil buňky. Ke změnám exprese dochází například u genů *TGFB*, *XBP1*, *EIF4A* a mnoha dalších (Guarini et al. 2012).

U pacientů s inaktivním genem *ATM* je zkrácené stádium onemocnění nevyžadující léčbu, udává se průměrně 25 měsíců od zjištění diagnózy (Guarini et al. 2012). Také doba přežití je kratší než u ostatních pacientů (Austen et al. 2007).

4.4 Gen *NOTCH1*

4.4.1 Charakteristika Notch proteinů

Jako první byly geny *NOTCH* dokumentovány v první polovině 20. století u octomilky (*Drosophila melanogaster*), bylo zjištěno, že haploinsuficience způsobuje u octomilek vrubování (ang. notching) na konci křídel (Mohr 1919). V roce 1985 byla podrobněji zkoumána struktura Notch transkriptu, přičemž bylo zjištěno, že geny *NOTCH* kódují membránový receptor, jehož aktivita je součástí mechanismu mezibuněčné interakce (Wharton et al. 1985).

U savců jsou na povrchu buněk vystaveny čtyři různé Notch receptory tvořené proteiny Notch1 – Notch4. Každý z těchto proteinů vzniká v Golgiho aparátu a následně je štěpen na dvě podjednotky, které se na povrchu buňky opět spojí disulfidickou vazbou a vytvoří heterodimer membránového Notch receptoru typu I (Blaumueller et al. 1997).

Při navázání Notch ligandu na receptor dojde k aktivaci signální dráhy, což vede ke štěpení receptoru. Vyštěpená extracelulární část je transportována cytoplasmou až do jádra, kde společně s kooperujícími proteiny reguluje transkripci dalších genů (např. genů z rodiny *HES* či *HRT*) (Leong & Karsan 2006). Aktivace Notch signální dráhy vede u buněk ke zvýšené proliferaci a k inhibici apoptózy. Při nesprávné regulaci tato dráha může výrazně přispívat k tumorigenezi (Leong & Karsan 2006).

Navíc bylo zjištěno, že v B-lymfocytech u CLL se konstitutivně exprimují proteiny Notch1 a Notch 2, stejně jako jejich ligandy Jagged1 a Jagged2. Nadbytek těchto receptorů a ligandů má za následek zvýšenou aktivitu Notch signální dráhy, což způsobuje zvýšenou proliferaci a nedostačnou indukci apoptózy leukemických buněk (Rosati et al. 2009).

4.4.2 Mutace *NOTCH1* u CLL

Mutace genu *NOTCH1* je detekována u 5 – 11 % pacientů s CLL, častěji se vyskytuje v případech s mutovaným *IGHV* úsekem (Sportoletti et al. 2010; Rossi, Rasi, et al. 2012). U pacientů s mutovaným *NOTCH1* je vyšší pravděpodobnost progresu onemocnění do Richterova syndromu (Fabbri et al. 2011).

Ve většině případů je v genu *NOTCH1* detekována 2-nukleotidová delece s posunem čtecího rámce (Fabbri et al. 2011). Tato mutace je zodpovědná za dřívější výskyt stop-kodonu, čímž vzniká kratší transkript. Výsledkem je protein s chybějící PEST doménou, sekvencí bohatou na prolin (P), kyselinu glutamovou (E), serin (S) a treonin (T). Ztráta PEST domény způsobí větší stabilitu proteinu Notch1 (Puente et al. 2011). V genu *NOTCH1* se mohou vyskytovat také různé delece či inserce. Ve všech případech je však v důsledku mutace protein zkrácen o doménu PEST, což má za následek hromadění izoformy Notch1 proteinu a následnou deregulaci signální dráhy (Rossi, Rasi, et al. 2012).

Pacientům s mutací v genu *NOTCH1* je předpovídána horší prognóza, průběh onemocnění, a dřívější potřeba léčby, než u pacientů bez mutace *NOTCH1*. Také účinnost léčby bývá u těchto pacientů snižena, často se vyskytují rezistence na některé druhy chemoterapeutik (Sportoletti et al. 2010; Fabbri et al. 2011).

4.5 Gen *BIRC3*

4.5.1 Charakteristika proteinu c-IAP2

Z genu *BIRC3* (Baculoviral IAP Repeat Containing 3 gene), který je často také nazýván jako *CIAP2*, se exprimuje protein c-IAP2. Tento protein je součástí rodiny bakulovirálních inhibitorů apoptózy (IAP). Tvoří ho dvě domény N-terminální BIR repetitivní motiv a C-terminální RING finger doména (Rothe et al. 1995).

Protein c-IAP2 je součástí TNF (tumor necrosis factor) signální dráhy, jelikož se přes BIR motiv na N-konci váže na proteiny TRAF2 a TRAF3 (TNF-receptor associated factor) (Rothe et al. 1995). Komplex proteinů c-IAP2, TRAF2, TRAF3 svou vazbou negativně reguluje aktivitu NIK proteinu (NF- κ B inducing kinase), dobře známého též jako MAP3K14 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14). Protein c-IAP2 je prostřednictvím své RING domény s ubikvitin ligázovou aktivitou zodpovědný za ubikvitinylaci NIK proteinu, a tím i za jeho rozštěpení v proteazomu. Tímto sledem reakcí je regulována hladina NIK kinázy v buňce.

Volná NIK kináza, nenavázaná na výše zmíněný komplex proteinů, není ubikvitinylována a následně degradována. Za pomoci její fosforylační aktivity iniciuje signál v alternativní NF- κ B dráze. Dalo by se říci, že protein c-IAP2 za normálních okolností funguje jako inhibitor NF- κ B signalizace (Vallabhapurapu & Karin 2009).

4.5.2 Mutace *BIRC3* genu u CLL

Mutace *BIRC3* patří u chronické lymfatické leukémie ke vzácnějším. Je detekovatelná přibližně u 4 % pacientů s CLL (Rossi, Fangazio, et al. 2012).

V genu *BIRC3* se mohou vyskytovat různé typy mutací, rozsáhlé delece i jednobodové „frameshift“ či „nonsense“ mutace ovlivňující aktivitu proteinu. Následkem většiny mutací se vytvoří kratší transkript, ze kterého po translaci vznikne protein s neúplnou či naprosto chybějící C-terminální RING doménou. Protein bez RING domény ztrácí E3 ubikvitin ligázovou aktivitu, důležitou pro degradaci NIK proteinu, a tím i regulaci NF- κ B dráhy. Při zvýšené signalizační aktivitě NF- κ B dráhy dochází k nadměrné expresi antiapoptotických proteinů, což zvyšuje životnost leukemických buněk (Rossi, Fangazio, et al. 2012).

Pacienti s mutací *BIRC3* se řadí mezi nejrizikovější případy, mají silné projevy onemocnění a výrazně zkrácenou dobu přežití. Polovina pacientů s této rizikové skupiny se nedožije více jak 5 let od určení diagnózy CLL (Rossi et al. 2013).

Mutace v genu *BIRC3* jsou ve mnoha případech asociovány s rezistencí na některé druhy léčby. Uvádí se, že až 40 % pacientů s nemutovaným *TP53* a s prokazatelnou rezistencí na Fludarabin nese některou z mutací v genu *BIRC3* (Rossi, Fangazio, et al. 2012).

4.6 Gen MYD88

4.6.1 Charakteristika proteinu MyD88

Protein MyD88 (Myeloid differentiation primery response protein 88) byl poprvé popsán v roce 1990 (Lord et al. 1990). Je složen ze tří domén. N-terminální doména je zodpovědná za vazbu proteinů IRAK (IL-1 receptor associated kinase), C-terminální doména, homologní s doménou interleukinového receptoru, je nazývána TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) doména, mezi těmito doménami je třetí, spojovací doména (Wesche et al. 1997).

Jedná se o důležitý adaptorový protein TLR (Toll like receptor) a IL-1 receptorových signálních drah. Protein MyD88 hraje nezastupitelnou roli při správné funkci prozánětlivé dráhy a celkové B-lymfocytární imunitní odpovědi organismu (Rawlings et al. 2012). Při aktivaci TLR dochází k fosforylaci MyD88 proteinu, to umožní navázání IRAK proteinů, což má za následek aktivaci NF- κ B signální dráhy (Rawlings et al. 2012).

4.6.2 Mutace *MYD88* u CLL

Mutace v genu *MYD88* se vyskytuje přibližně u 2 - 3 % pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (Jeromin et al. 2014; Puente et al. 2011; Baliakas et al. 2015). Téměř ve všech případech se jedná o „missense“ mutaci uvnitř TIR domény (Wang et al. 2011). Mutace *MYD88* bývá často asociována s heterozygotní delecí 13q a mutovaným *IGHV* úsekem. (Wang et al. 2011). Často se vyskytuje u pacientů nižšího věku (Puente et al. 2011).

Při mutaci v genu *MYD88* je konstitutivně aktivovaná NF- κ B signální dráha, což vede ke zvýšené produkci chemokinů a cytokinů, podporujících proliferaci a zvyšujících životaschopnost CLL buněk (Puente et al. 2011)

Pacienti s mutací *MYD88* genu mají mírnější průběh onemocnění a dobu přežití často delší než 20 let (Martinez-Trillos et al. 2014). V některých studiích se uvádí, že mutace nemá výrazný vliv na průběh onemocnění a dobrá prognóza je dána nízkým věkem pacientů s danou mutací (Jeromin et al. 2014)

4.7 Gen *POT1*

4.7.1 Charakteristika proteinu *POT1*

Lidský gen *POT1* (Protection of telomeres 1 gene) je tvořen 22 exony. Při expresi dochází k alternativnímu sestřihu, díky kterému může z jednoho genu vzniknout až pět mírně odlišných proteinů. Odlišnost proteinů spočívá v jejich afinitě a síle vazby na jedno-řetězcovou DNA (Baumann et al. 2002).

Protein *POT1* obsahuje dvě N-terminální OB (oligonucleotide-binding) domény, zodpovědné za vazbu na DNA. Zpočátku se protein *POT1* na telomery neváže přímo, ale prostřednictvím dalšího proteinu nazývaného TRF1. Za normálních okolností následně dochází taktéž k vazbě *POT1* přes OB doménu na jedno-řetězcové přesahující vlákno na konci telomer (Loayza & De Lange 2003).

POT1 společně s dalšími proteiny (př. TIN2, RAP1,...) tvoří tzv. „telosom“, proteinový komplex na konci telomer, zodpovědný za regulaci délky a celkovou ochranu telomerních konců chromosomů. Vazba k proteinovému komplexu je zprostředkována C-terminální doménou proteinu *POT1* (Liu et al. 2004).

4.7.2 Mutace *POT1* u CLL

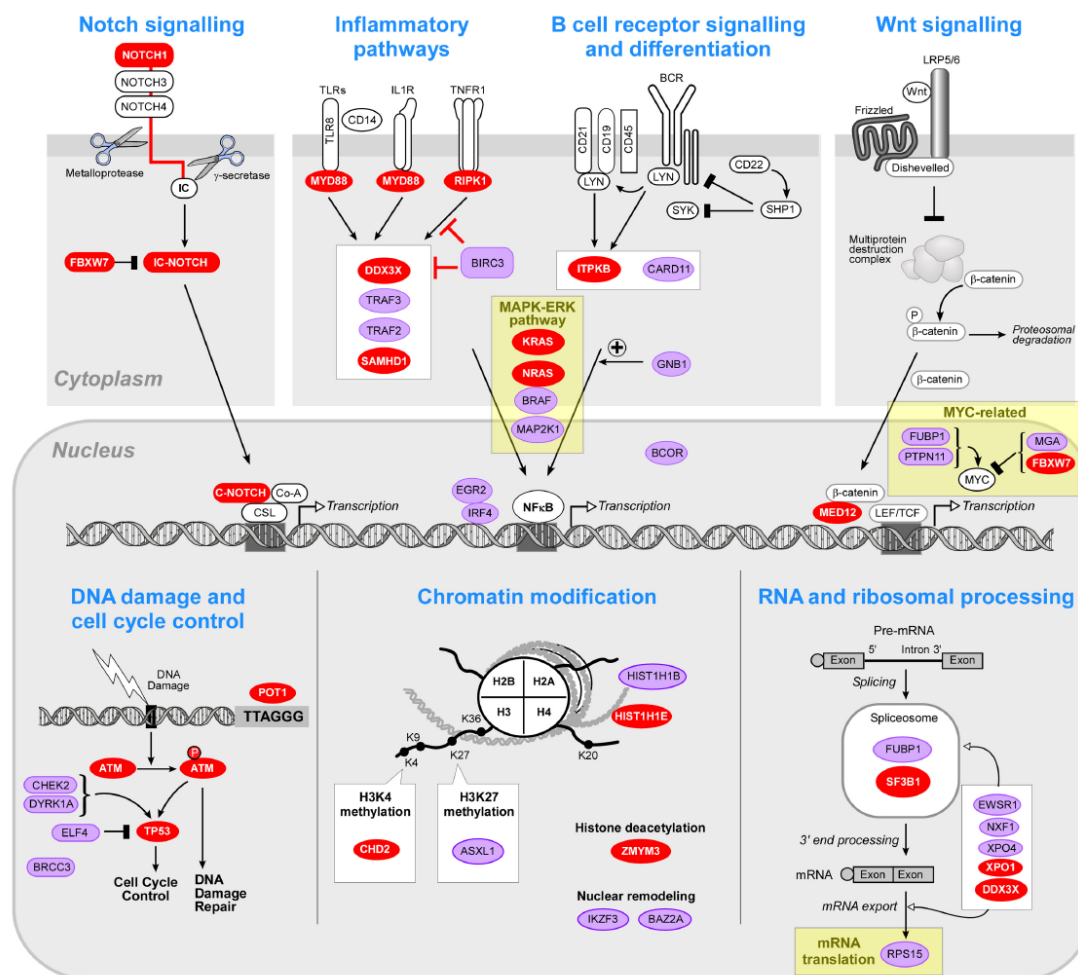
Mutaci genu *POT1* je možné detekovat přibližně ve 3 % případů onemocnění chronické lymfatické leukémie. Je popsán zvýšený výskyt těchto mutací u pacientů s nemutovaným *IGHV* úsekem. Uvádí se, že u 9 % pacientů s nemutovaným *IGHV* se nachází mutace *POT1* (Ramsay et al. 2013).

Ve studii A. J. Ramsaye a jeho spolupracovníků bylo detekováno 12 různých bodových mutací, z nichž většina má za následek zhoršení nebo úplnou ztrátu schopnosti vazby na DNA přes OB doménu. Protein *POT1* s mutovanou OB doménou je navázán na telomery přes proteinový komplex, nemůže však dojít k přímé interakci jedno-řetězcového přesahu DNA s proteinem *POT1*, a tím ke správné ochraně konců telomer (Ramsay et al. 2013). Špatně fungující proteinový komplex „telosom“ vede ke zvýšené genetické nestabilitě, což může mít za následek vznik různých chromozomálních aberací (Martínez & Blasco 2011).

Pacienti s mutací genu *POT1* mívají horší průběh onemocnění (Ramsay et al. 2013).

4.8 Shrnutí konkrétních mutací u CLL

Při žádné studii nebyla nalezena somatická mutace, která by byla detekovatelná u více než 20 % pacientů s CLL. Přítomnost konkrétních somatických mutací může záviset na mnoha faktorech, jako je například absolvovaná léčba či mutační status *IGHV* genů. Bylo prokázáno, že mutace v genech *ATM*, *TP53* či *SF3B1* se vyskytují často jako důsledek léčby (Wang et al. 2011; Landau et al. 2013). Nedávné studie poukázaly na odlišnosti ve výskytu genomických abnormalit u pacientů s mutovaným a nemutovaným *IGHV* úsekem. Nemutované *IGHV* geny jsou asociovány s mutacemi v genech *NOTCH1*, *SF3B1*, *POT1*, zatímco mutace v genu *MYD88* bývá spojena s mutovaným *IGHV* úsekem. Uvedené somatické mutace zasahují do několika signálních drah buňky (Obr. 5.).



Obr. 5.: Schéma buněčných procesů ovlivněných somatickými mutacemi u CLL. V genech proteinů označených červenou či fialovou barvou byla detekována zvýšená míra mutací u CLL. U proteinů označených červenou barvou byla mutace objevena již dříve. Mutace v genech fialově označených proteinů byly objeveny až ve studii D. A. Landau a jeho spolupracovníků v roce 2015 (převzato z Landau et al. 2015).

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout poznatky týkající se somatických mutací u chronické lymfatické leukémie a jejich dopadu na vývoj onemocnění.

Metody sekvenování nové generace pomohly rozšířit znalosti genomických změn a lépe pochopit problematiku klonální evoluce u CLL.

Výsledky rozsáhlých sekvenčních studií analyzované nejmodernějšími bioinformatickými metodami umožnily nalézt velké množství genů, ve kterých se při CLL vyskytují mutace se zvýšenou pravděpodobností. Klinické a funkční studie nově objevených mutací napomáhají odhalit nové mechanismy ovlivňující průběh a progresi CLL.

Hodnoty udávající procento mutací vyskytujících se u pacientů s CLL se v jednotlivých výzkumech nepatrně liší. To může být dáno odlišností použitých metod, či různě obsáhlými skupinami zkoumaných vzorků. Záleží také na stavu pacientů, jejichž vzorky byly do studie zahrnuty. Data ovlivňuje například absolvovaná léčba či mutační status *IGHV* úseku pacientů s CLL.

Ve vědecké studii V. Quesada a kol. bylo nalezeno více než 1000 odlišných somatických mutací. Medián počtu mutací detekovaných v jednom vzorku pacienta s CLL je 45, což v přepočtu vychází na jednu mutaci na megabázi (Victor Quesada et al. 2012). Přesto se somatické mutace u chronické lymfatické leukémie vyskytují v menší míře (5x -20x méně), než u dalších nádorových onemocnění (Fabbri et al. 2011).

Je nutné říci, že progresi chronické lymfatické leukémie neovlivňují pouze mutace v důležitých genech, nýbrž také odlišná epigenetika či další vlivy okolního prostředí (Guièze & Wu 2015).

Velké množství dat získané z rozsáhlých sekvenačních studií bude možné využít pro lepší předvídání průběhu klonální evoluce leukemických buněk, což může pomoci k přesnějšímu odhadu progresivity onemocnění. Získávání poznatků o somatických mutacích při chronické lymfatické leukémii napomáhá při objevování nových možností cílené léčby a to nejen u CLL.

Seznam zkratek

μL	mikrolitr
ALL	akutní lymfatická leukémie
ATM/ATM	protein/gen (ataxia-telangiectasia mutated protein/gene)
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
BIR	proteinová repetitivní doména (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat)
BIRC3	gen (baculoviral IAP Repeat Containing 3 gene)
BRAF	gen - protoonkogen
c-AIP2/C-AIP2	protein/gen (cellular inhibitors of apoptosis protein 2/gene)
CD19	povrchový marker diferenciační skupiny 19 (cluster of differentiation)
CD23	povrchový marker diferenciační skupiny 23 (cluster of differentiation)
CD38	povrchový marker diferenciační skupiny 38 (cluster of differentiation)
CD5	povrchový marker diferenciační skupiny 5 (cluster of differentiation)
CD79b	povrchový marker diferenciační skupiny 79b (cluster of differentiation)
CLL	chronická lymfatická leukémie
CpG	cytidin-fosfát-guanosin
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom (Diffuse Large B-cell Lymphoma)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EIF4A	gen (eukaryotic initiation factor-4A gene)
et al.	a kolektiv
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescent in situ hybridisation)
G0, G1	fáze buněčného cyklu (Gap 0, Gap 1)
HEAT	proteinová doména
HES	rodina genů (hairy and enhancer of split genes)
Hox	homeotický gen (homeobox gene)
HRT	rodina genů (Hairy-related transcription-factor genes)
CHD2	gen (chromodomain helicase DNA binding protein 2 gene)
IAP	inhibitor apoptózy (Inhibitor of apoptosis)
IGHV	variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (immunoglobulin heavy chain variable region)
IL-1	protein - cytokin (interleukin-1)
IRAK	protein - kináza (Interleukin-1 receptor-associated kinase)
Jagged 1/Jagged 2	proteiny, ligandy receptoru Notch
kb	kilobáze

kDa	kilodalton
MAP3K14	protein-kináza (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14)
MAPK-ERK sig.	signalizační dráha
Mb	megabáze
MBL	monoklonální B-lymfocytóza (Monoclonal B-cell lymphocytosis)
miRNA	mikro RNA
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MYD88/MYD88	protein/gen (Myeloid differentiation primary response 88 protein/gene)
NF-κB	komplex proteinů (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NIK	protein-kináza (NF-κB inducing kinase)
NOTCH1/NOTCH1	transmembránový protein/gen
NRAS	gen (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog gene)
OB	úsek vážící oligonukleotidy (oligonucleotide-binding fold)
Obr.	obrázek
p	krátké rameno chromozomu
p53	tumor supresorový protein
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEST	proteinová doména
PI3K	enzym (phosphatidylinositide 3-kinase)
POT1/POT1	protein/gen (protection of telomeres 1protein/gene)
pre-mRNA	prekurzorová - mediátorová RNA (precursor-messenger RNA)
q	dlouhé rameno chromozomu
RAP1	protein-GTPáza (Ras-related protein 1)
RAS	gen - protoonkogen
RING	proteinová doména obdobná zinkovému prstu (really interesting new gene domain)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SAP155	protein viz SF3B1
SF3b1/SF3B1	protein - sestřihový faktor / gen (splicing factor 3b subunit 1 protein/gene)
SF3b155	protein viz SF3B1
SLL	malobuněčný B-lymfom (small lymphocytic lymphoma)
snRNP	malý jaderný ribonukleoprotein (small nuclear ribonucleoprotein)
Src	protein - nereceptorová tyrozin-kináza
t	trisomie
TGFB	gen (transforming growth factor beta gene)
TIN2	protein (TRF1-interacting nuclear factor 2)

TIR	proteinová doména (Toll/interleukin-1 receptor homology domain)
TNF	protein - cytokin (tumor necrosis factor)
TP53	gen kódující protein p53 (tumor protein p53 gene)
TRAF 2/TRAF 3	protein (TNF receptor-associated factor 2,3)
TRF1	protein (telomeric repeat-binding factor 1)
WES	celoexomové sekvenování (whole exome sequencing)
WGS	celogenomové sekvenování (whole genome sequencing)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XBP1	gen (X-box binding protein 1 gene)
XPO1	gen (exportin1 gene)
ZAP-70/ZAP-70	protein -tyrozin kináza/gen (zeta-chain-associated protein kinase 70)

Seznam literatury

- Austen, B. et al., 2007. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *Journal of Clinical Oncology*, 25(34), pp.5448–5457.
- Austen, B. et al., 2005. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*, 106(9), pp.3175–3182.
- Baliakas, P. et al., 2015. Prognostic relevance of MYD88 mutations in CLL: The jury is still out. *Blood*, 126(8), pp.1043–1044.
- Baumann, P., Podell, E. & Cech, T.R., 2002. Human Pot1 (Protection of Telomeres) Protein : Cytolocalization , Gene Structure , and Alternative Splicing , 22(22), pp.8079–8087.
- Binet, J. & Caligaris-Cappio, F., 2006. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(3), pp.859–861.
- Binet, J.L. et al., 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48(1), pp.198–206.
- Blaumueller, C.M. et al., 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, 90(2), pp.281–291.
- Boeckler, F.M. et al., 2008. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), pp.10360–10365.
- Bullrich, F. et al., 1999. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research*, 59(1), pp.24–27.
- Campo, E. et al., 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond : evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), pp.5019–5032.
- Cass, D.M. & Berglund, J.A., 2006. The SF3b155 N-terminal domain is a scaffold important for splicing. *Biochemistry*, 45(33), pp.10092–10101.
- Crespo, M. et al., 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 348(18), pp.1764–1775.

- Cuneo, A. et al., 2004. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*, 18(3), pp.476–83.
- Damle, R.N. et al., 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), pp.1840–1847.
- Dighiero, G., 2003. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*, 17, pp.2385–2391.
- Döhner, H. et al., 2000. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 343(26), pp.1910–1916.
- Escudier, S.M. et al., 1993. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 81(10), pp.2702–2707.
- Fabbri, G. et al., 2011. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine*, 208(7), pp.1389–401.
- ¹Gatti, R. et al., 1988. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*, 336, pp.577–580.
- Golas, M.M. et al., 2003. Molecular Architecture of the Multiprotein Splicing Factor SF3b. *Science*, 300(5621), pp.980–984.
- Greaves, M. & Maley, C.C., 2012. Clonal evolution in cancer. , 481(7381), pp.306–313.
- Guarini, A. et al., 2012. Atm gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*, 97(1), pp.47–55.
- Guièze, R. & Wu, C.J., 2015. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 126(4), pp.445–453.
- Hallek, M., 2013. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology*, 88(9), pp.803–816.
- Hallek, M., 2015. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*, 90(5), pp.446 – 460.
- Hamblin, T.J. et al., 1999. Unmutated Ig V Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94(6), pp.1848–1854.

¹ sekundární citace

- Hernández, J.Á. et al., 2009. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, 94(3), pp.364–371.
- Hoyer, J.D. et al., 1995. True T-cell chronic lymphocytic leukemia: a morphologic and immunophenotypic study of 25 cases. *Blood*, 86(3), pp.1163–1169.
- Chan, a C. et al., 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, 71(4), pp.649–662.
- Chiorazzi, N., 2007. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best practice & research. Clinical haematology*, 20(3), pp.399–413.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R. & Ferrarini, M., 2005. Chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 352(8), pp.804 –8015.
- Ibrahim, S. et al., 2001. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 98(1), pp.181–186.
- Isono, K. et al., 2005. Mammalian Polycomb-mediated repression of Hox genes requires the essential spliceosomal protein Sf3b1. *Genes and Development*, 19(5), pp.536–541.
- Jeromin, S. et al., 2014. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*, 28(1), pp.108–17.
- Juliusson, G. et al., 1990. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *The New England Journal of Medicine*, 323(11), pp.720–724.
- Kastan, M.B. et al., 1991. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *cancer research*, pp.6304–6311.
- Kastan, M.B. & Lim, D.S., 2000. The many substrates and functions of ATM. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(3), pp.179–86.
- Kikushige, Y. et al., 2011. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, 20(2), pp.246–259.
- Landau, D.A. et al., 2013. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4), pp.714–726.

- Landau, D.A. et al., 2015. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526(7574), pp.525–30.
- Lane, D.P., 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, pp.15–16.
- Leong, K. & Karsan, A., 2006. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, 107(6), pp.2223–2233.
- Liu, D. et al., 2004. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp.51338–51342.
- Loayza, D. & De Lange, T., 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, 423(6943), pp.1013–8.
- Lord, K.A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D.A., 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5(7), pp.1095–1097.
- Martínez, P. & Blasco, M.A., 2011. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews Cancer*, 11(3), pp.161–176.
- Martinez-Trillos, A. et al., 2014. Mutations in TLR / MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. , 123(June), pp.3790–3796.
- Matutes, E. et al., 1994. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8(10), pp.1640–1645.
- McCarron, K.F., Hammel, J.P. & Hsi, E.D., 2000. Usefulness of CD79b expression in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *American Journal of Clinical Pathology*, 113(6), pp.805–813.
- McCarthy, H. et al., 2003. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 101(12), pp.4903–8.
- Messmer, B.T. et al., 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), pp.755–764.
- Miller, C. et al., 1986. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature*, 319(6056), pp.783–784. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/319783a0>.

- Mohr, O., 1919. Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, 275(4), pp.275–282.
- Montserrat, E., 2006. New Prognostic Markers in CLL. *Hematology*, pp.279–284.
- Neilson, J.R. et al., 1997. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 11, pp.1929–1932.
- Notta, F. et al., 2011. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*, 469(7330), pp.362–367.
- Nowell, P.C., 1976. The Clonal Evolution of Tumor Cell Population. *Science*, 194(4260), pp.23–28.
- Puente, X.S. et al., 2015. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 526(7574), pp.519–524.
- Puente, X.S. et al., 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), pp.101–105.
- Quesada, V. et al., 2012. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 44(1), pp.47–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.1032>.
- Quesada, V. et al., 2013. The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *BMC medicine*, 11, p.124.
- Quesada, V., Ramsay, A.J. & Lopez-Otin, C., 2012. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *The New England journal of medicine*, 366, p.2530.
- Ramsay, A.J. et al., 2013. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*, 45(5), pp.526–30.
- Rawlings, D.J. et al., 2012. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol*, 12(4), pp.282–294.
- Rosati, E. et al., 2009. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*, 113(4), pp.856–865.
- Rosenwald, A. et al., 2001. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 194(11), pp.1639–1647.

- Rossi, D., Fangazio, M., et al., 2012. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(12), pp.2854–2862.
- Rossi, D. et al., 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(8), pp.1403–1412.
- Rossi, D., Rasi, S., et al., 2012. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(2), pp.521–529.
- Rossi, D. et al., 2011. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia : association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, 118(26), pp.6904–6908.
- Rossi, D. et al., 2009. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: Implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clinical Cancer Research*, 15(3), pp.995–1004.
- Rothe, M. et al., 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83(7), pp.1243–1252.
- Savitsky, K. et al., 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268(5218), pp.1749–1753.
- Shahjahani, M. et al., 2015. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cellular Oncology*, 38(2), pp.93–109.
- Shanafelt, T.D. et al., 2006. Prospective Evaluation of Clonal Evolution During Long-Term Follow-Up of Patients With Untreated Early-Stage Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 24(28), pp.4634–4641.
- Schuh, A. et al., 2012. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*, 120(20), pp.4191–4196.
- Sieklucka, M. et al., 2008. Apoptosis in B-CLL: The relationship between higher ex vivo spontaneous apoptosis before treatment in III-IV Rai stage patients and poor outcome. *Oncology Reports*, 19(6), pp.1611–1620.
- Sportoletti, P., Baldoni, S. & Cavalli, L., 2010. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *British Journal of Haematology*, 151(4), pp.404–406.

- Stankovic, T. et al., 1999. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *The LancetLancet*, 353(9146), pp.26–9.
- Stankovic, T. et al., 2004. Microarray analysis reveals that TP53 and ATM mutant B-CLLs share a defect in activation of pro-apoptotic responses following DNA damage but are distinguished by major differences in activation of pro-survival responses. *Blood*, 103(1), p.0. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958068.
- Stilgenbauer, S. et al., 2007. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: Acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica*, 92(9), pp.1242–1245.
- Tsimberidou, A.M. & Keating, M.J., 2005. Richter syndrome: Biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer*, 103(2), pp.216–228.
- Uziel, T. et al., 1996. Genomic Organization of the ATM Gene. *Genomics*, 33(0201), pp.317–320.
- Vallabhapurapu, S. & Karin, M., 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, 27, pp.693–733.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, a J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), pp.307–310.
- Vousden, K.H. & Lane, D.P., 2007. P53 in Health and Disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(4), pp.275–83.
- Wahl, M.C., Will, C.L. & Lührmann, R., 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*, 136(4), pp.701–718.
- Wang, C. et al., 1998. Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes and Development*, 12(10), pp.1409–1414.
- Wang, J. et al., 2014. Tumor evolutionary directed graphs and the history of chronic lymphocytic leukemia. *eLife*, 3.
- Wang, L. et al., 2011. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 365(26), pp.2497–506.
- Wesche, H. et al., 1997. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6), pp.837–847.

²Wharton, K.A. et al., 1985. Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*, 43(3), pp.567–581.

Zenz, T. et al., 2009. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion , TP53 mutation, p53-p21dysfunction nad miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*, 114(13), pp.2589–2597.

Zenz, T. et al., 2010. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 28(29), pp.4473–4479.

Citace z dalších zdrojů (webové stránky)

<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/chronic-leukemias/> (citováno dne 8.5. 2016)

² sekundární citace