

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Nikola Hlawiczková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení mutací u vybraných
hematologických chorob pomocí metody
MassArray**

Diplomová práce

Bc. Nikola Hlawiczková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: RNDr. Martina Divoká, Ph.D.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola HLAWICZKOVÁ**
Osobní číslo: **R180455**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Název tématu: **Stanovení mutací u vybraných hematologických chorob pomocí metody MassArray**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Cílem DP je určení mutací pomocí metody MassArray u vybrané skupiny hematologických pacientů.
2. Stručný přehled literárních údajů zaměřených na problematiku stanovení mutací pomocí technologie MassArray.
3. Experimentální část: výsledky vlastních analýz provedených metodou MassArray.
4. Vyhodnocení zjištěných mutací u vybrané skupiny hematologických pacientů a určení jejich významu v diagnostice hematologických chorob.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Michael J. Mosko, Aleksej A. Nakorchevsky, Eunice Flores, Heath Metzler, Mathias Ehrich, Dirk J. van den Boom, James L. Sherwood and Anders O.H. Nygren: Ultrasensitive Detection of Multiplexed Somatic Mutations Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol.18, No.1, January 2016.

Tania Fleitas, Maider Ibarrola-Villava, Gloria Ribas, Andrés Cervantes: MassARRAY determination of somatic oncogenic mutations in solid tumors: Moving forward to personalized medicine. *Cancer Treatment Reviews* 49 (2016) 5764.

Dunlap J, Beadling C, Warrick A, Neff T, Fleming WH, Loriaux M, Heinrich MC, Kovacsovics T, Kelemen K, Leeborg N, Gatter K, Braziel RM, Press R, Corless CL, Fan G: Multiplex high-throughput gene mutation analysis in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol.* 2012 Dec;43(12):2167-76

Agena Bioscience MassARRAY Analyser Compact User's Guide. [online] Dostupné z <https://agenacx.com/>

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM DETECTION WITH THE MASSARRAY SYSTEM FROM AGENA. [online] Dostupné z <http://www.labclinics.com/en/snp-genotyping-agena/>

MassARRAY System. [online] Dostupné z https://agtc.med.wayne.edu/pdfs/sequenom_massarray_system_brochure.pdf

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Martina Divoká, Ph.D.


Hemato-onkologická klinika



Datum zadání diplomové práce: **12. října 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2020**

UNIVERSITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra Biologie a Aplikované Genetiky
Sachemská 5/10, Olomouc – Holešovice
tel. 585 633 111
02-11-2018



L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 27. března 2017

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Nikola Hlawiczková

Název práce: Stanovení mutací u vybraných hematologických chorob pomocí metody MassArray

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: RNDr. Martina Divoká, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: chronická myeloidní leukémie, CML, mutace, tyrosin kinázová doména, *BCR-ABL1*, rezistence, tyrosin kinázový inhibitor, MassArray, Sangerovo sekvenování

Počet stran: 61

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Souhrn

Předložená diplomová práce s názvem „Stanovení mutací u vybraných hematologických chorob pomocí metody MassArray“ se věnuje detekci mutací v oblasti kinázové domény fúzního genu *BCR-ABL1* u pacientů s chronickou myeloidní leukémií, kteří byli léčeni a sledováni na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Teoretická část práce shrnuje základní poznatky a informace o chronické myeloidní leukémii, její molekulární podstatu a diagnostiku. Další kapitoly jsou věnované léčbě této nemoci, rozvoji rezistence na podávanou léčbu a detekci mutací v oblasti kinázové domény fúzního genu *BCR-ABL1*, které tuto rezistenci mohou zapříčínovat.

Experimentální část se zaměřuje na stanovení mutací v oblasti kinázové domény fúzního genu *BCR-ABL1*. Celkem bylo vyšetřeno 25 pacientů s CML se zvyšující se hladinou transkriptu *BCR-ABL1*, která značí snižující se biologickou odpověď na podávanou léčbu. Výchozím materiálem byla periferní krev nebo kostní dřev pacientů, ze které byla izolována RNA, která se reverzní transkripcí přepsala do komplementární cDNA. Získaná cDNA byla vyšetřena vybranými molekulárně genetickými metodami, které potvrdily přítomnost nebo nepřítomnost mutace v kinázové doméně *BCR-ABL1*.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Nikola Hlawiczková

Title: Detection of mutations in selected hematological diseases using the MassArray method

Type of thesis: master

Department: Department of Celly Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: RNDr. Martina Divoká, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: chronic myeloid leukemia, CML, mutation, tyrosine kinase domain, *BCR-ABL1*, resistance, tyrosine kinase inhibitor, MassArray, Sanger sequencing

Number of pages: 61

Number of appendices: 0

Language: czech

Summary

The presented diploma thesis entitled „Detection of mutations in selected hematological diseases using the MassArray method“ is dedicated to detection of *BCR-ABL1* kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia examined and treated at Hemato-Oncology Clinic of Faculty Hospital in Olomouc.

The theoretical part summarizes a basic knowledge and information about chronic myeloid leukemia, its molecular basis and diagnostics. Next chapters are dedicated to treatment of this disease, development of drug resistance and detection of *BCR-ABL1* kinase domain mutations cause the resistance.

The practical part focuses on determination of mutations in kinase domain of *BCR-ABL1* fusion gene. A total of 25 patients with CML with increasing *BCR-ABL1* transcript levels were examined. RNA was isolated from peripheral blood or bone marrow from CML patients and used for selected molecular genetic analysis that confirmed presence or absence of mutations in kinase domain of *BCR-ABL1*.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala v průběhu magisterského studia zcela samostatně, pod vedením RNDr. Martiny Divoké, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala RNDr. Martině Divoké, Ph.D. za její ochotu, čas a odborné rady, které mi poskytla během zpracování teoretické a experimentální části této diplomové práce. Dále bych také poděkovala Mgr. Janu Grohmannovi za jeho trpělivost a cenné připomínky, které mi během laboratorní práce věnoval.

Projekt byl podpořen granty MEX-1 (87-91) a IGA_LF_2020_002.

Obsah

Seznam zkratk	vii
Seznam obrázků	viii
Seznam tabulek	xiv
1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 Chronická myeloidní leukémie.....	3
3.2 Geny <i>ABL1</i> a <i>BCR</i>	4
3.3 Philadelphia chromosom.....	6
3.4 Molekulární podstata CML	8
3.5 Diagnostika CML	9
3.6 Léčba CML	11
3.6.1 Rezistence na TKI.....	12
3.7 Mutace <i>BCR-ABL1</i> genu.....	13
3.8 Detekce mutací	14
3.8.1 Sangerovo přímé sekvenování	16
3.8.2 MassArray	17
4 Materiál a metody	21
4.1 Biologický materiál.....	21
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	21
4.3 Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu.....	22
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.4.1 Izolace RNA	24
4.4.2 Přepis RNA na cDNA	25
4.4.3 Nested RT-PCR	27
4.4.4 Elektroforetická separace a purifikace produktu	28
4.4.5 Sekvenační analýza kinázové domény <i>BCR-ABL1</i> genu	29
4.4.6 MassArray analýza mutací v <i>BCR-ABL1</i> genu.....	30

5	Výsledky	34
6	Diskuze	51
7	Závěr.....	54
8	Literatura	55

Seznam zkratek

ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ASO-PCR	alelově specifická PCR
ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleotidová kyselina
CML	chronická myeloidní leukémie
ddNTP	dideoxyribonukleotidtrifosfát
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DHPLC	denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DSB	dvouvláknový DNA zlom
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FN	fakultní nemocnice
HLA	lidský hlavní histokompatibilní komplex
HRM	vysokorozlišovací analýza křivek teploty tání
HSCT	alogenní transplantace krvetvorných buněk
IM	imatinib mesylát
KD	kinázová doména
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého
MDR	mnohočetná léková rezistence
MDS	myelodysplastický syndrom
nested RT-PCR	dvoukolová reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
PCR	polymerázová řetězová reakce
Ph chromosom	Philadelphia chromosom
Rb	retinoblastomový protein
TK	tyrosin kináza
TKI	tyrosin kinázový inhibitor

Seznam obrázků

- Obr. 1.** Karyotyp 46, XY, t(9;22)(q34;q11) pacienta s CML. Šipky ukazují na reciprokovou translokaci t(9;22), krátký chromosom 22 se nazývá Philadelphia. Převzato z Liu *et al.*, 2016.4
- Obr. 2.** Struktura proteinu Abl1. Protein obsahuje regulační domény SH3 a SH2, doménu SH1 s tyrosin kinázovou aktivitou, DNA a aktin vazebnou doménu. Na N-konci se nachází jaderný lokalizační signál. Upraveno podle Rohoň a Faber, 2013.5
- Obr. 3.** Struktura proteinu Bcr. Protein obsahuje oligomerizační doménu (OD), doménu se serin-threonin kinázovou aktivitou, doménu homologní s guanosin exchange factor (GEF) a doménu s GTPasovou aktivitou (GAP). Upraveno podle Bernt a Hunger, 2014.6
- Obr. 4.** Schéma standardní translokace t(9;22)(q34;q11). Vyměňují se konce dlouhých ramen chromosomu 9 a 22 se zlomy v 9q34 a 22q11. Gen *ABL1* je přemístěn k 5 'BCR sekvenci na chromosomu 22 a 3 'BCR sekvence z chromosomu 22 je přemístěna na chromosom 9. Upraveno podle Faber *et al.*, 2010.6
- Obr. 5.** Varianty leukemického fúzního genu *BCR-ABL1* podmíněné zlomy v různých oblastech genu *BCR* a *ABL1*. Ke zlomu na chromosomu 9 dochází v úseku prvního exonu (1b nebo 1a). Zlomy na chromosomu 22 jsou rozděleny na tři oblasti: minor, major, mikro. Zlomem v oblasti major vzniká 210kDa protein (p210), zlomem v oblasti minor vzniká 185-190kDa protein (p185 nebo p190), zlomem v oblasti mikro vzniká 230kDa protein (p320). Převzato ze Salesse a Verfaillie, 2002.9
- Obr. 6.** Mechanismus působení imatinib mesylátu (IM). Protein Bcr-Abl1 má tyrosin kinázovou aktivitu, kdy přenáší fosfát z ATP na určité substráty, což vede ke vzniku CML fenotypu. IM blokuje navázání ATP a inhibuje enzymatickou aktivitu tyrosin kinázy a transformaci buněk. Upraveno podle Goodman a Gerson, 2013.12
- Obr. 7.** Mapa častých aminokyselinových substitucí KD Bcr-Abl1. Struktura KD obsahuje P-smyčku (vazba fosfátu), SH3 a SH2 kontaktní region (vazba s proteiny obsahující SH2 a SH3 domény), IM vazebnou doménu, katalytickou doménu a aktivační doménu. Hvězdy udávají pozice aminokyselin, které se vodíkovou vazbou nebo van der Waalsovými silami podílejí na vazbě imatinibu. Upraveno podle Soverini *et al.*, 2011.14
- Obr. 8.** Schéma nasedání primerů při nested RT-PCR pro detekci mutací v kinázové doméně *BCR-ABL1*. Černé šipky značí primery prvního kola nested RT-PCR, které nasedají k sekvenci

<p>genu <i>BCR</i> a <i>ABL1</i>. Oranžové šipky značí primery druhého kola nested RT-PCR, které amplifikují produkt prvního kola. Upraveno podle Jones <i>et al.</i>, 2009.</p>	15
<p>Obr. 9. Postup automatického Sangerova sekvenování. Upraveno podle https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html, navštíveno 21.3.2020.</p>	17
<p>Obr. 10. Příprava vzorku pro MassArray analýzu. Postup zahrnuje amplifikaci úseku DNA s bodovou mutací, SAP reakci defosforylující neinkorporované dNTPs a iPLEX extenzní reakci se specifickými ddNTPs. Upraveno podle https://www.labclinics.com/en/snp-genotyping-agena/, navštíveno 25.3.2020.</p>	18
<p>Obr. 11. MALDI-TOF analýza. Vzorek na SpectroCHIP destičce je ozářen laserem, převeden do plynné fáze a ionizován. Ionty vzorku jsou vedeny do letové trubice s detektorem, který zaznamenává jejich dobu letu t, kterou převádí na měrnou hmotnost iontu m/z. Upraveno podle https://agenabio.com/wp-content/uploads/2020/03/SYS0034A4-01-MassARRAY-Brochure-EMEA-WEB.pdf, navštíveno 26.3.2020.</p>	19
<p>Obr. 12. Ukázka hmotnostního spektra z analýzy MassArray. Na ose x je zaznamenána hodnota měrné hmotnosti iontu m/z, na ose y je zaznamenána intenzita daného iontu. Upraveno podle https://agenabio.com/wp-content/uploads/2020/03/SYS0034A4-01-MassARRAY-Brochure-EMEA-WEB.pdf, navštíveno 26.3.2020.</p>	20
<p>Obr. 13. Detekce izolované totální RNA (s typickým profilem hlavních RNA podjednotek; „smear“ představuje mRNA) na 1,5% agarózovém gelu. Dráha M obsahuje 1 μl 100 bp standardu molekulové hmotnosti (Promega). Dráhy 1 a 2 obsahují 2 μl izolované RNA pacienta č. 1 a 2 (Tab. 11.) s 1 μl 6x nanášecího pufru a 1,8 μl formamidu.</p>	25
<p>Obr. 14. Detekce genu <i>ABL1</i> na 1,5% agarózovém gelu. Dráha M obsahuje 1 μl 100 bp standardu molekulové hmotnosti (Promega). Dráha 1 a 2 obsahuje 10 μl PCR produktu pacienta č. 1 a č. 2 s 2 μl 6x nanášecího pufru (Tab. 11.).</p>	26
<p>Obr. 15. Detekce amplifikovaného fúzního genu <i>BCR-ABL1</i> na 1,5% agarózovém gelu. Dráha M obsahuje standard molekulové hmotnosti 100 bp (Promega). Rámeček ukazuje produkty druhého kola RT-PCR o cca 1200 bp pacientů 21–25 (Tab. 11.). Dráha 4 a 5 obsahuje navíc nespecifické produkty reakce. Z důvodu nízké hladiny transkriptu <i>BCR ABL1</i> u jednoho pacienta se fúzní gen dostatečně nepodařilo amplifikovat, proto v dráhách 6 a 7 nebyl detekován specifický produkt. Dráha 8 představuje negativní kontrolu.</p>	29

Obr. 16. Negativní výsledek MassArray analýzy mutace E255K u pacienta č. 1. Nukleotidové substituce guaninu za adenin zapříčiňující aminokyselinovou substituci glutamátu za lysin v pozici 255 aminokyselinového řetězce Bcr-Abl1 nebyla u pacienta č. 1 detekována.....	35
Obr. 17. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 7. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin je cca v 60 % zastoupení.....	36
Obr. 18. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 8 (květen 2019). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin je vůči wild type alele bez substituce v přibližně stejném zastoupení.....	36
Obr. 19. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 8 (srpen 2019). Wild type alela nebyla detekována. Přítomná je pouze mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin.....	37
Obr. 20. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 8 (únor 2020). Wild type alela nebyla detekována. Přítomná je pouze mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin.....	37
Obr. 21. Sekvence exonu 7 genu <i>ABL1</i> pro navázání extenzních primerů pro mutace T315A a T315I. Substituce cytozinu za tymin (T315I) neumožňuje navázání primeru pro detekci mutace T315A. Substituce adeninu za guanin (T315A) neumožňuje navázání primeru pro detekci mutace T315I.	38
Obr. 22. Negativní výsledek MassArray analýzy mutace T315A u pacienta č. 8 (únor 2020). Z důvodu nepřítomnosti wild type T315 alely se primer pro detekci T315A nemohl plně navázat a extenzní reakce neproběhla. Největší pík v hmotnostním spektru představuje volný extenzní primer.....	38
Obr. 23. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 8 (květen 2019). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin je vůči wild type alele asi v 30% zastoupení.	38
Obr. 24. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 8 (srpen 2019). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin je vůči wild type alele asi v 40% zastoupení.	39
Obr. 25. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 8 (únor 2020). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin je vůči wild type alele asi v 45% zastoupení.	39

Obr. 26. Výsledek MassArray analýzy mutace F359V u pacienta č. 9. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za guanin byla z důvodu nefunkčnosti primeru nedostatečně amplifikovaná, což značí její slabý pík. Největší pík v hmotnostním spektru představuje volný extenzní primer.....	40
Obr. 27. Výsledek MassArray analýzy mutace L248V u pacienta č. 22. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za guanin se vůči wild type alele nachází v 95% zastoupení	40
Obr. 28. Výsledek MassArray analýzy mutace M244V u pacienta č. 23. Příčinou vysokého pozadí mohlo být zhoršení kvality matrice. I přes vysoké pozadí lze detekovat mutantní alelu s nukleotidovou substitucí adeninu za guanin, která se vyskytuje s nižší frekvencí než wild type alela M244.	41
Obr. 29. Detekce mutace M244V u pacienta č. 23 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí adeninu za guanin (ATG → GTG; šipka) má cca 20% frekvenci.	41
Obr. 30. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 23. Mutantní alela je vůči wild type alele s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin asi v 60% zastoupení.....	41
Obr. 31. Detekce mutace Y253H u pacienta č. 23 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin (TAC → CAC; šipka) má cca 60% frekvenci.	42
Obr. 32. Výsledek MassArray analýzy mutace G250E u pacienta č. 23. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí guaninu za adenin je asi v 15% zastoupení.	42
Obr. 33. Neúspěšná detekce mutace G250E u pacienta č. 23 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Z důvodu nižší frekvence mutantní alely, nelze mutaci zachytit. Šipka ukazuje pozici nukleotidové substituce guaninu za adenin v případě detekce G250E (GGG → GAG).	42
Obr. 34. Výsledek MassArray analýzy mutace M351T u pacienta č. 24. Nejsilnější pík ve spektru znázorňuje mutantní alelu M351T s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin. Wild type alela M351 nebyla detekována. Ve spektru lze detekovat navíc pík wild type alely Y253.	43

- Obr. 35.** Detekce mutace M351T u pacienta č. 24 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Wild type alela nebyla detekována. Šipka ukazuje nukleotidovou substituci thyminu za cytozin (ATG → ACG).....43
- Obr. 36.** Výsledek MassArray analýzy mutace F317L u pacienta č. 24. Mutace F317L/L vzniká nukleotidovou substitucí cytozinu za guanin nebo v tomto případě za adenin. Wild type alela nebyla detekována.43
- Obr. 37.** Detekce mutace F317L u pacienta č. 24 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Wild type alela nebyla detekována. Šipka ukazuje nukleotidovou substituci cytozinu za guanin (TTC → TTA).....44
- Obr. 38.** Sekvence exonu 7 genu *ABLI* pro navázání extenzních primerů pro mutace F317L/L a F317C. Substitute cytozinu za guanin nebo adenin (F317L/L) neumožní navázání primeru pro detekci mutace F317C. Naopak substitute thyminu za guanin (F317C) umožňuje navázání primeru pro detekci F317L/L.....44
- Obr. 39.** Negativní výsledek MassArray analýzy mutace F317C u pacienta č. 24. Z důvodu nepřítomnosti wild type F317 alely se primer pro detekci F317C nemohl navázat a extenzní reakce neproběhla. Největší pík v hmotnostním spektru představuje volný extenzní primer. .45
- Obr. 40.** Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 25. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za thymin byla vůči wild type alele v 85% zastoupení.....45
- Obr. 41.** Detekce mutace T315I u pacienta č. 25 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Šipka ukazuje substituci cytozinu za thymin u mutantní alely (ACT → ATT). Wild type alela nebyla detekována.45
- Obr. 42.** Výsledek MassArray analýzy mutace E255K u pacienta č. 25. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí guaninu za adenin byla vůči wild type alele v 30% zastoupení.....46
- Obr. 43.** Negativní MassArray detekce mutace T315I u pacienta č. 6. Přítomná je pouze wild type alela T315 bez substitute cytozinu za thymin znázorněná nejsilnějším píkem.46
- Obr. 44.** Detekce mutace T315I s 10% frekvencí Sangerovou metodou přímého sekvenování. Šipka ukazuje substituci cytozinu za thymin u mutantní alely (ACT → ATT). Substituovaný thymin je zobrazen červeným píkem.....47

Obr. 45. Negativní detekce mutace T315I s 5% frekvencí Sangerovou metodou přímého sekvenování. Šipka ukazuje pozici substituce cytozinu za tymin u mutantní alely (ACT → ATT). Mutantní alela T315I nebyla zachycena.	47
Obr. 46. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 50% zastoupení.....	48
Obr. 47. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 25% zastoupení.....	48
Obr. 48. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 10% zastoupení.....	48
Obr. 49. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 5% zastoupení.	49
Obr. 50. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 2,5% zastoupení. Mutantní alela T315I je zachycena velmi slabým píkem. Přítomnost mutace lze predikovat z kalibrační křivky (Obr. 51.).....	49
Obr. 51. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 1% zastoupení. Mutantní alelu v hmotnostním spektru nelze detekovat, v kalibrační křivce lze pozorovat mírnou odchylku od vzorku se 100% wild type T315 alelou (Obr. 51.).	49
Obr. 52. Kalibrační křivka detekce mutantní alely T315I v 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5% a 1% zastoupení. WT zobrazuje vzorek pacienta 6 se 100% wild type T315 alelou. MT zobrazuje vzorek pacienta 8 se 100% mutantní T315I alelou. MassArray detekce byla spolehlivá do 5% frekvence mutantní T315I alely. Mutantní T315I alela s 2,5% frekvencí byla v hmotnostním spektru zastoupena mírným píkem, v kalibrační křivce lze vidět odchýlení od vzorku se 100% wild type T315 alelou. Mutantní alela T315I s 1% frekvencí nebyla v hmotnostním spektru detekovaná, v kalibrační křivce lze vidět mírné odchýlení od vzorku se 100% wild type alelou.	50

Seznam tabulek

Tab. 1. Klasifikace sensitivity mutantních buněk k inhibitorům tyrosinových kináz (upraveno podle Rohoň a Faber, 2013).....	13
Tab. 2. Složení RT reakční směsi pro přepis RNA do cDNA.....	25
Tab. 3. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genu <i>ABL1</i>	26
Tab. 4. Složení reakční směsi prvního kola RT-PCR pro amplifikaci <i>BCR-ABL1</i>	27
Tab. 5. Složení reakční směsi druhého kola RT-PCR pro amplifikaci KD <i>ABL1</i>	28
Tab. 6. Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu.....	30
Tab. 7. Amplifikační a extenzní primery detekovaných mutací KD genu <i>BCR-ABL1</i>	31
Tab. 8. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci úseků KD genu <i>BCR-ABL1</i>	32
Tab. 9. Složení SAP reakční směsi.....	32
Tab. 10. Složení iPLEX extenzní reakční směsi	33
Tab. 11. Přehled zjištěných mutací v KD genu <i>BCR-ABL1</i> Sangerovým sekvenováním a MassArray metodou.....	34

1 Úvod

Chronická myeloidní leukémie (CML) je chronické myeloproliferativní onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovatelnému množení buněk myeloidní krevní řady. Ze všech leukémií je CML diagnostikována přibližně v 15–20 % případů. Onemocnění se nejčastěji vyskytuje u starších lidí s věkovým průměrem cca 55 let, nicméně postihuje všechny věkové kategorie.

CML je charakterizována balancovanou genetickou translokací t(9;22)(q34;q11.2), při které dochází k fúzi Abelson genu (*ABL1*) na chromosomu 9 s breakpoint cluster region genem (*BCR*) na chromozomu 22 za vzniku derivovaného chromosomu 22 známého jako Philadelphia chromosom. Přeskupením se tvoří fúzní onkogen *BCR-ABL1*, který se transkribuje a translatuje do Bcr-Abl1 onkoproteinu představujícího trvale aktivovanou nереceptorovou tyrosin kinázu. Hyperaktivovaná Bcr-Abl1 se zapojuje do signálních drah, které aktivují proliferaci buňky a inhibují její apoptózu.

Původní léčba CML zahrnující podávání perorální chemoterapie či interferonu α , byla na počátku 21. století nahrazena cílenou léčbou inhibitory tyrosinových kináz (TKI), které po navázání na tyrosin kinázu inhibují její enzymatickou aktivitu. Častým problémem při podávání TKI je rozvoj rezistence na podávané léčivo, proto se vyvinuly další skupiny léčiv nazývané TKI druhé a třetí generace. Rezistence je často důsledek bodových mutací v genu *BCR-ABL1* způsobujících konformační změny Bcr-Abl1 tyrosin kinázy. V případě pokračování stejné léčby mohou rezistentní buňky selektovat a expandovat. Z tohoto důvodu je včasné zachycení mutací klíčové, protože mohou naznačovat potřebu změny léčebné strategie.

Standartní metodou pro detekci mutací je Sangerova metoda přímého sekvenování s udávanou citlivostí cca 15–25 %. Mutace s menším než 20% výskytem v transkriptu nelze touto metodou identifikovat. Metoda MassArray je mnohem citlivější a dokáže detekovat mutaci až s 0,1% frekvencí v transkriptu. Klinický význam mutací s nízkou frekvencí výskytu zatím nebyl prokázán, nicméně jejich identifikace může predikovat úpravu léčby.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je určení mutací pomocí metody MassArray u vybrané skupiny hematologických pacientů a shromáždit stručný přehled literárních údajů zaměřených na problematiku stanovení mutací pomocí technologie MassArray.

Experimentální část se věnuje výsledkům vlastních analýz provedených metodou MassArray, vyhodnocení zjištěných mutací u vybrané skupiny hematologických pacientů a určení jejich významu v diagnostice hematologických chorob.

3 Literární přehled

3.1 Chronická myeloidní leukémie

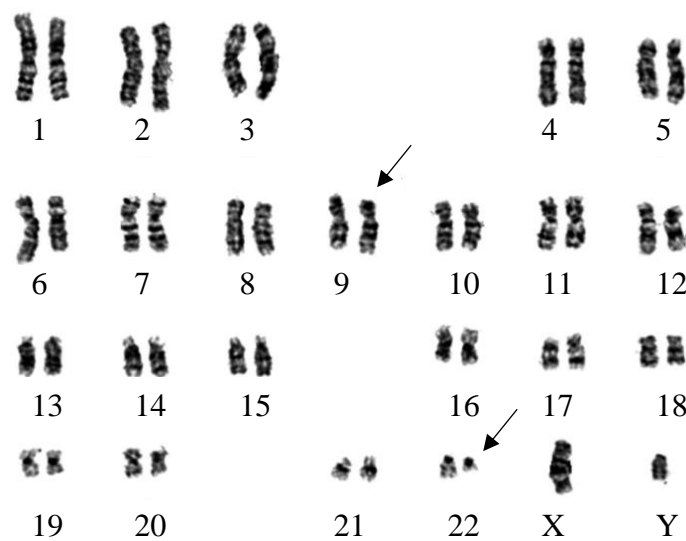
Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění, které vzniká nádorovou transformací hematopoetické kmenové buňky. Jedná se tedy o nekontrolované množení buněk myeloidní krevní řady, především granulocytů (Cortes *et al.*, 1996).

Obvykle se udává, že CML reprezentuje přibližně 15–20 % všech leukémií, kdy postihuje s mírnou predominancí spíše muže než ženy a to v poměru 1,4–2,2 : 1,0 (Sawyers, 1999). Onemocnění je nejčastěji diagnostikováno u starších lidí, jejichž věkový medián se pohybuje okolo 55 let. Nemoc vzácně postihuje i děti, u kterých CML reprezentuje asi 3 % z dětských leukémií. U adolescentů tvoří CML asi 10 % ze všech druhů leukémií. Její incidence u dospělých je 1–2 nové případy na 100 000 obyvatel za rok (Hehlmann *et al.*, 2007).

CML je diagnostikována u více než třetiny osob zcela náhodně, jelikož příznaky v počátku onemocnění bývají mírné a nespecifické, způsobené především chudokrevností a zvětšenou slezinou. Obvykle na CML upozorní vyšetření krevního obrazu, ve kterém je zjištěn zvýšený počet bílých krvinek (leukocytóza) s převahou neutrofilních granulocytů včetně jejich nezralých forem (myelocyty, metamyelocyty, atd.). S časem se agresivita CML stupňuje, příznaky nemoci se zhoršují a objevují se metabolické a cévní problémy či krvácivé stavy (Faber a Urbanová, 2010).

Přestože neexistuje univerzální a platná definice jednotlivých fází CML, udává se, že neléčená CML klasicky probíhá ve třech fázích; iniciální chronické, akcelerované a blastické (Cortes a O'Dwyer, 2004). Až 90 % diagnostikovaných osob s CML lze zařadit do chronické fáze. Tato fáze je zpravidla nejdelší s nejlepší odpovědí na léčbu, kdy pacienti přežívají od 2 let do 15–20 let. Postupné zhoršení stavu pacienta (pokles váhy, zvýšená teplota, únava, slabost, tlak pod levým žeberním obloukem, bolest kostí a kloubů) a jeho snížená odpověď na terapii je známkou akcelerované fáze CML. V tomto stádiu se často objevují další cytogenetické změny a mutace fúzního onkogenu *BCR-ABL1*. Po akcelerované fázi může nastat fáze blastická neboli blastický zvrát. U třetiny osob nastupuje blastický zvrát přímo po fázi chronické, kdy se pro tuto situaci objevuje termín blastická krize (Faber *et al.*, 2010). Pacienti trpí obdobnými symptomy jako ve fázi akcelerované, nicméně s agresivnějším projevem. Svým průběhem a příznaky je blastická fáze velmi podobná akutní leukémii (Cortes a O'Dwyer, 2004).

Při cytogenetickém vyšetření pacientů s CML je typickým nálezem tzv. Philadelphia chromosom (Ph) (Obr. 1.). Tento malý chromosom je důsledek reciproké translokace mezi chromosomy 9 a 22, $t(9;22)$. Výsledkem přemístění částí ramen zmíněných chromosomů je vznik fúzního genu *BCR-ABL1*, jehož produktem je onkoprotein Bcr-Abl1 formující konstitutivně aktivovanou tyrosinovou kinázu (TK). Takto aktivovaná TK neustále fosforyluje tyrosinová rezidua některých proteinů a tím zásadně ovlivňuje určité intracelulární dráhy podílející se na vzniku leukemického fenotypu, např. zvýšená buněčná proliferace, inhibice apoptózy, snížená adheze buněk v kostní dřeni, genomová nestabilita aj. (Rohoň a Faber, 2013).



Obr. 1. Karyotyp 46, XY, $t(9;22)(q34;q11)$ pacienta s CML. Šipky ukazují na reciprokou translokaci $t(9;22)$, krátký chromosom 22 se nazývá Philadelphia. Převzato z Liu *et al.*, 2016.

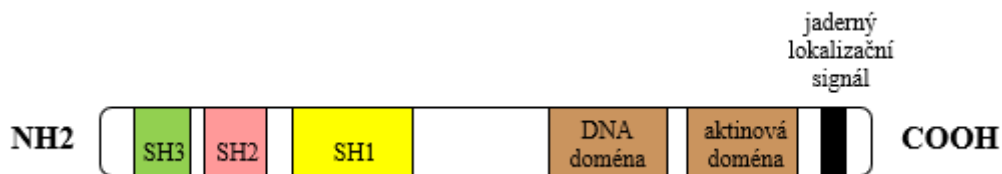
3.2 Geny *ABL1* a *BCR*

Gen *ABL1* je lidským homologem onkogenu *v-ABL*, který byl původně identifikován u Abelsonova viru myší leukémie (Ab-MuLV) (Abelson a Rabstein, 1970). Lidský gen *ABL1* se nachází na dlouhém raménku chromosomu 9 a kóduje nереceptorovou tyrosin kinázu (TK). Tento protoonkogen obsahuje 11 exonů, přičemž na 5' konci se nachází exony označované jako e1b a e1a. Alternativním sestřihem se překládá pouze jeden z nich, a vznikají tak dvě proteinové izoformy o velikosti 145 kDa (Laneuville, 1995).

V závislosti na buněčné lokalizaci proteinu Abl1 je ovlivněna řada buněčných procesů. Převážně je Abl1 protein lokalizován v jádře (Yoshida, 2007). V nedělicích se buňkách

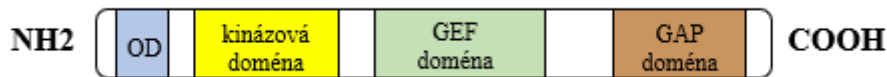
je aktivita nukleárního Abl1 proteinu blokována vazbou tumor supresorového retinoblastomového proteinu (Rb). Na přechodu G1/S fáze buněčného cyklu je Rb protein fosforylován a disociuje z komplexu (Welch a Wang, 1995). Kináza Abl1 se tak stává aktivní a zprostředkovává odpověď na buněčný stres a přechod buněk do apoptózy. Cytosolová forma Abl1 má především signalizační funkci, reguluje cytoskelet a tím adhezi a motilitu buněk (Yoshida, 2007).

Protein Abl1 se skládá z domén SH3, SH2 a SH1 (Src homology), DNA vazebné a aktin vazebné domény. Doména SH1 má tyrosin kinázovou aktivitu. Doména SH2 slouží jako pozitivní regulátor aktivity proteinu Abl1, naopak doména SH3 jako negativní regulátor. Aminoterminální konec (N-konec) proteinu nese tzv. čepičkovou strukturu (cap), která navázáním na SH3 doménu autoinhibuje tyrosin kinázovou aktivitu Abl1. Karboxyterminální konec (C-konec) proteinu Abl1 je bohatý na prolin a obsahuje jaderný lokalizační signál (Obr. 2.) (Nagar *et al.*, 2003).



Obr. 2. Struktura proteinu Abl1. Protein obsahuje regulační domény SH3 a SH2, doménu SH1 s tyrosin kinázovou aktivitou, DNA a aktin vazebnou doménu. Na N-konci se nachází jaderný lokalizační signál. Upraveno podle Rohoň a Faber, 2013.

Gen *BCR* („breakpoint cluster region“) se nachází na dlouhém raménku chromosomu 22 a obsahuje 23 exonů. Alternativním sestřihem v oblasti intronu 1 vznikají dvě proteinové izoformy s velikostí 130 kDa a 160 kDa (Laurent *et al.*, 2001). Protein Bcr je rozpustný oligomerní multidoménový protein, který je lokalizovaný zejména v cytoplasmě, nicméně může být asociovaný i s kondenzovanou DNA (Wetzler *et al.*, 1995). Na N-konci proteinu se nachází oligomerizační doména, po které následuje doména se serin-threonin kinázovou aktivitou. Na C-konci genu je GAP doména aktivující GTPázu, před kterou se nachází doména GEF (guanosin exchange factor) (Obr. 3.). Tyto domény ovlivňují nitrobuněčnou signalizaci, organizaci cytoskeletu a buněčnou proliferaci (Diekmann *et al.*, 1991). I když funkce genu *BCR* není zcela objasněna, dle jeho domén lze usuzovat, že signalizační dráhy reguluje dvěma hlavními mechanismy; fosforylací a vazbou GTP (Laurent *et al.*, 2001).

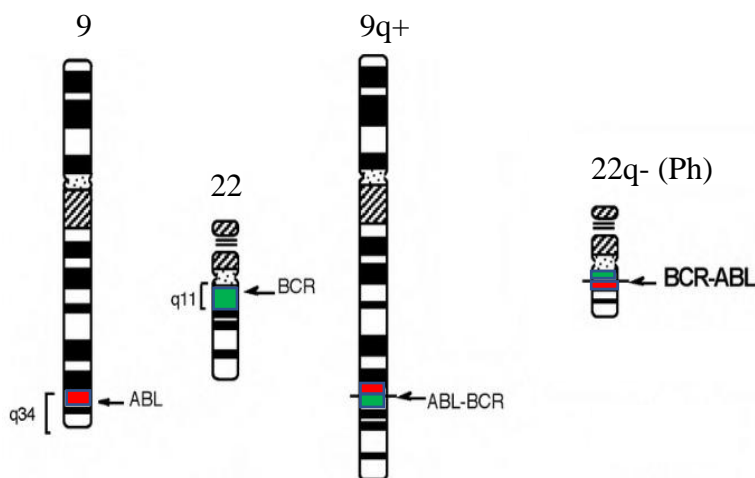


Obr. 3. Struktura proteinu Bcr. Protein obsahuje oligomerizační doménu (OD), doménu se serin-threonin kinázovou aktivitou, doménu homologní s guanosin exchange factor (GEF) a doménu s GTPasovou aktivitou (GAP). Upraveno podle Bernt a Hunger, 2014.

3.3 Philadelphia chromosom

Zásadním objevem pro pochopení podstaty CML bylo nalezení chromosomové abnormality u pacientů s CML, v jejichž karyotypu byl pozorován zkrácený „minute“ chromosom 22. Tento chromosom byl nazván chromosom Philadelphia (Ph) (Nowell a Hungerford, 1960).

Ph chromosom je derivovaný chromosom 22, jehož distální konec obsahuje genetický materiál z chromosomu 9. Vzniká při reciproké translokaci mezi chromosomy 9 a 22, $t(9;22)$. Společně s Ph chromosomem vzniká i derivovaný chromosom 9, jehož distální úsek obsahuje materiál z chromosomu 22 (Obr. 4.; Rowley, 1973).



Obr. 4. Schéma standardní translokace $t(9;22)(q34;q11)$. Vyměňují se konce dlouhých ramen chromosomu 9 a 22 se zlomy v 9q34 a 22q11. Gen *ABL1* je přemístěn k 5' BCR sekvenci na chromosomu 22 a 3' BCR sekvence z chromosomu 22 je přemístěna na chromosom 9. Upraveno podle Faber *et al.*, 2010.

Předpokládá se, že před výměnou genetického materiálu dochází na obou translokovaných chromosomech ke zlomům, k tzv. double strand breaks (DSBs), které se poté nesprávnou reparací spojují. Příčinou zlomů může být působení určitého exogenního agens (např. ionizující záření, chemoterapeutika), anebo endogenního agens

(např. kyslíkové radikály), popř. mohou vznikat i spontánně během buněčného cyklu (Agarwal *et al.*, 2006).

Důvod časté translokace mezi chromosomy 9 a 22, resp. mezi geny *ABL1* a *BCR*, není zcela objasněn. Bylo zjištěno, že geny *BCR* a *ABL1* jsou v buněčných jádrech kostní dřeně a lymfocytů ve velmi těsné blízkosti, která umožňuje jejich vzájemnou vysokou frekvenci rekombinace. Nicméně v blízkosti genu *ABL1* se nachází i β -globinový gen, z čehož vyplývá, že blízkost genů *BCR* a *ABL1* není jediným důvodem jejich časté translokace (Neves *et al.*, 1999).

V cca 5 % případů je místo klasické translokace t(9;22) diagnostikována variantní translokace, do které se zapojují kromě chromosomů 9 a 22 i jiné chromosomy, a které také vedou k tvorbě fúzního produktu *BCR-ABL1*. Přestože se variantní a klasická translokace odlišuje, průběh nemoci pacientů je v obou případech stejný. Dle počtu chromosomů zapojených do výměny se rozlišují 2 skupiny variantních translokací. Jednoduchá variantní translokace je charakterizována genetickou výměnou mezi dvěma chromosomy, přičemž jeden z chromosomů 9 nebo 22 je nahrazen variantním (V), tzn. t(V;22) a t(9;V). Při komplexní variantní translokaci změna postihuje kromě chromosomů 9 a 22 i další skupiny chromosomů, tzn. t(V;9;22) (Rohoň a Faber, 2013). Nejčastěji do translokace vstupují chromosomy 3, 11, 12, 14 a 17 (Fitzgerald a Morris, 1991).

Mechanismus vzniku variantních translokací není přesně charakterizován, nicméně existují 2 teorie. První hypotéza popisuje jednostupňový proces, ve kterém vznikají zlomy současně na třech různých chromosomech, které se ve stejném čase mezi sebou recipročně vymění. Druhá teorie pracuje s myšlenkou víceúrovňového procesu, kdy po klasické translokaci t(9;22) následuje translokace druhá zahrnující další chromosom (Marzocchi *et al.*, 2011).

Existují také vzácné případy, kdy u pacientů není cytogenetickým vyšetřením Ph chromosom identifikován (cca 5 % všech CML). Jedná se o maskovaný Ph chromosom, který vzniká kryptickou translokací zapříčiněnou submikroskopickými aberacemi mezi chromosomy 9 a 22. I v tomto případě dochází k fúzi genů *BCR* a *ABL1* a výsledný produkt lze detekovat polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Pacienti s maskovaným Ph chromosomem se označují jako Ph negativní a *BCR-ABL1* pozitivní a mají stejný klinický průběh jako pacienti s klasickou translokací t(9;22). Existují také atypické CML, kdy gen *ABL1* fúzuje s jiným genem než *BCR* (např. gen *TEL-ABL1*) (Rohoň a Faber, 2013).

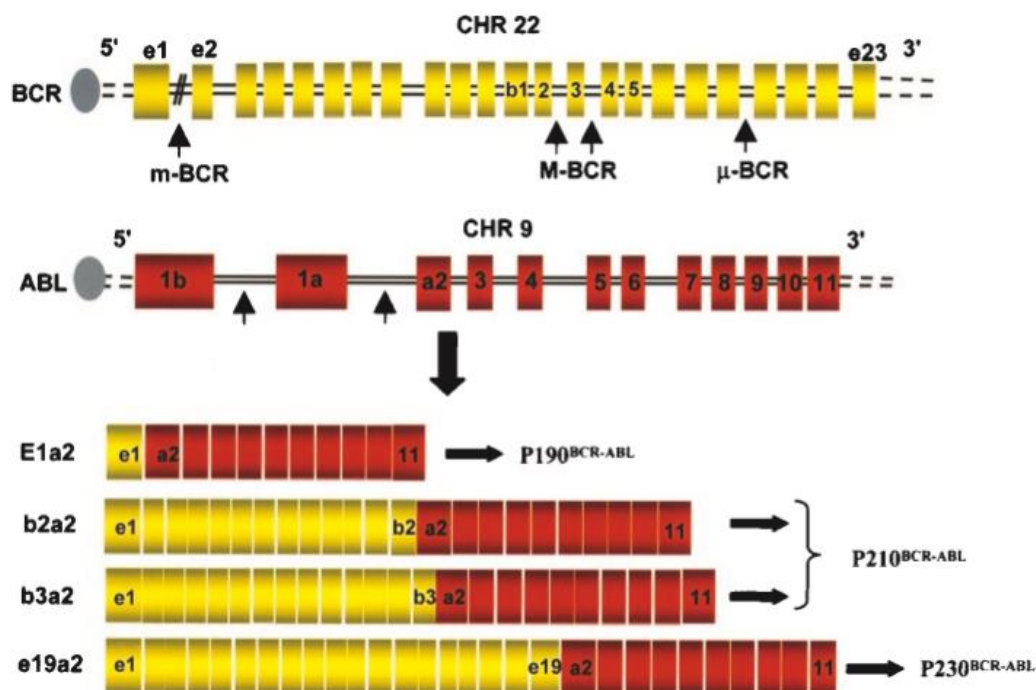
3.4 Molekulární podstata CML

Nejvýznamnějším markerem CML je onkoprotein Bcr-Abl1. Jeho vznik je spojen s reciprokou translokací mezi chromosomy 9 a 22, která podmiňuje tvorbu fúzního genu *BCR-ABL1*, který je lokalizován na chromosomu Ph (22q-). Současně vzniká i reciproký gen *ABL1-BCR* na chromosomu 9 (9q+), u kterého se předpokládá, že jeho přítomnost nemá vliv na patogenezi CML (Salesse a Verfaillie, 2002). Fúzní gen *BCR-ABL1* může být detekován také u některých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), vzácně lze jej identifikovat u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), popřípadě u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) (Dai *et al.*, 2017).

Zlom na chromosomu 9 zasahuje pruh q34 dlouhého raménka, kde je lokalizován gen *ABL1*. Na chromosomu 22 dochází ke zlomu v pruhu q11 dlouhého raménka v oblasti genu *BCR*. Zlomy na 9 a 22 chromosomu mohou vznikat v různých úsecích genů *ABL1* a *BCR*, jejichž důsledkem je tvorba odlišných fúzních leukemických genů *BCR-ABL1*. Fúzní geny *BCR-ABL1* kódují stejnou část genu *ABL1*, ale liší se v délce sekvence genu *BCR* zachované na 5' konci fúzního genu. Gen *ABL1* obsahuje 11 exonů, kdy ke zlomům dochází nejčastěji v intronu mezi exony e1b a a2. Gen *BCR* obsahuje 23 exonů a zlomy jsou rozděleny mezi oblasti major (M-BCR), minor (m-BCR) a mikro (μ -BCR). Na základě zlomového úseku *BCR* genu se velikost fúzního proteinu pohybuje v rozmezí 185–230 kDa (Salesse a Verfaillie, 2002).

Oblast M-BCR je 5,8 kb dlouhý úsek, který obsahuje exony 12, 13 a 14. Zlom mezi exony 13 a 14 se označuje jako b2 a zlom mezi exonem 14 a 15 se označuje jako b3. Dle těchto zlomů rozlišujeme transkripční varianty b2a2 a b3a2, které mají stejný transformační potenciál a nevykazují rozdíl v agresivitě onemocnění. Finálním produktem genů je 210kDa cytoplazmatický fúzní protein p210^{BCR/ABL}. Tento protein lze detekovat u naprosté většiny pacientů s CML (cca 90 % případů). Vzácně lze u pacientů prokázat 185–190kDa protein (p185, p190), který se tvoří zlomy v oblasti m-BCR v rámci prvního a druhého exonu *BCR* genu. Existují i alternativní zlomy, které vznikají v oblasti μ -BCR (Melo, 1997).

Udává se, že translokace a následná fúze *BCR-ABL1* je dostačující změna pro buněčnou transformaci a rozvoj CML. Fúzi genů *BCR* a *ABL1* mohou tedy vznikat transkripční varianty e1a2, b2a2, b3a2 a e19a2 označované dle jednotlivých exonů (Obr. 5.). Vzácně lze nalézt atypické varianty e2a2 a b3a3, které vznikají inzercí DNA mezi danými exony genů *ABL1* a *BCR* (Rohoň a Faber, 2013).



Obr. 5. Varianty leukemického fúzního genu *BCR-ABL1* podmíněné zlomy v různých oblastech genu *BCR* a *ABL1*. Ke zlomu na chromosomu 9 dochází v úseku prvního exonu (1b nebo 1a). Zlomy na chromosomu 22 jsou rozděleny na tři oblasti: minor, major, mikro. Zlomem v oblasti major vzniká 210kDa protein (p210), zlomem v oblasti minor vzniká 185-190kDa protein (p185 nebo p190), zlomem v oblasti mikro vzniká 230kDa protein (p320). Převzato ze Salesse a Verfaillie, 2002.

Na rozdíl od Abl1 proteinu je fúzní protein Bcr-Abl1 lokalizovaný v cytoplazmě Ph pozitivních somatických buněk, kde je navázaný na cytoskeletální proteiny. Kináza Abl1 fúzí s *BCR* genem získá dvojitě svinutou oligomerní doménu na C-konci, která umožňuje dimerizaci, autofosforylaci podjednotek v oligomeru a nárůst katalytické aktivity TK. Fúzí s *BCR* genem se také ztrácí čepičková struktura na N-konci proteinu Abl1, která je důležitá pro negativní regulaci aktivity TK. Hyperaktivovaná Bcr-Abl1 přebírá funkci normální Abl1 a zapojuje se do signálních drah regulujících proliferaci a přežívání buněk. Transformované buňky ztrácejí svou adhezivní schopnost, jsou vyplavovány z kostní dřeně, zvyšují svou proliferaci a inhibují apoptózu (Panjarian *et al.*, 2013).

3.5 Diagnostika CML

Základním vyšetřením, které může předpovědět CML, je krevní obraz a diferenciální rozpočet bílých krvinek. V krevním obraze je patrný zvýšený počet leukocytů (leukocytóza), jejíž hodnota se pohybuje v rozmezí $20-500 \times 10^9 \cdot l^{-1}$. Lze detekovat zvýšený počet krevních destiček (trombocytémie), nebo vzácněji jejich snížený počet (trombocytopenie).

Bývá přítomna mírná až středně těžká anémie. V diferenciálním rozpočtu leukocytů dominují neutrofilní granulocyty, které jsou vyplavovány ve všech vývojových stádiích. Typicky se detekuje eozinofilie a bazofilie. Kostní dřeň má zvýšenou buněčnost a erythropoéza je redukována na úkor granulopoézy (Doubek *et al.*, 2013)

Pro potvrzení diagnózy CML jsou nutná další vyšetření, která zahrnují identifikaci Ph chromosomu a onkogenu *BCR-ABL1*, které jsou typickými markery CML. Pro identifikaci Ph chromosomu se využívají klasické cytogenetické metody. Jednou z nich je G-pruhování, při kterém se tvoří světlé a tmavé pruhy na metafázních chromosomech. Na základě charakteristického pruhování jednotlivých chromosomů se sestavuje karyotyp pacientů, ve kterém se identifikuje přítomnost Ph chromosomu typického pro CML (Testoni *et al.*, 2009).

Fúzní gen *BCR-ABL1* lze také potvrdit molekulárně cytogenetickou metodou fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH). Metoda FISH využívá specifické, fluorescenčně značené DNA sondy, které jsou komplementární k cílové DNA sekvenci genů *BCR* a *ABL1*. Dle pozice jednotlivých fluorescenčních signálů lze odhalit jak geny *BCR* a *ABL1*, tak i fúzní gen *BCR-ABL1* (Testoni *et al.*, 2009).

Pokud je leukemický klon aktivní, je analyzovaný gen *BCR-ABL1* exprimován, a tudíž lze detekovat jeho transkript a výsledný protein. K detekci transkriptu genu *BCR-ABL1* se používá molekulární metoda reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Pro analýzu proteinu se využívají techniky biochemické např. Western blot. Jelikož jsou proteinové analýzy vcelku pracné a chybí jejich validace, nejsou pro rutinní vyšetření pacientů vhodné (Testoni *et al.*, 2009).

Pro pravidelné monitorování stavu pacientů s CML se nejčastěji využívá RT-PCR. Její citlivost dosahuje až 0,0001 % (identifikace 1 leukemické buňky v 10^6 leukocytů), na rozdíl od cytogenetických a proteinových analýz s citlivostí cca 1 % (identifikace 1 leukemické buňky mezi 100 normálních buněk) (Faber *et al.*, 2010). Mezi její výhody patří kromě vysoké citlivosti také přesnost a relativní jednoduchost. V kvalitativní podobě RT-PCR detekuje přítomnost či nepřítomnost transkriptu *BCR-ABL1*. Pro sledování množství transkriptu genu *BCR-ABL1* se využívá kvantitativní RT-PCR. Jelikož je vzorkem periferní krev, lze vyšetření provádět poměrně často, čímž se zvyšuje prognostický význam. Metodu RT-PCR lze aplikovat i v případě selhání cytogenetického vyšetření, protože nevyžaduje k detekci dělicí se buňky. Přes veškeré klady této metody by se v pravidelných intervalech ovšem cytogenetické vyšetření provádět mělo, aby se včasné zachytili nově vznikající přídavné chromosomové aberace (Testoni *et al.*, 2009).

3.6 Léčba CML

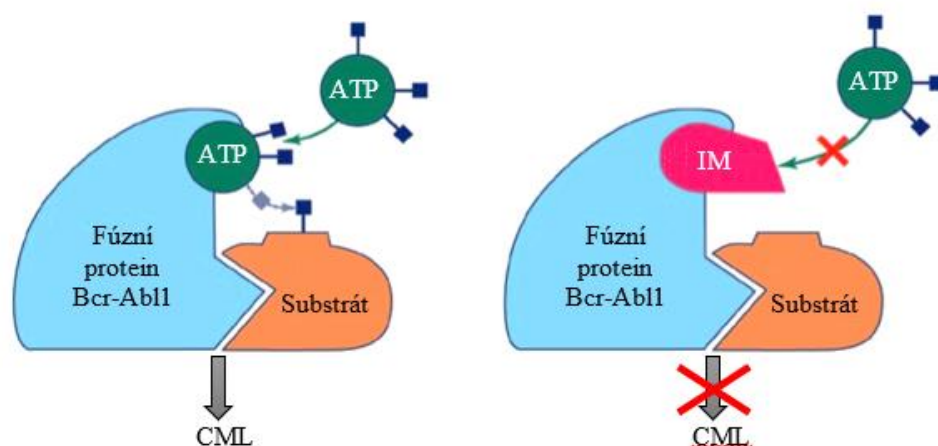
Cílem léčby CML je oddálit nebo zabránit rozvoji blastické fáze či zkvalitnit a prodloužit délku života pacientů. Ještě nedávno se k léčbě používala zejména perorální chemoterapie, léčba interferonem α a v některých případech i transplantace krvetvorných buněk (Doubek *et al.*, 2013).

Jedním z prvních podávaných cytostatik byl busulfan, který dokázal prodloužit střední přežití pacientů až o 45 měsíců (Hehlmann *et al.*, 1994). Z důvodu jeho četných nežádoucích účinků byl nahrazen méně toxickou a dodnes používanou hydroxyureou. Hydroxyurea se dobře vstřebává a má rychlý účinek. Její podávání redukuje symptomatickou leukocytózu či trombocytémii. Užíváním hydroxyurey lze dosáhnout u více než 80 % pacientů kompletní nebo částečné hematologické remise. Nicméně může vyvolat řadu nežádoucích účinků a je prokázána její mutagenita a teratogenita (Goldman, 2010).

Dodnes jediným léčebným postupem, kterým lze zcela uzdravit pacienta z CML, je alogenní transplantace krvetvorných buněk (HSCT) (Faber *et al.*, 2010). Léčba je vhodná pro pacienty mladší 50 let, pro které se nalezne HLA vhodný dárce. Bohužel věkový průměr osob při stanovení diagnózy CML je mnohem vyšší a pohybuje se okolo 55 let. HSCT je také zatížena nezanedbatelným rizikem toxicity a mortality (Goldman, 2010).

Pacienti bez vhodného dárce podstupují léčbu interferonem α , který dokáže prodloužit průměr celkového přežití o 66–89 měsíců. Jeho používáním lze dosáhnout kompletní cytogenetické odpovědi až u 25 % pacientů (Rohoň a Faber, 2013).

Pokrok v terapii byl umožněn až poznáním molekulární podstaty CML, díky kterému byl v roce 2001 zaveden na trh první inhibitor tyrosinové kinázy (TKI) imatinib mesylát (IM). Enzym TK obsahuje aktivní místo pro vazbu ATP a následně katalyzuje přenos terminálního fosfátu na tyrosinová rezidua substrátů a ovlivňuje tím řadu signálních drah. IM se váže blízko nukleotidového vazebného místa bílkoviny Bcr-Abl1, čímž blokuje navázání ATP a udržuje tak Bcr-Abl1 kinázu v neaktivní formě (Obr. 6). Zablokováním Bcr-Abl1 dochází u leukemických buněk k apoptóze. I když IM nezabraňuje vzniku fúzního genu *BCR-ABL1*, cíleně inhibuje jeho účinek na proteinové úrovni. Díky těmto vlastnostem se IM stal lékem první linie u nově diagnostikovaných pacientů s CML (Marcucci *et al.*, 2003).



Obr. 6. Mechanismus působení imatinib mesylátu (IM). Protein Bcr-Abl1 má tyrosin kinázovou aktivitu, kdy přenáší fosfát z ATP na určité substráty, což vede ke vzniku CML fenotypu. IM blokuje navázání ATP a inhibuje enzymatickou aktivitu tyrosin kinázy a transformaci buněk. Upraveno podle Goodman a Gerson, 2013.

Častým problémem při podávání IM je rozvoj rezistence neboli neschopnosti navození či udržení léčebné odpovědi (Rohoň a Faber, 2013). V důsledku rezistencí se vyvinuly další skupiny léčiv nazývané TKI druhé generace (desatinib, nilotinib, ...) a TKI třetí generace (ponatinib) (Jabbour *et al.*, 2011).

Podávání TKI nevede k úplnému odstranění leukemických buněk. V průběhu TKI léčby dochází pouze ke snížení těchto buněk na hladinu, která je nedostatečná k jejich záchytu. Ve většině případů dochází u pacientů ke střídání negativní a pozitivní detekce fúzního transkriptu *BCR-ABL1*. Stabilní a nesnižující se hladina *BCR-ABL1* signalizuje rozvoj rezistence k léčbě (Faber *et al.*, 2010).

3.6.1 Rezistence na TKI

Rezistenci rozlišujeme na primární, při které není vůbec pozorována odpověď na léčbu, a sekundární, kdy ke ztrátě odpovědi dochází v průběhu léčby. Primární rezistence se vyskytuje cca v 5 % případů a může být zapříčiněna faktory ovlivňující farmakokinetiku léčiva. Rozvoj sekundární rezistence lze pozorovat u 16 % pacientů s CML v chronické fázi, u 73 % pacientů v akcelerované fázi a až u 95 % pacientů v blastické fázi (Rohoň a Faber, 2013).

Příčiny vzniku rezistence k IM lze také rozdělit na *BCR-ABL1* závislé (dependentní) a *BCR-ABL1* nezávislé (non-dependentní). Do první skupiny patří amplifikace *BCR-ABL1* genu a tím jeho zvýšená exprese a bodové mutace v *BCR-ABL1* genu. Do druhé skupiny se řadí mnohočetná léková rezistence (MDR), konstitutivní aktivace jiných signálních

drah (např. Src kinázy), přídatné cytogenetické změny a změny v influxu a efluxu buněčných transportérů (Jabbour *et al.*, 2011).

U většiny pacientů je rozvoj rezistence na léčbu spojen s bodovými mutacemi v genu *BCR-ABL1*, které jsou výsledkem genomové nestability při CML. Vznik některých bodových mutací je spojován s užíváním určitého TKI, např. nilotinib generuje mutace v kinázové doméně Bcr-Abl1 v úseku P-smyčky, dasatinib spíše mutace v kontaktních úsecích kinázové domény Bcr-Abl1. Mutace často způsobují konformační změny Bcr-Abl1 kinázy, které mění vazebné místo pro ATP či IM. Vznikají tak různě citlivé až rezistentní buňky vůči podávanému TKI (Tab. 1.), které se mohou v případě pokračování užívání selektovat a expandovat (La Rosée a Deininger, 2010). Přítomnost mutací predikuje ve většině případů progresi onemocnění, a proto by pacienti měli být co nejdříve převedeni na léčbu TKI druhé či třetí generace (Faber *et al.*, 2010).

Tab. 1. Klasifikace sensitivity mutantních buněk k inhibitorům tyrosinových kináz (upraveno podle Rohoň a Faber, 2013)

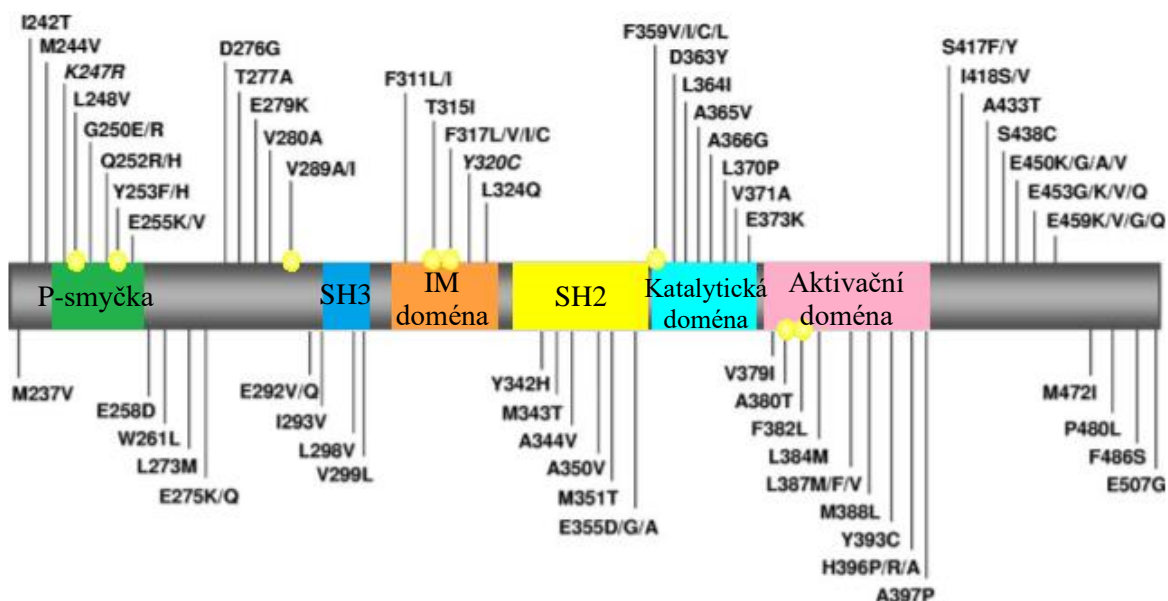
Klasifikace sensitivity	Koncentrace TKI inhibující růst 50 % buněk v <i>in vitro</i> testu (IC ₅₀)		
	Imatinib [nmol·l ⁻¹]	Nilotinib [nmol·l ⁻¹]	Dasatinib [nmol·l ⁻¹]
citlivé	≤ 1000	≤ 50	≤ 3
středně citlivé	≤ 3000	≤ 500	≤ 60
rezistentní	> 3000	> 500	> 60

*IC₅₀ – inhibiční konstanta

3.7 Mutace *BCR-ABL1* genu

Mutace se mohou vyskytovat ve všech oblastech *BCR-ABL1* genu. Nejčastěji jsou za rozvoj rezistence zodpovědné bodové mutace postihující oblast kinázové domény (KD). Její struktura je rozdělená na části, které se označují jako P-smyčka, IM vazebné místo, katalytická doména a aktivační smyčka. (Branford *et al.*, 2003).

I když je v současnosti popsáno víc než 100 mutací, tak pouze část z nich má dopad na klinický projev a rozvoj sekundární rezistence. Typ mutace a její lokalizace má prognostický význam. Nejčastěji se jedná o mutace postihující P-smyčku, aktivační doménu nebo vazebné místo pro IM (Obr. 7; Jabbour *et al.*, 2011).



Obr. 7. Mapa častých aminokyselinových substitucí KD Bcr-Abi1. Struktura KD obsahuje P-smyčku (vazba fosfátu), SH3 a SH2 kontaktní region (vazba s proteiny obsahující SH2 a SH3 domény), IM vazebnou doménu, katalytickou doménu a aktivační doménu. Hvězdy udávají pozice aminokyselin, které se vodíkovou vazbou nebo van der Waalsovými silami podílejí na vazbě imatinibu. Upraveno podle Soverini *et al.*, 2011.

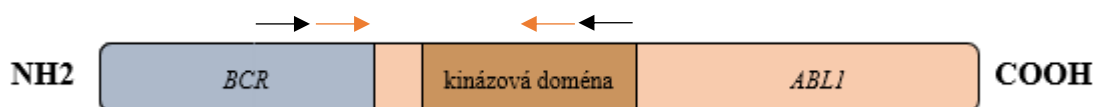
Oblast P-smyčky je velmi konzervativní s vysokým podílem aminokyseliny glycinu a zprostředkovává vazbu s fosfátovou skupinou ATP. Mutace v této oblasti jsou spojeny s horší prognózou. Mutace v IM vazebném místě je spojena s rozvojem léčebné rezistence. V tomto úseku se vyskytuje nejčastější a nejznámější mutace T315I, která označuje substituci aminokyseliny threoninu za izoleucin v pozici 315 aminokyselinového řetězce. Další oblastí je katalytická doména, kdy mutace v této oblasti mohou snižovat její kinázovou aktivitu. Posledním úsekem je aktivační smyčka, která spojuje aminoterminální a karboxyterminální části KD (Rohoň a Faber, 2013).

3.8 Detekce mutací

Obecný postup analýzy mutací začíná izolací mRNA pacienta, která je následně reverzní transkripcí přepsána na komplementární DNA (cDNA). Dalším krokem je dvoustupňová (nested) RT-PCR (Alikian *et al.*, 2011).

První kolo RT-PCR amplifikuje cDNA v úseku celkové kinázové domény (KD) *BCR-ABL1* za použití primerů, které hybridizují k sekvenci genu *BCR* a *ABL1*. Tímto se zabrání amplifikaci KD „normálního“ genu *ABL1*, který není součástí fúzního genu, jehož přítomnost by snižovala citlivost detekce. Ve druhém kole RT-PCR se amplifikují produkty z prvního kola RT-PCR s použitím interních primerů nasedajících k sekvenci genu *BCR* a *ABL1* (Obr. 8;

Faber *et al.*, 2010). Produkty druhého kola RT-PCR se verifikují gelovou elektroforézou, specifický produkt je z gelu vyřezán, purifikován a dále analyzován (Alikian *et al.*, 2011).



Obr. 8. Schéma nasedání primerů při nested RT-PCR pro detekci mutací v kinázové doméně *BCR-ABL1*. Černé šipky značí primery prvního kola nested RT-PCR, které nasedají k sekvenci genu *BCR* a *ABL1*. Oranžové šipky značí primery druhého kola nested RT-PCR, které amplifikují produkt prvního kola. Upraveno podle Jones *et al.*, 2009.

Mutace v kinázové doméně TK lze detekovat mnoha metodami, mezi které patří přímé sekvenování, alelově specifická PCR (ASO-PCR), vysokorozlišovací analýza křivek teploty tání (HRM), denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie (DHPLC), metoda MassArray atd. Jednotlivé metody se mezi sebou liší svou citlivostí, specificitou, možností kvantifikace a schopností detekce známých nebo i nových mutací (Alikian *et al.*, 2011).

Metoda ASO-PCR vyniká svou citlivostí, která umožňuje identifikovat méně než 0,1 % mutovaného transkriptu *BCR-ABL1*. Jelikož tato metoda umožňuje detekovat současně pouze jeden typ mutace, pro klinickou praxi není příliš vhodná (Faber *et al.*, 2010).

Metody DHPLC a HRM slouží k určení přítomnosti mutace a k její lokalizaci v cDNA kinázové doméně, nicméně neurčí přesný typ mutace. Jsou vhodné pro potvrzení výsledků sekvenační analýzy, popř. pro rychlou selekci vzorků s mutacemi pro následnou sekvenační analýzu (Poláková *et al.*, 2008).

Metoda MassArray umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Mezi výhody této technologie patří rychlost, přesnost a především citlivost, která umožňuje dle použitých reagensí detekovat mutaci s frekvencí jen 0,1 % (Agena Bioscience). Ačkoliv význam nízké úrovně mutací zatím nebyl zcela objasněn, je vhodná jejich brzká identifikace, protože mohou naznačovat potřebu úpravy léčebné terapie (Hughes *et al.*, 2006).

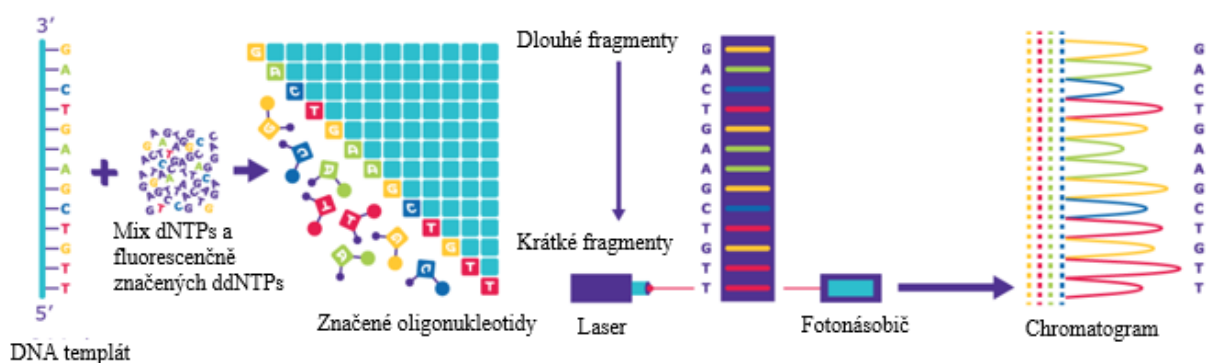
Doporučovanou metodou pro mutační analýzu je Sangerova metoda přímého sekvenování (Soverini *et al.*, 2011) s citlivostí okolo 15–25 %. Mutace, které mají menší než 20% výskyt v transkriptu, se snadno ztrácí a nelze je přímým sekvenováním identifikovat. Tato skutečnost nemusí být nutně nevýhodná, jelikož se zatím neprokázal u velmi nízkých hladin mutací jejich klinický význam (Alikian *et al.*, 2011).

3.8.1 Sangerovo přímé sekvenování

Nejčastěji se pro detekci mutací v KD *BCR-ABL1* využívá dideoxy sekvenování neboli enzymatické Sangerovo sekvenování. Metoda je založena na inhibici enzymové aktivity DNA polymerázy a následné terminaci syntézy DNA (Kircher a Kelso, 2010).

Základem je polymerázová řetězová reakce (PCR), při které se kromě obyčejných deoxynukleotidů (dNTPs) používají i dideoxynukleotidy (ddNTPs). ddNTPs jsou chemickými analogy normálních nukleotidů, které na 3' pozici uhlíku postrádají hydroxylovou skupinu -OH nutnou pro elongaci DNA. Každý ddNTP je označen příslušnou fluorescenční značkou, která po excitaci emituje signál umožňující rozpoznání konkrétní dusíkaté báze. Během PCR reakce DNA polymeráza náhodně začleňuje kromě normálních dNTPs i modifikované nukleotidy, které blokují další navázání nukleotidu, a tím ukončují syntézu DNA. Jelikož je inkorporace ddNTPs náhodná, vznikají různě dlouhé fragmenty DNA, které začínají na 5' konci primeru a vždy končí specifickým fluorescenčně značeným ddNTP (Kircher a Kelso, 2010).

Tyto fragmenty jsou poté na základě své délky separované v elektroforetickém sekvenačním gelu na kapiláře automatického sekvenátoru. Řetězce DNA migrují gelem a prochází před laserovým paprskem, který cílí na konkrétní pozice. Sekvence je čtena elektronicky a je zaznamenána detekčním systémem v podobě křivek konkrétní fluorescenční barvy odpovídající konkrétnímu detekovanému nukleotidu. Pokud je zobrazeno několik barevných křivek současně, jsou v analyzované směsi stejně dlouhé fragmenty zakončené různými nukleotidy. Výsledkem sekvenační analýzy je chromatogram, jehož záznamem je pořadí jednotlivých bází ve zkoumané sekvenci DNA (Obr. 9.; Passarge, 2019).



Obr. 9. Postup automatického Sangerova sekvenování. Upraveno podle <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>, navštíveno 21.3.2020.

3.8.2 MassArray

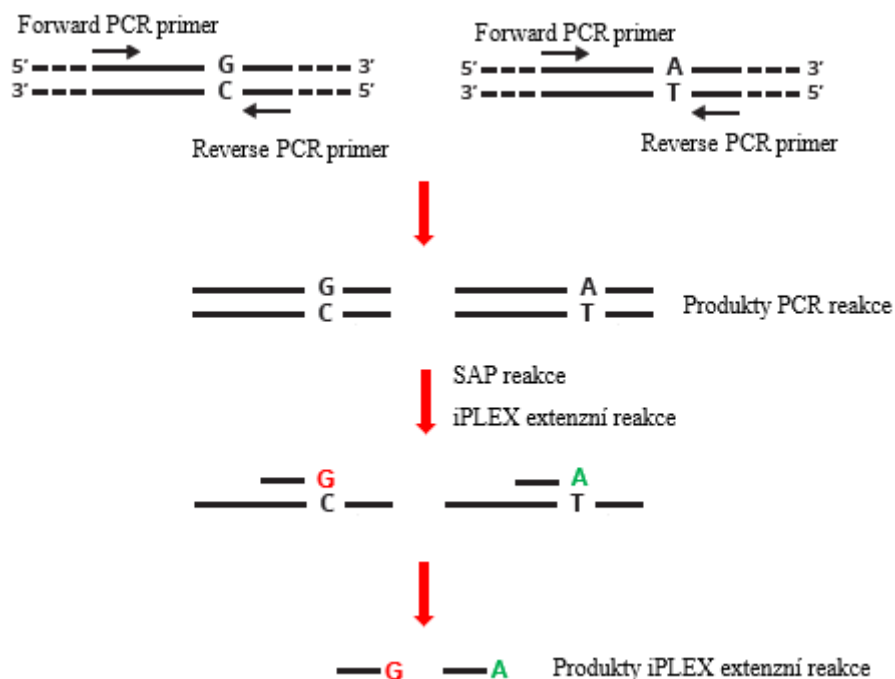
K detekci mutací v kinázové doměně *BCR-ABL1* lze využít i technologii MassArray. Systém MassArray je nefluorescenční detekční platforma, která kombinuje multiplexní primer extenzní reakci s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu). Genetický analyzátor MassArray existuje v 96 jamkovém nebo 384 jamkovém provedení, přičemž v každé jamce lze současně analyzovat až 40 různých bodových mutací kinázové domény *BCR-ABL1* (Gabriel *et al.*, 2009).

Před začátkem MassArray analýzy je potřeba vytvořit specifické PCR a iPLEX extenzní primery pro hledané bodové mutace kinázové domény *BCR-ABL1* pomocí Agena software. Samotná MassArray analýza zahrnuje 4 základní kroky (Gabriel *et al.*, 2009).

Prvním krokem je PCR amplifikace úseku DNA s lokalizovanou bodovou mutací. Následuje SAP reakce, při které enzym shrimp alkalická fosfatáza defosforyluje neinkorporované nukleotidy, které již nemohou prodlužovat vlákno DNA (Gabriel *et al.*, 2009).

Třetí krok zahrnuje iPLEX extenzní reakci, při které specifické extenzní primery hybridizují k amplifikovanému úseku DNA tak, aby končili před detekovaným polymorfním místem. Po přidání extenzního enzymu a mass-modifikovaných ddNTPs se amplifikovaný úsek prodlouží o jednu bázi charakterizující určitou alelu (Obr. 10.). Modifikované ddNTPs slouží jako terminátory elongace, protože postrádají na 3' pozici uhlíku hydroxylovou skupinu -OH, která je nutná pro napojení dalšího nukleotidu (Gabriel *et al.*, 2009). Hmotnost extenzního primeru je předem determinována a označuje analyzovanou sekvenci. Spolu s připojeným

ddNTP získávají produkty iPLEX extenzní reakce specifickou molekulou hmotnost, která umožňuje následné hmotnostně spektrometrické genotypování (Gao *et al.*, 2012).



Obr. 10. Příprava vzorku pro MassArray analýzu. Postup zahrnuje amplifikaci úseku DNA s bodovou mutací, SAP reakci defosforylující neinkorporované dNTPs a iPLEX extenzní reakci se specifickými ddNTPs. Upraveno podle <https://www.labclinics.com/en/snp-genotyping-agenal/>, navštíveno 25.3.2020.

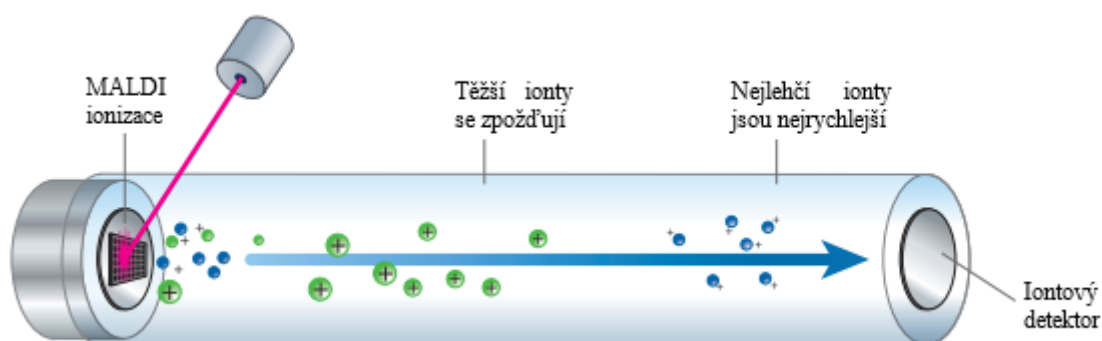
Posledním krokem je spektrometrická analýza MALDI-TOF, která separuje nabitě částice, tzn. DNA ionty, na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). V genetickém analyzátoru MassArray je malé množství předem připravených vzorků automaticky přeneseno z mikrotitrační destičky na SpectroCHIP, kde kokrytalizují s matricí. Jako matrice se používá čistá pryskyřice, která je vzhledem ke vzorku v nadbytku. Poté je SpectroCHIP spolu se vzorky smíchanými s matricí automaticky přenesen do MALDI-TOF analyzátoru, kde podléhají MALDI ionizaci a následné TOF detekci (Gabriel *et al.*, 2009).

MALDI ionizace je dvoustupňový proces, ve kterém jsou krystaly vzorku prvně ozářeny krátkými laserovými pulsy. Energie laserového pulsu je absorbována matricí, čímž dochází k její rychlé desorpci z povrchu SpectroCHIP destičky. Odpařující se matrice s sebou strhává molekuly analytu, které jsou tímto převedeny do plynné fáze. Molekuly analytu se v plynné fázi ionizují přenosem protonu z excitované molekuly matrice. Výsledkem MALDI ionizace

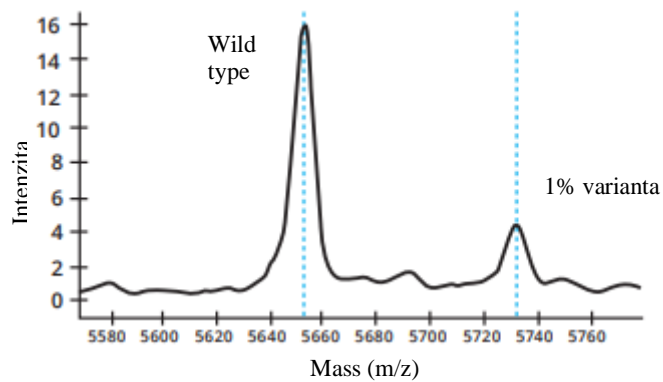
jsou především jednou kladně nabitě pseudomolekulární DNA ionty, které jsou detekovány průletovým hmotnostním analyzátozem TOF (Butler *et al.*, 1996).

Generované DNA ionty jsou urychleny napětím, které je směřuje z iontového zdroje do vakuové letové trubice, na jejímž konci je detektor. Princip TOF analyzátoru spočívá v měření času, který potřebuje daný iont pro překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem neboli doba letu t . Z této hodnoty se poté vyjadřuje měrná hmotnost iontu m/z , přičemž platí, že čím lehčí je analyzovaný DNA iont, tím dříve dorazí na detektor a naopak (Obr. 11.; Gabriel *et al.*, 2009)

Na základě doby letu MassArray systém určuje hmotnost pozorovaných primerů determinujících analyzovanou sekvenci a jejich terminálních ddNTPs, přičemž automaticky generuje daný genotyp (Gao *et al.*, 2012). Výstupem je hmotností spektrum, které zaznamenává závislost relativní intenzity detekovaných pseudomolekulárních DNA iontů na měrné hmotnosti iontů m/z (Obr. 12.; Gabriel *et al.*, 2009)



Obr. 11. MALDI-TOF analýza. Vzorek na SpectroCHIP destičce je ozářen laserem, převeden do plynné fáze a ionizován. Ionty vzorku jsou vedeny do letové trubice s detektorem, který zaznamenává jejich dobu letu t , kterou převádí na měrnou hmotnost iontu m/z . Upraveno podle <https://agenabio.com/wp-content/uploads/2020/03/SYS0034A4-01-MassARRAY-Brochure-EMEA-WEB.pdf>, navštíveno 26.3.2020.



Obr. 12. Ukázka hmotnostního spektra z analýzy MassArray. Na ose x je zaznamenána hodnota měrné hmotnosti iontu m/z , na ose y je zaznamenána intenzita daného iontu. Upraveno podle <https://agenabio.com/wp-content/uploads/2020/03/SYS0034A4-01-MassARRAY-Brochure-EMEA-WEB.pdf>, navštíveno 26.3.2020

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Výchozím materiálem pro analýzu mutací byl vzorek periferní krve nebo kostní dřeň 25 pacientů léčených a sledovaných na Hemato-onkologické klinice FN v Olomouci se zvyšující se hladinou fúzního transkriptu *BCR-ABL1* a s rozvojem rezistence na podávanou léčbu.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 100 bpDNA Ladder (Promega, kat. č. G2101)
- Agaróza I pro DNA elektroforézu (Amresco, kat. č. 0710-500G)
- AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂ (Applied Biosystems, Life technologies, kat. č. N8080243)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mmol·l⁻¹, Promega, kat. č. U1330)
- DEPC voda (Ambion, kat. č. 4387937)
- Etanol (96%, lékárna FNOL)
- Ethidium bromid (10 g·l⁻¹, Top-Bio, kat. č. P047)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Life technologies, kat. č. 4311320)
- Chloroform (Dr. Kulich pharma s.r.o., kat. č. 10000448)
- Nanášecí pufr („LoadingDye“) 6x (Promega, kat. č. G1881)
- Octan sodný, pH 5,5 (3 mol·l⁻¹, lékárna FNOL)
- Parafinový olej (lékárna FNOL)
- Reverzně osmotická a ultračistá voda ze systému Direct-Q 3UV (Millipore)
- Specifické primery (Eastport)
- Specifické primery pro MassArray (KRD)
- TRI reagent (MRC, kat. č. TR 118)
- Trizol (Invitrogen, kat. č. 15596026)

Použité soupravy

- BigDye® Terminátor v1. 1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337450)
- Complete Genotyping Reagent Set 96 (Agena Bioscience, kat. č. 10158)
- High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4387406)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 28706)

Použité roztoky a jejich příprava

Agarózový 1,5% gel

1,5 g agarózy

100 ml 1x TBE pufru

2 μ l ethidium bromidu

10x lyzační pufr pro erytrocyty

41,45 g NH_4Cl

395 g NH_4HCO_3

50 ml 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA pH 8,0 (příprava: 7,44 g rozpustit v 200 ml TK H_2O)

doplnit do 500 ml TK H_2O , pH upravit na 6,5

10x TBE elektroforetický pufr, pH 8,3–8,5

1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris

0,89 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina boritá

0,02 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA

70% Ethanol

73 ml 96% absolutního alkoholu

27 ml reverzně osmotické a ultračisté H_2O

4.3 Seznam použitých přístrojů a spotřebního materiálu

Použité přístroje

- analytická váha FA-2000 (LAB systém)
- automatické pipety (Pipetman®, Gilson France) + špičky s filtrem

- centrifuga 5430 R (Eppendorf)
- centrifuga Biofuge 22R (Heraeus, Německo)
- dokumentační systém AlphaDigiDoc™RT2 (Alpha Innotech)
- elektroforéza horizontální MSMIDI (Clever Scientific Ltd)
- genetický analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)
- lednička s mrazícím boxem -20 °C (Liebherr)
- MassARRAY System with Chip Prep Module, 96 Genotyping (Agena Bioscience)
- mikrovlnná trouba 1195 (ETA) - mrazící boxy -80 °C (SANYO, Japonsko)
- program Chromas Version 2.6.2. (Technelysium Pty Ltd, Austrálie)
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- stolní minicentrifuga C 1301 (Labnet)
- transiluminátor 312 nm (VILBER LOURMAT)
- výrobce ledu Icematic F100 Compact (CASTELMAC Spa, Itálie)
- zařízení na úpravu vody Direct-Q 3UV (Millipore)
- zdroj k napětí ELFO ST 304 (Apelex)
- termoblok (BioSan, Litva)
- Thermocycler peqSTAR 2x Gradient (PEQLAB-Life Science, Německo)
- vortex CERTOMAT ® MV (B. Braun Biotech International)

Použitý spotřební materiál

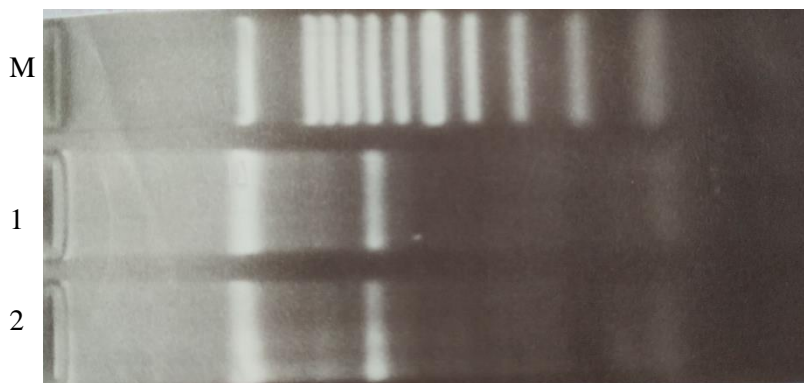
- laboratorní sklo (Erlanmayerovy baňky, odměrné válce; SIMAX, Česká republika)
- latexové ochranné rukavice
- materiál potřebný pro provoz genetického analyzátoru ABI PRISM 3100 a provedení sekvenční analýzy (Applied Biosystems)
- mikrozkušavky (1,5ml; SARSTEDT, Německo)
- PCR mikrozkušavky (0,2ml; Applied Biosystems)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

Periferní krev nebo kostní dřev pacientů byla inkubována s lyzačním pufrem. Izolace RNA byla provedena guanidin thiokyanát-fenol-chloroformovou extrakcí (Chomzynski, 1987) neboli činidlem známým pod komerčním názvem jako TRI reagent. Nanodropem byla stanovena koncentrace a čistota vyizolované RNA. Kvalita RNA byla verifikována elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu (Obr. 13.).

1. Objem periferní krve nebo kostní dřevě pacienta ve falkoně doplnit do 50 ml lyzačním pufrem a inkubovat v lednici 15 min. Lyzát centrifugovat 5 min při 3 500 g, supernatant odstranit a pelet resuspendovat v 15 ml lyzačního pufru. Centrifugovat za stejných podmínek a odstranit supernatant.
2. Pelet přenést do 1,5ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem a v digestoři přidat 1 ml TRIZOL. K rozpuštěnému peletu přidat 200 μ l chloroformu, 1 min vortexovat a nechat vzorek stát 3 min při laboratorní teplotě.
3. Centrifugovat 15 min při 14 000 g při 4 °C. Cca 2/3 supernatantu převést do čisté 1,5ml zkumavky s 500 μ l izopropanolu a nechat 5 min precipitovat.
4. Centrifugovat 15 min při 14 000 g při 4 °C. Supernatant odstranit a přidat k peletu 1 ml 75% ethanolu ředěného s DEPC H₂O. Centrifugovat za stejných podmínek, odstranit supernatant a přidat 1 ml 75% ethanolu ředěného s DEPC H₂O. Centrifugovat 5 min při 14 000 g, odstranit supernatant a pelet usušit.
5. Pelet resuspendovat v 15 μ l DEPC H₂O při 65 °C 10 min v termobloku. Nanodropem stanovit koncentraci a čistotu vyizolované RNA. Ověřit kvalitu RNA elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu.
6. Připravit 1,5% agarózový gel v 1x koncentrovaném TBE pufru (1,5 g agarózy, 100 ml 1x TBE pufru). Po rozvaření agarózy přidat 2 μ l ethidium bromidu (10 g·l⁻¹), nalít do vaničky s hřebínkem a nechat ztuhnout.
7. Elektroforetickou komůrku s vaničkou se ztuhlým gelem převrstvit 1x TBE pufrem, do jamek gelu nanést 2 μ l izolované RNA smísené s 1 μ l 6x nanášecího pufru a 1,8 μ l formamidu, do další jamky nanést 1 μ l 100 bp DNA Ladder (0,13 g·l⁻¹). Separovat při 80 V po dobu 40 min. Ověřit produkty separace pod UV lampou.



Obr. 13. Detekce izolované totální RNA (s typickým profilem hlavních RNA podjednotek; „smear“ představuje mRNA) na 1,5% agarózovém gelu. Dráha M obsahuje 1 μ l 100 bp standardu molekulové hmotnosti (Promega). Dráhy 1 a 2 obsahují 2 μ l izolované RNA pacienta č. 1 a 2 (Tab. 11.) s 1 μ l 6x nanášecího pufru a 1,8 μ l formamidu.

4.4.2 Přepis RNA na cDNA

Vyizolovaná RNA byla přepsána do molekuly komplementární DNA (cDNA) reverzní transkripcí (RT). Pro kontrolu správné syntézy cDNA byla provedena PCR reakce s následnou elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu (Obr. 14.).

1. Dle Tab. 2. připravit RT reakční směs pro přepis RNA na cDNA. Dle koncentrace izolované RNA stanovit pipetovaný objem RNA (1,2 μ g). Součet objemů TK-H₂O a RNA se rovná 9 μ l. Celkový reakční objem činil 20 μ l. Inkubovat 1 hod při 37 °C, následně inkubovat 5 min při 95 °C pro inaktivaci zbytkové aktivity enzymu reverzní transkriptázy.

Tab. 2. Složení RT reakční směsi pro přepis RNA do cDNA

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]	
AB RT-Buffer (2x)	10	
TK-H ₂ O	a	a + b = 9
Izolovaná RNA	b	
RT-Enzym mix (20x)	1	

2. Dle Tab. 3. připravit PCR reakční směs pro kontrolu správného provedení reverzní transkripce a přidat 1 μ l cDNA produktu z předchozí reakce, zkumavku zakápnout parafínovým olejem. Celkový objem reakce činil 25 μ l.

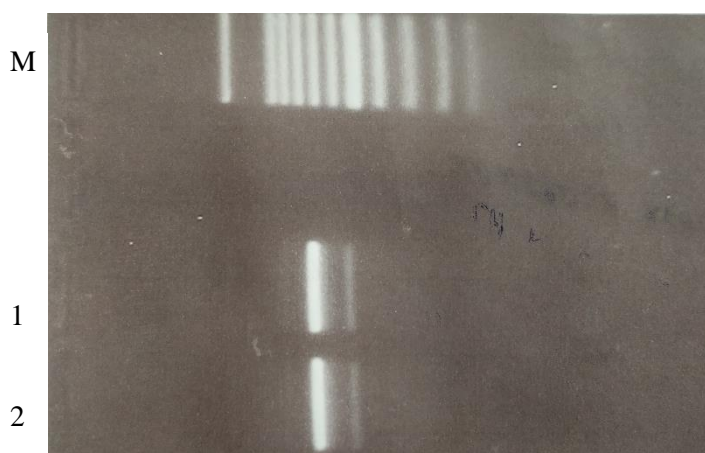
Tab. 3. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genu *ABL1*

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
TK-H ₂ O	20,0
Buffer (10x; Applied Biosystems)	2,5
MgCl ₂ (25 mmol·l ⁻¹ ; Applied Biosystems)	2,0
dNTPs mix (10 mmol·l ⁻¹ ; Promega)	0,5
Primery ABL1 F a R (0,1 mmol·l ⁻¹)	0,2
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ l; Applied Biosystems)	0,1
cDNA	1,0

Teplotní profil PCR reakce

- Počáteční denaturace: 95 °C, 7 min
 - Denaturace: 95 °C, 35 s
 - Hybridizace primerů: 56 °C, 40 s
 - Prodlužování primerů: 72 °C, 45 s
 - Finální extension: 72 °C, 7 min
- } 35 cyklů

3. PCR produkt detekovat elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu. Připravit 1,5% agarózový gel (viz Izolace RNA), do jamek gelu nanést 10 μ l PCR produktu smíšeného s 2 μ l 6x nanášecího pufu, do další jamky nanést 1 μ l 100 bp DNA Ladder (0,13 g·l⁻¹). Separovat při 80 V po dobu 40 min. Ověřit produkty separace pod UV lampou.



Obr. 14. Detekce genu *ABL1* na 1,5% agarózovém gelu. Dráha M obsahuje 1 μ l 100 bp standardu molekulové hmotnosti (Promega). Dráha 1 a 2 obsahuje 10 μ l PCR produktu pacienta č. 1 a č. 2 s 2 μ l 6x nanášecího pufu (Tab. 11.).

4.4.3 Nested RT-PCR

Pro amplifikaci genu *BCR-ABL1* byla použita metoda dvoukolové (nested) RT-PCR. První i druhé kolo RT-PCR amplifikuje *BCR-ABL1* gen za využití externích a interních primerů hybridizujících k sekvenci genu *BCR* (F primery) a *ABL1* (R primery).

1. Dle Tab. 4. připravit reakční směs pro první kolo RT-PCR a přidat 2 μl cDNA. Zkumavku zakápnout parafínovým olejem. Celkový reakční objem činil 50 μl (48+2).

Tab. 4. Složení reakční směsi prvního kola RT-PCR pro amplifikaci *BCR-ABL1*

Reagencie	Objem na 1 reakci [μl]
Deionizovaná H_2O	37,0
Pufr II (10x; Applied Biosystems)	5,0
MgCl_2 (25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; Applied Biosystems)	4,0
dNTPs mix ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; Promega)	1,0
Primer B/A F1 (0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,4
Primer B/A R1 (0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,4
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μl ; Applied Biosystems)	0,4
cDNA	2,0

Teplotní profil RT-PCR reakce prvního kola

- Počáteční denaturace: 95 °C, 7 min
 - Denaturace: 95 °C, 1 min
 - Hybridizace primerů: 50 °C, 1 min
 - Prodlužování primerů: 72 °C, 3 min
 - Finální extension: 72 °C, 10 min
- } 35 cyklů

Sekvence primerů prvního kola

Primer B/A F1 5' - GCT ACG GAG AGG CTG AAG AAG - 3'

Primer B/A R1 5' - GCT CGC ATG AGT TCA TAG ACC - 3'

2. Dle Tab. 5. připravit reakční směs pro druhé kolo RT-PCR a přidat 1 μl produktu prvního kola RT-PCR. Zkumavku zakápnout parafínovým olejem. Celkový reakční objem činil 50 μl (49+1).

Tab. 5. Složení reakční směsi druhého kola RT-PCR pro amplifikaci KD *ABL1*

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
Deionizovaná H ₂ O	38,0
Pufr II (10x; Applied Biosystems,)	5,0
MgCl ₂ (25 mmol·l ⁻¹ ; Applied Biosystems,)	4,0
dNTPs mix (10 mmol·l ⁻¹ ; Promega)	1,0
Primer B/A F1 (0,1 mmol·l ⁻¹)	0,4
Primer B/A R1 (0,1 mmol·l ⁻¹)	0,4
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ μ l; Applied Biosystems)	0,4
Produkt prvního kola RT-PCR	1,0

Teplotní profil RT-PCR reakce druhého kola

- Počáteční denaturace: 95 °C, 7 min
 - Denaturace: 95 °C, 1 min
 - Hybridizace primerů: 57 °C, 1 min
 - Prodlužování primerů: 72 °C, 3 min
 - Finální extension: 72 °C, 10 min
- } 35 cyklů

Sekvence primerů druhého kola

Primer B/A F2 5' - CAG ATG CTG ACC AAC TCG TGT - 3'

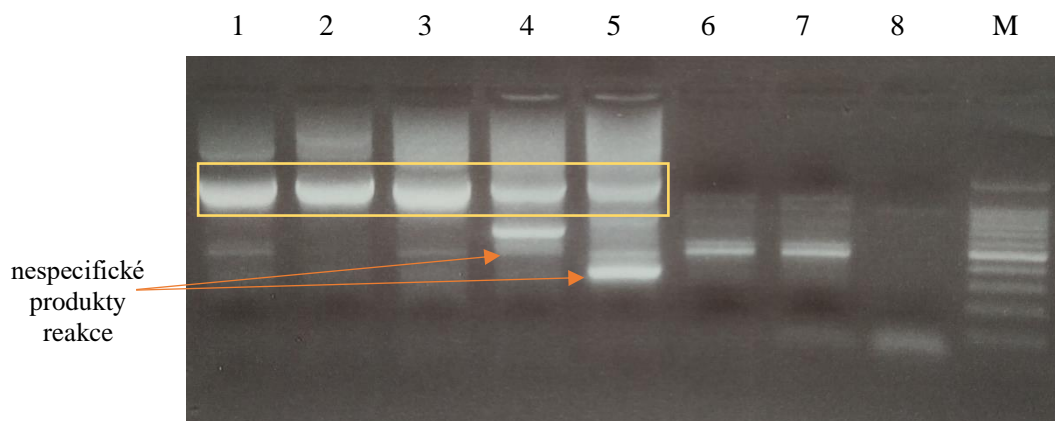
Primer B/A R2 5' - CTT CTC TAG CAG CTC ATA CAC C - 3'

4.4.4 Elektroforetická separace a purifikace produktu

Amplifikační produkt nested RT-PCR fúzního genu *BCR-ABL1* byl detekován elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu (Obr. 15.). Pod UV lampou byl z agarózového gelu vyřezán specifický PCR produkt o relativní molekulové hmotnosti cca 1 200 bp. Tento produkt byl následně purifikován pomocí QIAquick Gel Extraction Kit dle protokolu doporučeného výrobcem (QIAGEN).

1. Připravit 1,5% agarózový gel (2,25 g agarózy, 150 ml 1x TBE) obarvený 2 μ l ethidium bromidem (10 g·l⁻¹). Do jamek v gelu nanést 40 μ l produktu druhého kola nested RT-PCR předem smíšeného s 6 μ l 6x nanášecího pufru, do další jamky nanést 8 μ l 100 bp DNA Ladder (0,13 g·l⁻¹). Separovat cca 1 hod při 100 V.
2. Pod UV lampou vyříznout z gelu sterilním skalpelem separovaný produkt o velikosti cca 1 200 bp a umístit jej do 1,5ml mikrozkušavky. Do mikrozkušavky přidat 600 μ l QG pufru a inkubovat v termobloku při 50 °C do rozpuštění gelu.

3. Celý objem mikrozkušavky přenést na kolonku, která je umístěná v záchytné mikrozkušavce, a centrifugovat 1 min při 13 000 g. Vylít obsah záchytné zkumavky.
4. Do kolonky přidat 500 µl QG pufru, centrifugovat 1 min při 13 000 g. Vylít obsah záchytné zkumavky.
5. Na kolonku přidat 750 µl PE pufru, centrifugovat 1 min při 13 000 g. Vylít obsah sběrné zkumavky. Centrifugovat kolonku 2 min při 13 000 g.
6. Kolonku přenést do čisté 1,5ml mikrozkušavky a na její membránu přidat 40 µl EB pufru. Nechat stát 1 min při laboratorní teplotě. Centrifugovat 2 min při 13 000 g. Eluovaná DNA (obsahuje specifický RT-PCR produkt) byla použita pro sekvenační analýzu a analýzu MassArray.



Obr. 15. Detekce amplifikovaného fúzního genu *BCR-ABL1* na 1,5% agarózovém gelu. Dráha M obsahuje standard molekulové hmotnosti 100 bp (Promega). Rámeček ukazuje produkty druhého kola RT-PCR o cca 1200 bp pacientů 21–25 (Tab. 11.). Dráha 4 a 5 obsahuje navíc nescifické produkty reakce. Z důvodu nízké hladiny transkriptu *BCR-ABL1* u jednoho pacienta se fúzní gen dostatečně nepodařilo amplifikovat, proto v dráhách 6 a 7 nebyl detekován specifický produkt. Dráha 8 představuje negativní kontrolu.

4.4.5 Sekvenační analýza kinázové domény *BCR-ABL1* genu

Eluovaná DNA byla podrobena sekvenační analýze, ve které se využívaly 4 primery amplifikující úseky KD genu *BCR-ABL1*. Produkty sekvenační reakce byly po purifikaci analyzovány genetickým analyzátozem ABI PRISM 3100 a hodnoceny programem Chromas Version 2.6.2.

1. Dle Tab. 6. připravit sekvenační reakční směs a přidat 2 µl eluované DNA. Celkový reakční objem činil 10 µl.

Tab. 6. Složení reakční směsi pro sekvenační analýzu

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
Deionizovaná H ₂ O	4,0
Big Dye Terminátor v 1.1 kit	2,0
Sekvenační pufr (5x)	1,0
Sekvenační primer 1, 2, 3, 4 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1,0
Purifikovaný produkt RT-PCR	2,0

Teplotní profil sekvenační reakce

- Počáteční denaturace: 95 °C, 5 min
 - Denaturace: 95 °C, 30 s
 - Hybridizace primerů: 53 °C, 15 s
 - Prodlužování primerů: 60 °C, 4 min
- } 28 cyklů

Sekvence primerů pro sekvenování

SEQ Abl 1 (R) 5' - GTT CTC CCC TAC CAG GCA G - 3'

SEQ Abl 2 (F) 5' - AGA GAT CAA ACA CCC TAA CCT - 3'

SEQ Abl 3 (F) 5' - TGG TTC ATC ATC ATT CAA CGG - 3'

SEQ Abl 4 (R) 5' - GGA CAT GCC ATA GGT AGC A - 3'

2. PCR směs přenést do nové 1,5ml zkumavky, přidat 1 μ l octanu sodného ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 5,5) a 25 μ l 96% ethanolu. Precipitovat 10 min při -80 °C.
3. Centrifugovat 10 min při 16 500 g při 4 °C. Odstranit supernatant, k peletu přidat 50 μ l chlazeného 70% ethanolu (-20 °C) a opět centrifugovat.
4. Odstranit supernatant a pelet sušit ve tmě. Pelet rozpustit ve 20 μ l deionizovaného formamidu. Produkt přenést do jamek sekvenační destičky, denaturovat 5 min při 95 °C, prudce ochladit na ledu, přenést do sekvenátoru a provést sekvenační analýzu.

4.4.6 MassArray analýza mutací v *BCR-ABL1* genu

Před samotnou MassArray analýzou byly firmou Agena Bioscience nadesignované a nasynthetizované specifické PCR a iPLEX extenzní primery pro 18 určených a častých mutací v KD genu *BCR-ABL1*. Tyto primery byly rozděleny do 8 skupin (plexů) tak, aby nedocházelo k jejich nespecifické hybridizaci a falešně pozitivním výsledkům.

Příprava vzorků zahrnovala PCR amplifikaci úseku DNA s hledanou bodovou mutací, SAP reakci (shrimp alkalická fosfatáza) a iPLEX extenzní reakci charakterizující určitou bodovou mutací. Mikrotitrační destička s takto připravenými vzorky byla vložena spolu se SpectroCHIP do genetického analyzátoru MassArray, kde proběhla samotná analýza.

1. Připravit 8 PCR primer mixů o koncentraci $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ obsahujících příslušné „forward“ a „reverse“ primery, které odpovídají analyzovaným plexům. Připravit 8 mixů iPLEX extenzních primerů o koncentraci 7; 9,3; 11,6; $14 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dle jejich molekulové hmotnosti (Tab. 7.). Naředit vzorek eluované DNA na koncentraci $5 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 7. Amplifikační a extenzní primery detekovaných mutací KD genu *BCR-ABL1*

iPLEX	Mutace	Sekvence amplifikačních primerů 5'-3'	Sekvence extenzních primerů 5'-3'
1	E255V	F - CATCACCATGAAGCACAAGC R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	GGGGCCAGTACGGGG
	M351V	F - TACATGGCCACTCAGATCTC R - CCCTACCTGTGGATGAAGTT	CTTCTCCAGGTACTIONCA
	T315A	F - CAAACACCCTAACCTGGTGC R - TCAGGTAGTCCAGGAGGTTT	CGTAGGTCATGAACCTCAG
2	Y253H	F - CATCACCATGAAGCACAAGC R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	CGTACACCTCCCCGT
	M351T	F - TACATGGCCACTCAGATCTC R - CCCTACCTGTGGATGAAGTT	AGATCTCGTCAGCCA
	T315I	F - CAAACACCCTAACCTGGTGC R - TCAGGTAGTCCAGGAGGTTT	CCCCGTTCTATATCATCA
3	G250E	F - CATCACCATGAAGCACAAGC R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	TCCCCGTACTGGCCC
	F359I/L/V	F - ACATGGCCACTCAGATCTCG R - GTTTCGGGCAGCAAGATCTC	GTACCTGGAGAAGAAAAAC
	F317I/L/V	F - AGCCCCCGTTCTATATCATC R - TTGCACTCCCTCAGGTAGTC	CCGTTCTATATCATCACTGAG
4	Y253F	F - CATCACCATGAAGCACAAGC R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	TCGTACACCTCCCCG
	F317L/L	F - AGCCCCCGTTCTATATCATC R - TTGCACTCCCTCAGGTAGTC	GAGGTTCCCGTAGGTCAT
5	Q252H/H	F - CATCACCATGAAGCACAAGC R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	GTACACCTCCCCGTA
	F311L	F - ACGTGTTGAAGTCCTCGTTG R - TTCCCGTAGGTCATGAACTC	TGAACTCAGTGATGATATAGA
6	M244V	F - ACTACGACAAGTGGGAGATG R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	CCAGCTTGTGCTTCA
	F317C	F - AGCCCCCGTTCTATATCATC R - TTGCACTCCCTCAGGTAGTC	GTTCCCGTAGGTCATG
7	E255K	F - CATCACCATGAAGCACAAGC R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	CGCCCTCGTACACCT

iPLEX	Mutace	Sekvence amplifikačních primerů 5' - 3'	Sekvence extenzních primerů 5' - 3'
	H369R	F - ATTTTGGCCTGAGCAGGTTG R - GGTGCAGTCCATTTGATGGG	GGAACCTGGCTCCAGCA
8	L248V	F - ACTACGACAAGTGGGAGATG R - GGCTGTATTTCTTCCACACG	CACCATGAAGCACAAG

*na 5' konci amplifikačního primeru je přidána specifická Agena sekvence ACGTTGGATG

- Dle Tab. 8. připravit 8 PCR reakčních směsí lišících se v pipetovaných primer mixech. PCR reakční směsi rozpipetovat po 5 μ l do příslušných jamek v mikrotitrační destičce. Destičku zalepit, lehce zcentrifugovat a provést amplifikační reakci.

Tab. 8. Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci úseků KD genu *BCR-ABL1*

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
H ₂ O (HPLC)	0,8
Buffer (10x; Agena Bioscience)	0,5
MgCl ₂ (25 mmol·l ⁻¹ ; Agena Bioscience)	0,4
dNTPs mix (25 mmol·l ⁻¹ ; Agena Bioscience)	0,1
Primer mix 1–8 (0,5 μ mol·l ⁻¹)	1,0
HotStartTaq polymeráza (5U/ μ l; Agena Bioscience)	0,2
cDNA (5 mg·l ⁻¹)	2,0

Teplotní profil PCR reakce

- Počáteční denaturace: 95 °C, 2 min
 - Denaturace: 95 °C, 30 s
 - Hybridizace primerů: 56 °C, 30 s
 - Prodlužování primerů: 72 °C, 1 min
 - Finální extension: 72 °C, 5 min
- } 45 cyklů

- Dle Tab. 9. připravit v 1,5ml zkumavce SAP reakční směs. Přidat ke vzorkům v mikrotitrační destičce 2 μ l SAP mixu. Celkový objem po adici činil 7 μ l. Zalepit mikrotitrační destičku, lehce zcentrifugovat a inkubovat v termocycléru dle následujících podmínek: 40 min při 37 °C, 5 min při 85 °C. Vzorek uchovávat při 4 °C.

Tab. 9. Složení SAP reakční směsi

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
H ₂ O (HPLC)	1,53
TS buffer (10x; Agena Bioscience)	0,17
SAP enzym (1,7 U/ μ l; Agena Bioscience)	0,30

4. Dle Tab. 10. připravit v 1,5 ml zkumavce 8 iPLEX reakčních směsí lišících se v mixech extenzních primerů. Přidat 2 μl iPLEX mixu ke vzorkům v mikrotitrační destičce. Celkový objem reakce po adici činil 9 μl . Zalepit mikrotitrační destičku, lehce zcentrifugovat a provést extenzní reakci.

Tab. 10. Složení iPLEX extenzní reakční směsi

Reagencie	Objem na 1 reakci [μl]
H ₂ O (HPLC)	0,619
iPLEX buffer (10x; Agena Bioscience)	0,200
iPLEX termination mix (Agena Bioscience)	0,200
Primer mix (7; 9,3; 11,6; 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,940
iPLEX enzym (Agena Bioscience)	0,041

Teplotní profil iPLEX extenzní reakce

- Počáteční denaturace: 94 °C, 30 s
 - Denaturace: 94 °C, 5 s
 - Hybridizace primerů: 52 °C, 5 s
 - Prodlužování primerů: 80 °C, 5 s
 - Finální extension: 72 °C, 3 min
- } 5 cyklů } 45 cyklů

5. Přidat ke vzorkům v mikrotitrační destičce 30 μl H₂O (HPLC) a lehce zcentrifugovat. Vložit mikrotitrační destičku se vzorky spolu se SpectroCHIP destičkou do MassArray analyzátoru a provést MALDI-TOF analýzu.

5 Výsledky

Na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci bylo od září 2019 do července 2020 vyšetřeno 25 pacientů s diagnostikovanou CML, kteří byli léčeni v období od roku 2010 do roku 2020, a u kterých se projevila rezistence na podávané léčivo. Soubor pacientů čítal 8 mužů (32 %) a 17 žen (68 %), přičemž jejich věkový medián činil 65 let.

Z periferní krve, popř. kostní dřeně pacientů byla izolovaná celková RNA, která se reverzní transkripcí přepsala do cDNA. Po amplifikaci genu *BCR-ABL1* metodou nested RT-PCR, následné elektroforetické separaci a purifikaci byl vzorek sekvenován Sangerovým přímým sekvenováním a podroben MassArray analýze. Metodami byly detekovány bodové mutace v kinázové doméně *BCR-ABL1*, které by mohly zapříčinit rezistenci pacienta na léčbu.

Z celkového souboru pacientů byly bodové mutace v kinázové doméně *BCR-ABL1* potvrzeny u 7 pacientů (Tab. 11.). Detekované mutace se nejčastěji nacházely v oblasti P-smyčky (L248V, G250E, Y253H, E255K) nebo v oblasti vazebného místa pro léčivo imatinib mesylát (T315I, F317L). Detekovány byly také bodové mutace v oblasti SH2 kontaktu (M351T), v oblasti katalytické domény (F359V) a na N-konci kinázové domény Bcr-Abl1 (M244V).

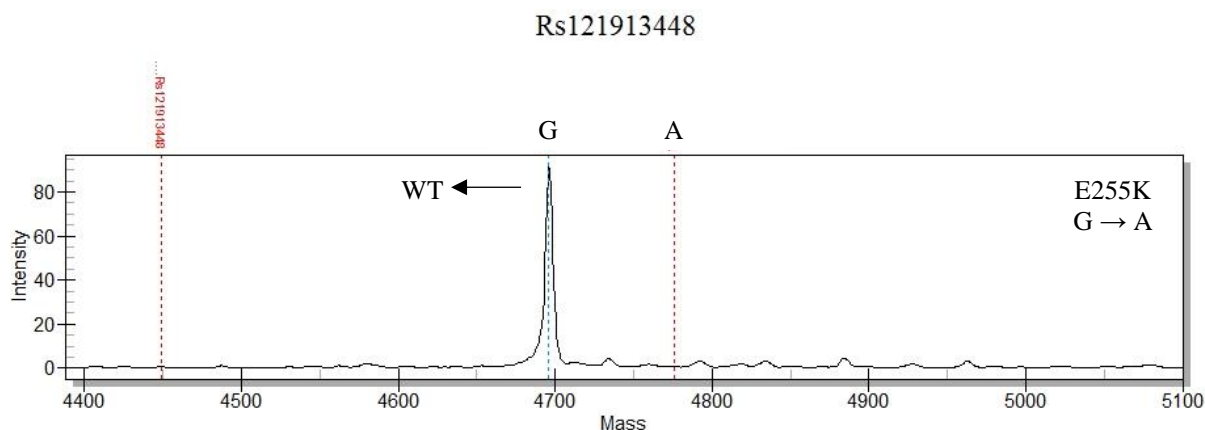
Tab. 11. Přehled zjištěných mutací v KD genu *BCR-ABL1* Sangerovým sekvenováním a MassArray metodou

Pacient	Pohlaví / věk	Mutace v KD genu <i>BCR-ABL1</i>	
		Sangerovo sekvenování	MassArray metoda
1	Ž / 82	-	-
2	Ž / 82	-	-
3	Ž / 48	-	-
4	Ž / 41	-	-
5	Ž / 72	-	-
6	Ž / 48	-	-
7	M / 75	T315I	T315I
8	Ž / 53	T315I, Y253H	T315I, Y253H
9	Ž / 65	F359V	F359V
10	Ž / 77	-	-
11	Ž / 80	-	-
12	M / 82	-	-
13	Ž / 55	-	-
14	M / 65	-	-
15	M / 73	-	-
16	Ž / 84	-	-
17	Ž / 89	-	-
18	Ž / 62	-	-

Pacient	Pohlaví / věk	Mutace v KD genu <i>BCR-ABL1</i>	
		Sangerovo sekvenování	MassArray metoda
19	Ž / 15	-	-
20	M / 82	-	-
21	M / 82	-	-
22	Ž / 60	L248V	L248V
23	M / 69	Y253H, M244V	Y253H, G250E , M244V
24	Ž / 69	M351T, F317L	M351T, F317L
25	M / 31	T315I, E255K	T315I, E255K

Legenda: M = muž, Ž = žena

Mutace v oblasti KD genu *BCR-ABL1* nebyly Sangerovým sekvenováním a metodou MassArray detekovány u pacientů 1–6 a pacientů 10–21. Hmotnostní spektrum těchto pacientů zobrazovalo pouze wild type alely. Příklad nepřítomné mutace zobrazuje Obr. 16., který zachycuje negativní MassArray detekci mutace E255K u pacienta č. 1. Tato mutace vzniká v důsledku nukleotidové substituce guaninu za adenin, která mění aminokyselinu glutamát na lysin v pozici 255 aminokyselinového řetězce Bcr-Abl1.

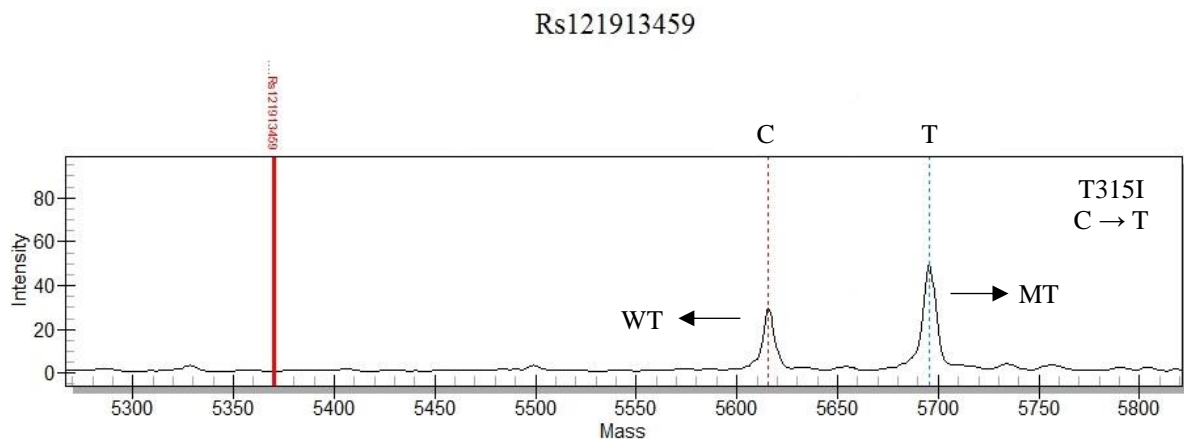


Obr. 16. Negativní výsledek MassArray analýzy mutace E255K u pacienta č. 1. Nukleotidové substituce guaninu za adenin zapříčiňující aminokyselinovou substituci glutamátu za lysin v pozici 255 aminokyselinového řetězce Bcr-Abl1 nebyla u pacienta č. 1 detekována.

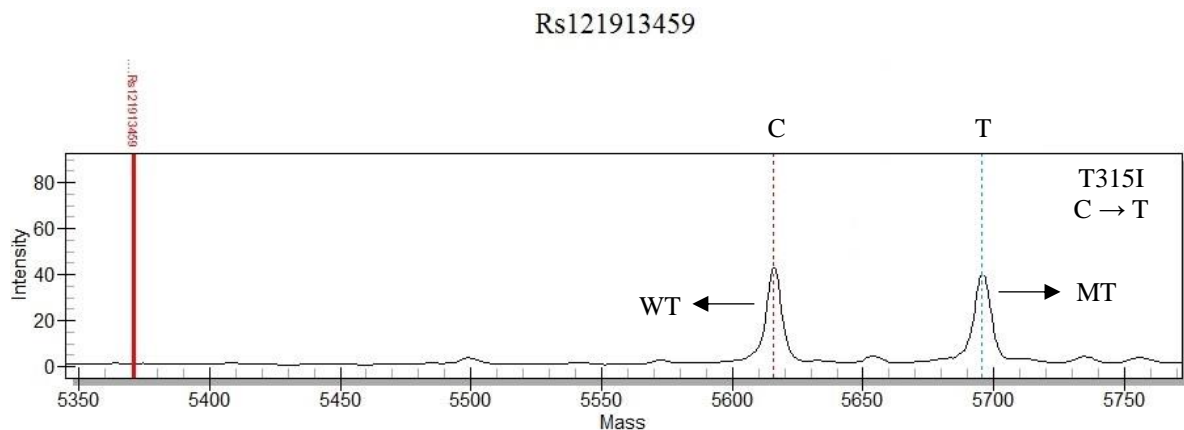
Sangerova metoda z 9 typů mutací odhalila 8, kdy frekvence mutantní alely G250E nebyla dostatečná pro záchyt (Obr. 33.). Metoda MassArray detekovala všechny mutace, včetně G250E (Obr. 32.), přičemž díky lepší citlivosti umožnila v některých případech lépe charakterizovat procentuální zastoupení wild type a mutantní alely (např. Obr. 40.).

U pacienta č. 7 byla potvrzena přítomnost mutantní alely T315I, která vykazovala 60% zastoupení vůči wild type alele T315 (Obr. 17). Od pacienta č. 8 byly analyzovány 3 vzorky, které byly odebrány v květnu 2019, v srpnu 2019 a v únoru 2020. U pacienta byly detekovány

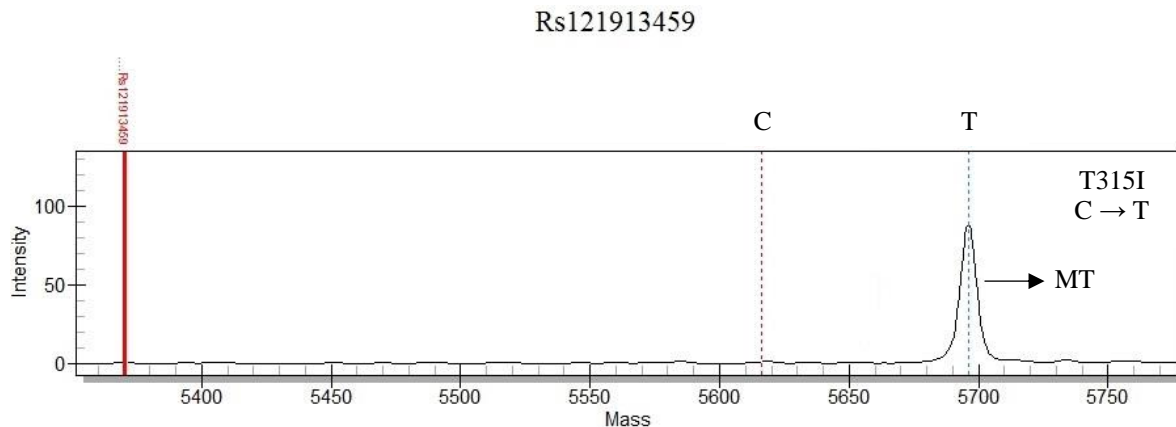
mutace T315I a Y253H. V květnu 2019 byla mutantní alela T315I vůči wild type alele v 50% zastoupení (Obr. 18.) a mutantní alela Y253H vůči wild type alele v 30% zastoupení (Obr. 23.). Vzorek odebraný v srpnu odhalil relaps choroby, kdy wild type alela T315 již nebyla detekována (Obr. 19.) a frekvence mutantní Y253H alely se zvýšila na 40 % (Obr. 24.). V únorovém vzorku wild type alela T315 taktéž nebyla detekována (Obr. 20.) a frekvence mutantní Y253H alely dosahovala 45 % (Obr. 25.).



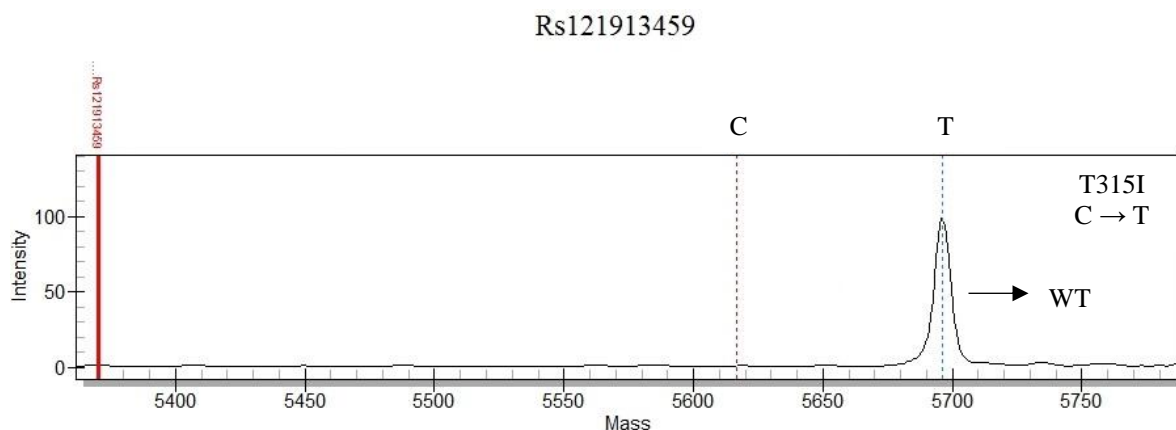
Obr. 17. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 7. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin je cca v 60 % zastoupení.



Obr. 18. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 8 (květen 2019). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin je vůči wild type alele bez substituce v přibližně stejném zastoupení.

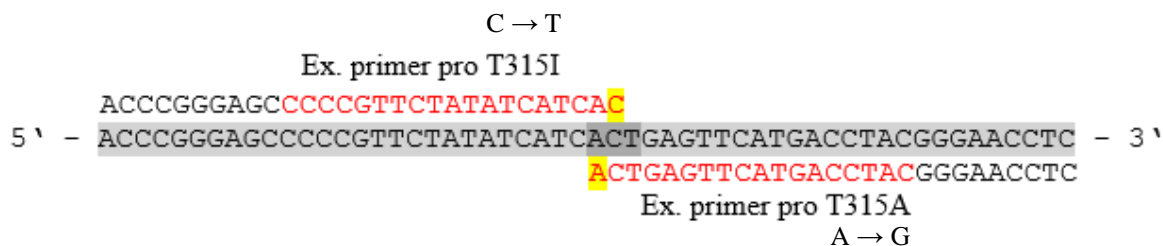


Obr. 19. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 8 (srpen 2019). Wild type alela nebyla detekována. Přítomná je pouze mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin.

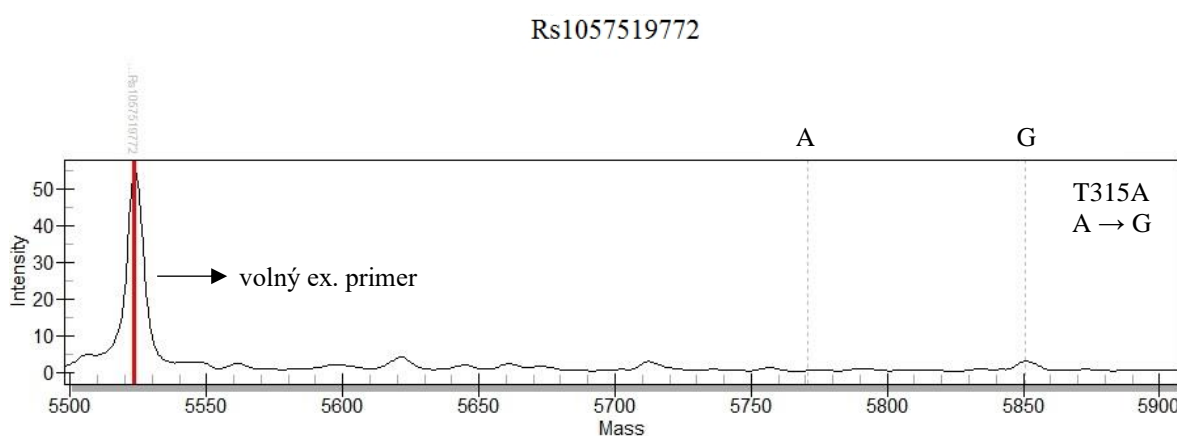


Obr. 20. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 8 (únor 2020). Wild type alela nebyla detekována. Přítomná je pouze mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin.

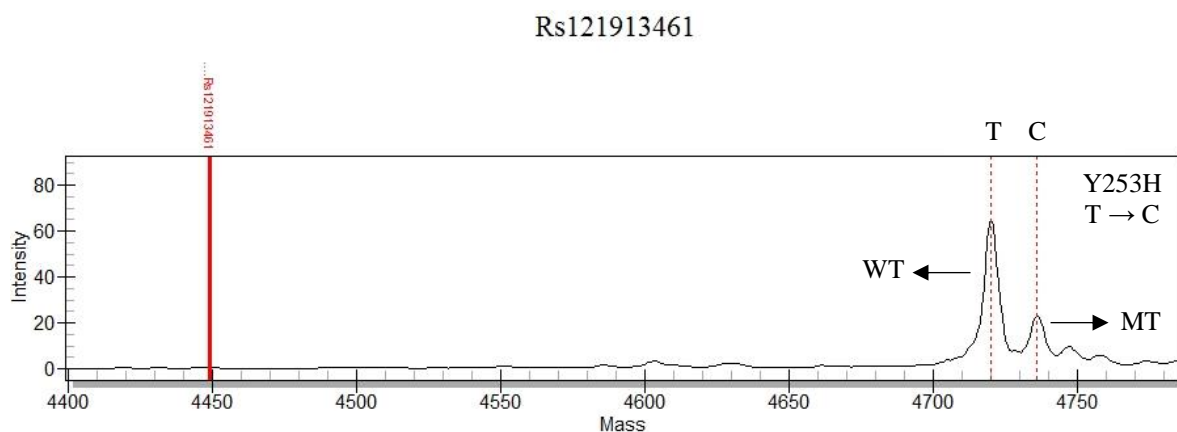
Mutace T315A a T315I zasahují stejný ACT kodon 315 exonu 7 genu *ABL1* (Obr. 21.). V případě existence pouze mutantní alely T315I (Obr. 19., 20.), kdy dochází k nukleotidové substituci cytozinu na tymin, se z důvodu nekomplementarity bází poslední nukleotid na 3' konci extenzního primeru pro mutaci T315A nemůže na sekvenci vázat, nedochází k připojení ddNTP a nelze tuto mutaci detekovat (Obr. 22.). To samé platí v případě existence pouze mutantní alely T315A s nukleotidovou substitucí adeninu za guanin, která opět mění sekvenci pro nasednutí extenzního primeru pro detekci alely T315I, což neumožňuje její detekci. Jedná se tedy o nepřímý důkaz existence pouze mutantní alely T315I, resp. T315A.



Obr. 21. Sekvence exonu 7 genu *ABL1* pro navázání extenzních primerů pro mutace T315A a T315I. Substituce cytozinu za tymin (T315I) neumožňuje navázání primeru pro detekci mutace T315A. Substituce adeninu za guanin (T315A) neumožňuje navázání primeru pro detekci mutace T315I.

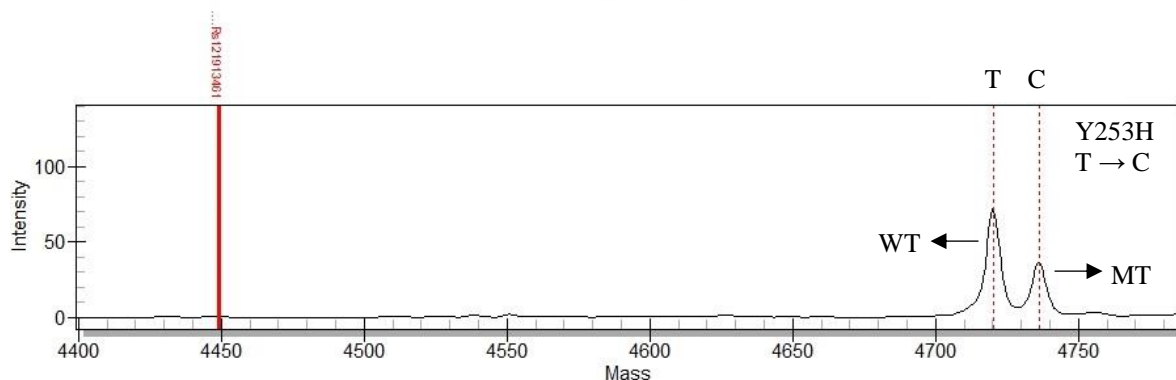


Obr. 22. Negativní výsledek MassArray analýzy mutace T315A u pacienta č. 8 (únor 2020). Z důvodu nepřítomnosti wild type T315 alely se primer pro detekci T315A nemohl plně navázat a extenzní reakce neproběhla. Největší pík v hmotnostním spektru představuje volný extenzní primer.



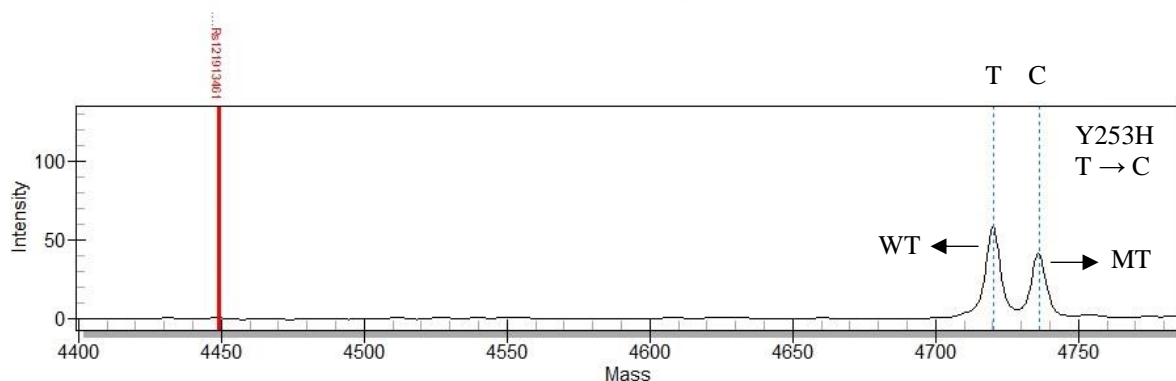
Obr. 23. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 8 (květen 2019). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin je vůči wild type alele asi v 30% zastoupení.

Rs121913461



Obr. 24. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 8 (srpen 2019). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí thyminu za cytozin je vůči wild type alele asi v 40% zastoupení.

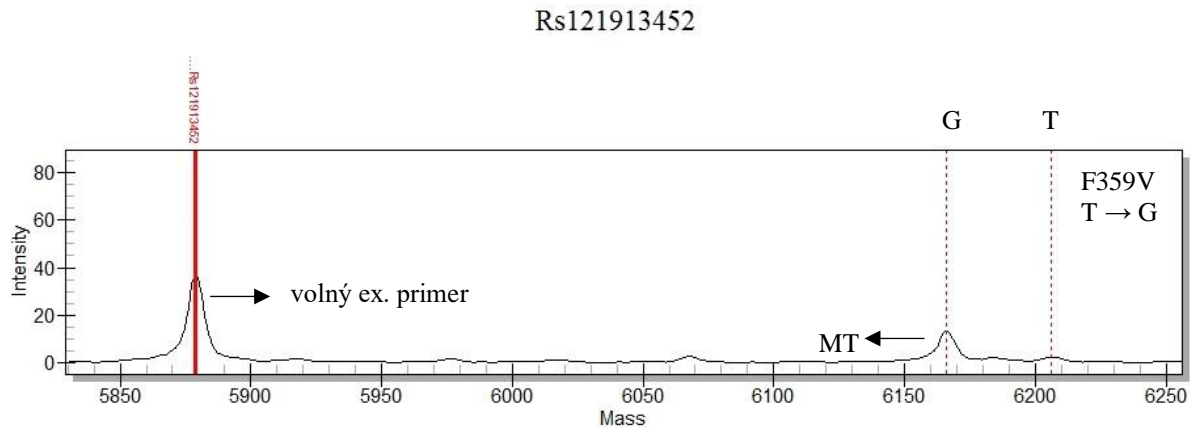
Rs121913461



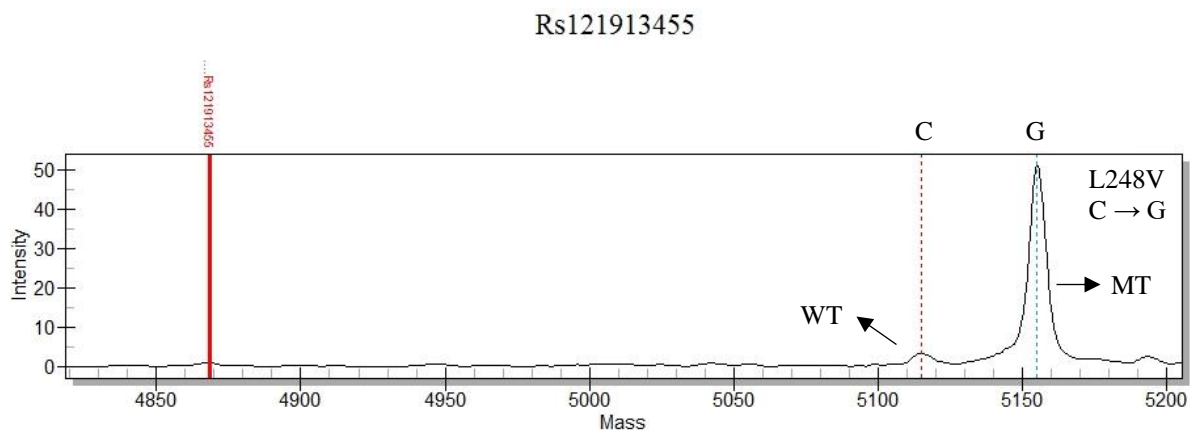
Obr. 25. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 8 (únor 2020). Mutantní alela s nukleotidovou substitucí thyminu za cytozin je vůči wild type alele asi v 45% zastoupení.

U pacienta č. 9 lze v hmotnostním spektru pozorovat kromě mutantní alely F359V i silný pík pro volný extenzní primer, což naznačuje chybu v přípravné reakci způsobenou nejspíš nefunkčním primerem (Obr. 26.). U pacienta č. 22 byla detekována mutantní alela L248V, která dosahovala 95% frekvence (Obr. 27.). U pacienta č. 23 byla detekována mutantní alela M244V (Obr. 28., 29.), jejíž frekvenci nelze z hmotnostního spektra zhodnotit z důvodu vysokého pozadí, které je pravděpodobně způsobené zhoršenou kvalitou matrice. Dále byla u pacienta č. 23 detekována mutace Y253H, která měla dle MassArray i dle Sangerovy metody 60% frekvenci (Obr. 30., 31.). Poslední detekovanou mutací u pacienta č. 23 byla mutace G250E, jejíž 15% frekvenci zachytila pouze metoda MassArray (Obr. 32., 33.). U pacienta č. 24 byla potvrzena mutantní alela M351T a F317L, která v obou případech dosahovala 100% frekvence (Obr. 34–37.). U pacienta č. 25

byla potvrzena mutantní alela T315I, jejíž frekvence byla Sangerovou metodou stanovena na 100 %, nicméně MassArray analýza odhalila 15% zastoupení wild type alely T315 (Obr. 40, 41.). Poslední mutací u pacienta č. 25 byla mutace E255K, která dosahovala 30% zastoupení (Obr. 42.).

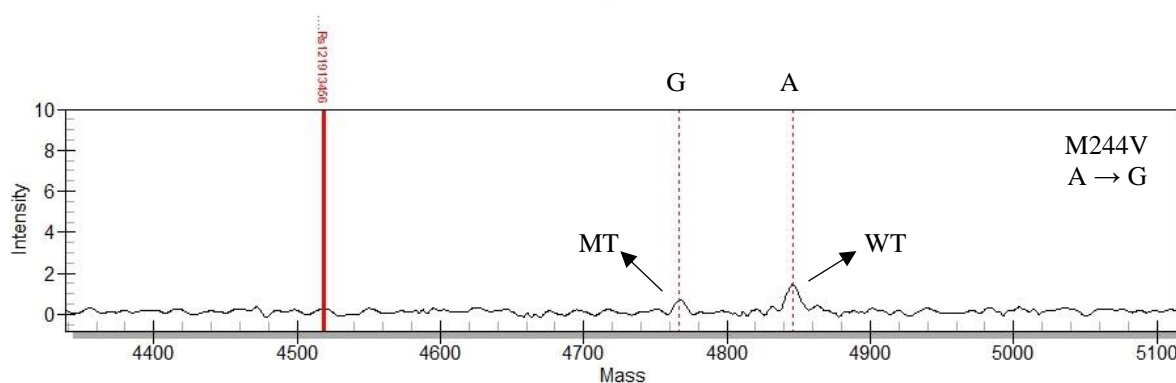


Obr. 26. Výsledek MassArray analýzy mutace F359V u pacienta č. 9. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za guanin byla z důvodu nefunkčnosti primeru nedostatečně amplifikovaná, což značí její slabý pík. Největší pík v hmotnostním spektru představuje volný extenzní primer.

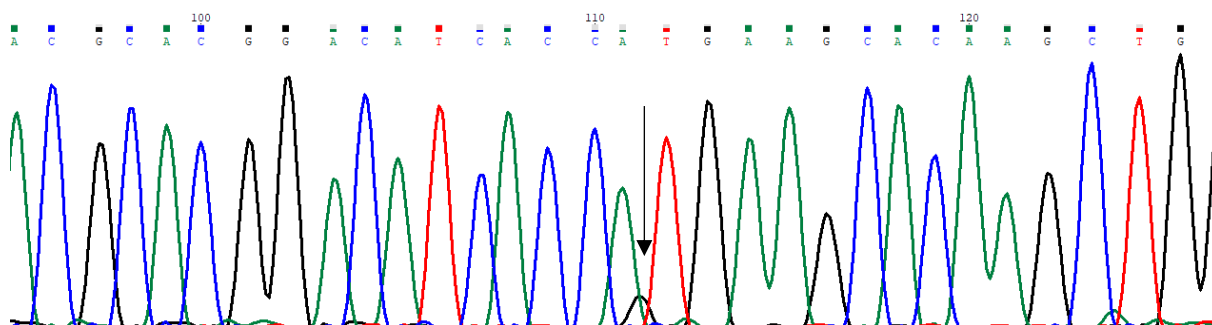


Obr. 27. Výsledek MassArray analýzy mutace L248V u pacienta č. 22. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za guanin se vůči wild type alele nachází v 95% zastoupení

Rs121913456

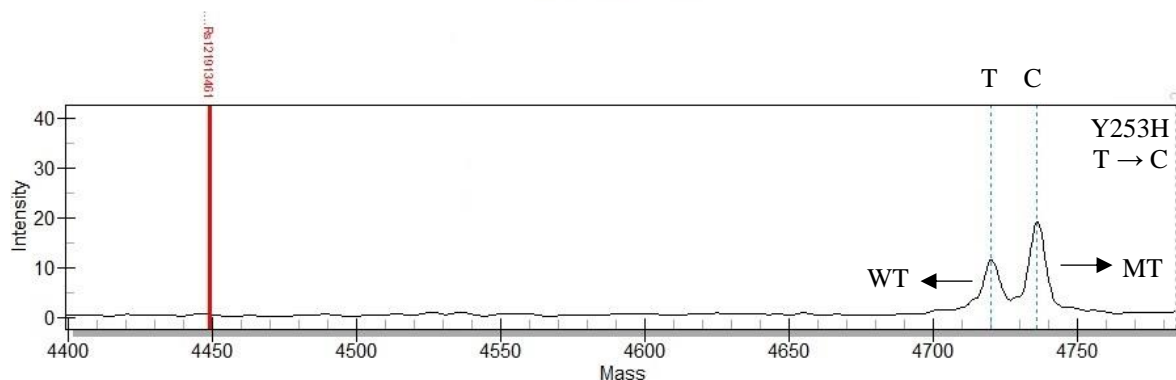


Obr. 28. Výsledek MassArray analýzy mutace M244V u pacienta č. 23. Příčinou vysokého pozadí mohlo být zhoršení kvality matrice. I přes vysoké pozadí lze detekovat mutantní alelu s nukleotidovou substitucí adeninu za guanin, která se vyskytuje s nižší frekvencí než wild type alela M244.

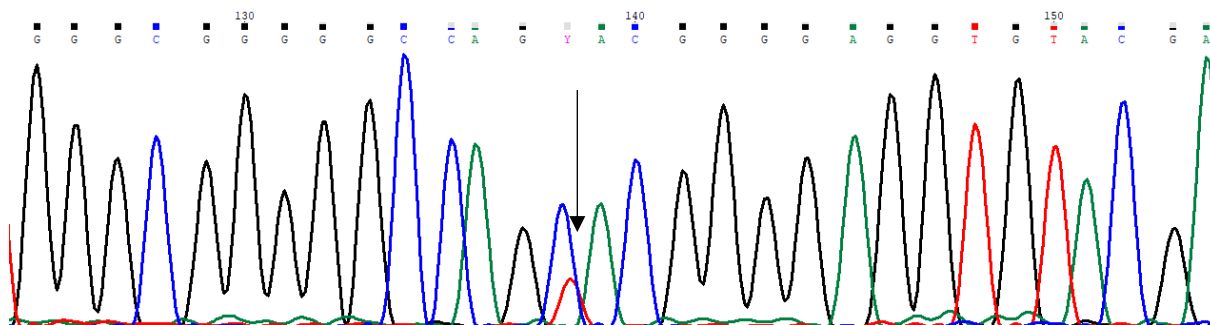


Obr. 29. Detekce mutace M244V u pacienta č. 23 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí adeninu za guanin (ATG → GTG; šipka) má cca 20% frekvenci.

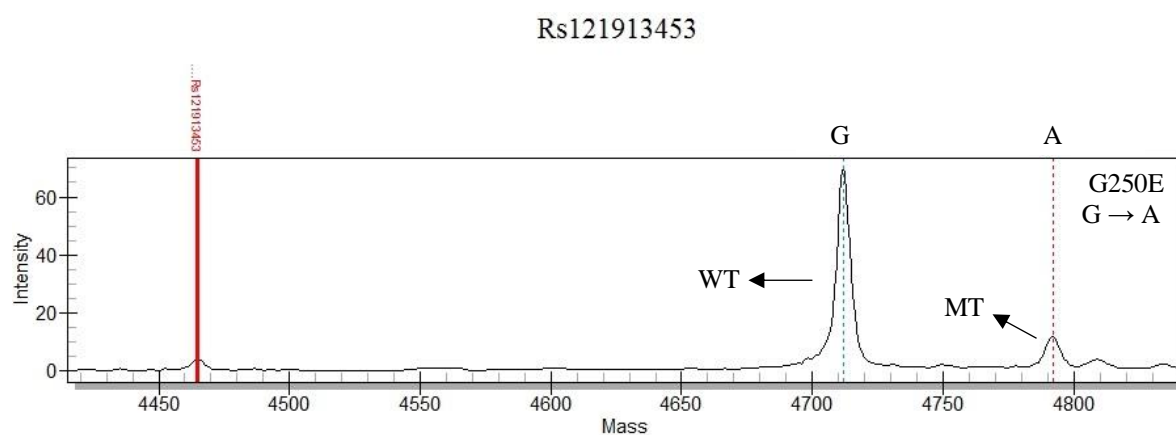
Rs121913461



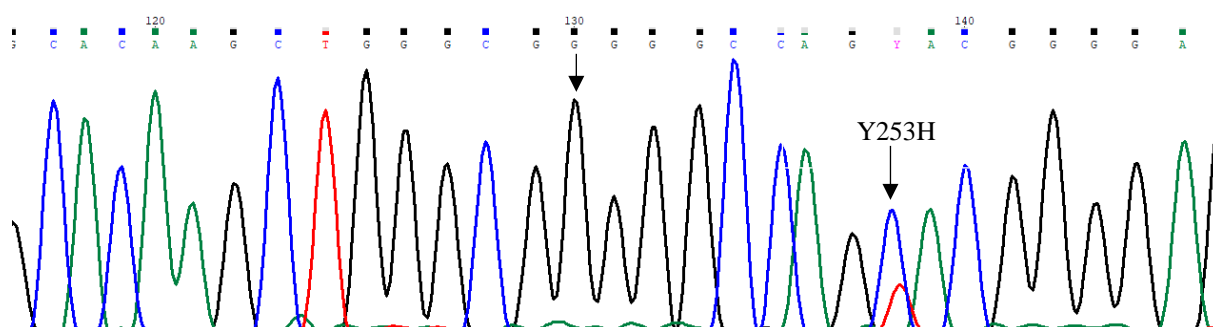
Obr. 30. Výsledek MassArray analýzy mutace Y253H u pacienta č. 23. Mutantní alela je vůči wild type alele s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin asi v 60% zastoupení.



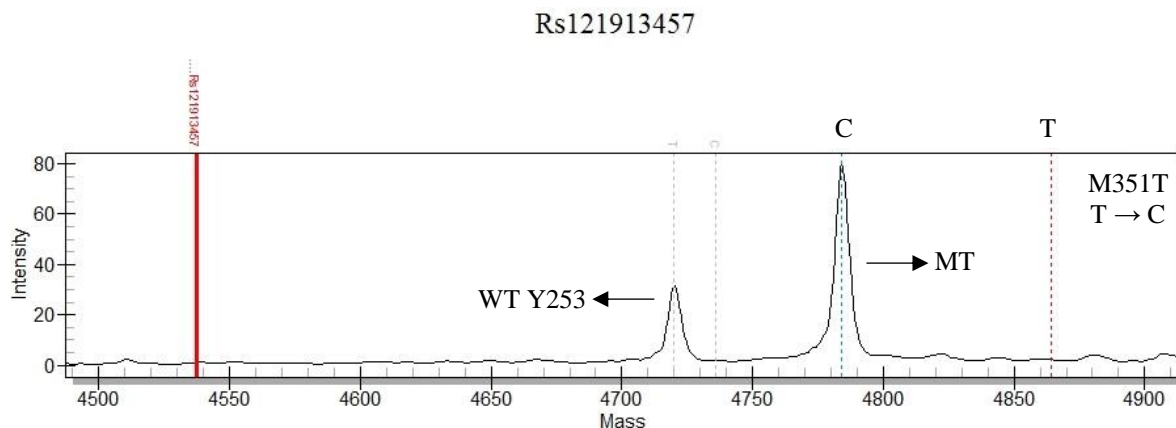
Obr. 31. Detekce mutace Y253H u pacienta č. 23 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin (TAC → CAC; šipka) má cca 60% frekvenci.



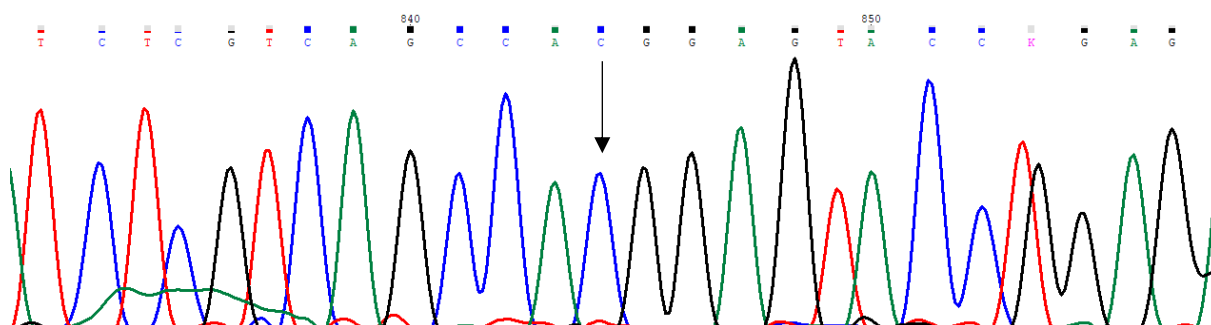
Obr. 32. Výsledek MassArray analýzy mutace G250E u pacienta č. 23. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí guaninu za adenin je asi v 15% zastoupení.



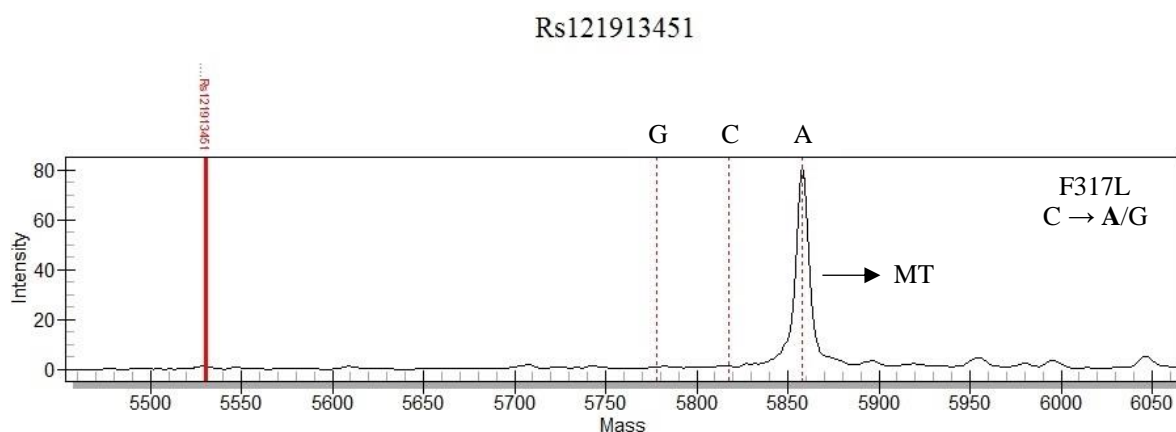
Obr. 33. Neúspěšná detekce mutace G250E u pacienta č. 23 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Z důvodu nižší frekvence mutantní alely, nelze mutaci zachytit. Šipka ukazuje pozici nukleotidové substituce guaninu za adenin v případě detekce G250E (GGG → GAG).



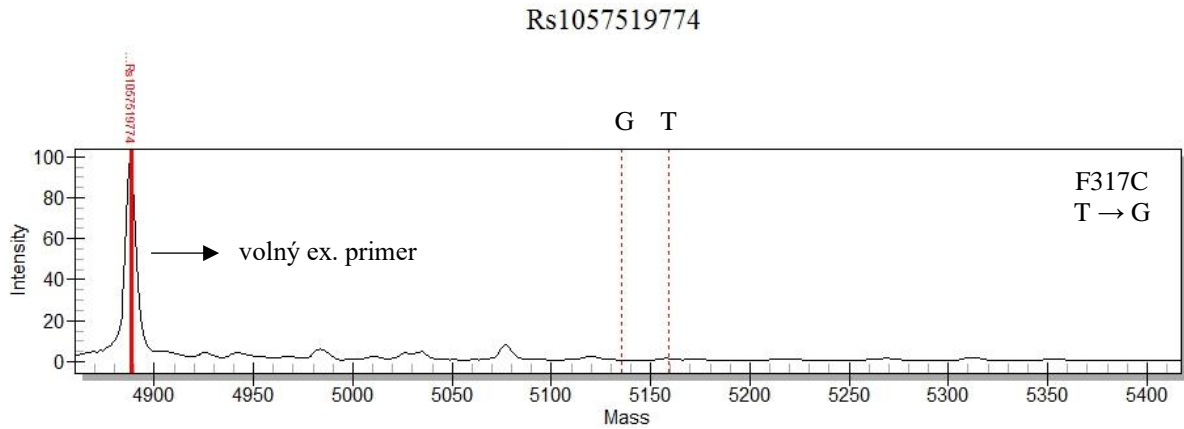
Obr. 34. Výsledek MassArray analýzy mutace M351T u pacienta č. 24. Nejsilnější pík ve spektru znázorňuje mutantní alelu M351T s nukleotidovou substitucí thyminu za cytozin. Wild type alela M351 nebyla detekována. Ve spektru lze detekovat navíc pík wild type alely Y253.



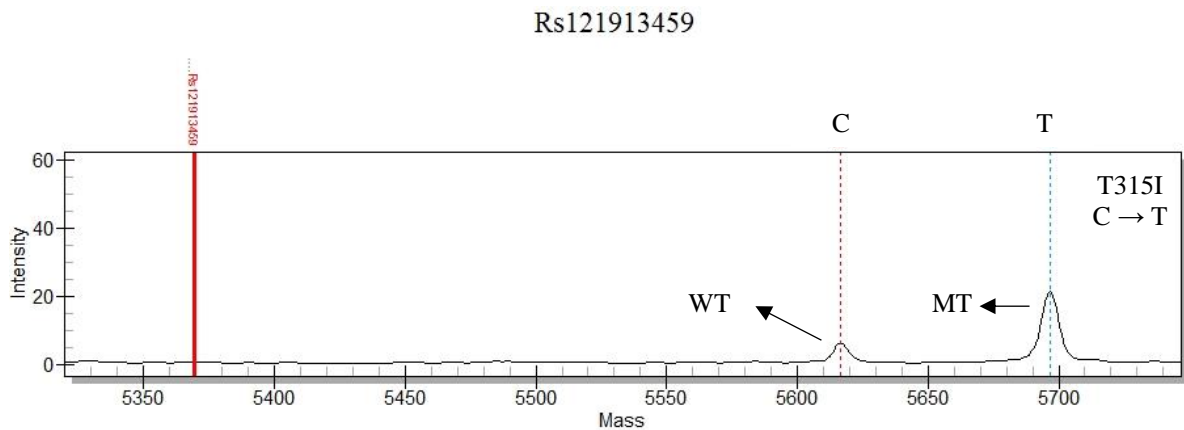
Obr. 35. Detekce mutace M351T u pacienta č. 24 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Wild type alela nebyla detekována. Šipka ukazuje nukleotidovou substituci thyminu za cytozin (ATG → ACG).



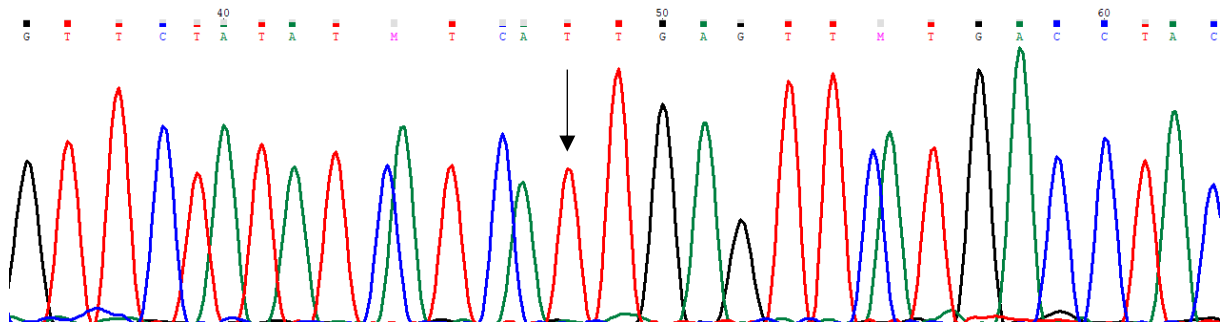
Obr. 36. Výsledek MassArray analýzy mutace F317L u pacienta č. 24. Mutace F317L/L vzniká nukleotidovou substitucí cytozinu za guanin nebo v tomto případě za adenin. Wild type alela nebyla detekována.



Obr. 39. Negativní výsledek MassArray analýzy mutace F317C u pacienta č. 24. Z důvodu nepřítomnosti wild type F317C alely se primer pro detekci F317C nemohl navázat a extenzní reakce neproběhla. Největší pík v hmotnostním spektru představuje volný extenzní primer.

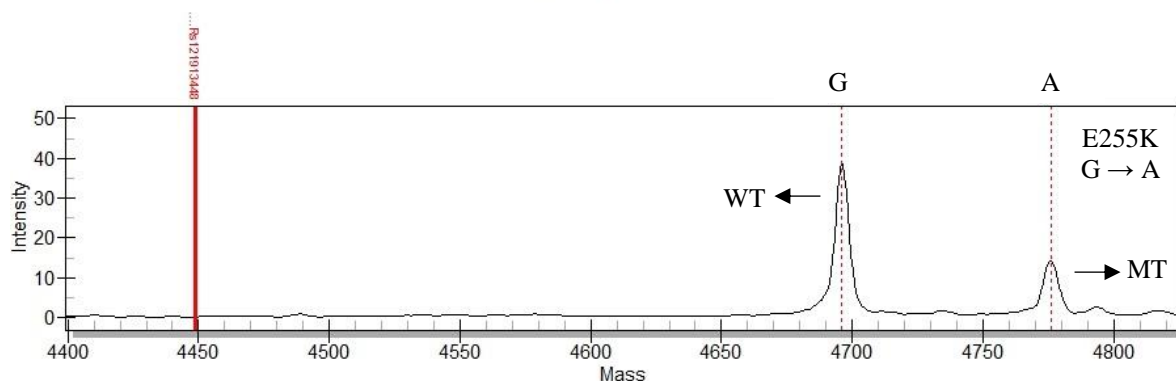


Obr. 40. Výsledek MassArray analýzy mutace T315I u pacienta č. 25. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin byla vůči wild type alele v 85% zastoupení.



Obr. 41. Detekce mutace T315I u pacienta č. 25 Sangerovou metodou přímého sekvenování. Šipka ukazuje substituci cytozinu za tymin u mutantní alely (ACT → ATT). Wild type alela nebyla detekována.

Rs121913448

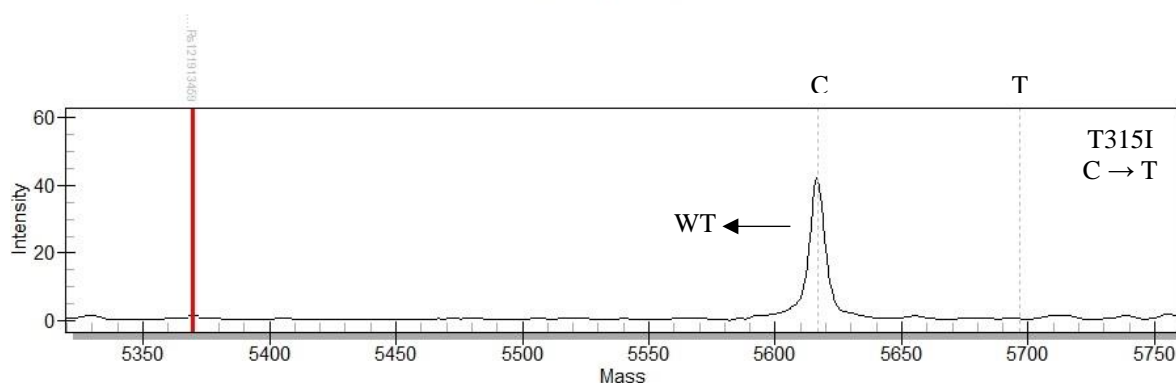


Obr. 42. Výsledek MassArray analýzy mutace E255K u pacienta č. 25. Mutantní alela s nukleotidovou substitucí guaninu za adenin byla vůči wild type alele v 30% zastoupení.

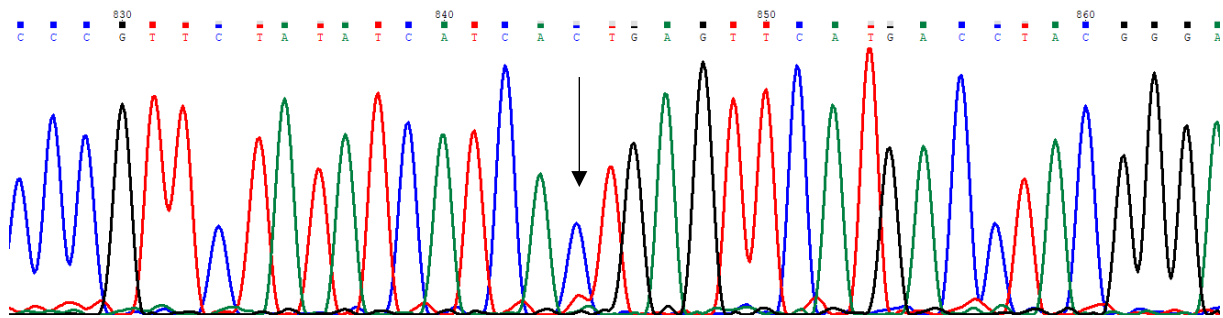
Pro stanovení detekčního limitu metody MassArray a Sangerovy metody přímého sekvenování byly vybrány vzorky pacientů 6 a 8. Vzorek pacienta 8 (únorový odběr), u kterého byla detekována pouze mutantní alela T315I, se ředil vzorkem pacienta 6, u kterého byla prokázána pouze wild type alela T315 (Obr. 20., 43.). Jejich smícháním vznikly vzorky s mutantní alelou T315I v 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5% a 1% zastoupení.

Sangerova metoda přímého sekvenování spolehlivě zachytila mutaci s 50% a 25% frekvencí. Mutace s 10% frekvencí byla v chromatogramu téměř nedetekovatelná (Obr. 44.). Mutace s 5% frekvencí Sangerova metoda vůbec nezachytila (Obr. 45.).

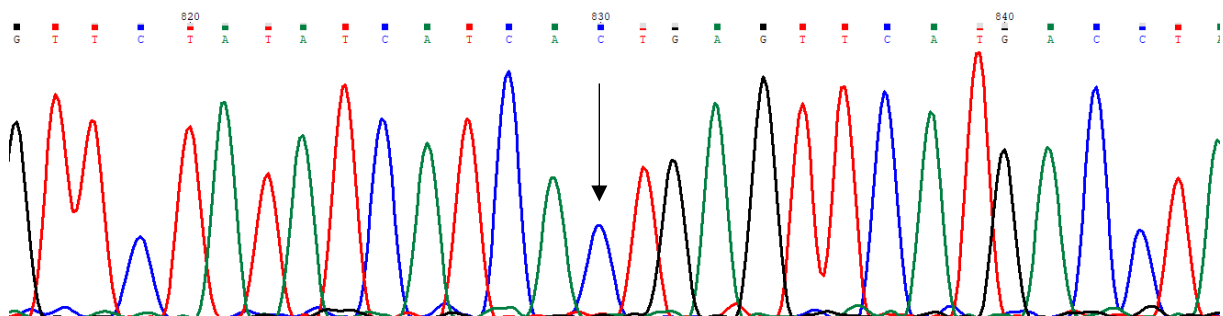
Rs121913457



Obr. 43. Negativní MassArray detekce mutace T315I u pacienta č. 6. Přítomná je pouze wild type alela T315 bez substituce cytozinu za thymin znázorněná nejsilnějším píkem.



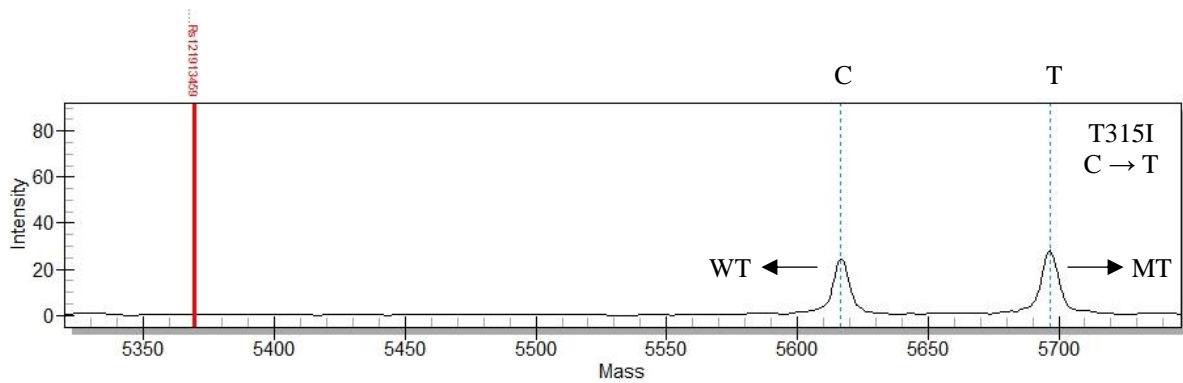
Obr. 44. Detekce mutace T315I s 10% frekvencí Sangerovou metodou přímého sekvenování. Šipka ukazuje substituci cytozinu za tymin u mutantní alely (ACT → ATT). Substituovaný tymin je zobrazen červeným píkem.



Obr. 45. Negativní detekce mutace T315I s 5% frekvencí Sangerovou metodou přímého sekvenování. Šipka ukazuje pozici substituce cytozinu za tymin u mutantní alely (ACT → ATT). Mutantní alela T315I nebyla zachycena.

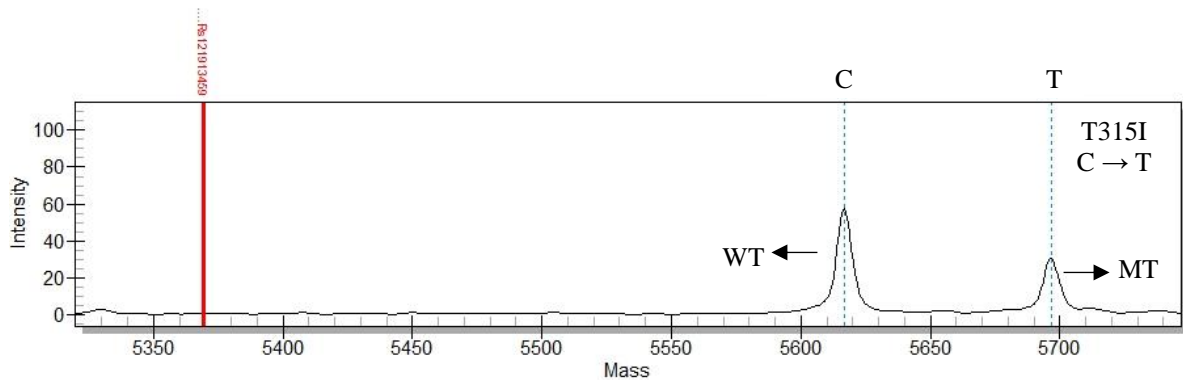
Mutantní alela T315I byla MassArray metodou spolehlivě detekována v případě 50%, 25%, 10% a 5% zastoupení (Obr. 46–49.). V hmotnostním spektru lze částečně detekovat také mutaci s 2,5% výskytem (Obr. 50.), jejíž přítomnost lze predikovat z kalibrační křivky (Obr. 52.). Mutace s 1% výskytem ve hmotnostním spektru není patrná (Obr. 51.), nicméně z kalibrační křivky lze její přítomnost předvídat. V případě dosažení tohoto výsledku u diagnostikovaného pacienta je možné u opakované mutační analýzy za určité časové období předpovídat záchyt mutantní alely.

Rs121913459



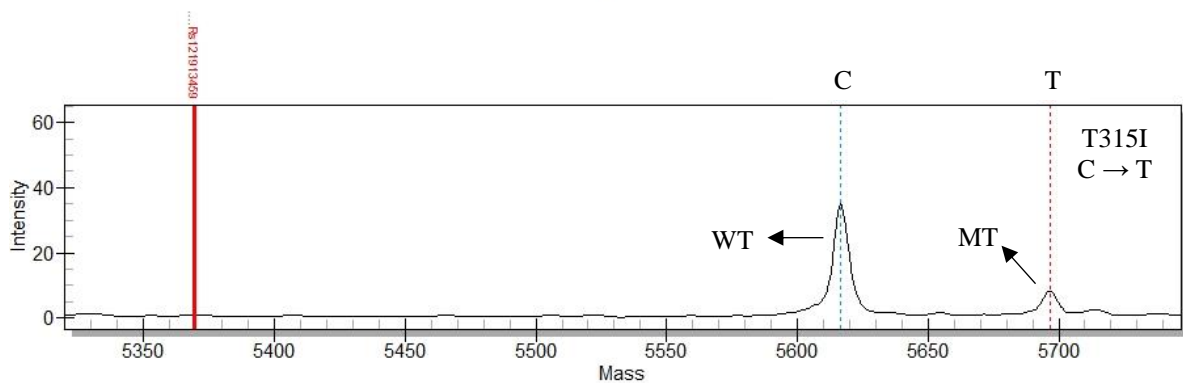
Obr. 46. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za thymin v 50% zastoupení.

Rs121913459



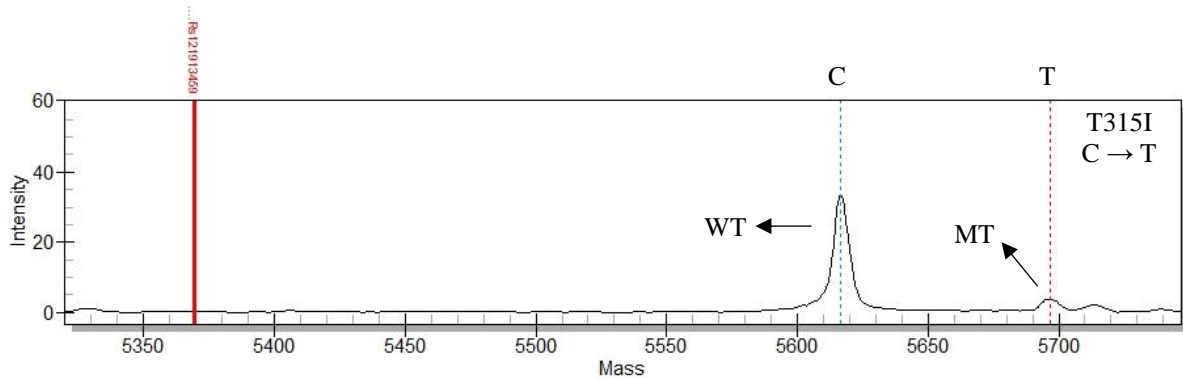
Obr. 47. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za thymin v 25% zastoupení.

Rs121913459



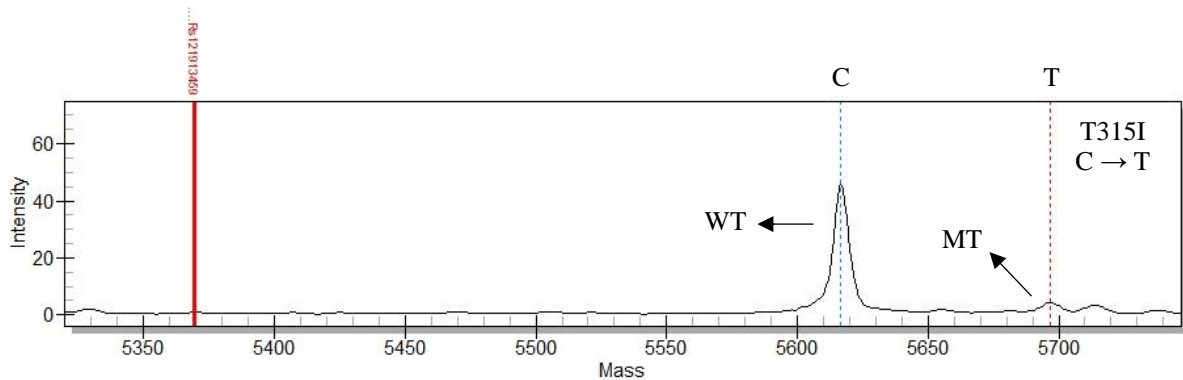
Obr. 48. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za thymin v 10% zastoupení.

Rs121913459



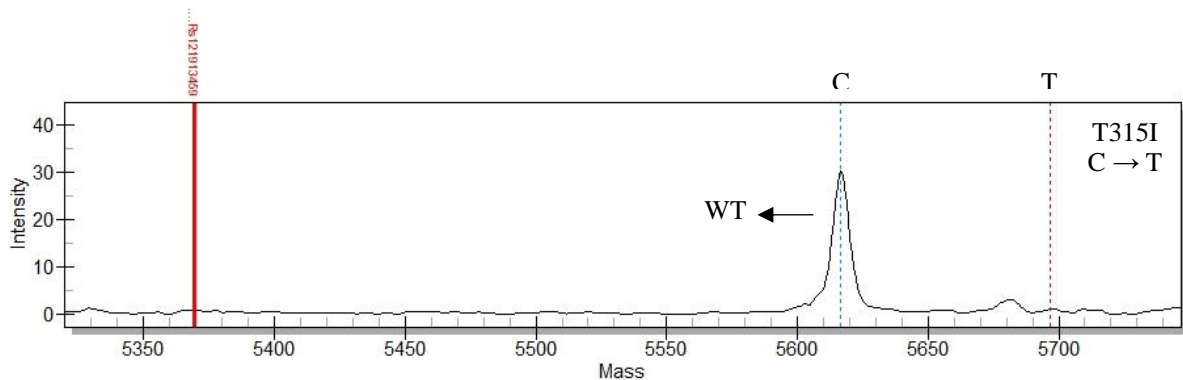
Obr. 49. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 5% zastoupení.

Rs121913459

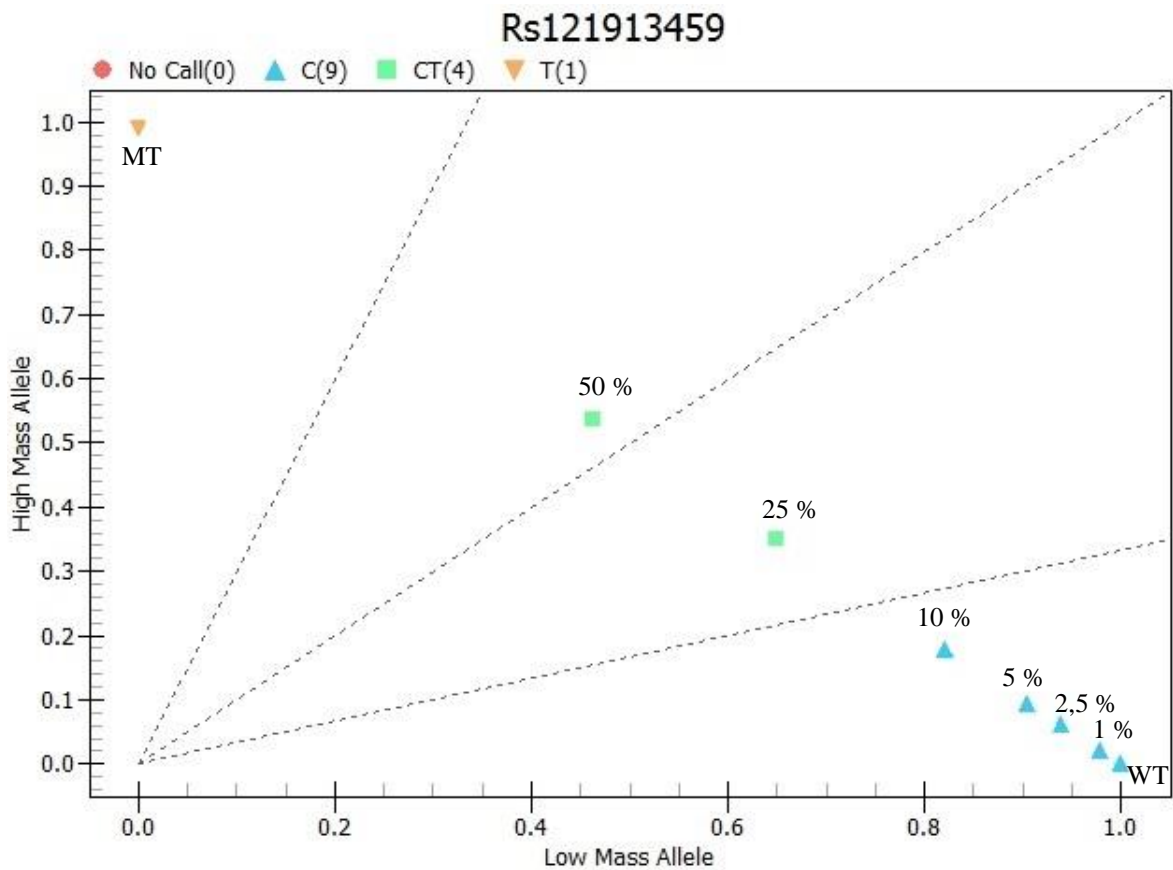


Obr. 50. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 2,5% zastoupení. Mutantní alela T315I je zachycena velmi slabým píkem. Přítomnost mutace lze predikovat z kalibrační křivky (Obr. 51.).

Rs121913459



Obr. 51. MassArray detekce mutantní alely T315I s nukleotidovou substitucí cytozinu za tymin v 1% zastoupení. Mutantní alelu v hmotnostním spektru nelze detekovat, v kalibrační křivce lze pozorovat mírnou odchylku od vzorku se 100% wild type T315 alelou (Obr. 51.).



Obr. 52. Kalibrační křivka detekce mutantní alely T315I v 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5% a 1% zastoupení. WT zobrazuje vzorek pacienta 6 se 100% wild type T315I alelou. MT zobrazuje vzorek pacienta 8 se 100% mutantní T315I alelou. MassArray detekce byla spolehlivá do 5% frekvence mutantní T315I alely. Mutantní T315I alela s 2,5% frekvencí byla v hmotnostním spektru zastoupena mírným píkem, v kalibrační křivce lze vidět odchýlení od vzorku se 100% wild type T315I alelou. Mutantní alela T315I s 1% frekvencí nebyla v hmotnostním spektru detekovaná, v kalibrační křivce lze vidět mírné odchýlení od vzorku se 100% wild type alelou.

6 Diskuze

Chronická myeloidní leukémie je myeloproliferativní klonální onemocnění, které je charakteristické přítomností derivovaného chromozomu Philadelphia (Ph) vzniklého reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22, a tvorbou fúzního genu *BCR-ABL1*. Expresí fúzního genu vzniká konstitutivně aktivovaná tyrosin kináza Bcr-Abl1, která stimuluje proliferaci krvetvorných buněk (Doubek *et al.*, 2013). Cílená léčba CML zahrnuje užívání tyrosin kinázového inhibitoru (TKI) první generace – imatinibu. V případě selhání či netolerance se léčba mění na TKI druhé (nilotinib, dasatinib, bosutinib,...) a třetí generace (ponatinib). U léčených pacientů s CML je pravidelně sledována dynamická exprese fúzního genu *BCR-ABL1*, jehož nárůst signalizuje špatnou odpověď na léčbu a rozvoj rezistence (Lee *et al.*, 2002). Nejznámější příčinou vzniku sekundární rezistence jsou bodové mutace v genu *BCR-ABL1*, především v oblasti kinázové domény (KD) tyrosin kinázy (La Rosée a Deininger, 2010). Doporučenou metodou pro detekci mutací v KD *BCR-ABL1* genu je Sangerova metoda přímého sekvenování. K analýze mutací lze použít také metodu MassArray. Rozvoj rezistence může být také důsledek mnohočetné lékové rezistence (MDR), konstitutivní aktivace jiných signálních drah (např. Src kinázy) a amplifikace genu *BCR-ABL1*, popř. jeho overexprese. Rezistence může být také asociována s dalšími cytogenetickými změnami či změnami v influxu a exfluxu buněčných transportérů (Jabbour *et al.*, 2011).

Na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci bylo od září 2019 do července 2020 vyšetřeno 25 pacientů s CML, kteří byli léčeni v období od roku 2010 do roku 2020, a u kterých se v průběhu léčby projevila sekundární rezistence na podávaný medikament. Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo od 15 do 82 let a věkový medián činil 65 let. Z celkového souboru pacientů byly mutace v kinázové doméně Bcr-Abl1 detekovány u 7 pacientů.

Pro detekci mutací byla použita doporučená Sangerova metoda přímého sekvenování s udávanou cca 15–25% citlivostí (Soverini *et al.*, 2011) a metoda MassArray s reagensiemi, které slibují záchyt mutace vyskytující se v 5% zastoupení (iPLEX Gold, Agena Bioscience). Při testování citlivosti Sangerovy metody byl spolehlivý detekční limit mutace stanoven na 25 %, což odpovídá literatuře. I přes relativně nízkou citlivost je sekvenování výhodné, protože lze detekovat veškeré mutace v rámci sekvenovaného úseku. U metody MassArray byl detekční limit stanoven na 5 %, což opět souhlasí s literaturou. Nevýhodou metody MassArray je zacílení pouze na určité známé typy mutací.

Sangerova metoda odhalila 8 typů mutací, kromě mutace G250E s 15% frekvencí, která nestačí pro její záchyt. Metoda MassArray detekovala všechny mutace včetně G250E a díky lepší citlivosti upřesnila procentuální zastoupení wild type a mutantních alel.

U 3 pacientů byla detekována mutace T315I, která patří mezi relativně častou a klinicky nejvýznamnější mutaci označovanou jako „gatekeeper“ mutaci. T315I mutace je charakterizována nukleotidovou substitucí cytozinu na tymin (ACT→ATT) v kodon 315 genu *ABL1* v úseku vazebného místa pro imatinib, přičemž mění aminokyselinu threonin na izoleucin. Threonin 315 je pro vazbu imatinibu klíčový a jeho změnou dochází k porušení vodíkových vazeb mezi Bcr-Abl1 a imatinibem, což vede k destabilizaci komplexu a neumožnění navázání imatinibu do ATP vazebné domény. Nositelé mutace jsou rezistentní na všechny TKI druhé generace, účinný je pouze TKI 3. generace ponatinib. Mutace se pojí s klinicky špatnou prognózou (Rahem *et al.*, 2017).

V oblasti vazebného místa pro imatinib byla dále u 1 pacienta detekována mutace F317L. Tato mutace se vyznačuje nukleotidovou substitucí cytozinu za guanin nebo adenin (TTC→TTG/A) v kodonu 317 genu *ABL1* zapříčiňující změnu aminokyseliny fenylalanin na leucin (Rohoň a Faber, 2013). Mutace generuje buněčné klony s citlivostí na nilotinib a střední citlivostí k imatinibu a dasatinibu (Jabbour *et al.*, 2008).

U 2 pacientů byla detekována mutace Y253H, která je také relativně častá a vzniká nukleotidovou substitucí tyminu za cytozin (TAC→CAC) v kodonu 253 genu *ABL1*, přičemž mění aminokyselinu tyrosin na histidin. Mutace zasahuje oblast P-smyčky, která zprostředkovává vazbu ATP, a poškozuje konformaci kinázové domény potřebnou pro vazbu imatinibu (Miething *et al.*, 2006). Buněčné klony obsahující mutace Y253H jsou rezistentní na imatinib, středně citlivé na nilotinib a citlivé na dasatinib a pojí se s horší prognózou (Rohoň a Faber, 2013).

V oblasti P-smyčky byla dále u 1 pacienta detekována mutace L248V charakterizovaná nukleotidovou substitucí cytozinu na guanin (CTG→GTG) v kodonu 248 v genu *ABL1* se záměnou aminokyseliny leucinu na valin. Mutací vzniká sekundární sestřihové místo v exonu 4 genu *ABL1*, přičemž alternativním sestřihem vzniká kratší inaktivní varianta Bcr-Abl1 s deletovaným aminoterminálním koncem, resp. s deletovanými aminokyselinami 248–274. Mutace je asociována s vysokým stupněm rezistence na imatinib a horší prognózou (Sherbenou *et al.*, 2008).

Dále byla v oblasti P-smyčky u 1 pacienta detekována mutace G250E, která je typická nukleotidovou substitucí guaninu na adenin (GGG→GAG) v kodonu 250 genu *ABL1* a následnou změnou glycinu na glutamát. Mutace destabilizuje konformaci P-smyčky

potřebnou pro navázání imatinibu, čímž generuje buněčné klony střední citlivostí k imatinibu. Mutace je spojena s horší prognózou (Reddy a Aggarwal, 2012).

Poslední mutací, která byla detekována v oblasti P-smyčky, byla E255K charakteristická nukleotidovou substitucí guaninu na adenin (GAG→AAG) v kodonu 250 genu *ABL1*, což mění aminokyselinu glutamát na lysin. Mutace v tomto úseku mění konformaci P-smyčky, která je důležitá pro navázání imatinibu (Reddy a Aggarwal, 2012). Buněčné klony s touto mutací jsou rezistentní na imatinib, středně citlivé na nilotinib a citlivé na dasatinib. Mutace je spojena s horší prognózou (Rohoň a Faber, 2013).

Dále byla u 1 pacienta detekována mutace F359V, která zasahuje oblast katalytické domény Bcr-Abl1. Mutace je podmíněná nukleotidovou substitucí tyminu na guanin (TTC→GTC) a změnou aminokyseliny fenylalaninu na valin. Fenylalanin 359 se van der Waalsovými silami podílí na vazbě imatinibu a jeho substituce destabilizuje komplex (Reddy a Aggarwal, 2012). Buněčné klony s mutací F359V jsou středně citlivé na imatinib a nilotinib, naopak citlivé k dasatinibu (Rohoň a Faber, 2013).

U 1 pacienta byla detekována mutace M351T, která postihuje oblast SH2 kontaktu. Vznik je podmíněný nukleotidovou substitucí tyminu na cytozin (ATG→ACG) v kodonu 351 genu *ABL1* a změnou methioninu na threonin. Mutace snižuje katalytickou aktivitu a transformující kapacitu tyrosin kinázy Bcr-Abl1 (Gharote *et al.*, 2015). Buněčné klony s touto mutací jsou citlivé na imatinib, nilotinib i dasatinib (Rohoň a Faber, 2013).

Detekována byla také mutace M244V, která zasahuje aminoterminální konec KD Bcr-Abl1, kdy v kodonu 244 dochází k nukleotidové substituci adeninu na guanin (ATG→GTG), což mění aminokyselinu methionin na valin. Její efekt na tyrosin kinázu není zcela objasněn, nicméně je spojena se střední citlivostí na imatinib a citlivostí na nilotinib a dasatinib (Shen *et al.*, 2015).

Klinický význam mutací s nízkou frekvencí výskytu zatím nebyl prokázán, nicméně jejich včasná detekce může predikovat progresi onemocnění a naznačovat potřebu změny léčebné strategie (Hughes *et al.*, 2006). Z těchto důvodů je metoda MassArray vhodným doplňkem Sangerovy metody přímého sekvenování.

U pacientů s nedetekovanou bodovou mutací v KD tyrosin kinázy Bcr-Abl1 je rezistence na léčbu zapříčiněna jinými mechanismy (konstitutivní aktivace jiných signálních drah, amplifikace či overexprese genu *BCR-ABL1* aj.).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo detekovat mutace metodou MassArray u vybrané skupiny hematologických pacientů.

Teoretická část shrnuje základní informace, molekulární podstatu a diagnostiku chronické myeloidní leukémie. Dále byla popsána léčba chronické myeloidní leukémie, rozvoj sekundární rezistence a detekce mutací v oblasti kinázové domény fúzního genu *BCR-ABL1*, které mohou rezistenci zapříčinit.

Experimentální část se věnuje detekci 18 vybraných mutací v kinázové doméně Bcr-Abl1 pomocí metody MassArray u 25 pacientů, u kterých se v průběhu léčby projevila rezistence na podávané léčivo. Ze všech pacientů byla u 7 z nich potvrzena přítomnost jedné či více mutací v KD Bcr-Abl1. Celkem bylo detekováno 8 typů mutací, které nejčastěji zasahovaly oblast vazebného místa pro léčivo imatinib mesylát (T315I, F317L) nebo oblast P-smyčky (L248V, G250E, Y253H, E255K). Byly nalezeny také bodové mutace v oblasti SH2 kontaktu (M351T), v úseku katalytické domény Bcr-Abl1 (F359V) a na N-konci KD Bcr-Abl1 (M244V).

Dále byla porovnána citlivost Sangerovy metody přímého sekvenování, která se obecně doporučuje pro detekci mutací v kinázové doméně Bcr-Abl1, s metodou MassArray. Sangerova metoda spolehlivě detekovala mutaci s minimálně 25% frekvencí. Metoda MassArray byla schopna spolehlivě detekovat mutaci s minimálně 5% frekvencí.

Přestože je Sangerovo přímé sekvenování hlavní metodou pro detekci mutací v KD Bcr-Abl1, má nižší citlivost než MassArray technika, která může být jejím vhodným doplněním.

8 Literatura

Abelson T. H., Rabstein S. L. (1970): Lymphosarcoma: Virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Research*, 30(8), 2213–2222.

Agarwal S., Tafel A. A., Kanaar R. (2006): DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair*, 5(9–10), 1075–1081.

Agena Bioscience, iPLEX Reagents User Guide, USG-CUS-071

Alikian M., Gerrard G., Subramanian P. G., Mudge K., Foskett P., Khorashad J. S., Lim A. C., Marin D., Milojkovic D., Reid A., Rezvani K., Goldman J., Apperley J., Foroni L. (2011): *BCR-ABL1* kinase domain mutations: Methodology and clinical evaluation. *American Journal of Hematology*, 87(3), 298–304.

Bernt K. M. a S. P. Hunger (2014): Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Oncology*, 4.

Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Parkinson I., Grigg A., Szer J., Taylor K., Herrmann R., Seymour J. F., Arthur C., Joske D., Lynch K., Hughes T. (2003): Detection of *BCR-ABL* mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*, 102(1), 276–283.

Butler J. M., Jiang-Baucom P., Huang M., Belgrader P., Girard J. (1996): Peptide nucleic acid characterization by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 68(18), 3283–3287.

Cortes J. E., Talpaz M., Kantarjian H. (1996): Chronic myelogenous leukemia: A review. *The American Journal of Medicine*, 100(5), 555–570.

Cortes J., O'Dwyer M. E. (2004): Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 18(3), 671–684.

Dai Y., Shuai X., Kuang P., Wang L., Liu T., Niu T. (2017): Philadelphia chromosome with acute myeloid leukemia and concurrent large B cell lymphoma of different origins: A case report. *Oncology Letters*, 13(3), 1189–1193.

Diekmann D., Brill S., Garrett M. D., Totty N., Hsuan J., Monfries C., Hall C., Lim L., Hall A. (1991): *Bcr* encodes a GTPase-activating protein for p21^{rac}. *Nature*, 351(6325), 400–402.

Doubek M., Mayer J., Brychtová Y., Cetkovský P., Cmunt E., Čermák J., Drgoňa L., Folber F., Haber J., Klamová H., Kořístek Z., Ráčil Z., Smolej L., Šálek C., Vydra J., Žáčková D., Žák P. (2013): Chronická myeloidní leukemie. In: Doubek M., Mayer J. (eds): *Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekčních komplikací u dospělých pacientů. Doporučení České leukemické skupiny – pro život (CELL)*, pp. 50–74, Česká leukemická společnost – pro život.

Faber E., Urbanová R. (2010): Chronická myeloidní a chronická lymfatická leukemie. *Interní medicína pro praxi*, 12(6), 321–324.

Faber E., Indrák K., Divoký V., Jarošová M., Kašparová P., Klamová H., Koza V., Poláková M. K., Mayer J., Michálek J., Moravcová J., Mužík J., Pelouchová J., Piterková L., Sedláček P., Škrobánková A., Veselovská J., Voglová J., Vrbacký F. (2010): *Chronická myeloidní leukémie*. Galén, Praha.

Fitzgerald P. H., Morris C. M. (1991): Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 57(2), 143–151.

Gabriel S., Ziaugra L., Tabbaa D. (2009): SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current Protocols in Human Genetics*, 2009, 60(1).

Gao X., Tan B. H., Sugrue R. J., Tang K. (2012): MALDI mass spectrometry for nucleic acid analysis. In: Cai Z., Liu S. (eds.): *Applications of MALDI-TOF Spectroscopy*, pp. 55–77, Springer, Heidelberg, Berlin.

Gharote M., Panchal H., Parikh S., Patel A., Rawal R., Anand A., Shah K. (2015): Sensitive allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction in detection of preexisting mutations

in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia patients: A retrospective analysis. *Journal of Applied Hematology*, 6(3).

Goldman J. M. (2010): Chronic myeloid leukemia: A historical perspective. *Seminars in Hematology*, 47(4), 302–311.

Goodman N. S., Gerson J. (2013): Mechanistic evidence in evidence-based medicine: A conceptual framework. *Agency for Healthcare Research and Quality*, Rockville

Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H. J., Pralle H., Hossfeld D. K., Queißer W., Löffler H., Hochhaus A., Heinze B., Georgii A., Bartram C. R., Griebhammer M., Bergmann L., Essers U., Falge C., Queißer U., Meyer P., Schmitz N., Eimernacher H., Walther F., Fett W., Kleeberg U. R., Kabisch A., Nerl C., Zimmermann R., Meuret G., Tichelli A., Kanz L., Tigges F. J., Schmid L., Brockhaus W., Tobler A., Reiter A., Perker M., Emmerich B., Verpoort K., Zankovich R., Wussow P. V., Prunmer O., Thiele J., Buhr T., Carbonell F., Ansari H. (1994): Randomized comparison of interferon- α with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*, 84(12), 4064–4077.

Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M. (2007): Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*, 370(9584), 342–350.

Hughes T., Deininger M., Hochhaus A., Branford S., Radich J., Kaeda J., Baccarani M., Cortes J., Cross N. C. P., Druker B. J., Gabert J., Grimwade D., Hehlmann R., Kamel-Reid S., Lipton H. J., Longtine J., Martinelli G., Saglio G., Soverini S., Stock W., Goldman J. M. (2006): Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*, 108(1), 28–37.

Chomzynski P. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.

Jabbour E., Kantarjian H. M., Jones D., Reddy N., O'Brien S., Garcia-Manero G., Burger J., Cortes J. (2008): Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with F317L

BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 112(13), 4839–4842.

Jabbour E., Parikh S. A., Kantarjian H., Cortes J. (2011): Chronic myeloid leukemia: mechanisms of resistance and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 25(5), 981–v.

Jones D., Kamel-Reid S., Bahler D., Dong H., Elenitoba-Johnson K., Press R., Quigley N., Rothberg P., Sabath D., Viswanatha D., Weck K., Zehnder J. (2009): Laboratory practice guidelines for detecting and reporting *BCR-ABL* drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(1), 4–11.

Jones D., Kamel-Reid S., Bahler D., Dong H., Elenitoba-Johnson K., Press R., Quigley N., Rothberg P., Sabath D., Viswanatha D., Weck K., Zehnder J. (2009): Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting BCR-ABL Drug Resistance Mutations in Chronic Myelogenous Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(1), 4–11.

Kircher M. a Kelso J. (2010): High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6), 524–536.

La Rosée P., Deininger M. W. (2020): Resistance to Imatinib: mutations and beyond. *Seminars in Hematology*, 47(4), 335–343.

Laneuville P. (1995): Abl tyrosine protein kinase. *Seminars in Immunology*, 7(4), 255–266.

Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R. (2001): The *BCR* gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Research*, 61(6), 2343–2355.

Lee W. I., Kantarjian H., Glassman A., Talpaz M., Lee M. S. (2002): Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. *Ann Oncol*, 13(5), 781–788

Liu B., Zhang W. a Ma H. (2016): Complete cytogenetic response to Nilotinib in a chronic myeloid leukemia case with a rare e13a3(b2a3) *BCR-ABL* fusion transcript: A case report. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2635–2638.

Marcucci G., Perrotti D., Caligiuri M. A. (2003): Understanding the molecular basis of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia and the related mechanisms of resistance. *Clin Cancer Research*, 9(4), 1248–1252.

Marzocchi G., Castagnetti F., Luatti S., Baldazzi C., Stacchini M., Gugliotta G., Amabile M., Specchia G., Sessarego M., Giussani U., Valori L., Discepoli G., Montaldi A., Santoro A., Bonaldi L., Giudici G., Cianciulli A. M., Giacobbi F., Palandri F., Pane F., Saglio G., Martinelli G., Baccarani M., Rosti G., Testoni N. (2011): Variant Philadelphia translocations: Molecular cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood*, 117(25), 6793–6800.

Melo V. J. (1997): 2 *BCR-ABL* gene variants. *Baillière's Clinical Haematology*, 10(2), 203–222.

Miething C., Feihl S., Mugler C., Grundler R., Bubnoff N., Lordick F., Peschel C., Duyster J. (2006): The Bcr-Abl mutations T315I and Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib. *Leukemia*, 20, 650–657.

Nagar B., Hantschel O., Young M. A., Scheffzek K., Veach D., Bornmann W., Clarkson B., Superti-Furga G., Kuriyan J. (2003): Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, 112(6), 859–871.

Neves H., Ramos C., da Silva M. G., Parreira A., Parreira L. (1999): The nuclear topography of *ABL*, *BCR*, *PML*, and *RAR α* Genes: Evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*, 93(4), 1197–1207.

Nowell P. C., Hungerford D. A. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 142, 1497.

Panjarian S., Jacob R.E., Chen S., Engen J. R., Smithgall T. E. (2013): Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5443–5450.

Passarge E. (2019): Barevný atlas genetiky. In: Passarge E.: Sekvenování, pp. 62–63, Grada, Praha.

Poláková K. M., Lopotová T., Klamová H. a Moravcová J. (2008): High-resolution melt curve analysis: Initial screening for mutations in *BCR-ABL* kinase domain. *Leukemia Research*, 32(8), 1236–1243.

Rahem R. M., Abuhmood A. A., Hussein L. (2017): Association of T315I mutation with resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with CML attended the Oncology-Hematology center in Al-Najaf city of Iraq. *Karbala International Journal of Modern Science*, 3(4), 231–240.

Reddy E. P., Aggarwal A. K. (2012): The ins and outs of bcr-abl inhibition. *Genes Cancer*, 3(5-6), 447–454.

Rohoň P., Faber E. (2013): Chronická myeloidní leukémie. In: Pospíšilová Š., Dvořáková D., Mayer J. (eds.): Molekulární hematologie, pp. 178–186, Galén, Praha.

Rowley J. D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290–293.

Salesse S., Verfaillie C. M. (2002): *BCR/ABL*: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 21(56), 8547–8559.

Sawyers Charles L. (1999): Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 340(17), 1330–1340.

Shen X., Zhang M., Shen Y., Shi W., Liu W., Wei W. U. (2015): Nilotinib rapidly reverses breakpoint cluster region-Abelson oncogene fusion gene and M244V mutations in a patient with chronic myelogenous leukemia: A case report. *Exp Ther Med.*, 10(4), 1479–1482.

Sherbenou D. W., Hantschel O., Turaga L., Kaupe I., Willis S., Bumm T., Press R. D., Superti-Furga G., Druker B. J., Deininger M. W. (2008): Characterization of *BCR-ABL* deletion mutants from patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 22(6), 1184–1190.

Soverini S., Hochhaus A., Nicolini F. E., Gruber F., Lange T., Saglio G., Pane F., Müller M. C., Ernst T., Rosti G., Porkka K., Baccarani M., Cross N. C. P., Martinelli G. (2011): *BCR-ABL* kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*, 2011, 118(5), 1208–1215.

Testoni N., Marzocchi G., Luatti S., Amabile M., Baldazzi C., Stacchini M., Nanni M., Rege-Cambrin G., Giugliano E., Giussani U., Abruzzese E., Kerim S., Grimoldi M. G., Gozzetti A., Crescenzi B., Carcassi C., Bernasconi P., Cuneo A., Albano F., Fugazza G., Zaccaria A., Martinelli G., Pane F., Rosti G., Baccarani M. (2009): Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response. *Blood*, 114(24), 4939–4943.

Welch P. J., Wang J. Y. (1995): Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5542–5551.

Wetzler M., Talpaz M., Yee G., Stass S. A., Van Etten R. A., Andreeff M., Goodacre A. M., Kleine H. D., Mahadevia R. K., Kurzrock R. (1995): Cell cycle-related shifts in subcellular localization of *BCR*: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3488–3492.

Yoshida K. (2007): Regulation for nuclear targeting of the Abl tyrosine kinase in response to DNA damage. In: Fagagna F., Chiocca S., McBlane F., Cavallaro U. (eds.): *Advances in molecular oncology*, pp. 155–165., Springer, Boston, MA