

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení prognostických markerů u pacientů
s chronickou lymfocytární leukémií (CLL)**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Bučilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Hana Dřimalová, Ph.D.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Hany Dřímálové, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne:

.....

Bc. Kateřina Bučilová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Haně Dřimalové, Ph.D. za vedení celé diplomové práce, odborné vedení experimentu, za rady, ochotu a čas, který mi věnovala při řešení dané problematiky. Zvláštní poděkování patří rovněž kolektivu zaměstnanců Laboratoře molekulární biologie HOK FN a LF UP Olomouc. V neposlední řadě též děkuji mé rodině, přátelům a partnerovi za podporu během studia.

SOUHRN

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je klonální onemocnění B lymfocytů, které jsou z důvodu narušení mechanismů apoptózy akumulovány v periferní krvi, kostní dřeni, játrech, slezině a v dalších orgánech. Přesný mechanismus vzniku CLL není dodnes zcela znám a je předmětem výzkumu. CLL častěji postihuje starší populaci (50 let a více). Diplomová práce podává přehled nejdůležitějších prognostických ukazatelů u CLL pacientů a zaměřuje se především na molekulárně genetické markery.

Experimentální část mé diplomové práce je zaměřena na detekci mutací v genech *BIRC3* a *NOTCH1* u rizikových pacientů s CLL a to jak u refrakterních pacientů, kteří nereagují na provedenou léčbu, tak u pacientů, u kterých je onemocnění aktivní. Ve své práci jsem využila metody molekulární biologie - PCR, Sangerovo sekvenování, alternativní PCR metoda ARMS (Amplification refractory mutation system) a HRM (High resolution melting) analýza, umožňující detekci změny v jedné bázi.

Cílem diplomové práce bylo zavést HRM analýzu pro detekci mutací v genu *BIRC3* u pacientů s CLL a zjistit její uplatnění v rutinní praxi na Hemato-onkologické klinice LF a FN Olomouc. Praktická analýza nádorové DNA od souboru nemocných ukázala, že HRM analýza poskytne informace o přítomnosti či absenci mutace v genu *BIRC3* a může být vhodnou screeningovou metodou pro více pacientů najednou, ale musí být vždy ověřena i Sangerovým sekvenováním. Sangerovo sekvenování je tak stále plnohodnotnou metodou v rutinně molekulárně biologických vyšetření.

SUMMARY

The chronic lymphocytar leukemia (CLL) is a clonal disease of B lymphocytes which are accumulated in peripheral blood, bone marrow, liver, spleen or other organs thanks to the disorder of apoptosis mechanism. The accurate mechanism of the CLL genesis has not been entirely known up to present day and is the item of investigation. CLL affects elderly population (50 years and more) more often. This diploma thesis gives an overview of the most important prognostics indicators in CLL patients and it is focused especially on molecular-genetic markers.

The experimental part of my final thesis is focused on the detection of mutations in *BIRC3* and *NOTCH1* genes in risk patients with CLL in refractory patients, who do not react on the performed treatment, and also in patients where the disorder is active. In my thesis I used the method of molecular biology - PCR, Sanger sequencing, alternative PCR method ARMS (Amplification refractory mutation system) and HRM (High resolution melting) analysis which enables the detection of changes in one bases.

The aim of my diploma thesis was the implementation of HRM analysis in the detection of mutations in *BIRC3* gene in patients with CLL and the detection of its application in the routine praxis in the Hemato-oncological clinics in Olomouc University Hospital. The practical analysis of cancer DNA in a group of patients demonstrated that the HRM analysis gives information about the presence or absence of the mutation in *BIRC3* gene and it can be an appropriate screening method for more patients at the same time, but it must always be checked by Sanger's sequencing. Sanger's sequencing remains a fully-fledged method in the routine of molecular-biological examination.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Chronická lymfocytární leukémie	9
2.1.1	Epidemiologie CLL	9
2.1.2	Biologie CLL	10
2.1.3	Léčba CLL	12
2.1.3.1	Léčba 1. linie	12
2.1.3.2	Léčba refrakterních pacientů a relapsu	13
2.2	Prognostické markery u CLL	13
2.2.1	Určení diagnózy a klinické prognostické markery	13
2.2.2	Zdvojovací čas lymfocytů	15
2.2.3	Sérové markery	16
2.3	Cytogetické prognostické markery	16
2.3.1	Delece na dlouhém raménku 13. chromozomu	17
2.3.2	Delece na dlouhém raménku 11. chromozomu	18
2.3.3	Trizomie 12. chromozomu	20
2.3.4	Delece na krátkém raménku 17. chromozomu	21
2.3.5	Delece na dlouhém raménku 6. chromozomu	22
2.3.6	Chromozom 8 a MYC translokace	23
2.4	Molekulární prognostické markery	24
2.4.1	Mutační stav <i>IgVH</i>	24
2.4.2	<i>CD38</i>	25
2.4.3	<i>ZAP-70</i>	25
2.4.4	<i>BIRC3</i>	26
2.4.5	<i>ATM</i>	27
2.4.6	<i>SF3B1</i>	28
2.4.7	<i>TP53</i>	29
2.4.8	<i>NOTCH1</i>	30
2.4.9	<i>MYD88</i>	32
2.4.10	<i>FBXW7</i>	33
3	CÍL PRÁCE	34
4	MATERIÁL A METODIKA	35
4.1	Materiál	35

4.1.1	Biologický materiál	35
4.1.2	Chemikálie.....	35
4.1.3	Komerční kity	35
4.1.4	Roztoky.....	36
4.1.5	Vybavení laboratoře	36
4.1.6	Software a databáze	37
4.1.7	Soubor pacientů	37
4.2	Metody	37
4.2.1	Separace mononukleárních buněk na hustotním gradientu	37
4.2.2	Izolace DNA	38
4.2.3	Měření koncentrace DNA.....	38
4.2.4	PCR reakce – amplifikace částí genu <i>BIRC3</i>	38
4.2.5	Amplifikační refrakční mutační systém (ARMS)	39
4.2.6	Elektroforéza	40
4.2.7	Extrakce produktu z gelu.....	40
4.2.8	Sekvenační reakce	40
4.2.9	Purifikace sekvenačních produktů.....	41
4.2.10	Sekvenace kapilární elektroforézou.....	41
4.2.11	Vyhodnocení vzorků	42
4.2.12	HRM analýza.....	42
4.2.12.1	<i>Optimalizace HRM analýzy</i>	42
4.2.12.2	<i>HRM analýza – postup</i>	43
5	VÝSLEDKY	45
6	DISKUZE	51
7	ZÁVĚR	54
8	LITERATURA	55
8.1	Vědecké publikace	55
8.2	Internetové zdroje.....	66
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	68

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění patří v dnešním světě k nejvíce rozšířeným chorobám postihujících lidskou populaci. Je pro ně typický nekontrolovatelný růst buněk. Na vzniku nádorů se podílí celá řada faktorů jako například věk, dědičnost, celkový životní styl, ale i vliv prostředí. I přes pokroky moderní medicíny není stále vznik některých onemocnění objasněn. Hematologické malignity představují podle světové zdravotnické organizace 10 % všech onkologických onemocnění.

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je hemato-onkologické onemocnění, jehož vznik není doposud zcela pochopen. Patří k nejběžněji diagnostikovanému typu leukémie u dospělé populace v západních zemích. Nejčastěji postihuje jedince nad 50 let. K rizikovým faktorům, které se podílí na vzniku CLL, patří především věk a výskyt hematologické malignity u přímých příbuzných. Na základě rozsáhlých studií nebylo potvrzeno, že by se na vzniku CLL podílely vnější faktory, jako je například záření či různé mutagenní látky.

Chronická lymfocytární leukémie je klonální onemocnění B-lymfocytů, které jsou akumulovány v periferní krvi, kostní dřeni, játrech a dalších orgánech. Hromadění patologických B-lymfocytů je způsobeno narušením mechanismů buněčné smrti.

Při stanovení prognózy u pacientů s CLL rozlišujeme různé prognostické markery, které hrají zásadní roli při určení správného léčebného postupu. Klinické prognostické markery zahrnují výsledky klinického vyšetření pacienta, krevního obrazu, krevního nátěru a imunofenotypizace. Cytogenetické prognostické markery, detekované metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), odhalují početní i strukturní chromozomové odchylky. Molekulární prognostické markery, vyšetřované metodami molekulární biologie, odhalují přítomnost např. bodových mutací, kratších delecí a inzercí. Klinické, cytogenetické i molekulární markery nám poskytují ucelený obraz o stavu pacienta a na jejich základě je možné určit prognózu a zvolit optimální léčbu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Chronická lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejběžnější leukémií u dospělé populace v západních zemích a je charakterizována akumulací zralých B-lymfocytů s typickým fenotypem CD5+ v kostní dřeni, periferní krvi, játrech, slezině a dalších orgánech (Hallek, 2015). V periferní krvi je pro stanovení diagnózy nutná přítomnost více než $5 \times 10^9/l$ lymfocytů (Hallek *et al.*, 2008).

CLL je heterogenní onemocnění s extrémně variabilním klinickým průběhem. U některých pacientů se nemoc velmi rychle vyvíjí, vyžaduje chemoterapii a doba přežití je krátká i přes intenzivní léčbu, zatímco u jiných je průběh nemoci indolentní, terapeutická intervence není nutná a pacienti přežívají mnoho let (Cordoba *et al.*, 2016).

Příčina vzniku CLL není zcela objasněna. K rizikovým faktorům, které přispívají ke vzniku CLL, patří především vysoký věk a výskyt hematologické malignity v rodině. Rozsáhlé epidemiologické studie nepotvrdily, že by se na vzniku CLL podílel vliv vnějších faktorů jako např. ionizující záření, viry, magnetické pole, radiace, kancerogenní chemikálie a mutagenní léky (Kozák, 2008).

2.1.1 Epidemiologie CLL

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) se řadí k nejčastěji diagnostikovaným typům leukémií u dospělých v západních zemích (Hallek, 2015). Ze všech diagnostikovaných leukémií představuje téměř 30 %. V severských zemích dokonce 35 – 40 % (Panovská *et al.*, 2013). Naopak u Asiatů je CLL z neznámých příčin velmi vzácná (Yang *et al.*, 2015). Ve východní Asii představuje pouhých 3 – 5 % nemocných (Panovská *et al.*, 2011).

Výskyt je častější u bělošské populace a postihuje více muže než ženy (Howlander, 2015). U mužů se také běžněji setkáváme s agresivnějším průběhem CLL (Kozák, 2008). V České republice se incidence pohybuje okolo 6 případů na 100 000 obyvatel za rok (Hadrabová, 2015). Tato nemoc obvykle zasahuje starší populaci a má variabilní klinický průběh (Hallek, 2015). Medián věku při diagnóze je 70 let (Hadrabová, 2015). U osob mladších 50 let se CLL vyskytuje pouze vzácně, avšak po překročení tohoto věku

riziko vzniku nemoci razantně stoupá (Dighiero *et Hamblin*, 2008). V důsledku častějšího provádění krevních testů se zvyšuje podíl mladších pacientů, u nichž je onemocnění odhaleno v rané fázi a mají minimální příznaky nemoci (Hallek, 2015). Velmi ohroženou skupinu představují přímí příbuzní pacientů s CLL, u kterých je riziko vzniku několikrát vyšší než u běžné populace (Ghia *et al.*, 2007).

2.1.2 Biologie CLL

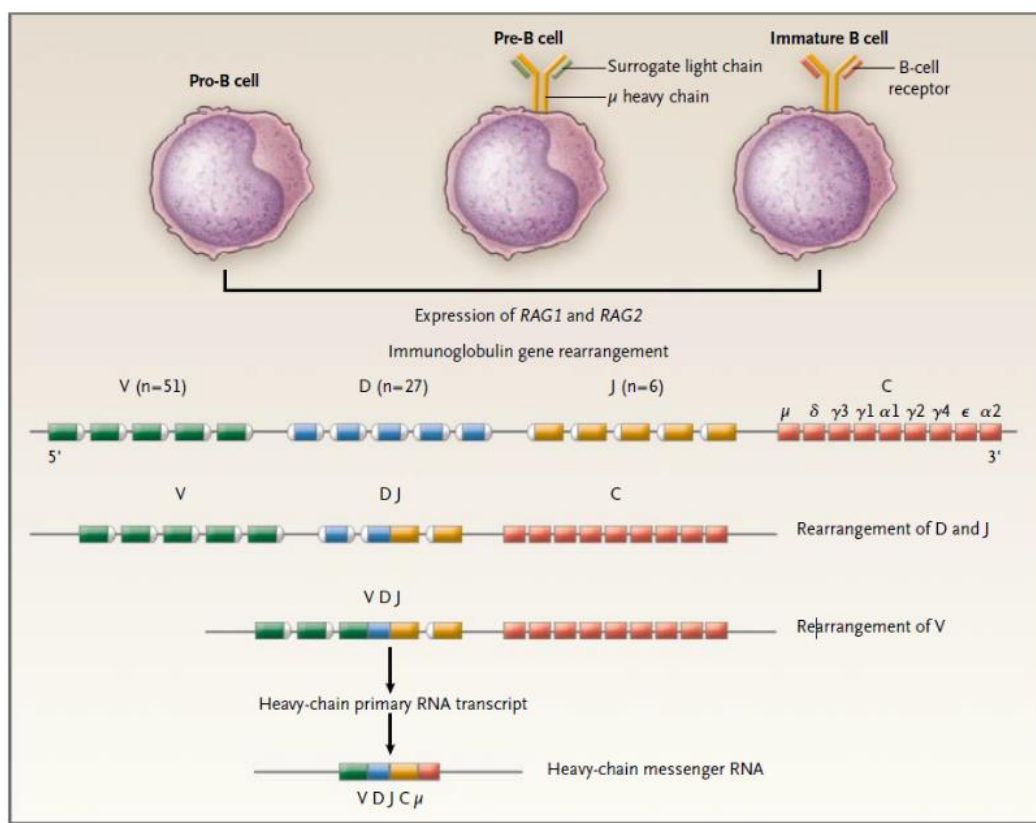
Z biologického hlediska se jedná o klonální onemocnění B-lymfocytů, při kterém dochází k nerovnováze mezi proliferací a apoptózou (Kozák, 2008). U pacientů s CLL jsou akumulovány antigenně stimulované zralé B-lymfocyty v kostní dřeni, periferní krvi, v játrech a slezině. Nádorové buňky se hromadí především z důvodu narušení mechanismů buněčné smrti (Chiorazzi *et al.*, 2005). Na této skutečnosti se spolupodílí i zvýšená exprese genu *BCL-2*, jehož nadbytek inhibuje apoptózu patologických lymfocytů a vede k jejich hromadění v organismu (Krejčí *et al.*, 2009).

B-lymfocyty označované také jako B buňky představují humorální složku specifické imunitní odpovědi. Prostřednictvím vysoce specifického receptoru B-Cell Receptor (BCR) rozpoznávají extracelulární antigen. BCR je na povrchu B-lymfocytů asi 120 000 a jejich struktura je velmi podobná struktuře protilátky. Snadno se pohybuje v buněčné membráně a pokud dojde k vazbě s antigenem, má afinitu přimykát se k ostrůvkům membránových lipidů. V případě aktivace BCR zralého B-lymfocytu antigenem dochází ke spuštění kaskády reakcí, které vedou k sekreci imunoglobulinů. Pokud se antigen naváže na nezralý B-lymfocyt, dojde k jeho apoptóze.

Po aktivaci BCR zralého lymfocytu volným antigenem dojde nejprve k oligomerizaci několika BCR a následně upevnění vazby na lipidové ostrůvky, ve kterých vznikne vnitrobuněčný signál směřující k cytoskeletu. Lipidové ostrůvky se shlukují a tvoří tzv. póly na povrchu B-lymfocytu. Polarizovaný B-lymfocyt následně proliferuje a vznikají efektorové plazmatické buňky, které žijí jen několik dní a jsou určeny k intenzivní produkci protilátek (Vrána *et al.*, 2011).

V kostní dřeni, kde B-lymfocyty vznikají, dochází zároveň k VDJ rekombinaci (viz obr. 1). Na základě této rekombinace jsou přeskupovány segmenty imunoglobulinových genů, které kódují BCR. Jako tzv. naivní putuje B-lymfocyt dále do periferní krve a v okamžiku, kdy se setká s antigenem, dojde k jeho aktivaci (van Lochem *et al.*, 2004; Hervé *et al.*, 2005).

Poté přechází do tmavé zóny germinálního centra lymfoidního folikulu, kde proliferuje, a zároveň dochází k somatickým hypermutacím variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinů (IgV_H) (Allen *et al.*, 2004). Objevem této somatické hypermutace došlo k významnému posunu v rámci stanovení prognózy a celkového přežití pacientů s CLL (Panovská *et al.*, 2013). Na základě tohoto objevu se CLL rozděluje na dvě podskupiny. První skupinu CLL představují buňky, které mají povrchový imunoglobulin kódovaný nemutovaným genem pro imunoglobulin (U-CLL). Druhý typ CLL (M-CLL) naopak představují buňky, které mají mutované geny pro povrchové imunoglobuliny (Kozák, 2008). Více viz dále v kapitole Molekulární prognostické markery.



Obr. 1: VDJ rekombinace

(převzato z Chiorazzi, 2005)

2.1.3 Léčba CLL

Pacienti s časným stádiem CLL (Rai 0, Binet A) nevyžadují léčbu a jsou pouze pravidelně sledováni (Panovská *et Doubek*, 2013). Indikací k zahájení léčby je aktivita nemoci např. rychlý nárůst lymfocytózy, únava, hubnutí a horečky neinfekčního původu u pacientů v intermediálním stádiu CLL (Rai I-II, Binet B). Nevyhnutelnost léčby je u pacientů v pokročilém stádiu CLL (Rai III-IV, Binet C) a je nutné ji zahájit co nejdříve (Hallek *et al.*, 2008). Je vhodné stanovit rozsah onemocnění na základě fyzikálního vyšetření, ultrasonografie břicha či CT hrudníku a břicha u mladších pacientů. Nezbytné je vyšetření FISH na přítomnost delece 17p a mutační analýza genu *TP53*, které mohou ovlivnit volbu léčebného postupu (Smolej *et al.*, 2013).

Léčba CLL v posledních dvou dekáдах zaznamenala výrazný vývoj a od monoterapie alkylačními cytostatiky se posunula k purinovým analogům, následně ke kombinované chemoterapii až k chemoimunoterapii. Chemoimunoterapie má příznivý vliv nejen na kvalitu léčebné odpovědi, ale i na celkové přežití pacientů s CLL. V současné době patří k nejúčinnější léčbě kombinace fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabinu (FCR). Kombinací těchto látek bylo dosaženo výborných výsledků v léčbě 1. linie (Hallek *et al.*, 2010).

2.1.3.1 Léčba 1. linie

V případě pacientů, kteří jsou v dobrém stavu bez významných přidružených onemocnění a s normální renální funkcí, je za nejvhodnější léčebný postup považován režim FCR. Pokud je u nemocného přítomna delece 17p nebo mutace genu *TP53*, je vhodná léčba pomocí ibrutinibu nebo kombinace léčiv idelalisib a rituximab (Eichhorst *et al.*, 2011).

U nemocných s významnými přidruženými chorobami se v případě léčby 1. linie volí možnost kombinace léčiv chlorambucilu nebo bendamustinu s rituximabem popřípadě s obinutuzumabem. V případě pacientů s delecí 17p nebo mutací v genu *TP53* se opět využívá ibrutinib nebo kombinace idelalisib a rituximab. U těžce komorbidních pacientů, u kterých se předpokládá krátká doba přežití, se využívá např. chlorambucil nebo cyklofosfamid (Smolej *et al.*, 2013). K výhodám chlorambucilu patří nízká toxicita, cena a možnost podávání orální cestou (Hallek, 2015).

2.1.3.2 Léčba refrakterních pacientů a relapsu

V případě pozdního relapsu, kdy se léčebná odpověď pohybuje v délce vyšší než 2 roky po chemoimunoterapii, se může zvolit opakované provedení této léčby. Pokud relaps nastane časněji (do 2 let) nebo v případě refrakterní CLL, musí být léčebný postup změněn. V případě relapsu či refrakterní CLL se zvažuje podání ibrutinibu nebo idelalisibu, které v porovnání s jinou dostupnou léčbou poskytují lepší kontrolu nemoci (Byrd *et al.*, 2014; Furmann *et al.*, 2014).

Případy refrakterní CLL by měly být konzultovány v centrech intenzivní hematologické péče. Je vhodné zvážit možnost alogenní transplantace krevetvorných buněk, která má kurativní potenciál (Smolej *et al.*, 2013).

2.2 Prognostické markery u CLL

Určení klinického stádia nemoci a následné prognózy je významné pro stanovení vhodné léčby pacienta. Díky využívání nejrůznějších moderních technologií jsou stále objevovány nové prognostické markery, které napomáhají co nejlépe určit rizikové skupiny pacientů a následně stanovit co nejefektivnější léčbu.

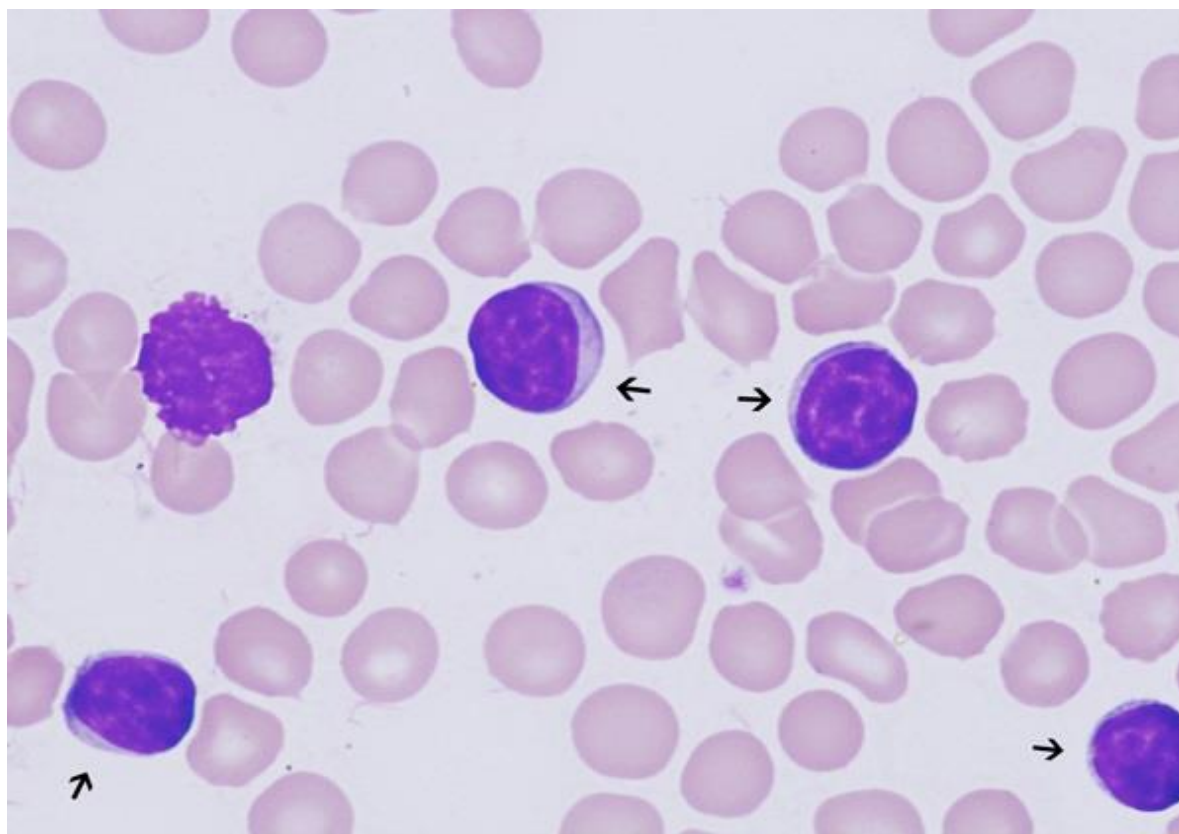
2.2.1 Určení diagnózy a klinické prognostické markery

Onemocnění může probíhat dlouhou dobu asymptomaticky. Téměř u 70 % pacientů je CLL diagnostikována náhodně při preventivních prohlídkách či předoperačním vyšetření na základě krevního obrazu (Montserrat *et Moreno*, 2008). V pokročilých fázích onemocnění se setkáváme s řadou příznaků, mezi které patří např. noční pocení, hubnutí, zvětšená játra a slezina (Ráčil *et al.*, 2011).

Pro určení diagnózy je vyžadováno vyšetření krevního obrazu s manuálním diferenciálním rozpočtem a průtoková cytometrie periferní krve s nálezem více než $5 \times 10^9/l$ klonálních lymfocytů typického fenotypu CD5+, CD19+ a CD23+. Dále exprese antigenu CD20 slabě pozitivní, povrchové imunoglobuliny slabě pozitivní, CD79a a FMC7 slabě pozitivní až negativní (Hadrabová, 2015).

Lymfocyty, které se vyskytují u typické formy CLL (viz obr. 2), jsou uniformní a zralé s kulatým nebo oválným jádrem, hutným, kondenzovaným chromatinem. Jadérka nejsou patrná. Cytoplazma tvoří úzký lem, který je agranulární a slabě bazofilní. Nádorové

lymfocyty jsou velmi křehké. V krevním nátěru nacházíme množství jaderných stínů a rozpadajících se buněk, které se nazývají Gumprechtovy stíny (viz obr. 2) (Panovská *et* Doubek, 2013).



Obr. 2: Atypické lymfocyty, Gumprechtovy stíny.

Šipkou označeny **atypické lymfocyty** s mozaikovitou strukturou chromatinu, charakteristické pro dg. CLL. Zcela vlevo (ke středu) je buněčný stín – máme-li potvrzenou diagnózu CLL, pak se tento buněčný stín nazývá **Gumprechtův stín** – jedná se o rozetřený lymfocyt (poškozená buňka). Tyto stíny vznikají při nátěru periferní krve na podložní sklo – fragilní lymfocyty (díky onemocnění CLL) se při nátěru rozbijí a zůstanou jen buněčné stíny. (Převzato z databáze HOK FN a LF UP Olomouc)

Vzhledem k tomu, že CLL je klinicky velmi heterogenní onemocnění lišící se mírou progresu, vnímavostí k léčbě a celkového přežití, jsou pro určení aktuálního klinického stádia dodnes využívány 2 základní skórovací systémy. Jedním z nich je klasifikace podle Raie (viz tab. I) známá od roku 1975 a druhým je klasifikace dle Bineta (viz tab. II) používaná od roku 1981. Tyto systémy jsou založeny na vyšetření krevního obrazu, avšak klasifikace podle Bineta navíc zahrnuje informace o počtu oblastí, kde má pacient zvětšené lymfatické uzliny

v oblastech hlavy, krku, třísel, a také zvětšení jater nebo sleziny (Binet *et al.*, 1981; Rai *et al.*, 1975).

Rai, stejně jako Binet, rozlišuje 3 prognostické skupiny pacientů s nízkým, středním a vysokým rizikem. U každé z těchto skupin se výrazně liší medián celkového přežití (Panovská *et Doubek*, 2013).

Tab. I: Klasifikace CLL podle Raie

Klasifikace podle Raie	Klinické projevy	Medián OS (měsíce)
Nízké riziko	Lymfocytóza	> 150
Střední riziko	Lymfocytóza, lymfadenopatie, hepato/splenomegalie	100
Vysoké riziko	Hb < 110 g/l nebo PLT < 100.10 ⁹ /l	19

Hb – hladina hemoglobinu, PLT – trombocyty v periferní krvi, OS – overall survival

(upraveno podle Hadrabová, 2015)

Tab. II: Klasifikace CLL podle Bineta

Klasifikace podle Bineta	Krevní obraz	Lymfadenopatie	Medián OS (měsíce)
A	Hb > 100 g/l a PLT > 100.10 ⁹ /l	0 – 2 postižené oblasti	Nedosažen
B	Hb > 100 g/l a PLT > 100.10 ⁹ /l	3 a více oblastí	84
C	Hb < 100/g/l a/nebo PLT < 100.10 ⁹ /l	Libovolný počet	24

Hb – hladina hemoglobinu, PLT – trombocyty v periferní krvi, OS – overall survival

(upraveno podle Hadrabová, 2015)

2.2.2 Zdvojovací čas lymfocytů

Prognostický význam kinetiky lymfocytů byl objeven již v roce 1966 (Galton, 1966). Lymphocyte doubling time (LDT) neboli zdvojovací čas lymfocytů je doba, za kterou dojde k zdvojnásobení počtu lymfocytů v periferní krvi. Pokud je LDT kratší než 12 měsíců, pacienti mají horší prognózu. Tento parametr je také využíván při indikaci k zahájení terapie. V případě, že je LDT kratší než 6 měsíců nebo pokud dochází k nárůstu lymfocytů o 50 % v čase kratším, než jsou 2 měsíce, je nutné zvážit zahájení terapie, avšak s ohledem na další parametry (Panovská *et al.*, 2011).

2.2.3 Sérové markery

V séru pacientů s CLL bylo objeveno několik markerů, které jsou významné pro stanovení prognózy. Zvýšená hladina některých markerů je spojena s agresivním průběhem CLL. Mezi tyto markery patří například β -2 mikroglobulin nebo thymidinkináza (Panovská *et al.*, 2011). β -2 mikroglobulin je sérový marker, který koreluje s nádorovou zátěží (Shanafelt *et al.*, 2004). Jedná se o extracelulární proteinovou složku z HLA třídy I a je přítomen v malých množstvích v séru a moči zdravých jedinců. Některé virové infekce mohou způsobit zvýšení hladiny β -2 mikroglobulinu (cytomegalovirus, virus Epstein-Barrové), ale zvýšení hladiny tohoto markeru bylo pozorováno také u pacientů s lymfoproliferativními onemocněními. Vysoká hladina β -2 mikroglobulinu je například nepříznivým prognostickým faktorem u CLL pacientů (Sagatys *et Zhang*, 2012). K významným sérovým markerům patří také thymidinkináza. Jedná se o enzym, který se podílí na syntéze DNA a je markerem buněčné proliferace. Hladina tohoto enzymu je zvýšena u pacientů s pokročilým stádiem onemocnění (Panovská *et al.*, 2011).

2.3 Cytogenetické prognostické markery

Přítomnost cytogenetických aberací hraje důležitou roli v patogenezi CLL. Genetické studie s využitím široké škály laboratorních metod (FISH, Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace) identifikovali široké spektrum genetických abnormalit (Puiggros *et al.*, 2014). Pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je možné detekovat aberace u více než 80 % pacientů (Vroblová *et al.*, 2009). Zhruba 20 % pacientů s CLL má normální karyotyp (Palma *et al.*, 2006). Chromozomální aberace a genové mutace mají význam pro stanovení prognózy pacientů s CLL (viz tab. III) (Rossi *et al.*, 2013). Nejčastější chromozomální aberace jsou například delece 11q, 13q a 17p nebo trizomie chromozómu 12. Bylo dokázáno, že delece některých chromozomů například 11q či 17p jsou spojeny se špatným klinickým průběhem a staly se důležitými prognostickými faktory (Puiggros *et al.*, 2014).

V průběhu onemocnění se u pacientů mohou objevovat nové cytogenetické aberace – dochází k tzv. klonálnímu vývoji. Z tohoto důvodu se doporučuje provádět FISH nejen v době diagnózy, ale i před léčbou nebo při progresi CLL.

Tab. III: Prognostické podskupiny a přidružené rizikové genetické faktory CLL v době stanovení diagnózy

Kategorie	Asociované genetické faktory
Velmi vysoké riziko	del (17p) <i>TP53</i> mutace <i>BIRC3</i> mutace
Vysoké riziko	del (11q) <i>ATM</i> mutace <i>NOTCH1</i> mutace <i>SF3B1</i> mutace
Středně vysoké riziko	Trizomie 12 Normální karyotyp
Nízké riziko	Izolovaná del (13q)

(upraveno podle Puiggros *et al.*, 2014)

2.3.1 Delece na dlouhém raménku 13. chromozomu

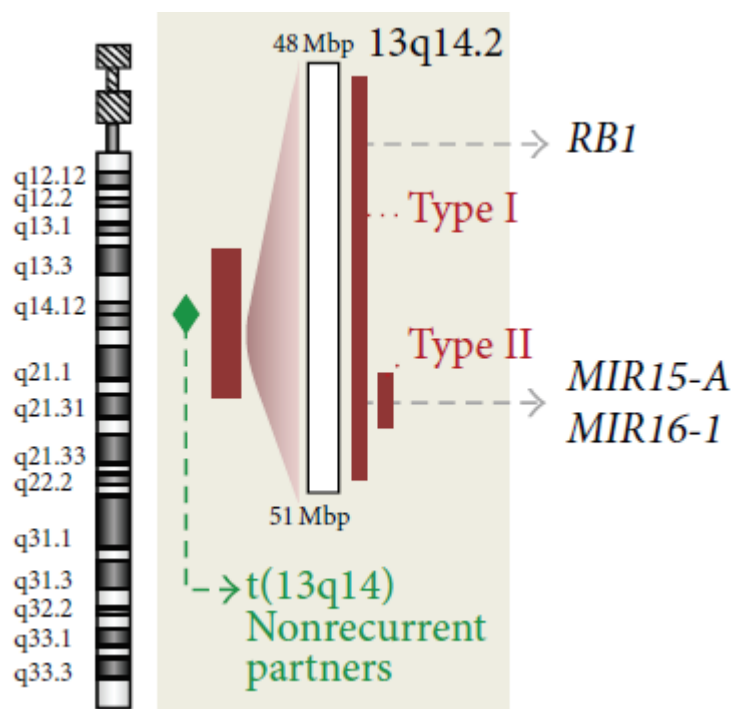
Deleci 13q14 (viz obr. 3) nacházíme u více než 50 % pacientů s CLL. S monoalelickou 13q14 delecí se setkáváme téměř u 70 % pacientů s CLL, zatímco s bialelickou 13q14 delecí pouze v 19 % případů (Smonskey *et al.*, 2012). Jedná se o nejběžnější cytogenetickou aberaci detekovanou pomocí FISH. V minulosti byla spojována s příznivou prognózou, avšak v posledních letech některé studie ukázaly, že určité geny lokalizované na chromozomu 13q by mohly být zodpovědné za patogenezi a prognostickou heterogenitu u pacientů s delecí 13q (Puiggros *et al.*, 2014).

Významný gen ležící v této oblasti je tumor-supresorový gen *RBI* (gen retinoblastomu). Ztráta funkce tohoto genu a také defekt v syntéze fosfoproteinu, který je tímto genem kódován, hraje významnou roli v kontrole buněčného cyklu a regulaci transkripce, což by mohlo být důležitým faktorem spouštějícím klonální expanzi B buněk (Papajík *et al.*, 2006). Bialelická delece genu *RBI* je vzácná, což naznačuje, že existují i jiné geny zapojené do patogeneze CLL.

Další úseky deletované v lokusu 13q14 u CLL pacientů jsou geny kódující mikroRNA, konkrétně *miR-15a* a *miR-16*, které vykazují aktivitu tumor supresorových genů tím, že indukují apoptózu a inhibují proliferaci. V případě, že delece 13q zahrnuje gen *RBI*, hovoříme o delecí typu I, která je spojena s kratší dobou přežití do zahájení první léčby

a s kratším celkovým přežitím než delece typu II, která zahrnuje *miR15a* a *miR-16-1* (viz obr. 3) (shrnutí v Puiggros *et al.*, 2014).

Pacienti s izolovanou delecí 13q14 mají dobrou prognózu, choroba zůstává dlouhodobě stabilní a neaktivní (Papajík *et al.*, 2006). Medián celkového přežití se pohybuje kolem 113 měsíců (viz tab. IV) (Kozák, 2008).



Obr. 3: Chromozom 13 a významné geny pro CLL

(upraveno podle Puiggros *et al.*, 2014)

2.3.2 Delece na dlouhém raménku 11. chromozomu

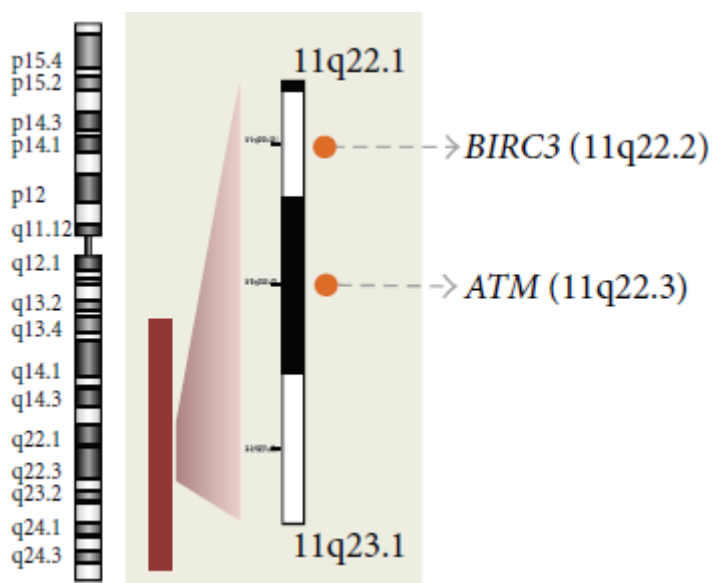
Delece dlouhého raménka 11. chromozomu (viz obr. 4) je druhou nejčastější aberací u pacientů s CLL (Papajík *et al.*, 2006). Je detekována téměř u 20 % nemocných (Puiggros *et al.*, 2014). Deletovaná oblast vyskytující se mezi q22-23 obsahuje mnoho kandidátních tumor supresorových genů (Dickinson *et al.*, 2005). K těmto genům, které jsou důležité zejména pro patogenezi CLL, patří mimo jiné gen *ATM* a *BIRC3* (Rossi *et al.*, 2012).

Nedávné studie poukazují na vysoký výskyt delece nebo mutace v genu *BIRC3*, který je negativním regulátorem NF- κ B signalizace lokalizované na 11q22. Bylo zjištěno, že delece a/nebo mutace *BIRC3* se nevyskytuje souběžně s poruchami v genu *TP53* a je spojena

s rezistencí na fludarabin. V době diagnózy předpovídá horší prognózu nezávisle na delecí 11q.

Delece 11q zahrnující gen *ATM* byla spojena s rychlejší progresí nemoci. Pacienti, léčení chemoterapií, u kterých byla přítomna *ATM* mutace a 11q delece, měli podstatně kratší celkové přežití i progresi onemocnění. Bylo prokázáno, že *ATM* mutace vyskytující se v 30 – 40 % případů a delece a/nebo mutace *BIRC3* mají prognostický význam v CLL. U pacientů s delecí 11q byla však delece/mutace *BIRC3* spojena s delší dobou přežití než u *ATM* mutace. Na základě výsledků studie Rose-Zerilli *et al.* (2014) je zřejmé, že interpretace klinického dopadu *BIRC3* abnormalit bez současné znalosti *ATM* mutačního statusu není možná (Rose-Zerilli *et al.*, 2014).

Delece 11q22-3 je spojena s výraznou lymfadenopatií, špatnou odpovědí na léčbu a s horší prognózou u pacientů do 55 let. Medián přežití je 79 měsíců (viz tab. IV) (Kozák, 2008; Rose-Zerilli *et al.*, 2014). Především u mladších pacientů je spojena s agresivním průběhem onemocnění (Panovská *et al.*, 2011). S touto delecí se setkáváme u 25 % neléčených pacientů v pokročilém stádiu onemocnění a u 10 % pacientů v raném stádiu onemocnění. Špatnou prognózu této genetické aberace lze překonat pomocí chemoimunoterapie u dříve neléčených pacientů (Hallek, 2015).



Obr. 4: Chromozom 11 a významné geny pro patogenezi CLL

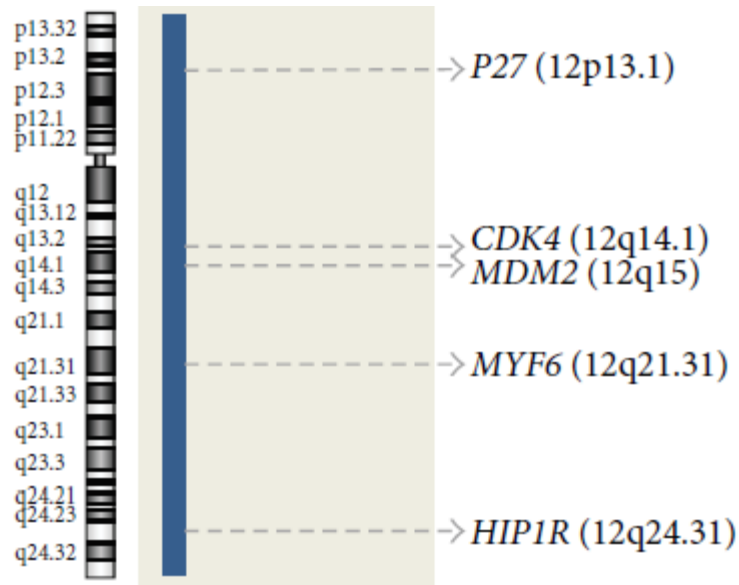
(upraveno podle Puiggros *et al.*, 2014)

2.3.3 Trizomie 12. chromozomu

Trizomie 12. chromozomu (viz obr. 5) patří mezi časté aberace vyskytující se u pacientů s CLL. Setkáváme se s ní v 10 – 20 % případů (Zenz *et al.*, 2010). V 40 – 60 % případů se objevuje jako jediná genetická aberace, avšak může být spojena i s dalšími chromozomálními aberacemi (např. 13q, 11q nebo 17q) (Puiggros *et al.*, 2014). Analýzy přežití pacientů s izolovanou trisomií 12 neprokázaly rozdíl v celkovém přežití těchto nemocných v porovnání s nemocnými s normálním karyotypem (Papajík *et al.*, 2006). Medián přežití je asi 114 měsíců (viz tab. IV) (Kozák, 2008). V nedávné době se ukázalo, že u pacientů s trizomií 12 se vyskytuje s vysokou frekvencí mutace v genu *NOTCH1*, který je spojován společně s nemutovaným *IgVH* s horší prognózou (Puiggros *et al.*, 2014). U pacientů, u nichž se vyskytuje trizomie 12. chromozomu, se dále setkáváme se zvýšenou expresí CD38 a také s atypickou morfologií lymfocytů (Quijano *et al.*, 2008).

Trizomie chromozomu 12 spolu s poškozením genu *TP53* nebo delecí 11. chromozomu a dále také mutace genu *NOTCH1* vykazují výrazně horší prognózu v porovnání s pacienty, u kterých se vyskytuje trizomie 12. chromozomu samostatně nebo v kombinaci s delecí chromozomu 13 (Del Giudice *et al.*, 2012).

V případě trizomie chromozomu 12 bylo obtížné stanovit soubor kandidátních genů především z toho důvodu, že postiženou oblast představuje celý chromozom. Nicméně pomocí RNA a proteinové analýzy exprese se předpokládá, že trisomie 12. chromozomu je asociována s up-regulací genů distribuovaných po celém chromozomu jako například *P27*, *CDK4*, *HIP1R*, *MYF6* a *MDM2*. Nadměrná exprese *HIP1R* byla navržena jako nejlepší potencionální marker, avšak klinický význam zůstává nejistý. *MDM2* je zapojen do degradace p53 a jeho zvýšená exprese může vést k dysregulaci buněčného cyklu (Puiggros *et al.*, 2014).



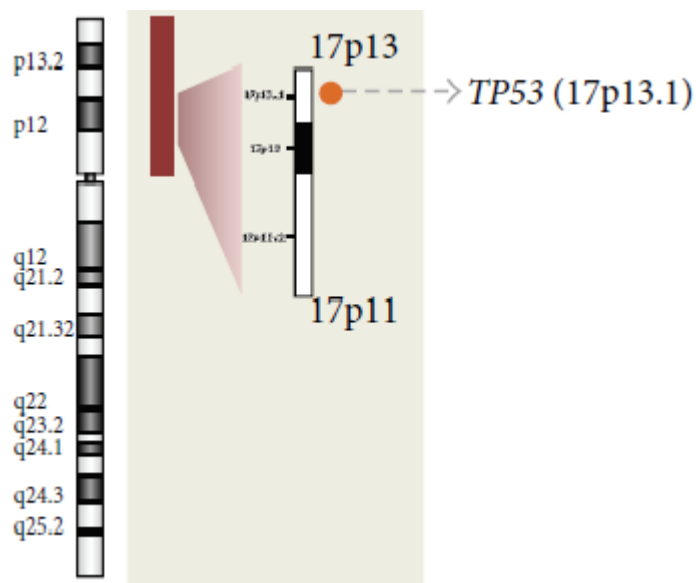
Obr. 5: Chromozom 12 a kandidátní geny pro stanovení patogeneze CLL

(upraveno podle Puiggros *et al.*, 2014)

2.3.4 Delece na krátkém raménku 17. chromozomu

S delecí krátkého raménka 17. chromozomu (viz obr. 6) se setkáváme u 5 – 8 % pacientů, kteří nepodstoupili chemoterapii. Tato delece téměř vždy zahrnuje oblast 17p13, kde se nachází tumor supresorový gen *TP53* (Hallek, 2015).

Gen *TP53* je u CLL nejčastěji poškozen právě delecí 17p13 v kombinaci s mutací druhé alely, ale vyskytovat se mohou i samostatné delece a mutace, tzv. monoalelické abnormality. Již delece jedné alely vede k porušení funkce proteinu p53. Pacienti s delecí 17p13 a/nebo mutací genu *TP53* mají nejhorší prognózu (Motyčková *et al.*, 2011). Délka přežití je asi 32 měsíců (viz tab. IV) (Kozák, 2008). Přibližně 40 % pacientů s del (17p) a mutací *TP53* je rezistentních k léčbě a je nutné u nich využít alternativní terapie jako je například alogenní transplantace kmenových buněk (Rossenquist *et al.*, 2013).



Obr. 6: Chromozom 17 a významný gen pro patogenezi CLL

(upraveno podle Puiggros *et al.*, 2014)

Tab. IV: Chromozomální aberace a celkové přežití pacientů s CLL

Karyotyp	Medián přežití (měsíce)
Delece 17p	32
Delece 11q	79
Trizomie 12	114
Normální karyotyp	111
Delece 13q	113

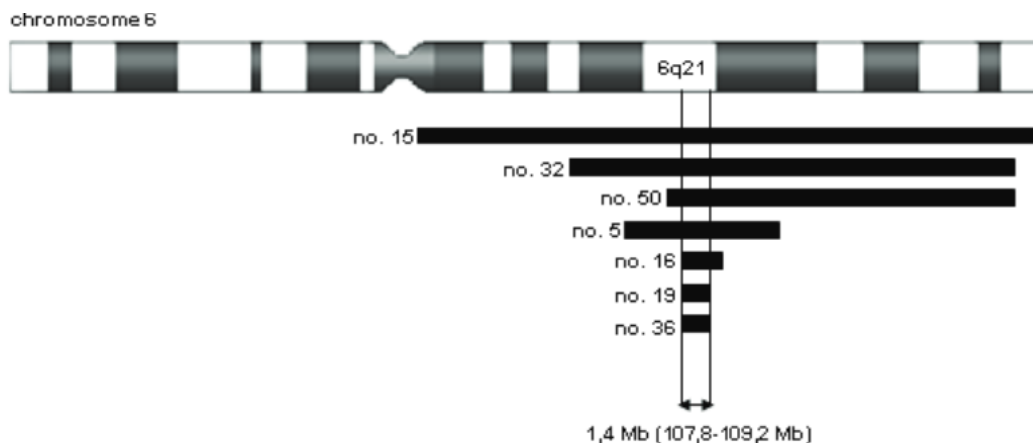
(upraveno podle Kozák, 2008)

2.3.5 Delece na dlouhém raménku 6. chromozomu

Frekvence výskytu této cytogenetické aberace je relativně nízká a setkáváme se s ní pouze u 3 – 6 % pacientů s CLL. Nejčastěji zasahuje oblast 6q21 (viz obr. 7). Delece na dlouhém rameni 6. chromozomu se objevuje také u dalších lymfoidních malignit např. u akutní lymfoblastické leukémie či non-Hodgkinova lymfomu. Tento fakt silně naznačuje, že se v deletované oblasti může nacházet zatím neidentifikovaný tumor supresorový gen (Dalsass *et al.*, 2013).

Del 6q je zpravidla spojena s jinými karyotypickými abnormalitami a pouze zřídka se vyskytuje jako jediná chromozomální abnormalita. Nebylo prokázáno, že by přítomnost této

delece měla vliv na přežití pacientů. U nemocných s touto delecí se setkáváme s vysokým počtem leukocytů a rozsáhlejší adenopatií (Wang *et al.*, 2011).



Obr. 7: Chromozom 6 a znázornění deletované oblasti 6q21

Černé pruhy reprezentují deletovanou oblast podél chromozomu 6q

(převzato z Urbankova *et al.*, 2014)

2.3.6 Chromozom 8 a MYC translokace

Abnormality v chromozomu 8 jsou pozorovány u 2 – 5 % pacientů s CLL (Blanco *et al.*, 2014). Přestože se původně předpokládalo, že CLL je onemocnění způsobené narušením apoptózy, je nyní zřejmé, že zvyšující se buněčné dělení a akumulace buněk hraje zásadní roli. Molekulární mechanismy, které řídí buněčné dělení v CLL, nejsou zcela pochopeny. Klíčem k pochopení by mohl být proto-onkoprotein MYC, regulátor vstupu buněk do buněčného cyklu. MYC je transkripční faktor, který je aktivován mitogeny a reguluje expresi proteinů nezbytných pro progresi buněčného cyklu a buněčného růstu. Nedávné studie ukázaly, že exprese MYC je zvýšena u pacientů s CLL (Krysov *et al.*, 2012).

Translokace zahrnující MYC jsou vzácné u CLL a doposud jejich prognostický význam zůstává nejasný. Častěji byly pozorovány v souvislosti s nepříznivými cytogenetickými markery. Zdá se, že MYC translokace je spojena s horší prognózou. Nedávné studie naznačují, že chromozomální translokace obecně mohou mít negativní dopad v souvislosti s odpovědí na léčbu a celkové přežití. Charakteristika těchto translokací je důležitá pro identifikaci podskupin pacientů, kteří by měli být pečlivě sledováni. Translokace jsou také spojovány s progresí a transformací do agresivnější formy onemocnění (Put *et al.*, 2012).

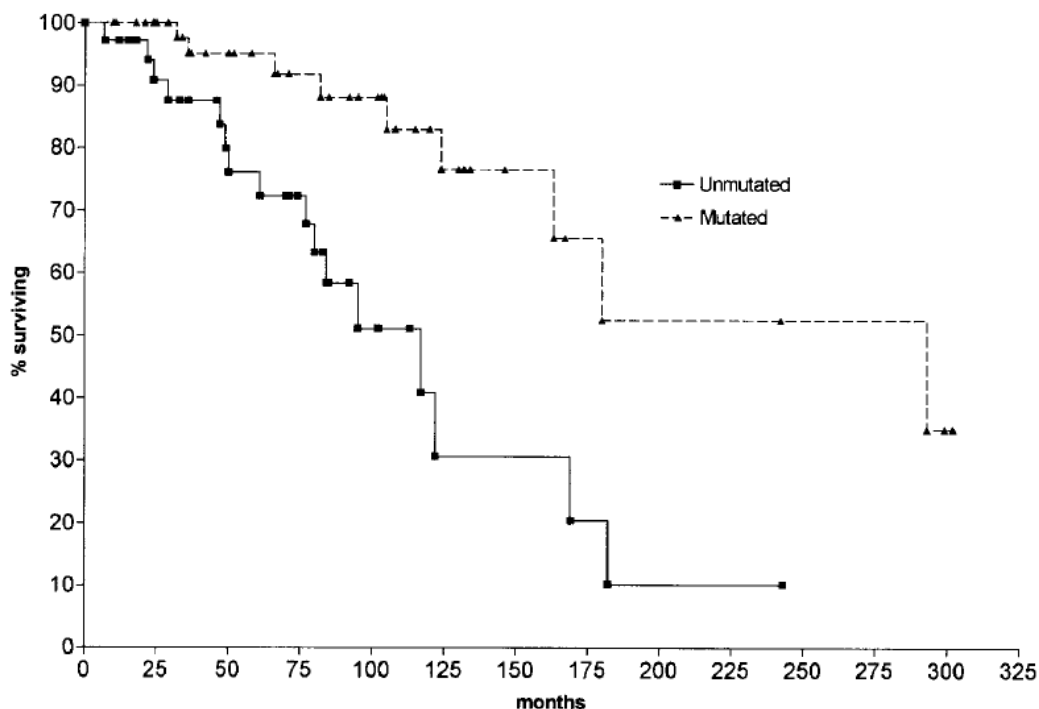
2.4 Molekulární prognostické markery

Cytogenetická analýza metodou FISH nám umožňuje detekci pouze velkých genetických aberací, které jsou rozpoznány specifickými sondami. Nevýhodou metody FISH je fakt, že její citlivost může být v počátcích onemocnění nižší, zejména pokud mají pacienti malé procento klonálních buněk v periferní krvi (Zent *et al.*, 2014).

Molekulárně genetickými metodami, jako jsou Sangerovo sekvenování a především pak pokročilými technikami sekvenování nové generace, jsou identifikovány i malé strukturální změny, polymorfismy či bodové mutace, které mají význam při stanovení prognózy CLL (Meldrum *et al.*, 2011; Ekblom *et al.*, 2010). V souvislosti s CLL bylo odhaleno poškození mnoha genů, např. *NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88* a *BIRC3*. Změny v těchto genech se vyskytují přibližně v 5 – 10 % případů CLL. Významnou korelaci s přežitím pacientů vykazují především geny *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3* a *TP53*. Tento objev podnítl integraci nově zjištěných genetických aberací do prognostického modelu založeného jak na přítomnosti chromozomálních abnormalit, tak i genových mutací (Rossi *et al.*, 2013).

2.4.1 Mutační stav *IgVH*

Zásadní posun v chápání CLL a stanovení prognózy bylo porovnání pacientů s mutovaným a nemutovaným genem *IgVH* (Moreno *et al.*, 2010). Přítomnost či absence somatické mutace v genu *IgVH*, který kóduje variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu, rozděluje pacienty s CLL do dvou podmnožin (Matthews *et al.*, 2004). Pacienti, u kterých je gen *IgVH* mutovaný (M-CLL), vykazují mnohem příznivější výsledky než pacienti s nemutovaným genem *IgVH* (U-CLL). Výjimku představují případy s výskytem genového segmentu *IgVH3-21*, kde se setkáváme se špatnou prognózou nezávisle na mutačním stavu *IgVH* (Moreno *et al.*, 2010). Na základě provedených studií bylo dokázáno, že přežití pacientů s nemutovaným *IgVH* se pohybuje v rozmezí 79 – 119 měsíců, na rozdíl od druhé skupiny pacientů, kde se medián přežití pohybuje v rozmezí 124 – 293 měsíců (viz obr. 8) (Matthews *et al.*, 2004). Mutační stav *IgVH* je tak i v současnosti považován za jeden z nejdůležitějších prognostických ukazatelů.



Obr. 8: Kaplan-Maierova křivka přežití pacientů s CLL ve srovnání s mutovaným a nemutovaným *IgVH*

Medián přežití U-CLL je 117 měsíců. Medián přežití u M-CLL je 293 měsíců
(převzato z Hamblin *et al.*, 1999)

2.4.2 CD38

Transmembránový glykoprotein CD38 s adenosindifosfát-ribozocyklázovou aktivitou je exprimován hematopoetickými buňkami. Má schopnost transdukovat signály důležité pro regulaci buněčné proliferace a přežití (Papajík *et al.*, 2006). Exprese CD38 v leukémických lymfocytech byla prvním markerem, u kterého byla zjištěna korelace s mutačním stavem *IgVH*. Nakonec se však ukázalo, že tento vztah není absolutní a podle některých studií se může exprese CD38 měnit v čase. Mutace v genu *IgVH* a exprese CD38 jsou tedy nezávislými prognostickými faktory (Montserrat, 2006).

2.4.3 ZAP-70

Zeta-asociovaný cytoplazmatický protein s tyrosin-kinázovou aktivitou o molekulární hmotnosti 70 kDa je jedním z odlišně exprimovaných genů u pacientů s CLL a není exprimován v normálních B-lymfocytech. (Papajík *et al.*, 2006). Protein ZAP-70 je klíčovou

signalizační molekulou T-lymfocytů a NK buněk. Je asociován se zvýšenou intracelulární signalizací prostřednictvím imunoglobulinového receptoru (Schroers *et al.*, 2005).

Zvýšená hladina exprese ZAP-70 se vyskytuje u pacientů s nemutovaným stavem *IgVH* a horší prognózou. Pacienti s klinickým stadiem Binet A, ale se zvýšenou hladinou exprese ZAP-70 (nad 20% pozitivních leukémických buněk), mají rychlejší progresi onemocnění a kratší dobu přežití než ti s normální hladinou ZAP-70 (Crespo *et al.*, 2003). Protein ZAP-70 byl tedy považován za nejslibnější marker, který měl nahradit stanovení mutačního stavu *IgVH*. V některých pracech bylo ovšem prokázáno, že korelace s mutačním stavem se nevyskytuje u všech pacientů, exprese ZAP-70 se může měnit v průběhu onemocnění a nevýhodou je i nestandardizovaná metodika. ZAP-70 je tedy dnes používán jako doplňující prognostický ukazatel (Vroblova *et al.*, 2010).

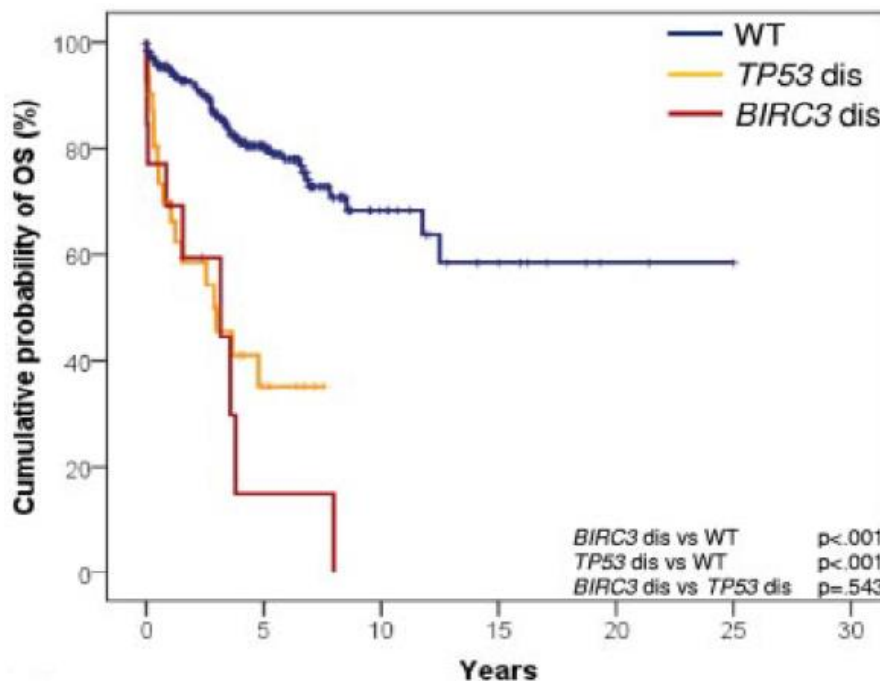
2.4.4 *BIRC3*

Gen *BIRC3* kóduje protein, který patří do rodiny proteinů IAP (inhibitory apoptotických proteinů), které inhibují apoptózu. Je lokalizován na lokusu 11q22, obsahuje 9 exonů a jeho velikost je 29 kb. Obsahuje 3 IAP repetice a RING doménu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/330>).

Většina mutací *BIRC3* se vyskytuje v C-koncové oblasti RING domény, která je důležitá pro degradaci MAP3K14 (Rossi *et al.*, 2013). *BIRC3* kooperuje s proteinovým komplexem, který negativně reguluje tuto MAP3K14 serin-threonin kinázu, centrální aktivátor NF- κ B signalizace (Rossi *et Gaidano*, 2012a). Inaktivace *BIRC3* způsobená mutací je příčinou nadměrné aktivace MAP3K14 dráhy a zvýšené hladiny NF- κ B, což vede ke zvýšené proliferaci a odolnosti k apoptóze (Gaidano *et al.*, 2012; Vallabhapurapu *et al.*, 2009). Aktivace dráhy NF- κ B je v CLL považována za mechanismus rezistence na eradikaci nemoci. Aktivace této dráhy koreluje se zvýšenou rezistencí proti fludarabinu u pacientů s CLL (Rossi *et Gaidano*, 2012a). U pacientů s CLL jsou mutace v genu *BIRC3* známkou agresivního průběhu onemocnění a horší prognózy (Zent *et Burack*, 2014).

S mutací v genu *BIRC3* se u pacientů s CLL setkáváme pouze u 4 % případů v době diagnózy, častěji při relapsu nebo u pacientů refrakterních na fludarabin (Foá *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2012). *BIRC3* delece a/nebo mutace se nevyskytuje současně s abnormalitami *TP53* a předpovídá horší prognózu a celkovou dobu přežití nezávisle na deleci 11q. Celkové přežití pacientů s abnormalitami v genu *BIRC3* je podobné jako u pacientů nesoucí *TP53*

abnormality (viz obr. 9) (Rossi *et al.*, 2012). Četnost výskytu a význam jednotlivých *BIRC3* abnormalit je však doposud stále nejasný.



Obr. 9: Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití u nově diagnostikovaných pacientů s CLL zahrnující poškození genů *BIRC3* a *TP53*

Medián přežití pacientů s *BIRC3* aberací je 3,1 roku. U pacientů s abnormalitou v genu *TP53* je medián přežití 2,9 roku (převzato z Rossi *et al.*, 2012)

2.4.5 *ATM*

Gen *ATM* je lokalizován na lokusu 11q22-q23. Obsahuje 69 exonů a jeho velikost je 191 kb. Protein kódovaný tímto genem patří do PI3/PI4 - kinázové rodiny. Tento protein je důležitým kontrolním bodem buněčného cyklu. Spolu s kinázou ATR jsou nutné pro buněčnou odpověď na poškození DNA a pro stabilitu genomu, rovněž jsou tzv. master kontroléry kontrolního bodu buněčného cyklu. Funguje jako regulátor široké škály navazujících proteinů, včetně tumor supresorového proteinu p53 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472>).

Expresse *ATM* se zvyšuje v případě poškození dsDNA, na základě čehož dochází k zástavě G1/S a G2/M fáze buněčného cyklu. Bývá aktivována také reparace DNA a apoptóza v případě nedostatečné opravy DNA (Sperka *et al.*, 2012).

U pacientů s CLL se s mutací v genu *ATM* setkáváme ve 12 % případů, avšak u pacientů s delecí 11q23 se procento výskytu této mutace zvyšuje na 30 % (Ouillette *et al.*, 2012; Austen *et al.*, 2005; Austen *et al.*, 2007). Nedostatek exprese ATM proteinu má za následek ztrátu funkce p53, závažný chronický oxidativní stres, rychlé zkrácení telomer, ztrátu kontrolního bodu v buněčném cyklu, defektní dsDNA reparace, což způsobuje progresi onemocnění (Rossi *et Gaidano*, 2012b). Jedinci, kteří nesou mutaci v genu *ATM*, mají o 70 % vyšší pravděpodobnost vzniku lymfoidní malignity ve srovnání s těmi, kteří tuto mutaci nenesou (Foá *et al.*, 2013).

Ve studii Rose-Zerilli *et al.* (2014) bylo prokázáno, že *ATM* mutace a *BIRC3* delece a/nebo mutace mají nezávisle na sobě prognostický význam u pacientů s CLL. Poprvé bylo prokázáno, že 40 % pacientů s *BIRC3* delecí mají současně delecí a mutaci *ATM*. U pacientů s 11q delecí bylo potvrzeno, že *ATM* mutace byla spojena se snížením celkového přežití a s progresí, která je srovnatelná s *TP53* abnormalitami, zatímco *BIRC3* delece a/nebo mutace neměla žádný vliv na celkové přežití. U Pacientů s 11q delecí, u kterých je v první linii provedena chemoterapie, způsobuje *ATM* mutace horší výsledek než u pacientů s *BIRC3* delecí a/nebo mutací (Rose-Zerilli *et al.*, 2014).

Tento gen se běžně nevyšetřuje vzhledem k jeho velikosti a absenci preferovaných míst pro mutace (tzv. hot-spots).

2.4.6 *SF3B1*

Gen *SF3B1* je lokalizován na lokusu 2q33.1, jeho velikost je 56 kb a obsahuje 27 exonů. Tento gen kóduje podjednotku sestřihového faktoru 3b. Spojením faktoru 3b spolu se sestřihovým faktorem 3a a jednotky 12S RNA vzniká U2 malý jaderný ribunukleoproteinový komplex U2 snRNP, který se podílí na sestřihu pre-mRNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23451>).

U pacientů s CLL byly popsány vícenásobné mutace genu *SF3B1*. Nejčastěji missense mutace v HEAT repeticích, které vedou ke vzniku proteinů s abnormální sestřihovou aktivitou. Přesné mechanismy, kterými mutace v tomto genu mění biologii CLL, zůstávají nejasné. *SF3B1* mutace se vyskytují u 5 - 15 % případů CLL, kdy pravděpodobnost výskytu této mutace je nižší u pacientů v době diagnózy a vyšší u pacientů refrakterních na léčbu. Tato mutace je u pacientů s CLL spojena se snížením celkového přežití. Mutace *SF3B1* byly také

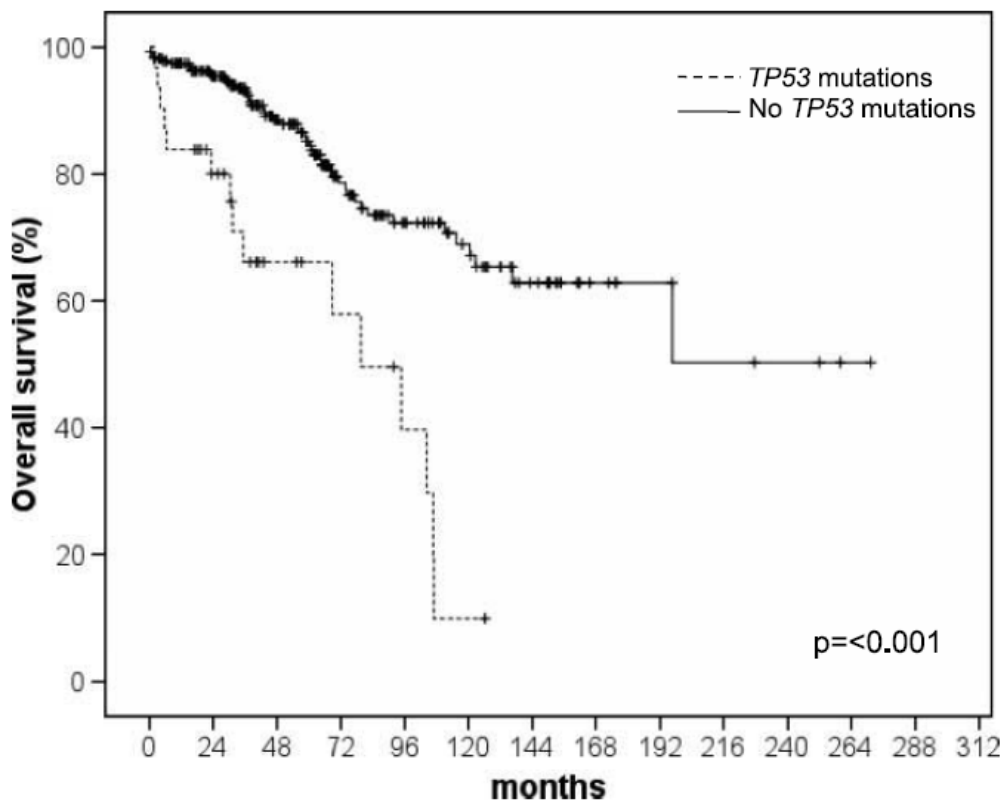
pozorovány u MDS, což naznačuje, že změny sestřihu mohou být důležitým patogenetickým mechanismem hematologických malignit (Rossi *et al.*, 2011; Zent *et Burack*, 2014).

2.4.7 *TP53*

Gen *TP53*, který kóduje tumor supresorový protein p53, se nachází na lokusu 17p13.1. Obsahuje 12 exonů a jeho velikost je 25 kb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>). Protein p53 je klíčový mediátor při odpovědi na poškození DNA, kontrolu buněčného cyklu a apoptózy (Zent *et Burack*, 2014).

Gen *TP53* může být inaktivován somatickou mutací nebo delecí (Rossi *et al.*, 2009). Výskyt mutace je spojen se špatnou odpovědí na léčbu, krátkou dobou přežití (viz obr. 10) a s rizikem transformace do difúzního buněčného B-lymfomu (Zent *et Burack*, 2014). Nachází se u 4 – 37 % pacientů (Hallek, 2015). Buňky nesoucí *TP53* mutace mohou být v průběhu onemocnění selektovány (Landau *et al.*, 2013; Schuh *et al.*, 2012). Z tohoto důvodu se doporučuje vyšetřit mutace genu před zahájením léčby (Pospisilova *et al.*, 2012).

Mutace v genu *TP53* je přítomna až u dvou třetin pacientů s delecí 17p13, pouze zlomek pacientů nese tuto mutaci bez delece 17p13. Není jisté, jestli *TP53* mutace v nepřítomnosti delece 17p13 má stejný biologický profil a klinický obraz CLL. Ve studii Rossi *et al.* (2009) bylo popsáno, že mutace *TP53* předpovídá špatnou prognózu u refrakterních pacientů nezávisle na delecí 17p13. Mutace se u vyšetřovaného souboru pacientů nacházela především v exonu 5 až 8. Analýza mutace v genu *TP53* má praktický význam u pacientů, kteří jsou kandidáti pro léčbu (Rossi *et al.*, 2009).



Obr. 10: Kaplan-Maierovy křivky celkového přežití zahrnující TP53 mutaci

Medián celkového přežití pacientů s mutací v genu TP53 je 79,6 měsíců

(převzato z Rossi *et al.*, 2009).

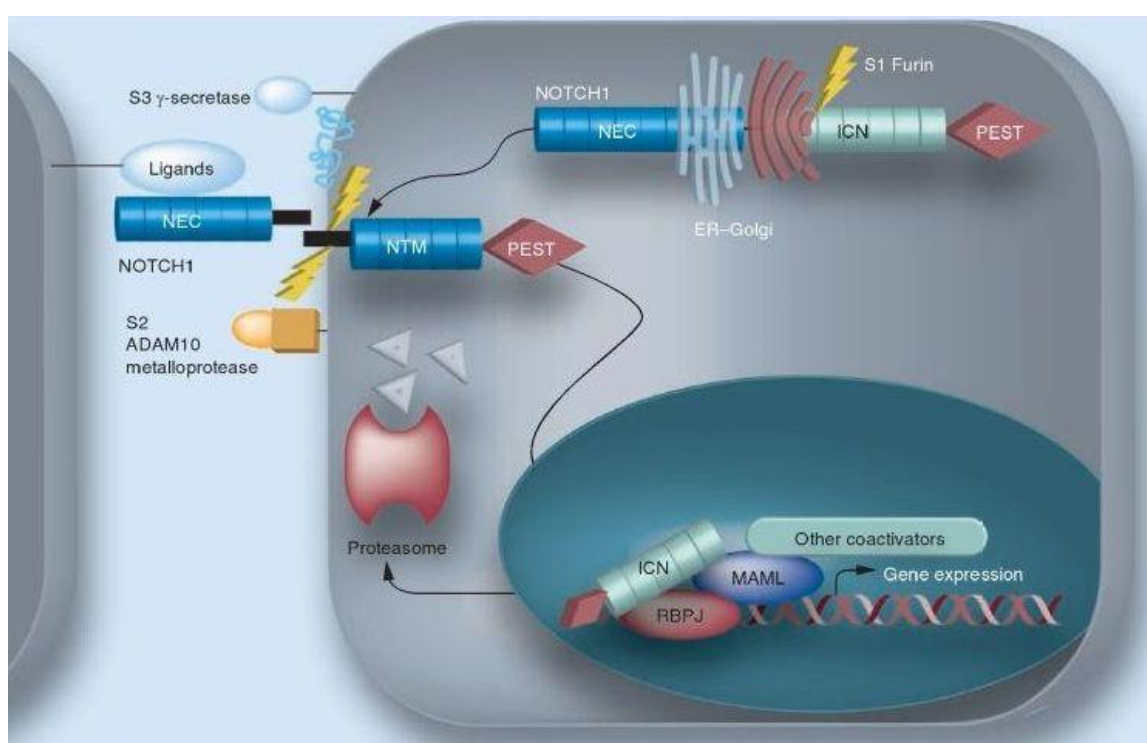
2.4.8 NOTCH1

Gen *NOTCH1* je lokalizován na lokusu 9q34.3, obsahuje 34 exonů a jeho velikost je 67 kb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4851>). Aktivace *NOTCH1* u leukémií byla poprvé objevena u pacientů s T-ALL a později bylo zjištěno, že *NOTCH1* je aktivován až u 50 % těchto pacientů. Později byly mutace tohoto genu zjištěny u 10-15 % CLL pacientů.

NOTCH1 kóduje transmembránový protein, který funguje jako ligandem aktivovaný transkripční faktor (Balatti *et al.*, 2012). *NOTCH1* je tvořen N-koncovou extracelulární podjednotkou, C-koncovou transmembránovou a intracelulární podjednotkou, která obsahuje C-terminální PEST doménu zodpovědnou za proteosomální degradaci aktivovaného *NOTCH1* a ovlivňuje tak dobu trvání *NOTCH1* aktivity (viz obr. 11). Nejčastější delece jsou v PEST doméně (exon 34) a ve většině případů se jedná o mutaci p.P2514Rfs*4. Delece dvou nukleotidů (CT) vede k posunu čtecího rámce, vzniku stop kodonu a poškození PEST

domény. Konstitutivní aktivace *NOTCH1* signální dráhy vede ke zvýšené proliferaci buněk a má za následek proliferaci a rezistenci B-CLL buněk k apoptóze (Gianfelici, 2012).

Frekvence výskytu se zvyšuje v pokročilých fázích onemocnění (Rossi *et al.*, 2012). S mnohem vyšším výskytem této mutace se setkáváme u refrakterních pacientů (20%) (Zent *et Burack*, 2014). *NOTCH1* mutace se také nachází častěji u pacientů s nemutovaným stavem *IgVH* a/nebo u pacientů s izolovanou trizomií chromozomu 12. Tato mutace je naopak méně častá v případech, ve kterých je trizomie chromozomu 12 spojena s jinými chromozomálními aberacemi (Rossi *et Gaidano*, 2012a).



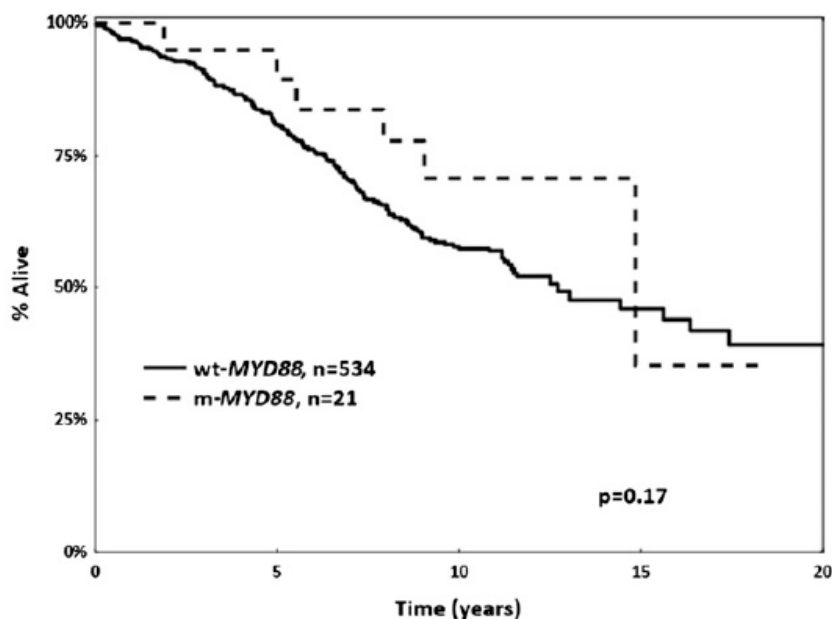
Obr. 11: *NOTCH1* signální dráha

Po navázání ligandu na receptor jsou zahájeny dvě po sobě jdoucí proteolytická štěpení receptoru, která umožňují, aby intracelulární doména *NOTCH1* byla translokována do jádra, což vede k regulaci transkripce více cílových genů. Intracelulární část tohoto proteinu po stimulaci hraje důležitou roli v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze. ICN – intracelulární podjednotka, NEC – N-terminální extracelulární podjednotka, NTM – C-terminální transmembránová podjednotka (převzato z Rossi *et Gaidano*, 2012a)

2.4.9 MYD88

Mutace *MYD88* byla opakovaně nalezena u různých lymfoproliferativních poruch, včetně CLL (Martínez-Trillos *et al.*, 2014). Gen *MYD88* obsahuje 5 exonů. Jeho velikost je 5,9 kb a je lokalizován na lokusu 3p22. Kóduje adaptorový protein, který má zásadní funkci jako přenašeč v signálních drahách interleukinu-1 a Toll-like receptoru. Tyto dráhy regulují aktivaci mnoha prozánětlivých genů a hrají důležitou roli v imunitní odpovědi. Kódovaný protein se skládá z N-koncové tzv. death domény a C-koncové receptorové Toll-interleukin1 domény. Pacienti s defekty v tomto genu mají sklon k pyogenním bakteriálním infekcím (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4615>).

MYD88 mutace se vyskytuje u 2 - 5 % pacientů s CLL. Častěji se s ní setkáváme u pacientů s mutovaným genem *IgVH*. Podle nedávné studie je tato mutace častěji nalezena u mladších pacientů v souvislosti s delší dobou celkového přežití (viz obr. 12) (Baliakas *et al.*, 2015).



Obr. 12: Kaplan-Meierovy křivky pro *MYD88* - celkové přežití u pacientů s CLL

Všechny případy zahrnují mutované *IgVH* geny

(převzato z Baliakas *et al.*, 2015)

2.4.10 *FBXW7*

Gen *FBXW7* se nachází na lokusu 4q31.3, obsahuje 16 exonů a jeho velikost je 279 kb. Kóduje protein z F-box proteinové rodiny. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55294>). Bylo prokázáno, že zprostředkovává ubiquitin-dependentní proteolýzu několika onkoproteinů včetně NOTCH, c-MYC, c-JUN. Na základě zjištěných poznatků se předpokládá, že by *FBXW7* mohl fungovat jako tumorový supresor lidských nádorů. Gen *FBXW7* je inaktivován mutací u různých typů rakoviny. Nejvyšší frekvence této mutace byla zaznamenána u akutní lymfocytární leukémie (Akhoondi *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že mutace *NOTCH1* a *FBXW7* mohou být asociovány i s trisomií chromozomu 12 (Wang *et al.*, 2011). Výskyt této mutace u CLL pacientů je pod hranicí 10 % a její vliv na onemocnění je zatím nejasný (Jeromin *et al.*, 2014).

3 CÍL PRÁCE

- Prakticky zvládnout metody běžně používané v laboratoři molekulární genetiky (PCR, elektroforéza, kapilární elektroforéza) a zavedení metody analýzy křivek tání (HRM analýza).
- Pomocí HRM analýzy vyšetřit DNA buněk kostní dřeně nebo periferní krve u dvou skupin CLL pacientů: 1) pacienti relaxující nebo refrakterní; 2) pacienti s aktivním onemocněním. Dále porovnat s výsledky získanými z kapilární elektroforézy. Hodnocením přítomnosti či absence mutace v genu *BIRC3* zjistit, je-li HRM analýza vhodnou metodou pro stanovení přítomnosti či absence mutace v genu *BIRC3*.
- Obě skupiny pacientů vyšetřit na přítomnost mutace v *NOTCH1* genu.
- Porovnat přítomnost mutací v genech *BIRC3* a *NOTCH1* mezi oběma skupinami CLL pacientů.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Aspirát kostní dřeně (cca 1 ml)

Periferní krev (9 ml)

4.1.2 Chemikálie

Ethanol (Fagron)

Sterilní voda (v čistotě pro molekulárně genetické aplikace; Millipore, USA)

EDTA (Sigma)

Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

100 bp DNA Ladder (Promega)

MgCl₂ (Applied Biosystems)

10x PCR Buffer II (Applied Biosystems)

dATP (Promega)

dCTP (Promega)

dGTP (Promega)

dTTP (Promega)

Agarose I (Amresco)

Hi-Di Formamide (Applied Biosystems)

PCR ethidium bromid (Top-Bio)

Primery (Eastport)

4.1.3 Komerční kity

MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche)

BigDye® Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 High Resolution Melting Master kit (Roche)

TRIZOL Reagent (Invitrogen)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

4.1.4 Roztoky

PBS, pH 7,4 (Fosfátový fyziologický roztok)

137 mmol/l NaCl

2,7 mmol/l KCl

4,3 mmol/l Na₂HPO₄

1,4 mmol/l KH₂PO₄

70% Ethanol

Příprava ředěním absolutního alkoholu (96%):

73 ml absolutního alkoholu / 100 ml roztoku

4.1.5 Vybavení laboratoře

Automatické pipety (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Pipetman®, Gilson France) + Špičky

Centrifuga pro 1,5ml zkumavky BIOFUGE 22R (Heraeus, Německo)

Genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)

Laboratorní centrifuga MEGAFUGE 1,0 R (Heraeus, Německo)

Laboratorní sklo (odměrné válce, kádinky) (SIMAX, Česká republika)

Ochranné laboratorní vinylové rukavice (Ansell, Velká Británie)

96 Well Plate pro genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)

Lednice (4-8 °C)

Mikrozkušavky (2 ml, 1,5 ml, SARSTEDT, Německo)

Mrazicí boxy (-80°C, -20°C) (SANYO, Japonsko)

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)

PCR mikrozkušavky 0,2 ml (Applied Biosystems, USA)

Plastové centrifugační zkumavky (15 ml, 50 ml, TPP)

10x pufr s EDTA pro genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)

Stolní mikrocentrifuga FORCE 7 (Denver Instrument Company, USA)

Thermal Cycler Veriti 96 Well (Applied Biosystems, USA)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (CASTELMAC SpA, Itálie)

Izolátor NK MagNA Pure Compact (Roche)

GeneMarker V1.85 (SoftGenetics LLC, USA)

LightCycler® 480 (Roche)

4.1.6 Software a databáze

Program Chromas (Technelysium Pty Ltd, Australia)

LightCycler® 480 release 1. 5. 0 SP3 version 1. 5. 0. 39 (Roche Applied Science)

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank® Database
(www.ncbi.nlm.nih.gov)

4.1.7 Soubor pacientů

Na hemato-onkologické klinice (HOK) FN a LF UP Olomouc jsem se spolupodílela na zavedení metody HRM pro detekci mutací v genu *BIRC3*. Metodami molekulární biologie bylo vyšetřeno 49 pacientů s diagnózou CLL. Všichni pacienti byli v době vyšetření ve stádiu aktivního onemocnění nebo se u nich projevila refrakterita na léčbu. Ze skupiny 49 pacientů bylo pro bližší charakteristiku vybráno 20 pacientů, kteří byli dále rozděleni do dvou skupin po 10. První skupina byla tvořena pacienty, kteří jsou refrakterní a nemají tedy žádnou odezvu na provedenou léčbu (CLL-R skupina). Druhá skupina pacientů byla tvořena těmi, u nichž je onemocnění aktivní (CLL-A skupina). Obě skupiny pacientů byly také vyšetřeny na přítomnost mutace v *NOTCH1* genu. Vyšetření byla provedena ze vzorků DNA připravených z buněk kostní dřeně a periferní krve. Všichni pacienti byli vyšetřeni klasickou cytogenetikou a metodou FISH s panelem CLL sond (13q14, 13q34, 17p13, 11q22, 6q21, 8q24, IgH a centromera 12).

4.2 Metody

4.2.1 Separace mononukleárních buněk na hustotním gradientu

3 – 9 ml periferní krve nebo kostní dřeně bylo smícháno v poměru 1:1 s 1x PBS. 4 ml smíchané krve byly naneseny na 3 ml Histopaque. Následně byla provedena centrifugace při 2000 rpm, 20 min při 4 °C bez brzdy. Prstenec mononukleárních buněk byl odebrán do 50ml zkumavky. Následně byly přidány 3 – 4 objemy vychlazeného (4 – 8 °C) 1x PBS pufu. Opět byla provedena centrifugace při 3500 rpm, 10 min při 4 – 8 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a poté následovala izolace DNA.

4.2.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena na automatickém izolátoru MagNA Pure Compact System. Princip spočívá v prověřené technologii izolace pomocí magnetických kuliček. DNA byla izolována ze suspenze mononukleárních buněk (viz separace mononukleárních buněk na hustotním gradientu).

4.2.3 Měření koncentrace DNA

Koncentrace izolované DNA byla měřena na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) a v případě potřeby byly vzorky naředěny 10mM Tris-HCL pH 7.4 na požadovanou koncentraci.

4.2.4 PCR reakce – amplifikace částí genu *BIRC3*

Reakční směs byla připravena smícháním reagensů o odpovídajících koncentracích (viz tab. V). Po promíchání a rozpipetování do jednotlivých mikrozkušavek byly následně přidány 2 μ l DNA o koncentraci 100 μ M. Poté proběhla PCR reakce v termocykleru podle teplotního profilu, který je uveden v tab. VI.

Tab. V: Složení reakční směsi pro PCR *BIRC3*

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 test [μ l]
voda	-	-	37,6
pufř	10x	1x	5
Mg	25 mM	1,5 mM	4
dNTPs (4ks)	10 mM	0,25 mM každý	1
Primer F + R (2 ks)	100 pmol/ μ l	10 pmol každý	0,2
Taq	5U	1U	0,2
DNA	100 ng/ μ l	200 ng/reakci	2

Sekvence primerů (Rose-Zerilli *et al.*, 2014)

BIRC3 exon 7F 5'-TGCCTATACATTTTGTGGTT-3'

BIRC3 exon 7R 5'-AAAAACCTGACTGGATTGAG-3'

BIRC3 exon 10F 5'-CCACAGAAGATGTTTCAGGT-3'

BIRC3 exon 10 R 5'-GTGCTACCTCTTTTCGTTC-3'

Tab. VI: Teplotní profil pro PCR genu *BIRC3*

Počet cyklů	Teplota	Čas
1 cyklus	95 °C	10 min
40 cyklů	95 °C	45 s
	55 °C	45 s
	72 °C	1 min
1 cyklus	72 °C	10 min
	4 °C	∞

4.2.5 Amplifikační refrakční mutační systém (ARMS)

ARMS (amplification-refractory mutation system) je jednoduchá metoda používaná pro detekci jakékoliv mutace zahrnující jednonukleotidové změny nebo malé delece (Little, 2001). Tato reakce byla použita pro detekci mutace v genu *NOTCH1*.

Reakční směs byla připravena smícháním reagensů o odpovídajících koncentracích (viz tab. VII). V této reakci byly použity 3 primery – 2 forward a 1 reverse primer. První forward primer byl navržen pro mutovanou alelu (velikost amplifikovaného produktu 183 bp), druhý forward primer pro wild-type alelu (velikost amplifikovaného produktu 283 bp). Třetí, reverse primer byl společný pro mutovanou i nemutovanou alelu. Po promíchání a rozpipetování reagensů do jednotlivých mikrozkušavek byl následně přidán 1 µl DNA o koncentraci 25 µM. Poté proběhla PCR reakce v termocycleru podle teplotního profilu, který je uveden v tab. VIII.

Tab. VII: Složení reakční směsi pro ARMS PCR *NOTCH1*

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 test [µl]
voda	-	-	21,75
pufr	10x	1x	3
Mg	25 mM	1,5 mM	1,8
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,6
Primer ForC	10 µM	0,1 µM	0,3
Primer ForMUT	20 µM	0,4 µM	0,6
Primer Rev	20 µM	0,5 µM	0,75
Taq	5 U	1 U	0,2
DNA	25 ng/µl	25 ng/reakci	1

Sekvence primerů

forward: *NOTCH1* – mutovaný 5'-TCCTCACCCCGTCCCGA-3'
 NOTCH1 – nemutovaný 5'-GTGACCGCAGCCCAGTT-3'
reverse: *NOTCH1* – reversní 5'-AAGGCTTGGGAAAGGAAGC-3'

Tab. VIII: Teplotní profil pro PCR genu *NOTCH1*

Počet cyklů	Teplota	Čas
1 cyklus	95 °C	3 min
40 cyklů	95 °C	30 s
	57°C	40 s
	72 °C	40 min
1 cyklus	72 °C	7 min
	4 °C	∞

4.2.6 Elektroforéza

Po PCR reakci byly vzorky naneseny na 2% agarózový gel v 1xTBE pufru s ethidium bromidem. Do každé jamky bylo přidáno 16 µl PCR produktu a 4 µl barviva s glycerolem. Dále byl do jedné z jamek nanesen 100 bp marker (10 µl). Elektroforéza probíhala při 100 V cca 1,5 hod. PCR produkty byly následně detekovány pod UV světlem. PCR produkty genu *BIRC3* byly z gelu vyřezány čistým skalpelem na UV stolku a přeneseny do mikrozkušavek a dále zpracovány.

4.2.7 Extrakce produktu z gelu

Extrakce PCR produktu z gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kit podle návodu výrobce. Dále byla provedena spektrofotometrická analýza, díky níž byla stanovena koncentrace a čistota vyizolované DNA.

4.2.8 Sekvenační reakce

Výchozím materiálem pro sekvenační reakci byl specifický PCR produkt extrahovaný z gelu. Vstupní množství templátu pro sekvenační PCR bylo 15 ng/reakci (PCR produkty exonu 7 byly o velikosti 490 bp a u exonu 10 o velikosti 546 bp). Reagencie byly pipetovány do jednotlivých mikrozkušavek podle rozpisu v tab. IX. Vše bylo nutné připravovat na ledu.

Tab. IX: Reagencie pro sekvenační reakci *BIRC3*

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 test [μl]
Reverzně osmotická ultračistá voda	-	-	5
Extrahovaný PCR produkt	-	15 ng/μl	1
5x Sequencing Buffer	5x	0,5x	1
Sekvenační primer	5 pmol/μl	5 pmol/reakci	1
BigDye Terminator	5x	1x	2

Tab. X: Teplotní profil sekvenační reakce, *BIRC3*

Počet cyklů	Teplota	Čas
1 cyklus	95 °C	5 min
26 cyklů	95 °C	30 s
	53 °C	15 s
	60 °C	4 min
1 cyklus	10 °C	∞

4.2.9 Purifikace sekvenačních produktů

Purifikace sekvenačních produktů byla provedena ethanolovým srážením. Do čistých mikrozkušavek byl napipetován 96% ethanol po 25 μl a 1 μl 3M octanu sodného. Poté byla přidána PCR směs po sekvenační reakci a vzorky byly ponechány nejméně 15 min při – 80 °C. Následovala centrifugace v chlazené centrifuze (4 °C) 15 min při 16500 rpm. Po centrifugaci byl opatrně odpipetován supernatant a k sedimentu bylo přidáno 50 μl 70% ethanolu. Opět byla provedena centrifugace v chlazené centrifuze (4 °C) 10 min při 16500 ot./min. Supernatant byl opatrně odpipetován a zkumavky se sedimentem byly zakryty gázou a sušeny přibližně 30 min.

4.2.10 Sekvence kapilární elektroforézou

Po purifikaci byly sedimenty v jednotlivých mikrozkušavkách rozpuštěny v 15 μl deionizovaného formamidu, krátce centrifugovány a přeneseny do jednotlivých jamek v sekvenační destičce. Destička se vzorky byla krátce centrifugována a vložena do termocycleru na 3 min při 95 °C pro finální denaturaci vzorků. Následovalo ochlazení v ledu a separace PCR produktů na kapilární elektroforéze.

4.2.11 Vyhodnocení vzorků

Zpracování jednotlivých vzorků bylo provedeno pomocí počítačového programu Chromas. Srovnání získaných sekvencí se sekvencí referenční (NCBI Reference Sequence: NM_182962.2) bylo provedeno pomocí funkce BLAST na portálu NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&QUERY=&SUBJECTS=).

4.2.12 HRM analýza

High resolution melting (HRM) neboli vysokorozlišovací analýza křivek tání je metoda, která vznikla na základě spolupráce mezi Wittwer Laboratory for DNA Analysis a University of Utah and Idaho Technology. Tuto citlivou a rychlou metodu lze využívat k zachytu jednonukleotidových či vícenukleotidových záměn v DNA. Změny ve struktuře DNA jsou sledovány pomocí fluorescenčních barviv. Nespornou výhodou této metody je poměrně nízká cena, časová nenáročnost a malé množství vzorku, které se pro samotnou analýzu využívá (Živčák *et al.*, 2013).

Cílová sekvence je amplifikována pomocí PCR reakce za přítomnosti fluorescenčního barviva, které se váže na dsDNA. Amplikony jsou poté krátce denaturovány a následně rychle renaturovány. Teplota je poté opět pomalu zvýšena a DNA začne tát. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® 480 release 1. 5. 0 SP3 version 1. 5. 0. 39.

4.2.12.1 Optimalizace HRM analýzy

HRM analýza byla použita jako další možnost detekce změn v genu *BIRC3*, a to v exonech 7 a 10 za použití specifických primerů (podle Rose-Zerilli *et al.*, 2013) (viz níže). Při testování komerčního kitu na HRM analýzu jsme použili pozitivní a negativní vzorky z brněnského hematologického pracoviště (Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno). Pro optimalizaci byly použity různé koncentrace hořčíku (konečné koncentrace 1,5mM, 2mM a 2,5mM) a různé teploty anealingu (58 °C a 60 °C). Pro exon 7 byla ideální koncentrace MgCl₂ 2mM, zatímco pro exon 10 to bylo 2,5mM MgCl₂. Nejvhodnější teplota anealingu byla u obou exonů 58 °C po dobu 15 sec.

4.2.12.2 HRM analýza – postup

Reagencie na HRM analýzu byly pipetovány na ledu. Jednotlivé složky master mixu byly napipetovány podle tab. XI pro exon 7 a podle tab. XII pro exon 10. Master mix byl podle předem připraveného rozpisu napipetován do jamek mikrotitrační destičky po 15 μ l. Poté byly přidány jednotlivé vzorky DNA po 5 μ l. Mikrotitrační destička byla zakryta fólií, zcentrifugována a vložena do lightcycleru, kde proběhla HRM analýza podle teplotního profilu viz tab. XIII. Zpracování výsledných křivek a vyhodnocení teploty tání bylo vyhodnoceno pomocí softwaru LightCycler® 480 release 1. 5. 0 SP3 version 1. 5. 0. 39.

Tab. XI: Složení reakční směsi pro HRM reakci *BIRC3* – exon 7

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 test [μ l]
voda	-	-	1,4
Master mix	2x	1x	10
Mg	25 mM	2 mM	1,6
Primer F	4 μ M	0,2 μ M	1
Primer R	4 μ M	0,2 μ M	1
DNA	100 μ M	5 μ M	5

Sekvence primerů pro HRM analýzu (Rose-Zerilli *et al.*, 2014)

BIRC3 exon 7F 5'- TTCCATATAGTTATCCATTTTGAACCT-3'

BIRC3 exon 7R 5'-ACATACTTGATTCTTTTTCCTCAGTTG-3'

Tab. XII: Složení reakční směsi pro HRM analýzu *BIRC3* – exon 10

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem na 1 test [μ l]
voda	-	-	1
Master mix	2x	1x	10
Mg	25 mM	2,5 mM	2
Primer F	4 μ M	0,2 μ M	1
Primer R	4 μ M	0,2 μ M	1
DNA	100 μ M	5 μ M	5

Sekvence primerů pro HRM analýzu (Rose-Zerilli *et al.*, 2014)

BIRC3 exon 10F 5'-TGAAGAAGCAAAGTGCCTTTTATT-3'

BIRC3 exon 10R 5'-AAAGTTTAGACGATGTTTTGGTTCT-3'

Tab. XIII: Teploní profil HRM analýzy *BIRC3* – exon 7, exon 10

Počet cyklů	Teplota	Čas
Preinkubace	95 °C	10 min
Amplifikace 45 cyklů	95 °C	10 s
	58 °C	15 s
	72 °C	12 s
HRM	95 °C	1 min
	40 °C	1 min
	65 °C	1 s
	95 °C	
Chlazení 1 cyklus	40 °C	10 s

5 VÝSLEDKY

Při optimalizaci HRM analýzy bylo vyšetřeno 49 pacientů s diagnózou CLL. Z nich bylo vybráno 20 vzorků pacientů získaných v období 2013 – 2015. Vzorky byly vybrány tak, aby vytvořily dvě skupiny: 10 CLL pacientů s aktivním onemocněním (CLL-A skupina) a 10 CLL pacientů refrakterních na léčbu (CLL-R skupina). Věkový medián pacientů byl 54 vs. 56 let a 60 % těchto pacientů se nacházelo v době diagnózy ve fázi B a C onemocnění podle klasifikace Binet *et al.*, 1981. Charakteristika a přehled nalezených mutací u obou skupin pacientů jsou shrnuty v tab. XIV a tab. XV.

Z výsledků cytogenetického vyšetření u obou skupin pacientů je patrné, že nejčastější cytogenetickou aberací byla delece 13q14 (CLL-A skupina 6/10; CLL-R skupina 7/10). Delece 11q22 se vyskytovala u obou skupin pacientů s podobnou frekvencí (CLL-A skupina 5/10; CLL-R skupina 4/10). V každé skupině je 7/10 pacientů (tzn. celkem 14/20) s nemutovaným stavem *IgVH*, který je spojován s horším průběhem onemocnění a zároveň je u obou skupin častější nález klonu se subgenem *VH1-69*. U pacientů s nemutovaným stavem *IgVH* se také častěji vyskytují nepříznivé genetické aberace. Delece 11q22 byla nalezena celkem u 9/20 pacientů a 8/9 těchto pacientů mělo nemutovaný stav *IgVH*. Delece 17p13 byla také jako jediná nalezena u pacienta s nemutovaným stavem *IgVH*. Na rozdíl od toho se u většiny pacientů s mutovaným stavem *IgVH* (6/20 u obou skupin) vyskytuje pouze delece 13q14 (4/6), která je stejně jako mutovaný stav *IgVH*, spojena s dobrou prognózou. Pouze u 1/6 pacientů s mutovaným stavem *IgVH* byla nalezena mutace, a to v genu *NOTCH1*. U tohoto pacienta (č. 6 ze skupiny CLL-A) se ovšem vyskytuje i více cytogeneticky nepříznivých faktorů (tab. XV). Další abnormality se vyskytovaly pouze v jednotkách případů.

V rámci molekulární analýzy byly sledovány dva geny *NOTCH1* a *BIRC3*. Mutace v genu *NOTCH1*, která byla zjišťována na základě PCR a následné elektroforézy, se vyskytovala častěji a byla přítomna u pacientů č. 5, 6, 9 a 17 (CLL-A skupina 1/10; CLL-R skupina 3/10). Jedná se o nejčastější mutaci v tomto genu, p.P2514Rfs*4. V případě mutace v genu *NOTCH1* byly na elektroforetogramu patrné dva bandy. V případě negativního výsledku pouze jeden band (viz obr. 13). V celém souboru byla nalezena mutace v genu *NOTCH1* u 4/20 pacientů a 3/4 těchto pacientů měli již v době diagnózy Binet C nebo B.

V celém souboru pacientů byly vyšetřeny exony 7 a 10 v genu *BIRC3* jak metodou přímého sekvenování (obr. 16), tak i HRM analýzou (obr. 14, 15). Mutace v genu *BIRC3* byla nalezena pouze v exonu 10 u jednoho pacienta s aktivním onemocněním (pacient č. 15) pomocí HRM analýzy (viz obr. 14) i metodou přímého sekvenování (viz obr. 16). Jde o frameshift delecí p.Q547fs*21 (c.1639delC) popsanou i v jiných studiích (Baliakas *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2013). U tohoto pacienta se vyskytovaly i další negativní prognostické markery, jako nemutovaný *IgVH*, subgen *VH1-69* a delece 11q22. V souboru pacientů nebyla nalezena žádná mutace v exonu 7 (viz obr. 15). V několika případech byla detekována přítomnost polymorfismu (SNP) (viz obr. 17). Jako pozitivní kontroly pro jednotlivé exony byly použity pozitivní vzorky z brněnského pracoviště (Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno).

Tab. XIV: Charakteristika a přehled nalezených mutací u skupiny refrakterních pacientů (CLL-R skupina)

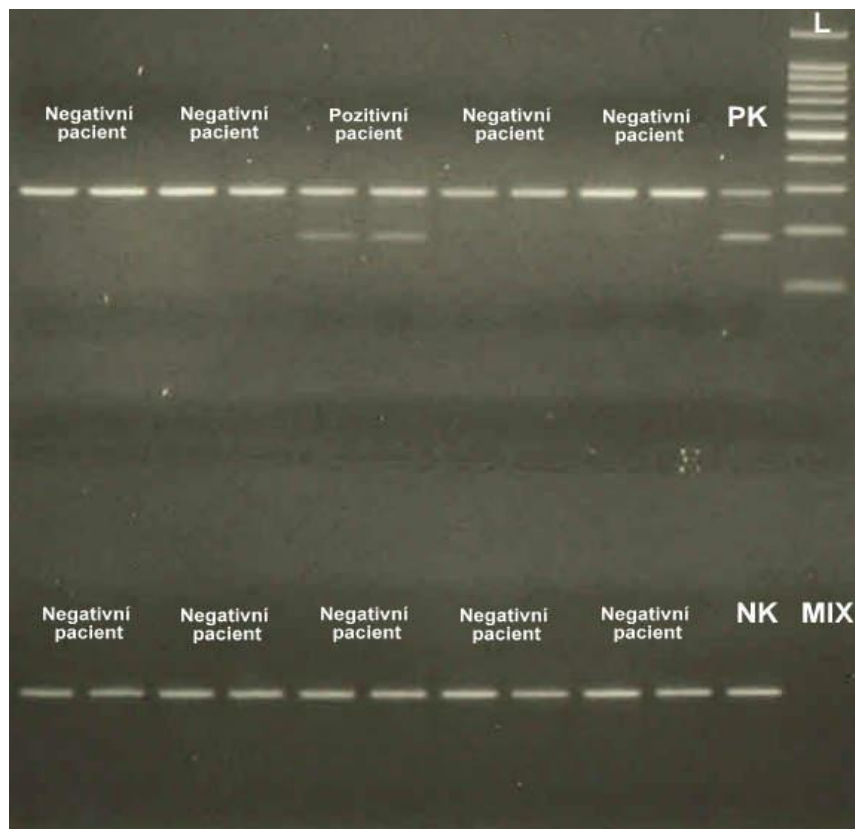
Pacient č.	Pohlaví/věk v dg	Binet	Mutační stav <i>IgVH</i>	FISH	<i>BIRC3</i> mutace EXON7	<i>BIRC3</i> mutace EXON10	<i>NOTCH1</i> mutace
1	M/67	A	n(VH1-69)	-	-	-	-
3	F/50	B	n(VH1-69)	del 11q22, dup MYC	-	-	-
5	M/62	C	n(VH4-4)	del 13q14	-	SNP	+
9	F/62	C	n(VH3-33)	del 13q14	-	-	+
10	F/40	A	m(VH4-3)	del 13q14	-	SNP	-
11	M/58	A	m(VH3-15)	del 13q14	-	-	-
13	M/58	B	nVH3-11	del 11q22, del 13q14	-	-	-
16	M/40	B	n(VH1-69)	del 11q22, del 13q14	-	-	-
17	M/44	B	n(VH1-18)	del 11q22, del 13q14	-	-	+
19	F/61	A	m(VH3-33)	del 6q21	-	-	-

Legenda k tabulce: M – male, F – female, SNP - single nucleotide polymorphism, m – *IgVH* mutovaný, n - *IgVH* – nemutovaný

Tab. XV: Charakteristika a přehled nalezených mutací u skupiny pacientů s aktivním onemocněním (CLL-A skupina)

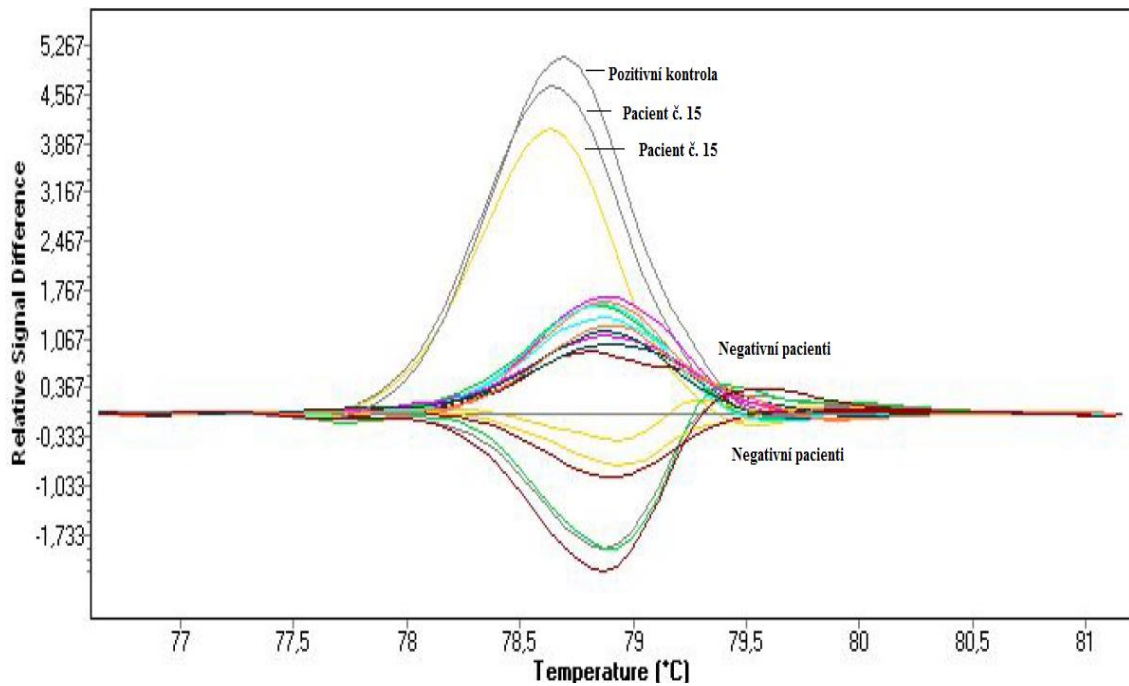
Pacient č.	Pohlaví/věk v dg	Binet	Mutační stav <i>IgVH</i>	FISH	<i>BIRC3</i> mutace EXON7	<i>BIRC3</i> mutace EXON10	<i>NOTCH1</i> mutace
2	M/37	B	n(VH3-66)	del 11q22	-	-	-
4	M/65	C	n(VH3-74)	del 11q22	-	-	-
6	M/56	A	m(VH3-23)	del 11q22, del 13q14, dup MYC	-	SNP	+
7	M/68	C	n(VH3-11)	del 17p13, del 13q14	-	SNP	-
8	M/60	A	m(VH3-21)	del 13q14	-	SNP	-
12	M/64	A	n(VH1-69)	del 11q22, trisomie 12	-	-	-
14	F/39	A	m(VH4-59)	del 13q14	-	SNP	-
15	M/61	B	n(VH1-69)	del 11q22	-	+	-
18	M/61	C	n(VH1-69)	del 13q14	-	-	-
20	M/50	B	n(VH1-69)	del 13q14	-	-	-

Legenda k tabulce: M – male, F – female, SNP - single nucleotide polymorphism, m – *IgVH* mutovaný, n - *IgVH* - nemutovaný

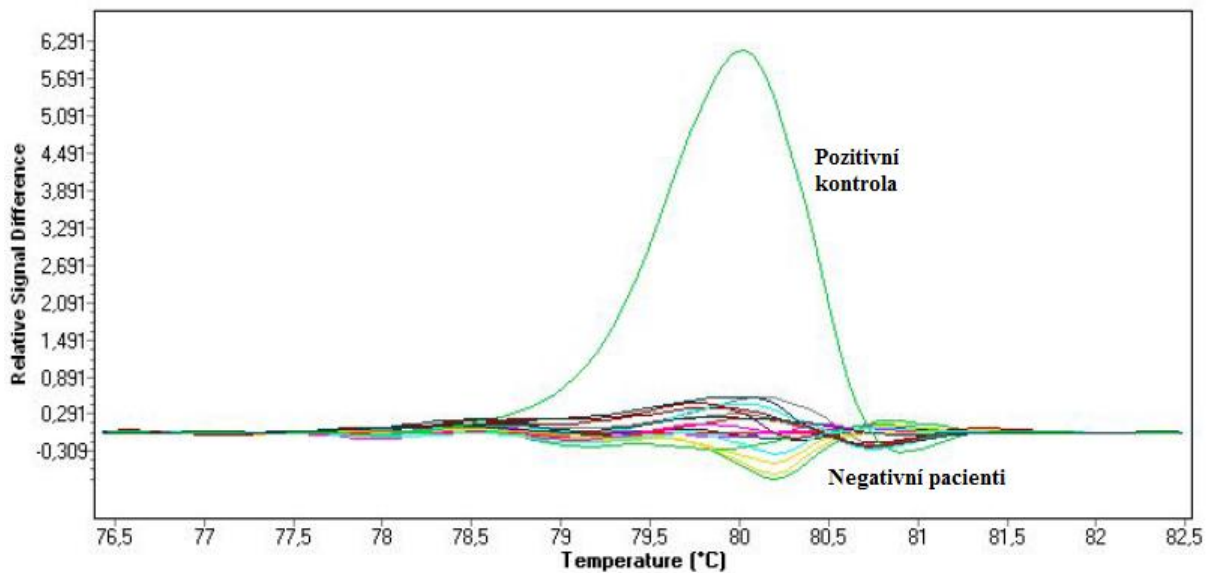


Obr. 13: Elektroforetogram – ukázka vyšetření mutace v genu *NOTCH1*:

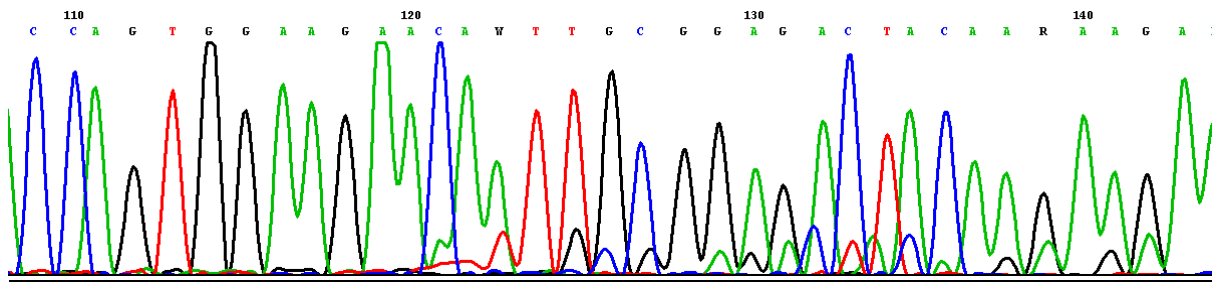
PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola, L – ladder, MIX – master mix. V případě přítomnosti mutace v genu *NOTCH1* jsou patrné 2 bandy. V případě absence mutace je patrný pouze jeden band. Pacienti byli vyšetřováni v dubletech.



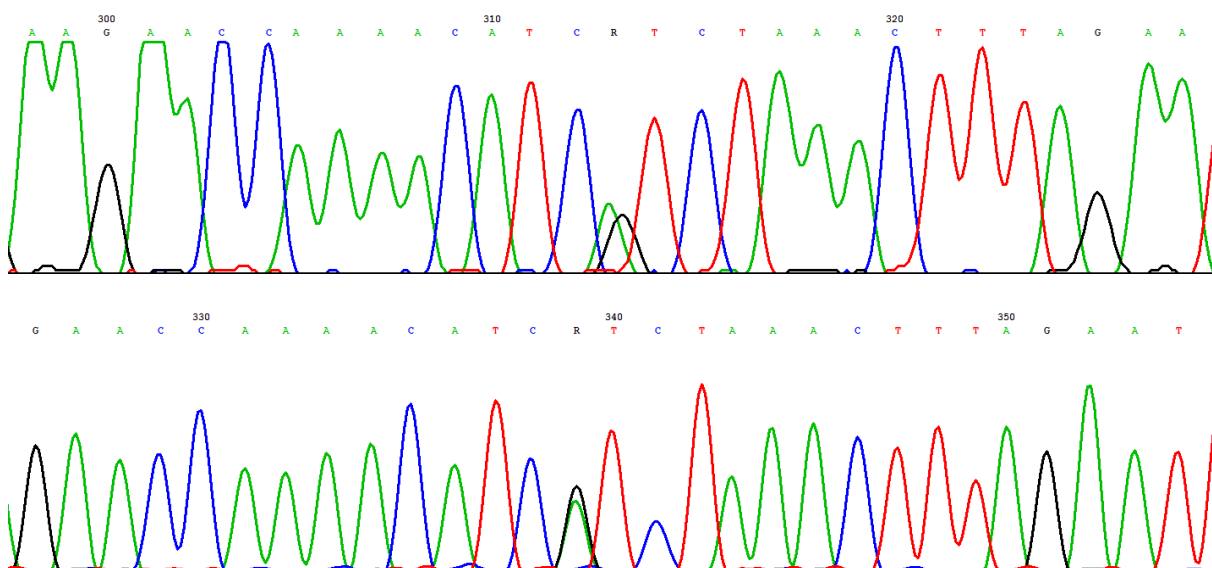
Obr. 14: HRM analýza genu *BIRC3*, exon 10, pacient č. 15 – pozitivní



Obr. 15: HRM analýza genu *BIRC3*, exon 7



Obr. 16: Sekvence *BIRC3*, exon 10, pacient č. 15



Obr. 17: Sekvence *BIRC3*, přítomnost SNP v exonu 10

6 DISKUZE

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je hemato-onkologické onemocnění postihující B lymfocyty (Hallek, 2015). Jedná se o nejčastěji diagnostikovaný typ leukémie v západních zemích. Chápání CLL prošlo dramatickými změnami a stále se vyvíjí již od roku 1950 (Rai *et Jain*, 2016). Pro stanovení diagnózy a následné prognózy pacientů jsou využívány prognostické markery – klinické, cytogenetické a molekulární. Tyto prognostické markery jsou zjišťovány různými metodami – od metod klasické cytogenetiky (FISH) až po moderní metody molekulární biologie (sekvenování), které poskytují ucelený obraz o celkovém stavu pacienta a o jeho přežití.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na stanovení molekulárních prognostických markerů, konkrétně na přítomnost mutace v genu *BIRC3* a *NOTCH1*. Gen *BIRC3* je složený ze 3 IAP repetice a RING domény, jejíž C-koncová oblast je nejčastěji mutována (Rossi *et al.*, 2013). Přítomnost této mutace vede ke zvýšené proliferaci a odolnosti buněk vůči apoptóze (Gaidano *et al.*, 2012). Předpovídá pacientům s CLL horší prognózu, ale její výskyt je poměrně vzácný (Zent *et Burack*, 2014). Častěji se objevuje u nemocných s delecí 11q22 a *TP53* mutací (Rai *et Jain*, 2016). S tímto tvrzením koreluje i náš nález mutace v genu *BIRC3* právě u pacienta s del 11q22. Ke stanovení přítomnosti či absence mutace v *BIRC3* byly v rámci diplomové práce použity metody molekulární biologie - HRM analýza a Sangerovo sekvenování. HRM analýza je metoda, která umožňuje odhalit změnu již v jedné bázi a oproti klasickému sekvenování je časově i finančně méně náročná, ale je vhodná pro screening více pacientů současně.

Vyšetření byla provedena ze vzorků periferní krve a kostní dřeně. Obě metody byly použity ke zjištění mutace ve dvou exonech – exon 7 a exon 10 genu *BIRC3*, ve kterých se mutace vyskytují častěji (Rose-Zerilli *et al.*, 2014). Ve spolupráci s lékaři z HOK FN a LF UP Olomouc bylo vybráno 49 pacientů, z nichž bylo blíže charakterizováno 20, kteří byli buď refrakterní (CLL-R skupina, 10 pacientů) nebo se vyskytovali ve stádiu aktivního onemocnění (CLL-A skupina, 10 pacientů). Právě u takových pacientů byl popsán vyšší výskyt mutací v genech *BIRC3*, *NOTCH1* a *SF3B1* a bylo prokázáno, že tyto mutace mají nepříznivý prognostický dopad (Gaidano, 2012; Rai *et Jain*, 2016). Schopnost zachytit mutace v genu *BIRC3* oběma použitými metodami byla ověřena pomocí pozitivních vzorků pacientů, které byly poskytnuty z brněnského pracoviště (Centrum molekulární biologie a genové terapie,

Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno). Celkem byla u 6 pacientů (CLL-R skupina 2/10; CLL-A skupina 4/10) zjištěna přítomnost jednonukleotidového polymorfismu (SNP) v genu *BIRC3* exonu 10 (rs1055088), který se nachází v již nekódující sekvenci a jeho výskyt v celosvětové populaci je 0.6635 (<http://exac.broadinstitute.org/variant/11-102207851-G-A>). SNP byl odhalen metodou Sangerova sekvenování. HRM analýzou byl SNP zachycen pouze v polovině případů a vždy byla nutná sekvenace k určení, zda se jedná o mutaci nebo SNP. Význam SNP v patogenezi CLL nebyl doposud zcela pochopen, ale není vyloučeno, že by v budoucnu mohly mít význam pro lepší pochopení patogeneze CLL (Coombs *et al.*, 2012). V celém souboru 49 pacientů byla mutace nalezena pouze u jednoho pacienta, konkrétně v exonu 10. Přítomnost mutace *BIRC3* v exonu 10 byla detekována jak HRM analýzou, tak i metodou Sangerova sekvenování a v obou případech byla potvrzena. Pacient s touto mutací patřil do skupiny CLL-A (pacient č. 15). Podle publikace Rossi *et al.* (2012) se s touto mutací častěji setkáváme u jedinců relabujících a refrakterních. Soubor vyšetřených pacientů byl však příliš malý, proto by bylo vhodné ověřit tento fakt na větším souboru nemocných. Samotná aktivita onemocnění nebo špatná odpověď na léčbu mohla být u tohoto souboru pacientů způsobena některou z mnoha jiných změn v genech, jako jsou *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* a další, které byly v posledních letech odhaleny metodami NGS u pacientů s CLL.

Dále jsme chtěli zjistit, jestli pacienti z obou rizikových skupin nemají mutaci v genu *NOTCH1*, která by mohla být také příčinou nepříznivého průběhu onemocnění. Mutace v genu *NOTCH1* se u nemocných CLL vyskytuje s vyšší četností než mutace v *BIRC3*. V souboru 20 pacientů byla celkově nalezena ve 4 případech (CLL-A skupina 1/10; CLL-R skupina 3/10), čímž byla potvrzena skutečnost, že s tímto typem mutace se u refrakterních pacientů setkáváme častěji a že její výskyt je spojen s nemutovaným stavem *IgVH* (3/4 celkem) (Zent *et Burack*, 2014; Balatti *et al.*, 2012).

Vyhodnoceny byly také výsledky cytogenetické analýzy, které byly poskytnuty laboratoří Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošové CSc., HOK FN a LF UP v Olomouci. Cytogenetické abnormality se vyvíjejí v průběhu nemoci (jsou ovlivněny např. léčbou) a mohou být významným faktorem pro klinický průběh nemoci (Rai *et Jain*, 2016). Nejčastější cytogenetickou aberací je delece 13q14 (Smonskey *et al.*, 2012). Tento fakt se shoduje s vyhodnocením výsledků souboru pacientů, kdy tato aberace byla nejčastější. Přítomnost této abnormality byla celkem detekována u 13 pacientů (CLL-A skupina 6/10;

CLL-R skupina 7/10). K dalším často zastoupeným cytogenetickým aberacím patřila delece 11q22 (CLL-A 5/10, CLL-R 4/10). U jedinců s touto abnormalitou hrozí vyšší riziko transformace do Richterova syndromu (Foá *et al.*, 2013).

Pro stanovení prognózy CLL je velmi důležitá i somatická mutace v genu *IgVH*, jejíž přítomnost předpovídá pacientům příznivější prognózu, na rozdíl od těch, u kterých tato mutace chybí (Moreno *et Montserrat*, 2010). V souboru 20 pacientů byla přítomna u 6 pacientů (CLL-A skupina 3/10; CLL-R skupina 3/10). U nemocných patřících do skupiny s nemutovaným *IgVH* (U-CLL) se často setkáváme s výskytem subgenu *VH1-69* (Forconi *et al.*, 2010). Subgen *VH1-69* byl přítomen u 7 pacientů s U-CLL. Tohle zjištění koreluje se skutečností, že subgen *VH1-69* se u pacientů s U-CLL vyskytuje častěji. Přítomnost subgenu *VH1-69* souvisí s nepříznivou prognózou, pacienti vyžadují včasný terapeutický zásah a doba jejich přežití je kratší než u ostatních pacientů s U-CLL, u kterých se tento subgen nevyskytuje (Panovska-Stavridis *et al.*, 2007).

U pacientů s U-CLL se častěji setkáváme s nepříznivými genetickými aberacemi. Delece 11q22 byla nalezena u 9/20 pacientů, z nichž 8/9 mělo U-CLL. Delece 17p13, která předpovídá pacientům nepříznivou prognózu, byla nalezena u pacienta s U-CLL (pacient č. 7). Naopak u pacientů s M-CLL (6/20) se vyskytovala delece 13q14 (4/6), předpovídající příznivější prognózu.

Na základě výsledků z praktické analýzy molekulárních prognostických markerů vyplývá, že metoda HRM může poskytnout informace o přítomnosti či absenci mutace, nacházející se v genu *BIRC3*, a mohla by být vhodnou screeningovou metodou při diagnostice mutace v tomto genu. Nicméně je vhodná především u stanovení výskytu mutace pro více pacientů najednou a vždy je nutné ověřit sekvenováním, zda se skutečně jedná o mutaci nebo pouze o SNP. Tuto skutečnost by bylo vhodné ověřit na větším souboru pacientů. Výsledky vyšetření prognostických markerů potvrzují důležitost stanovení somatické mutace v genu *IgVH*, který je (v kontextu s dalšími genetickými aberacemi) stěžejním prognostickým markerem.

7 ZÁVĚR

Diagnostika prognostických markerů chronické lymfocytární leukémie zahrnuje celou řadu metod. Na základě vyšetření těchto markerů je možné stanovit široké spektrum genetických a molekulárních abnormalit. Pomocí prognostických markerů je nejen určena prognóza pacientů s CLL a délka jejich přežití, ale je zvolena i co nejefektivnější léčba pro každého pacienta. Vznik chronické lymfocytární leukémie nebyl doposud zcela pochopen. Využívání nových metod molekulární diagnostiky by mohlo vést k lepšímu pochopení mechanismů vzniku této choroby.

Zavedením metody HRM do provozu na HOK FN a LF UP Olomouc byla zjišťována přítomnost mutace v genu *BIRC3*, konkrétně v exonu 7 a exonu 10. Výsledky HRM analýzy byly porovnány s výsledky sekvenační analýzy.

Na základě zjištěných výsledků usuzují, že HRM analýza je vhodnou metodou pro verifikaci přítomnosti či absence mutace v genu *BIRC3*. Tato metoda je oproti klasickému sekvenování rychlejší a levnější, ale je vhodná především pro screening více pacientů najednou. Vzhledem k tomu, že mutace v *BIRC3* se objevuje spíše sporadicky, nemá tato skutečnost v běžném laboratorním provozu velký význam a navíc je vždy nutné ověřit sekvenováním, zda se jedná o mutaci diagnostického významu, či pouze o SNP. Soubor pacientů vyšetřených touto metodou byl příliš malý, a proto by bylo vhodné ověřit a vyzkoušet vyšetření pomocí HRM analýzy na větším počtu pacientů.

Je velmi důležité využívat nové metody v diagnostice hemato-onkologických onemocnění, které mohou být přínosem pro pochopení molekulárních mechanismů vzniku těchto chorob, ale i pro stanovení prognózy a vhodné léčby pacientů. V současné době je nejmodernější metou využití NGS, ale i tato metoda bývá často doplňována klasickým sekvenováním. Sangerovo sekvenování je tak stále plnohodnotnou metodou v rutinně molekulárně biologických vyšetření.

8 LITERATURA

8.1 Vědecké publikace

Akhoondi, S., Sun, D., von der Lehr, N., Apostolidou, S., Klotz, K., Maljukova, A., Cepeda, D., Fiegl, H., Dofou, D., Marth, Ch., Mueller-Holzner, E., Corcoran, M., Dagnell, M., Nejad, S. Z., Nayer, B. N., Zali, M. R., Hansson, J., Egyhazi, S., Peterson, F., Sangfelt, P., Norgren, H., Grander, D., Reed, S. I., Widschwendter, M., Sangfelt, O., Spruck, Ch. (2007): FBXW7/hCDC4 Is a General Tumor Suppressor in Human Cancer. *Cancer Res* 67(19): 9006 – 9012.

Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N. & Cyster, J. G. (2004): Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5(9): 943 - 952.

Austen, B., Powel, J. E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A. M. R., Fegan, C., Moss, P., Stankovic, T. (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): 3175–3182.

Austen, B., Skowronska, A., Baker, C., Powell, J. E., Gardiner, A., Oscier, D., Majid, A., Dyer, M., Siebert, R., Taylor, A. M. (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. *J. Clin. Oncol.* 25(34): 5448–5457.

Balatti, V., Bottoni, A., Palamarchuk, A., Alder, H., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Pekarsky, Y., Croce, C. M. (2012): *NOTCH1* mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 119(2): 329 – 331.

Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Rossi, D., Sutton, L-A., Kminkova, K., Scarfo, L., Pospisilova, S., Gaidano, G., Stamatopoulos, K., Ghia, P., Rosenquist, R. (2015): Prognostic relevance of *MYD88* mutations in CLL: the jury is still out. *Blood* 126(8): 1043 – 1044.

Blanco, G., Puiggros, A., Rodriguez-Rivera, M., Melero, M., Garcia-Malo, M. D., Collado, R., Ortega, M., Calasanz, M. J., Luño, E., Vargas, M. T., Grau, J., Martinez-Laperche, C., Valiente, A., Cervera, J., Piñán, A., Hernández-Rivas, J., Batlle, A., Salido, M., Ortuno, F., Ardanaz, M. T., Ferrer, A., Ivars, D., Rodriguez, A., Abrisqueta, P., Espinet, B. (2014): Chromosome 8 Abnormalities (8p Losses and 8q Gains) in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Del(17p). *Blood* 124(21): 5638 – 5638.

Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S. & Gremy, F. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48(1): 198 - 206.

Byrd, J. C., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Kay, N. E., Reddy, N. M., Coutre, S., Tam, C. S., Tam, C. S., Mulligan, S. P., Jaeger, U., Devereux, S., Barr, P. M., Fuman, R. R., Kipps, T. J., Cymbalista, F., Pocock, Ch., Thornton, P., Caligaris-Cappio, F., Robak, T., Delgado, J., Schuster, S., Montillo, M., Schuh, A., de Vos, S., Gill, D., Bloor, A., Dearden, C., Moreno, C., Jones, J. J., Chu, A. D., Fardis, M., McGreivy, J., Clow, F., James, D. F., Hillmer, P. (2014): Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 371: 213 - 223.

Coombs, C. C., Rassenti, L. Z., Falchi, F., Slager, S. L., Strom, S. S., Ferrajoli, A., Weinberg, J. B., Kipps, T. J., Lanasa, M. C. (2012): Single nucleotide polymorphism and inherited risk of chronic lymphocytic leukemia among African Americans. *Blood* 120(8): 1687 – 1690.

Cordoba, P., Sanchez-Beato, M., Herreros, B., Domenech, E., Garcia-Marco, J., Garcia, J. F., Martinez-Lopez, J., Rodriguez, A., Garcia-Raso, A., Llamas, P., Piris, M. – A. (2016): Two distinct molecular subtypes of chronic lymphocytic leukemia give new insights on the pathogenesis of the disease and identify novel therapeutic targets. *Leukemia & Lymphoma* 57(1): 134 – 142.

Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., Montserrat, E. (2003): ZAP-70 Expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations on chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 348:1764 – 1775.

Dalsass, A., Mestichelli, F., Ruggieri, M., Gaspari, P., Pezzoni, V., Vagnoni, D., Angelini, M., Angelini, S., Bigazzi, C., Falcioni, S., Troiani, E., Alesiani, F., Catarini, M., Attolico, I., Scortechini I., Discepoli, G., Galieni, P. (2013): 6q deletion detected by fluorescence *in situ* hybridization using bacterial artificial chromosome in chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of haematology* 91(1): 9 - 10.

Del Giudice, I., Rossi, D., Chiaretti, S., Marinelli, M., Tavoraro, S., Gabrielli, S., Laurenti, L., Marasca, R., Rasi, S., Fangazio, M., Guarini, A., Gaidano, G., Foa, R. (2012): NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Hematologica* 97(3): 437-441.

Dickinson, J. D., Smith, L. M., Sanger, W. G., Zhou, G., Townley, P., Lynch, J. C., Pavletic, Z. S., Bierman, P. J., Joshi, S. S. (2005): Unique gene expression and clinical characteristics are associated with the 11q23 deletion in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 128(4): 460 – 471.

Dighiero, G., Hamblin, T. J.(2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 371: 1017-1029.

Eichhorst, B., Dreyling, M., Robak, T., Montserrat, E., Hallek, M.(2011): Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 6: 50 – 54.

Eklom, R., Galindo, J. (2010): Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity (Edinb)*107(1): 1–15.

Foa, R., Del Giudice, I., Guarini, A., Rossi, G., Gaidano, G. (2013): Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 98(5): 675–685.

- Forconi, F., Potter, K. N., Weatley, I., Darzentas, N., Sozzi, E., Stamatopoulos, K., Mockridge, C. I., Packham, G., Stevenson, F. K. (2010): The normal IGVH1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. *Blood* 115(1): 71 – 77.
- Furman, R. R., Sharman, J. P., Coutre, S. E., Cheson, B. D., Pagel, J. M., Hillmen, P., Barrientos, J. C., Zelenetz, A. D., Kipps, T. J., Flinn, I., Ghia, P., Eradat, H., Ervin, T., Lamanna, N., Coiffier, B., Pettitt, A. R., Path, F. R. C., Ma, S., Sttilgenbauer, S., Cramer, P., Aiello, M., Johnson, D. M., Miller, L. L., Li, D., Jahn, T. M., Dansey, R. D., Hallek, M., O'Brien S. M. (2014): Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 370:997 - 1007.
- Gaidano, G., Foá, R., Dalla-Favera, R., (2012): Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 122(10): 3432 – 3438.
- Galton, D., A., G. (1966): The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canadian Medical Association Journal* 94: 1005 – 1010.
- Ghia, P., Ferreri, A. J. M. & Caligaris-Cappio, F. (2007): Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Reviews Oncology/Hematology* 64: 234-246.
- Gianfelici, V. (2012): Activation of the NOTCH1 pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 97(3): 328 – 330.
- Hadrabová, M. (2015): Chronická lymfocytární leukémie. *Onkologie* 9(3): 107-111.
- Hallek, M. (2015): Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology* 90(5): 446 – 460.
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., Bergmann, M., Catalano, J., Zinzani, P. L., Caligaris-Cappio, F., Seymour, J. F., Berrebi, A., Jäger, U., Cazin, B., Trnecny, M.,

Westermann, A., Wendtner, C. M., Eichhorst, B. F., Staib, P., Bühler, A., Winkler, D., Zenz, T., Böttcher, S., Ritgen, M., Mendila, M., Kneba, M., Döhner, H., Stilgenbauer, S. (2010): Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 376(9747):1164 - 1174.

Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., Kipps, T. J. (2008): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111(12): 5446 – 5456.

Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., Stevenson, F. K. (1999): Unmutated IgV_H Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 94(6): 1848 – 1854.

Hervé, M., Xu, K., Ng, Y. S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B. T., Chiorazzi, N. & Meffre, E. (2005): Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 115(6):1636 - 1643.

Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Yu, R.J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E. J. (2015): SEER Cancer Statistic Review 1975 – 2012.

Chiorazzi, N., Rai, K. R. & Ferrarini, M. (2005): Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 352:804 - 815.

Jeromin, S., Weissmann, S., Haferlach, C., Dicker, F., Bayer, K., Grossmann, V., Alpermann, T., Roller, A., Kohlmann, A., Haferlach, T., Kern, W., Schnittger (2014): *SF3B1* mutations correlated to cytogenetics and mutations in *NOTCH1*, *FBXW7*, *MYD88*, *XPO1*, and *TP53* in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 28(1): 108 – 117.

Kozák, T. (2008): Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie* 2(3): 156-162.

Krejčí, M., Adam, Z., Pour, L., Brychtová, Y., Mayer, J., Vorlíček, J. (2009): Chronická B-lymfatická leukemie a jí podobné stavy. *Vnitřní lékařství* 55(9): 746-765.

Krysov, S., Dias, S., Paterson, A., Ian Mockridge, C., Potter, K. N., Smith, K-A., Ashton-Key, M., Stevenson, F. K., Packham, G. (2012): Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 119(1): 170 –179.

Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, Ch., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E. S., Neuberger, D., Brown, J. R., Getz, G., Wu, C. J. (2013): Evolution and impact of subclonal mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152(4): 714 – 726.

Little, S. (2001): Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*.

Martínez-Trillos, A., Pinyol, M., Navarro, A., Aymerich, M., Jares, P., Juan, M., Rozman, M., Colomer, D., Delgado, J., Giné, E., González-Díaz, M., Hernández-Rivas, J. M., Colado, E., Rayón, C., Payer, A. R., Terol, M. J., Navarro, B., Quesada, V., Puente, X. S., Rozman, C., López-Otín, C., Campo, E., López-Guillermo, A., Villamor, N. (2014): Mutation in *TLR/MYD88* pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 123(24): 3790 – 3796.

Matthews, Ch., Catherwood, M. A., ‘Curly’ Morris, T. C. M., Alexander, H. D. (2004): Routine Analysis of IgV_H Mutational Status in CLL Patients using BIOMED-2 Standardized Primers and Protocols. *Leukemia & Lymphoma* 45(9): 1899 – 1904.

Meldrum, C., Doyle, M. A., Thothill, R. W. (2011): Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin. Biochem. Rev* 32(4): 177 – 195.

Montserrat, E. (2006): New Prognostic Markers in CLL. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 279 – 284.

Montserrat, E. & Moreno, C. (2008): Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. Ann Oncol 19(7): 320 – 325.

Moreno, C. & Monserrat, E. (2010): Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use? Hematologica 95(1): 12 – 15.

Motyčková, M., Žák, P., Vroblová, V., Andrýs, C., Belada, D., Malý, J., Smolek, L. (2011): Prognostické faktory u chronické lymfocytární leukemie. Vnitřní lékařství 57(10): 847 - 857.

Ouillette, P., Li, J., Shaknovich, Y., Melnick, A., Shedden, K., Malek, S. N. (2012): Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosom. Cancer 51(12): 1125–1132.

Palma, M., Kokhaei, P., Lundin, J., Choudhury, A., Mellstedt, H., Österborg, A. (2006): The biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Annals of Oncology 17(10): 144-154.

Panovská, A., Brychtová, Y., Mayer, J., Doubek, M. (2011): Chronická B-lymfocytární leukémie. Postgraduální medicína 03: 294 – 301.

Panovská, A., Doubek, M. (2013): Chronická lymfocytární leukémie – diagnostika a léčba. Onkologie 7(3): 117-120.

Panovska-Stavridis, I., Ivanovski, M., Siljanovski, N., Cevreska, L., Efremov, D. G. (2007): Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated V_H genes. Leuk Res 31(2): 245-248.

Papajík, T., Jarošová, M., Plachý, R. & Indrák, K. (2006): Chronická B-lymfocytární leukemie Část I. Pohled na původ, biologii a genetické změny leukemických buněk. *Trans Hemat dnes.* 12(2): 53-61.

Pospisilova, S., Gonzalez, D., Malcikova, J., Trbusek, M., Rossi, D., Kater, A. P., Cymbalista, F., Eichhorst, B., Hallek, M., Döhner, H., Hillmen, P., van Oers, M., Gribben, J., Ghia, P., Stilgenbauer, S., Zenz, T. (2012): ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26(7): 1458 – 1461.

Puiggros, A., Blanco, G., Espinet, B. (2014): Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemie: Where We Are and Where We Go. *BioMed Research International*: 1 – 13.

Put, N., Van Roosbroeck, K., Konings, P., Meeus, P., Brusselmans, C., Rack, K., Gervais, C., Nguyen-Khac, F., Chapiro, E., Radford-Weiss, I., Struski, S., Dastugue, N., Gachard, N., Lefebvre, Ch., Barin, C., Eclache, V., Fert-Ferrer, S., Laibe, S., Mozziconacci, M-J., Quilichini, B., Poirel, H. A., Woldarska, I., Hagemeijer, A., Moreau, Y., Vanderberghe, P., Michaux, L. (2012): Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytoc leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol* 91: 863 – 873.

Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J. M., Barrena, S., Sánchez, M. L., Teodosio, C., Giraldo, P., Giralt, M., Pérez, M. C., Romero, M., Perdiguier, L. & Orfao, A. (2008): Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B ClinCytom*, 74, 139 - 149.

Ráčil, Z., Burešová, L., Brejcha, M. (2011): Clinical and laboratory features of leukemias at the time of diagnosis: an analysis of 1,004 consecutive patients. *Am J Hematol.*86(9): 800 - 803.

Rai, K. R., Jain, P. (2016): Chroniclymphocyticleukemia (CLL) – Then and now. *AmericanJournalof Hematology* 91(3): 330 – 340.

Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N. & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46(2):219 - 234.

Rosenquist, R., Cortese, D., Bhoi, S., Mansouri, L., Gunnarsson, R. (2013): Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leukemia & Lymphoma* 54(11): 2351-2364.

Rose-Zerilli, M., J., J., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Rodriguez, A., E., Chaplin, T., Gardiner, A., Steele, A., J., Collins, A., Young, B., D., Skowronska, A., Catovsky, D., Stankovic, T., Oscier, D., G., Strefford, J., C. (2014): ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Hematologica* 99(4): 736 – 742.

Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscaggin, A., Spina, V., Deambrogi, C., Marinelli, M., Famà, R., Greco, M., Daniele, G., Forconi, F., Gattei, V., Bertoni, F., Deaglio, S., Pasqualucci, L., Guarini, A., Dalla-Favera, R., Foà, R. & Gaidano, G. (2012): Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119(12):2854-2862.

Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., Deambrogi, C., Khiabani, H., Serra, R., Bertoni, F., Forconi, F., Laurenti, L., Marasca, R., Dal-Bo, M., Rossi, F. M., Bulian, P., Nomdedeu, J., Del Poeta, G., Gattei, V., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Foà, R., Dalla-Favera, R. & Gaidano, G. (2013): Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121(8):1403 - 1412.

Rossi, D., Gaidano, G. (2012a): Molecular Genetics of High-risk Chronic Lymphocytic Leukemia. *Expert Rev Hematol* 5(6): 593 – 602.

Rossi, D., Gaidano, G. (2012b): ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica* 97(1): 5–8.

Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., Fangazio, M., Vaisitti, T., Monti, S., Chiaretti, S., Guarini, A., Del Giudice, I., Cresta, S., Deambrogi, C., Gargiulo, E., Gattei, V., Forconi, F., Bertoni, F., Deaglio, S., Rabadan, R., Pasqualucci, L., Foá, R., Dalla-Favera, R., Gaidano, G. (2011): Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 118(26):6904–6908.

Rossi, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Sozzi, E., Cresta, S., Rasi, S., De Paoli, L., Spina, V., Gattei, V., Capello, D., Forconi, F., Laurina, F., Gaidano, G. (2009): The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: Implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 15(3): 995 – 1004.

Sagatys, E. M., Zhang, L. (2012): Clinical and Laboratory Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer control* 19(1): 18 – 25.

Shanafelt, T. D., Geyer, S. M., Kay, N. E. (2004): Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 103(4): 1202 – 1210.

Schroers, R., Griesinger, F., Trümper, L., Haase, D., Kulle, B., Klein-Hitpass, L., Sellmann L., Dührsen, U., Dürig, J. (2005): Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19: 750 – 758.

Schuh, A., Becq, J., Humphray, S., Alexa, A., Burns, A., Clifford, R., Feller, S. M., Grocock, R., Henderson, S., Khrebtukova, I., Kingsbury, Z., Luo, S., McBride, D., Murray, L., Menju, T., Timbs, A., Ross, M., Taylor, J., Bentley, D. (2012): Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by wholegenome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* 120(20): 4191 – 4196.

Smolej, L., Špaček, M., Obrtlíková, P., Pospíšilová, Š., Jarošová, M., Urbanová, R., Lysák, D., Brejcha, M., Schwarz, J., Doubek, M. (2013): Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie (CLL). *Transfuze Hematol. dnes* 19(2): 61 – 68.

Smonskey, M. T., Block, A. W., Deeb, G., Chanan-Khan, A. A., Bernstein, Z. P., Miller, K. C., Wallace, P. K., Starostik, P. (2012): Monoallelic and Biallelic Deletions of 13q14.3 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Society for Clinical Pathology* 137: 641 - 646.

Sperka, T., Wang, J., Rudolph, K. L. (2012): DNA damage checkpoints instem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(9): 579–590.

Urbankova, H., Papajik, T., Plachy, R., Holzerova, M., Balcarkova, J., Divoka, M., Prochazka, V., Pikalova, Z., Indrak, K., Jarosova, M. (2014): Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetic and CLL FISH panel. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 158(1): 56 – 64.

Vallabhapurapu, S., Karin, M. (2009): Regulation and function of NF- κ Btranscription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol* 27: 693–733.

van Lochem, E. G., van der Velden, V. H., Wind, H. K., te Marvelde, J. G., Westerdal, N. A. & vanDongen, J. J. (2004): Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis inhuman bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clinical Cytometry*60:1 - 13.

Vrána, A., Fellnerová, I., Vránová, J. (2011): Imunitní systém – obecný úvod. In. *Imunologie a imunomodulační terapie.* pp. 13 – 37, Univerzita Palackého v Olomouci.

Vrobllová, V., Smolej, L., Vrbacký, F., Jankovičová, K., Hrudková, M., Malý, J., Krejsek, J. (2009): Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *ACTA MEDICA.* 52(1): 3 - 8.

Vroblova, V., Vrbacky, F., Hrudkova, M., Jankovicova, K., Schmitzova, D., Maly, J., Krejsek, J., Smolej, L. (2010): Significant change in ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*84(6): 513 - 517.

Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D. S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A. R., Fernandes, S. M., Goldstein, N. R., Folco, E. G., Cibulskis, K., Tesar, B., Sievers, Q. L., Shefler, E., Gabriel, S., Hacohen, N., Reed, R., Meyerson, M., Golub, T. R., Lander, E. S., Neuberger, D., Brown, J. R., Getz, G. & Wu, C. J. (2011): SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 365(26):2497 - 2506.

Yang, S-M., Li, J-Y., Gale, R. P., Huang, X-J. (2015): The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? *Blood reviews* 29: 205 – 213.

Zent, C. S., Burack, W. R. (2014): Mutations in chronic lymphocytic leukemia and how they affect therapy choice: focus on NOTCH1, SF3B1, and TP53. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1: 119 – 124.

Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H. & Stingelbauer, S. (2010): From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10(1): 37 - 50.

Živčák, J., Trebuňová, M., Laputková, G. (2013): Vysoko-rozlišovacia analýza kriviek topenia (HRM analýza) – nová technika v biomedicínskom výskume. *Transfer inovácií* 26: 223 – 225.

8.2 Internetové zdroje

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/330>>[cit. 2016-1-19]

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472>> [cit. 2016-1-23]

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23451>> [cit. 2016-2-14]

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>> [cit. 2016-2-16]

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4851>> [cit. 2016-2-16]

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4615>> [cit. 2016-2-23]

ULR: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55294>>[cit. 2016-2-26]

ULR: <<http://exac.broadinstitute.org/variant/11-102207851-G-A>>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ARMS	amplifikační refrakční mutační systém
BCR	B-Cell receptor
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3
CD	cluster of differentiation
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CT	computer tomography
Del	delece
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ds	double stranded
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7
FCR	fludarabin, cyklofosfamid, rituximab
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FN	fakultní nemocnice
Hb	hemoglobin
HIP1R1	huntingtin interacting protein 1 related
HLA	human leukocyte antigen
HRM	high resolution melting
HOK	hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice v Olomouci
ICN	intracelulární podjednotka
LF	lékařská fakulta
LDT	lymphocyte doubling time
M-CLL	mutated IgVH
MDS	myelodysplastický syndrom
MYD88	myeloid differentiation primary response 88
MYF6	myogenic factor 6
NEC	N-terminální extracelulární podjednotka
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NGS	next generation sequencing
NTM	C-terminální transmembránová podjednotka

OS	overall survival
p	krátké raménko chromozomu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI3K	phospatidilinositol-3-kináza
PLT	trombocyty v periferní krvi
RB1	retinoblastoma 1
RNA	ribonukleová kyselina
TP53	tumor protein 53
U-CLL	unmutated IgVH
UP	Univerzita Palackého
q	dlouhé raménko chromozomu
SF3B1	splicing factor 3b subunit 1
WHO	World Health Organization
WT	wild type
ZAP-70	zeta-asociovaný protein o molekulární hmotnosti 70 kd