

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2017**

**Bc. Petra Gregorová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Expresní profilování chemokinových  
receptorů u chronické lymfocytární leukémie**

**Diplomová práce**

**Bc. Petra Gregorová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Dr. Ing. Eva Kriegová**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Dr. Ing. Evy Kriegové a použila jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

Olomouc 28. dubna 2017

-----  
podpis

## Souhrn

Významnou roli v patogenezi chronické lymfocytární leukémie (CLL) hraje mikroprostředí, které je mimo jiné zajišťováno chemokiny a jejich receptory. Znalost exprese chemokinových receptorů je nezbytná pro poznání patogeneze tohoto onemocnění a může se stát významným prognostickým faktorem u pacientů s CLL. Komplexní expresní profil chemokinových receptorů však u tohoto onemocnění nebyl doposud studován.

Tato práce se zabývá expresním genovým profilováním známých signálních chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C a expresním proteinovým profilováním vybraných chemokinových receptorů u pacientů s CLL v porovnání se zdravými jedinci. U pacientů s CLL byla zjištěna zvýšená genová exprese v periferních mononukleárních buňkách u genů *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CCR7*, *CCR8* a *CCR10* a snížená genová exprese u *CXCR1*, *CXCR2*, *CCR4*, *CCR5* ve srovnání se zdravými jedinci. U chemokinových receptorů *CXCR4* a *CCR7* byla potvrzena zvýšená exprese u CLL i na proteinové úrovni. Subanalýza u podskupin pacientů s prognosticky významnými cytogenetickými aberacemi del(17p) a del(13q) neprokázala rozdíly v expresních profilech studovaných chemokinových receptorů.

Naše studie popsala komplexní expresní profily chemokinových receptorů u CLL a nominovala řadu dosud nestudovaných chemokinových receptorů u tohoto onemocnění pro další studie.

## **Summary**

Microenvironment plays an important role in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL). Chemokine receptors and their ligands are crucial components of the microenvironment. Knowledge of the chemokine receptor expression is important to understand their role in the pathogenesis of this disease and could be important in prognostication of patients suffering from CLL. Comprehensive expression profile of chemokine receptors in CLL is still unknown.

This thesis is focused on gene profiling of major signalling chemokine receptors of the class C-C and C-X-C as well as on the protein profiling of the chosen chemokine receptors in CLL patients comparing to healthy controls. Up-regulated gene expression of CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7, CCR8 and CCR10 and down-regulated gene expression of CXCR1, CXCR2, CCR4 and CCR5 was detected in peripheral mononuclear cells obtained from CLL patients comparing to healthy controls. Elevated protein expression was observed for CXCR4 and CCR7 on CLL cells. Subanalysis in patient subgroups according to the presence of prognostically relevant cytogenetic changes del(17p) and del(13q) did not reveal changes in chemokine receptor pattern between these groups.

Our study reported comprehensive gene expression pattern of chemokine receptors in CLL and nominated spectrum of novel chemokine receptors for future studies.

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala především své vedoucí diplomové práce Dr. Ing. Evě Kriegové za velkou podporu, trpělivost a ochotu mi kdykoliv pomoci ať už s uvedením do problematiky či vypracováním této práce. Dále bych velmi ráda poděkovala Gayane Manukyan, MD. Ph.D., která byla ochotna mi vysvětlit každý experiment do detailu, a které také velmi děkuji za to, že vzbudila můj zájem a nadšení v oblasti průtokové cytometrie. Moje velké díky patří i Mgr. Zuzaně Mikulkové Ph.D., Mgr. Gabriele Gabčové, Ing. Regině Fillerové, Mgr. Veronice Kraiczové a Mgr. Anně Petráčkové za odbornou pomoc při zpracování výsledků a jejich interpretaci. V neposlední řadě patří mé díky také Mgr. Petře Schneiderové a Mgr. Tereze Dýškové, Ph.D. nejen za morální podporu, ale i za odborné konzultace.

Chtěla bych také poděkovat celému Ústavu imunologie za poskytnutí vybavení a podpory při psaní mé diplomové práce a také Hemato-onkologické klinice za poskytnutí klinických vzorků.

Za velkou podporu vděčím také své rodině, která mi jak po finanční, tak po morální stránce byla vždy velkou oporou při mém studiu.

Práce vznikla za podpory grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR (VES16-32339A) a interní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (LF UP\_2017\_009).

## Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Současný stav řešené problematiky .....	9
2.1.	Chronická lymfocytární leukémie.....	9
2.1.1.	Etiologie chronické lymfocytární leukémie.....	9
2.2.	Biologie chronické lymfocytární leukémie.....	11
2.2.1.	Somatická hypermutace v těžkém imunoglobulinovém řetězci ve variabilním místě.....	12
2.2.2.	Protein kináza 70 asociována s zeta řetězcem .....	13
2.3.	Chromozomové aberace u chronické lymfocytární leukémie .....	13
2.4.	Signální dráhy u chronické lymfocytární leukémie .....	14
2.4.1.	Signální dráhy B-buněčného receptoru.....	15
2.5.	Mikroprostředí u chronické lymfocytární leukémie .....	16
2.5.1.	C-X-C chemokinový receptor 4.....	18
2.5.2.	C-X-C chemokinový receptor 3.....	19
2.5.3.	C-C chemokinový receptor 7 .....	20
2.5.4.	C-X-C chemokinový receptor 5.....	21
2.6.	Léčba chronické lymfocytární leukémie.....	21
2.6.1.	Ibrutinib.....	21
2.6.2.	Idelalisib.....	22
2.6.3.	Venetoclax .....	23
2.6.4.	Rituximab.....	23
2.7.	Principy použitých metod .....	23
2.7.1.	Průtoková cytometrie .....	23
2.7.2.	Kvantitativní PCR v reálném čase .....	26
2.7.2.1.	Kvantitativní PCR v reálném čase s využitím TaqMan® sond .....	26
2.7.2.2.	Kvantitativní PCR v reálném čase s využitím SYBR® Green .....	27
2.7.2.3.	Technologie WaferGen The SmartChip My Design™ .....	27

2.7.3. Statistika.....	28
3. Cíl práce .....	29
4. Materiál a metodika .....	30
4.1. Vybavení laboratoře a materiál .....	30
4.2. Schéma pracovního postupu .....	31
4.3. Soubor pacientů a kontrol .....	31
4.4. Relativní genová exprese .....	32
4.4.1. Izolace mononukleárních buněk a RNA .....	32
4.4.2. Reverzní transkripce .....	32
4.4.3. Kvantitativní PCR.....	33
4.5. Proteinová exprese .....	37
5. Výsledky .....	40
5.1. Analýza genové exprese chemokinových receptorů.....	40
5.2. Analýza proteinové exprese průtokovou cytometrií .....	45
5.3. Proteinové expresní profily.....	47
5.4. Shrnutí výsledků .....	48
6. Diskuse.....	50
7. Závěr .....	53
9. Seznam použitých zkratk .....	68



## 1. Úvod

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění, které je charakterizováno proliferací a akumulací klonů neoplastických B-lymfocytů v kostní dřeni a lymfatických uzlinách a periferní krvi. CLL je jednou z nejčastějších leukémií vyskytujících se u dospělých jedinců v západních zemích. V současné době není známa přesná příčina vzniku tohoto onemocnění, pouze rizikové faktory predisponující k tomuto onemocnění, jako jsou například věk nebo genetická predispozice. I přes rozsáhlý výzkum v této oblasti zůstává CLL stále nevléčitelným onemocněním.

Důležitou roli v přežívání maligních B-lymfocytů hraje jejich mikroprostředí, které je zajišťováno mimo jiné i chemokiny, nízkomolekulárními peptidy s chemotaktickými účinky a řadou dalších působků. Receptory chemokinů a jejich ligandy jsou zapojeny do regulace klíčových dějů v patogenezi CLL, jako například migrace, buněčné přežívání a proliferace. Komplexní expresní profil jednotlivých chemokinových receptorů a jejich podskupin však u pacientů s CLL stále chybí.

V této práci jsme se proto zaměřili na studium expresních profilů známých signálních chemokinových receptorů v periferních mononukleárních buňkách získaných u pacientů s CLL a jejich srovnání se zdravými kontrolami. Dále jsme provedli subanalýzu, kdy byly srovnány genové expresní profily u pacientů s CLL rozdělených podle prognosticky významných cytogenetických aberací del(17p) a del(13q). Studie genových profilů vybraných chemokinových receptorů byla doplněna o proteinovou expresní studii. Identifikace klíčových chemokinových receptorů může přispět k objasnění patogeneze tohoto stále nevléčitelného onemocnění.

## **2. Současný stav řešení problematiky**

### **2.1. Chronická lymfocytární leukémie**

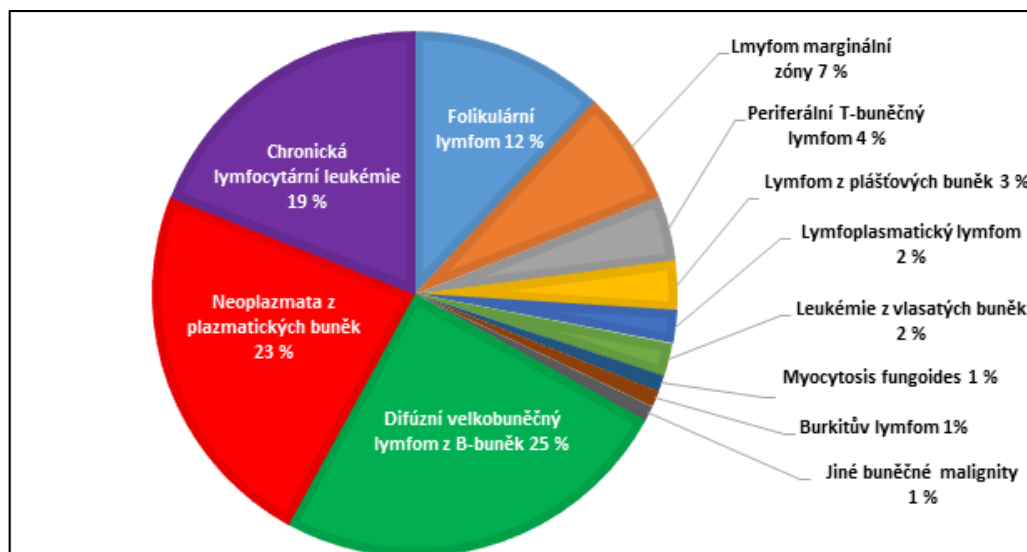
Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je onemocnění krve a kostní dřeně. Vývoj tohoto onemocnění začíná při hematopoéze, kdy z hematopoetických kmenových buněk vznikají abnormální B-lymfocyty. Leukemické buňky exprimují také odlišné molekuly a spouští jiné signální dráhy, které zajišťují jejich přežívání a klonální množení. Leukemické buňky se hromadí v kostní dřeni a sekundárních lymfatických orgánech a utlačují tak proliferaci nejen zdravých B-lymfocytů, ale i ostatních krevních derivátů. Následkem toho se mohou objevovat další přidružené komplikace onemocnění CLL jako je infekce, anémie nebo trombocytopenie. CLL je jednou z nejčastějších leukémií vyskytujících se u dospělých jedinců (Teras et al. 2016). V současné době není známa přesná příčina vzniku CLL, pouze rizikové faktory, kterými jsou například věk nebo genetická predispozice. Pacienti s CLL se dělí do několika prognostických tříd, podle kterých jim lékař určí odpovídající léčbu, a to buď pomocí dostupných chemoterapeutik, radioterapie nebo pacienta doporučí jako vhodného kandidáta pro transplantaci kostní dřeně. Nově se vybraným pacientům podávají inhibitory signální dráhy B-buněčného receptoru (BCR) a BCL2 antagonisté. I přes dosavadní rozsáhlý výzkum v této oblasti zůstává CLL stále nevléčitelným onemocněním (Morrison et al. 2016).

#### **2.1.1. Etiologie chronické lymfocytární leukémie**

CLL je jednou z nejčastějších forem leukémie vyskytující se v západních zemích (viz Obrázek 1). Toto onemocnění se vyskytuje s větší četností u lidí nad 65 let a až 1,96 krát častěji postihuje muže než ženy (Teras et al. 2016b). V České republice je průměrný věk pacienta v době stanovení diagnózy 72 let (Panovská et al. 2013).

Příčina vzniku CLL není doposud známá, víme pouze o rizikových faktorech, které prokazatelně přispívají k rozvoji nemoci. Jedním z těchto rizikových faktorů je rodinná anamnéza. Téměř 12 % pacientů s CLL má příbuzného se stejnou diagnózou (6 - 9 %) nebo jiným lymfoproliferativním onemocněním. Ze statistik vyplývá, že výskyt CLL je u nejbližších příbuzných pacienta s CLL 3 – 8 krát vyšší než u běžné populace (Yuille et al. 1998, Capalbo et al. 2000). Jednou z příčin dědičnosti CLL mohou být somatické hypermutace v těžkém globulinovém řetězci ve variabilním místě genu (*IgVH*), které byly prokázány u 68 % případů dědičné CLL (Crowther-Swanepoel et al. 2008). Dalším, velice významným dědičným faktorem, který je asociován se vznikem CLL, je výskyt jednonukleotidových polymorfismů

(SNP) v jednom ze 13 lokusů: *10q23.31*, *18q21.33*, *11p15.5*, *4q25*, *2q33.1*, *9p21.3*, *18q21.32*, *15q15.1*, *2p22.2*, *2q13*, *8q22.3*, *5p15.33* nebo *2q33.1* (Berndt et al. 2013).



Obrázek 1: Četnost výskytu CLL v USA (převzato z Teras 2016)

Průběh CLL je velice různorodý, od velmi pomalého průběhu nemoci až po rapidní a velmi agresivní zvrát, který končí předčasným úmrtím (Kron et al. 2016). V průběhu nemoci se u pacientů stanovuje klinické stádium onemocnění dle stážovacích systémů Rai a Bineta, ve kterých jsou pacienti klasifikováni podle množství maligních lymfocytů, morfologie lymfocytů nebo přítomnosti anémie či trombocytopenie (Rai et al. 1975, Binet et al. 1981). Medián přežití je u pacientů s CLL 72 měsíců, doba přežití však záleží na klinickém průběhu CLL, cytogenetických změnách a přidružených onemocnění a komplikacích (Doubek et al 2010). Nejdůležitějšími markery pro zařazení do prognostické skupiny jsou: somatická hypermutace *IgVH* (variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu), přítomnost cytoplasmatického proteinu ZAP-70, chromozomové aberace a výskyt somatických mutací v CLL-asociovaných genech (Preetesh J. 2012).

Nebylo prokázáno, že časné zahájení léčby pacientů v raném stádiu onemocnění by mělo pozitivní vliv na průběh nemoci, spíše naopak (Dighiero et al. 1998). V případě postupu onemocnění podstupuje pacient kombinovanou chemoimunoterapii, která je velice agresivní, umožňuje však navodit až několikaletou kompletní remisi. Tato forma léčby je, na základě klinických vyšetření, vybrána pacientovi přímo na míru (Panovská et al. 2013b). Náklady na léčbu jednoho pacienta se pohybují v průměru okolo 157 000 \$ (Shanafelt et al. 2015). Cílem probíhajících výzkumů zabývajících se vývojem léčiv pro CLL je zkvalitnění života po dobu léčby a vývoj léků, které by byly šetrné i k pacientům hlavní

věkové skupiny CLL (nad 65 let). Do budoucna je cílem snížení celkových nákladů na léčbu a zpřístupnění léčby pro větší množství pacientů.

## 2.2. Biologie chronické lymfocytární leukémie

CLL je lymfoproliferativní onemocnění s dlouhodobě zvýšenou hladinou lymfocytů nad  $5 \times 10^9/l$ . Dochází k proliferaci a akumulaci neoplastických B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem (CD5+, CD19+, CD20+, CD23+) v kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině, které následně potlačují vznik ostatních krevních derivátů (Rozman et al. 1995, Papajík et al. 2002). Maligní B-lymfocyty produkují transformující růstový faktor (TGF), který podporuje proliferaci maligních B-lymfocytů, a naopak zamezuje proliferaci zdravých lymfocytů. Dále mají maligní lymfocyty zvýšenou expresi proteinu B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) patřícího do rodiny regulačních proteinů. Bcl-2 se podílí na regulaci apoptózy a v případě CLL má anti-apoptotické účinky. Interakce maligních lymfocytů s jejich mikroprostředím (stroma, cytokiny) může zvýšit anti-apoptotickou funkci a vést tak k delšímu přežívání maligních B-lymfocytů (Wang et al. 2011, Tichioni et al. 2007, Kipps 2003).

B-lymfocyty jsou buňky zodpovědné za specifickou imunitní odpověď. Tuto specifickou imunitní odpověď, vyznačující se produkcí protilátek, jsou schopné zprostředkovat pomocí širokého repertoáru antigenních receptorů, například B-buněčných receptorů (BCR) a expresí imunoglobulinů. BCR se u populace B-lymfocytů zdravých jedinců vyznačuje extrémní diversitou díky tzv. *error-prone* procesu DNA polymerázy 4, která zajišťuje přestavbu segmentů H (z ang. *heavy*) imunoglobulinového řetězce (V, D, J geny) a L (z ang. *light*) imunoglobulinového řetězce (V, J geny) (Brack et al. 1978). Pravděpodobnost, že dva na sobě nezávislé B-lymfocyty nesou přesně ten samý BCR je menší než  $10^{-12}$ . Naproti tomu maligní B-lymfocyty izolovány od různých pacientů s CLL nesou podobný nebo úplně identický BCR, zároveň se tyto buňky vyznačují velmi podobnou expresí povrchových markerů (Widhopf et al. 2007).

U jedinců s nejbližším příbuzným trpícím CLL byla zaznamenána proliferace B-lymfocytů s povrchovými antigeny stejnými, jaké jsou typické pro CLL buňky. Na rozvoj nemoci má vliv (v případě výskytu CLL v rodinné anamnéze) i přítomnost polymorfismů v genech kontrolujících klíčové funkce B-lymfocytů daného jedince (Rawstron et al. 2008). Přeměna prekurzorového B-lymfocytu na maligní B-lymfocyt je umožněna na základě genetických a epigenetických změn. K této přeměně může dojít v jakémkoliv stádiu ontogeneze B-lymfocytu, včetně stádia hematopoetické kmenové buňky (HSC). Některé HSC, které jsou

prekurzory buněk lymfoidní linie obsahující četné přestavby v genu kódujícího imunoglobulinu a T-buněčný receptor. Tyto lymfoidní buňky mohou snadno hromadit genetické abnormality a následkem toho může dojít k rozvoji monoklonální B-buněčné lymfocytózy (MBL). Další proliferace těchto B-lymfocytů je asociována s *de novo* vznikajícími mutacemi. Interakcemi mezi leukemickými buňkami v lymfatické tkáni dochází k rozvoji CLL (Kikushige et al. 2011).

Maligní B-lymfocyty se od těch normálních liší sníženými hladinami povrchového imunoglobulinu a expresí povrchových markerů CD5, CD19 a CD23 (Swerdlow et al. 2008). Maligní B-lymfocyty exprimují tyrosin kinázový sirotčí receptor 1 (ROR1), který je v B-lymfocytech zdravých jedinců exprimován pouze v embryonálním vývoji. V B-lymfocytech zdravých dospělých jedinců se vyskytuje velmi ojediněle a ve velice nízkých hladinách (0,01 % - 0,1 % všech mononukleárních buněk) (Zhang et al. 2013). B-lymfocyty ROR1+ mají dva různé fenotypové projevy (CD19/CD38 znaky nebo CD19/CD27). B-lymfocyty ROR1+ s fenotypovým projevem CD19+/CD38+ zároveň exprimují CD5 a CD23, což jsou markery maligních B-lymfocytů (Milleck et al. 2012). Toto tvrzení naznačuje, že ROR1+ buňky mohou být u zdravých jedinců prekurzory CLL buněk (Zhang et al. 2013b).

### **2.2.1. Somatická hypermutace v těžkém imunoglobulinovém řetězci ve variabilním místě**

Somatická hypermutace IgHV u maligních B-lymfocytů není náhodný proces a u různých IgHV může být velmi odlišná. Přeskupení vazebného místa pro antigen na Ig rekombinací genů V, D, J (H imunoglobulinový řetězec) a V, J (L imunoglobulinový řetězec), může způsobit vyšší afinitu k antigenu (Burger et al. 2013). Tento objev podpořil domněnku, že CLL můžeme rozdělit na dvě skupiny s odlišnou biologií a klinickým významem: se somatickou hypermutací IgHV a bez somatické hypermutace IgHV. U CLL buněk se nejčastěji vyskytují genové varianty *IgHV*: *IGHV1-69*, *IGHV4-34* a *IGHV3-7* (Chiorazzi et al. 2003).

Buňky s přítomnou somatickou hypermutací *IgHV* vykazují vysokou afinitu pouze na omezený výběr antigenních epitopů. Díky tomu, že Ig je schopen zprostředkovat vazbu s antigenním epitopem pouze za podmínek vykazující vůči němu vysokou afinitu, je BCR receptor těchto buněk ve většině případů téměř intaktní (Stevenson et al. 2004, Chiorazzi et al. 2005). Naproti tomu buňky bez somatické hypermutace *IgHV* mají BCR, který vykazuje nízkou afinitu vůči antigenním epitopům. Na tento BCR se může snadno navázat téměř jakýkoliv antigen z mikroprostředí buňky (Hoogeboom et al. 2012). Vazba antigenu

na BCR spouští signální dráhy CLL, které vedou k delšímu přežívání a proliferaci maligních buněk. Proto je *IgHV* důležitým prognostickým faktorem, kdy pacienti se somatickou hypermutací *IgHV* mají vyšší medián přežití než pacienti bez somatické hypermutace *IgHV* (Kipps 1993).

### **2.2.2. Protein kináza 70 asociována s zeta řetězcem**

Důležitou funkci v biologii CLL má cytoplasmatická tyrosin kináza protein kináza 70 asociovaná s zeta řetězcem (ZAP-70). Tento protein se nachází jak v T-lymfocytech, tak i ve zdravých a aktivních B-lymfocytech, kde působí jako stimulant (Nolz et al. 2005). U CLL hraje ZAP-70 klíčovou roli v signální dráze BCR a zároveň je také jedním z hlavních markerů pro maligní B-lymfocyty bez somatické hypermutace *IgHV* (Crespo et al. 2003). Přítomnost tohoto proteinu je asociována s větší buněčnou odpovědí na chemokiny CCL19, CCL21 a CCL12, což má za následek větší migraci buněk a aktivaci signálních drah, které vedou k přežívání ZAP-70<sup>+</sup> buněk (Richardson et al. 2005). ZAP-70 je důležitým prognostickým faktorem u pacientů s CLL, neboť jeho exprese je spojena se zvýšenou aktivitou signální dráhy BCR. ZAP-70 přímo fosforyluje tyrosin kinázu vyskytující se ve slezině (Syk) a je tedy spojován s agresivnějším průběhem CLL (Rassenti et al. 2004).

### **2.3. Chromozomové aberace u chronické lymfocytární leukémie**

CLL je heterogenní onemocnění s velice individuálním postupem, což má velký význam v určení léčebné strategie a prognózy (Hallek et al. 2008). Genetické aberace, stejně jako u jiných typů rakoviny, tak i u CLL mají důležitou funkci v patogenezi onemocnění. CLL je charakterizována relativně stabilním genomem v porovnání s ostatními hematologickými malignitami a nádory. Pouze v 50 % všech případů jsou u pacientů s CLL přítomny genetické abnormality (Smida 2012). Mezi nejvíce frekventované chromozomální abnormality patří parciální ztráty na jednom chromozomu. Nejčastěji postiženými chromozomy v souvislosti s CLL jsou delece na 17p, 13q, 11q a 6q (Baliakas et al. 2014). Cytogenetické abnormality jako je del(11q) a del(17p) jsou důležitými prognostickými markery, neboť jsou asociovány s horší prognózou u nositelů těchto mutací (Hallek et al. 2008b). Avšak nejsou to pouze chromozomové aberace, které jsou spojovány s heterogenitou u CLL. Současné studie ukázaly, že existuje spousta dalších markerů jako jsou mutace v genu *TP53*, *NOTCH1* nebo *BIRC3*, které prognosticky souvisejí s CLL (Puiggros et al. 2014). V této diplomové práci se budu detailněji

zabývat pouze delecemi 17p, 13q a 13q14, protože jsou zahrnuty do cílových skupin zkoumaného souboru pacientů experimentální části této práce.

Pacienti s delecí 17p jsou obecně klasifikováni jako nejrizikovější skupina, která je asociována se špatnou odpovědí na chemoterapii. Při této delecí dochází k deregulaci buněčného cyklu vlivem ztráty genu *TP53* (17p13) (Rossi et al. 2013). Pacienti s CLL a del(17p) jsou dále spojováni s atypickým imunofenotypem, kdy dochází k větší expresi CD20, FMC7, CD79b a povrchových Ig (Quijano et al. 2008). U těchto pacientů jsou také publikovány zvýšené exprese CD38, ZAP-70 a nepřítomnost somatické hypermutace na *IgHV*, které podporují špatnou prognózu (Rassenti et al. 2008).

Delece 13q se vyskytuje u 50 % všech pacientů s CLL s chromozomální aberací, což ji činí nejčastější cytogenetickou abnormalitou vyskytující se u tohoto onemocnění. Pacienti s delecí 13q i 13q14 jsou prognosticky řazeni do kategorie s nízkým rizikem (Puiggros et al. 2014b). V posledních letech byly detekovány v minimální deletované oblasti 13q regiony miRNA-15a a miRNA16-1, které mají funkci tumorsupresorů (Ouillette et al. 2008). Vedle těchto miRNA byly na 13q objeveny další geny jako například *DLEU7*, který se vyznačuje tumorsupresorovou aktivitou. Obecně bylo prokázáno, že velké delece na 13q (*DLEU7*) jsou spojovány s horší prognózou na rozdíl od delecí v minimální deletované oblasti 13q (Klein et al. 2010).

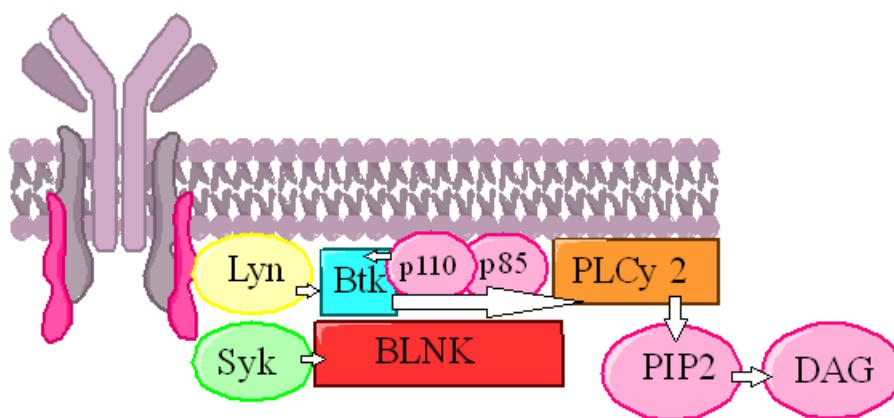
## **2.4. Signální dráhy u chronické lymfocytární leukémie**

Signální dráha je sled na sebe navazujících reakcí vedoucí k buněčné odpovědi. Pomocí signálních drah je umožněna komunikace buněk mezi sebou a koordinace buněčných procesů. Schopnost buňky reagovat na mikroprostředí správnou signální dráhou vede například ke správné funkci imunitního systému či k homeostáze. V případě, že dojde k nějaké chybě v tomto informačním procesu, dochází k patologickým procesům. Rozklíčování signálních drah jednotlivých nemocí je jedním z hlavních úkolů vědy, jelikož zablokování jednotlivých částí signální dráhy může mít potencionální terapeutické využití.

V této diplomové práci se budu zabývat především signální dráhou B-buněčného receptoru (BCR) a stručně popíši i klíčové molekuly této signální dráhy jako jsou Brutonova tyrozinkináza (Btk), fosfoinositid fosfolipáza C (PLC- $\gamma$ 2) a fosfatidylinositol-4,5,-bisfosfát 3-kináza (PI3K), které jsou s BCR propojeny a jsou velice důležité pro pochopení role chemokinových receptorů v patogenezi CLL.

### 2.4.1. Signální dráhy B-buněčného receptoru

B-buněčný receptor (BCR) je přítomen jak u normálních, tak u maligních B-lymfocytů. V patogenezi CLL však hraje BCR signální dráha klíčovou roli při přežívání a růstu maligních buněk (Woyach et al. 2012). BCR se skládá z imunoglobulinu IgM, který je nekovalentně připojen k heterodimeru CD79 $\alpha$  (Ig $\alpha$ ) /CD79 $\beta$  (Ig $\beta$ ). Když se na IgM naváže antigen, tak Immunoreceptor thyrosine-based activation motif (ITAM, neboli část heterodimeru CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$ ) je fosforylována kinázami Syk, zprostředkovávající dvojitou fosforylaci heterodimeru CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$  a Lyn tyrosinová kináza, která zprostředkovává stálou amplifikaci signálu přes BCR. Ve výsledku dochází k agregaci celého signálního komplexu BCR (Rolli et al. 2002, Fearon et al. 2002). Tento signální komplex se podílí na transdukcii signálu a vede ke spuštění 3 hlavních signálních drah BCR: Btk, PLC- $\gamma$ 2 a PI3K (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Signální dráha BCR u chronické lymfocytární leukémie. (převzato z Woyach et al. 2012 b)

Btk patří do skupiny tyrosinových kináz. Primárně je přítomna v hematopoetických buňkách a v některých případech u B-lymfocytů, nevyskytuje se však u plasmatických buněk či T-lymfocytů (Genevier et al. 1994). Btk zprostředkovává přímou transdukcii signálu z BCR (Petro et al. 2001). Ke spuštění Btk signální dráhy dochází pomocí tyrosinových kináz Syk a Lyn. Btk následně aktivuje transkripční faktor (NF- $\kappa$ B), který může mít antiapoptické účinky nebo vést k proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů (Petro et al. 2001b). Btk je spouštěna nejen přes BCR, ale také přes CXCR4 a CXCR5, což má za následek migraci a adhezi B-lymfocytů (Spaargaren et al. 2003).

Fosfolipázy C (PLC) jsou enzymy patřící do velké enzymatické rodiny fosfolipáz C. Obecně jsou přítomny zejména v hematopoetických buňkách, přičemž fosfolipáza PLC- $\gamma$ 2 je exprimována pouze v B-lymfocytech. PLC- $\gamma$ 2 je jedním z nejdůležitějších enzymů v signální dráze BCR. Aktivace PLC- $\gamma$ 2 probíhá tak, že Btk spolu se Syk a Lyn fosforylují PLC- $\gamma$ 2, který hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), čímž dochází k aktivaci druhého posla

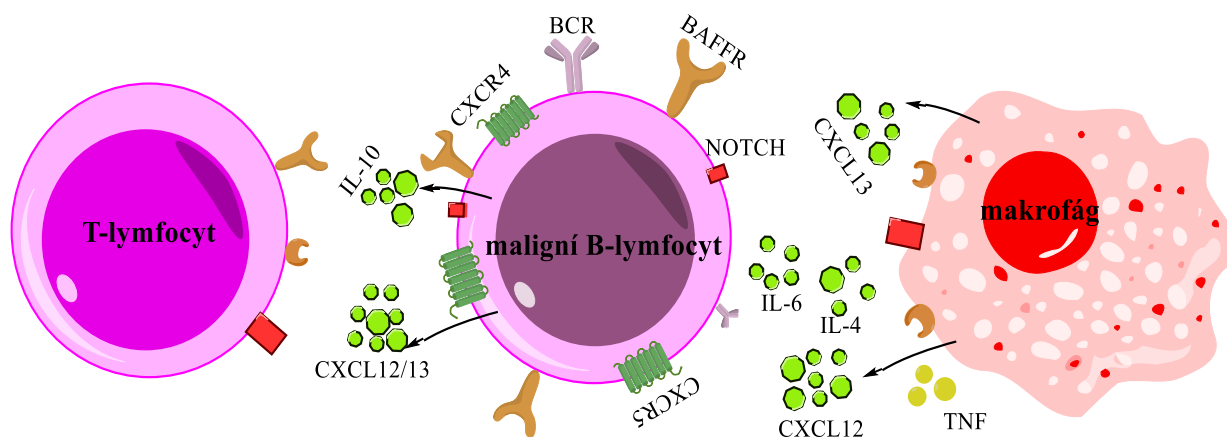


diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP<sub>3</sub>). DAG působí jako potencionální agonista BTK, spouští fosforylaci protein kinázy C, která dále způsobuje aktivaci signálních drah BCR v různých místech (Petro et al 2001c). IP<sub>3</sub> zprostředkovává skrz kalmodulin influx vápníku z endoplazmatického retikula do buňky, který je nezbytný pro reaktivaci BCR (Roos et al. 2005, Fluckiger et al. 1998).

PI3K je rozdělena do 3 tříd, klíčovou roli v homeostáze a funkci B-lymfocytů hraje signální dráha PI3Kδ (Jou et al. 2002). Signální dráha PI3K je spouštěna přes BCR a CXCR pomocí signálů z mikroprostředí. PI3K řídí migraci buněk, buněčný růst a přežívání buněk (Srinivasan et al. 2009, Okkenhaug et al. 2003). Aktivace PI3K vede k přeměně PIP<sub>2</sub> (zde dochází ke kompetici mezi PI3K a PLC-γ2) na fosfatidylinositol-1,4,5-trisfosfát (PIP<sub>3</sub>), což vede ke spuštění AKT/mTOR, a ERK signálních drah, které se podílejí na transformaci normální buňky v nádorovou (Woyach et al. 2012, Chen et al. 2005). U pacientů bez somatické hypermutace *IgHV* byla zjištěna nadměrná exprese PI3K, přičemž u CLL buněk zůstává PI3K neustále aktivována (Kienle et al. 2006).

## 2.5. Mikroprostředí u chronické lymfocytární leukémie

Přežívání maligních B-lymfocytů striktně závisí na mikroprostředí. Hypotéza „*seed and soil*“ od Stephena Pageta pochází už z roku 1889 a říká, že všechny rakovinné buňky jsou schopny průběžného vývoje, ale růstu jsou schopné jenom ty, které se nacházejí v příslušném orgánu, který jim zabezpečuje vhodné mikroprostředí (Nguyen et al. 2016). Mikroprostředí obecně dokáže zabraňovat CLL buňkám v apoptóze a udržuje je tak stále při životě, zajišťuje jejich proliferaci, migraci a reguluje jejich buněčný cyklus (Choi et al. 2016). Vliv mikroprostředí je zajištěn různými druhy interakcí mezi buňkami, ať už přímo mezibuněčnou komunikací, nebo působením cytokinů (viz Obrázek 3).



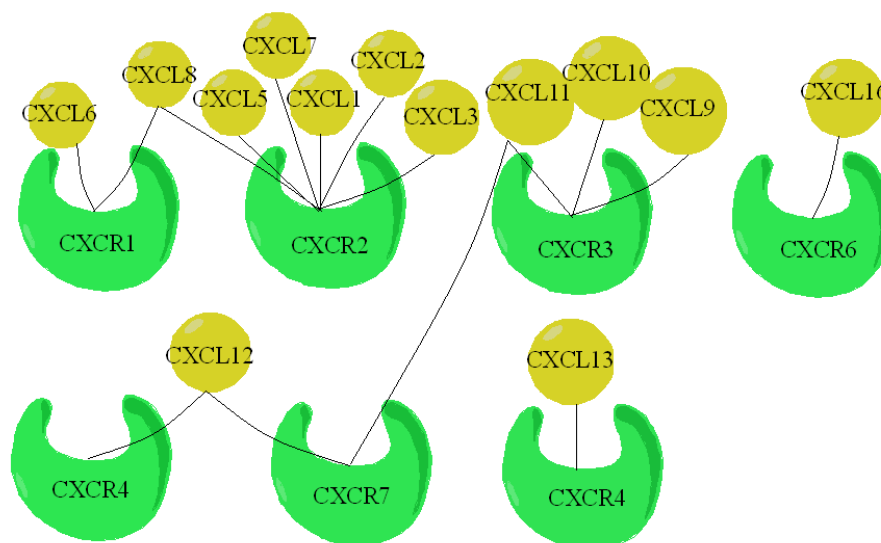
Obrázek 3: Interakce CLL buňky s mikroprostředím (převzato z Wiestner 2015).

Leukemické buňky jsou specifické expresí charakteristických receptorů a ligandů, které působí v jejich autokrinních drahách (NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt) a pomáhají tak k přežívání buňky (Munk et al. 2008 b). U CLL zajišťuje mikroprostředí hlavně kostní dřeň a sekundární lymfatické orgány. K proliferaci CLL buněk dochází v mikroanatomické struktuře nazývané proliferativní centrum, které je v histopatologii charakteristickým znakem CLL. V těchto proliferativních centrech dochází ke kontaktu CLL buněk s dalšími buňkami, které společně s okolní matrix vytvářejí CLL mikroprostředí (Stein et al. 1980):

- *Nurse-like* buňky (NLC) - exprimují adhezní molekuly a interagují s CLL buňkami pomocí cytokinů a chemokinů, také aktivují B-buněčný aktivační faktor, CD14 a proliferaci indukující ligand, což vede k expresi antiapoptických genů jako je *BCL2* nebo *SURVIVIN* (Cols et al. 2012)
- T-lymfocyty - mají u pacientů s CLL četné funkční defekty a jsou u nich exprimovány „*exhaustion*“ markery (CD22 a CD160), což způsobuje narušení cytotoxicity a migraci těchto buněk (Fecteau et al. 2012)
- Mezenchymální kmenové buňky (MSC) - zajišťují průběžnou sekreci chemokinů pro CLL buňky. Při přímém kontaktu s maligním B-lymfocitem podporují buněčné přežívání a aktivují ZAP70 a CD38. U CLL buněk také aktivují signální dráhu ROR1, která pomáhá přežívání buňky a zároveň indukuje expresi NF- $\kappa$ B (Purroy et al. 2015, Burger et al. 2013b)
- Přirození zabíječi (NK buňky) - mají u pacientů s CLL narušenou polymerizaci aktinu a schopnost komunikace s okolním prostředím. V NK buňkách pacientů s CLL také dochází k expresi lidského leukocytárního antigenu G, který snižuje cytotoxicitu NK a spouští u nich apoptózu (Maki et al. 2008).

CLL buňky v mikroprostředí mají aktivované receptory B-cell maturation antigen (BCMA) a faktor aktivující B-buňky B-cell activating factor receptor (BAFF), které mimo jiné pomáhají při aktivaci BCR (Cols et al. 2012). Interakce CLL buněk s mikroprostředím jsou stále předmětem výzkumu, jelikož odhalení těchto interakcí by mohlo mít potencionální terapeutické využití. Nedílnou součástí mikroprostředí CLL jsou i chemokiny. Chemokiny jsou peptidy o velikosti 8-12 kDa (přibližně 350 aminokyselin), které slouží jako chemoatraktanta. Superrodina chemokinů je rozdělena do 4 tříd (CXC, CX<sub>3</sub>C, CC a C) podle pozice 2 nejbližších párů cysteinů v sekvenci aminokyselin (Mudroch et al. 2000). Chemokiny mohou působit také jako mediátory ve významných signálních drahách CLL, například Btk. Obecně platí, že jeden

chemokinový ligand se může navázat na více receptorů a zároveň jeden chemokinový receptor může sloužit pro více chemokinových ligandů (viz Obrázek 4) (Balkwill 2004).



Obrázek 4: Chemokinové receptory třídy C-X-C a jejich ligandy (převzato z Proudfoot 2002).

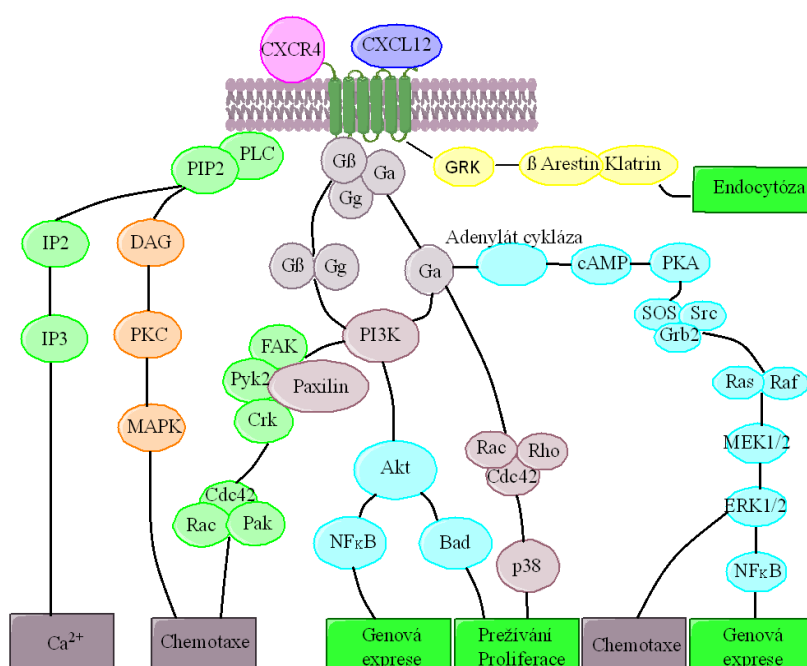
Cílem chemokinů je zprostředkovat migraci imunitních buněk do cílových míst. Všechny chemokinové receptory jsou charakteristické svými sedmi transmembránovými doménami na N-konci spřažené s G-proteinem (Mudroch et al. 2000b). Mezi nejvýznamnější chemokinové receptory v souvislosti s CLL patří CXCR4, CCR7 a CXCR5, které pomáhají při migraci maligních B-lymfocytů z periferní krve do sekundárních lymfatických orgánů (Borge et al. 2010). Zatímco komponenty mikroprostředí (NLC) sekretují chemokiny CXCL12, CXCL11, CXCL10, CLL buňky v periferní krvi exprimují na svém povrchu chemokinové receptory CXCR4, CXCR5 a CCR7. Interakce mezi ligandy a receptory vede k chemotaxi CLL buněk do tkáně, kde se nachází příznivé mikroprostředí (Davis et al. 2012). Interakce mezi ligandy a receptory v CLL ovlivňuje nejen migraci, ale podle nejnovějších studií i buněčný cyklus, apoptózu nebo proliferaci maligních B-lymfocytů (Choi et al. 2016).

### 2.5.1. C-X-C chemokinový receptor 4

Jedním z nejlépe prostudovaných chemokinových receptorů je chemokinový receptor CXCR4 (CD184). CXCR4 je exprimován na hematopoetických kmenových buňkách, T-lymfocytech, B-lymfocytech, monocYTEch, v makrofázích, neutrofilech a eozinofilech. Signální dráhy CXCR4 hrají klíčovou roli v tumorogenezi.

Ligandem pro CXCR4 je CXCL12 (SDF-1), který je exprimován v mnoha tkáních a může být příčinou vzniku metastáz. Při navázání CXCL12 na CXCR4 dochází ke spuštění

několika různých signálních drah, které jsou spojeny s chemotaxí, proliferací, přežíváním a migrací buňky (viz Obrázek 5). Spojení CXCL12/CXCR4 je zapojeno i v angiogenezi a tumorogenezi. Po navázání CXCL12 na CXCR4 dochází k fosforylaci GDP na GTP u  $G\alpha$  podjednotky G-proteinu. GTP způsobí rozpad G-proteinových podjednotek na  $G\alpha$  podjednotku, která aktivuje adenylát cyklázu a ta následně aktivuje protein kinázu A (PKA), nebo spouští signální dráhu Raf či Ras kináz, což má za výsledek aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B (pro přežívání buňky). Další podjednotky G-proteinu  $G\beta$ + $G\gamma$  aktivují signální dráhu PI3K nebo PLC. Zablokování interakce CXCL12/CXCR4 nebo inhibice signálních PI3K a PLC drah představuje jeden ze současných terapeutických cílů (Beverly et al. 2010).



Obrázek 5: Signální dráhy CXCL12-CXCR4 (převzato z Beverly et al. 2010).

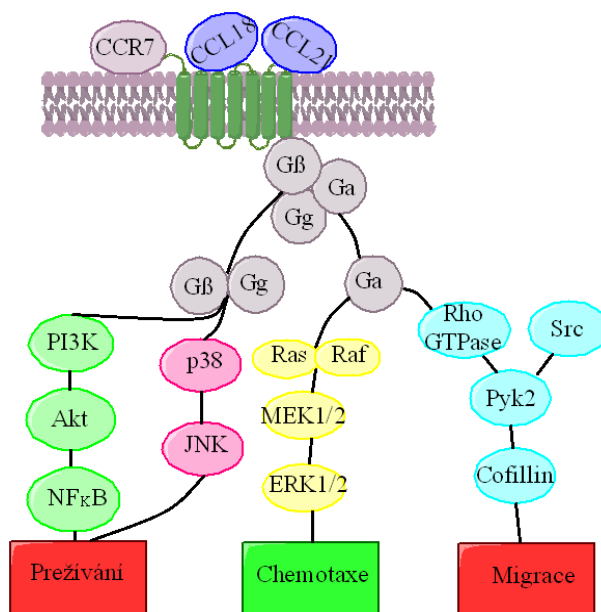
### 2.5.2. C-X-C chemokinový receptor 3

Chemokinový receptor CXCR3 (CD183) je exprimován v aktivovaných T-lymfocytech, NK buňkách a malé populaci zdravých B-lymfocytů při zánětu (Qin et al. 1998). Jelikož je exprese CXCR3 v maligních B-lymfocytech prokazatelně zvýšena, může sloužit jako biomarker u řady B maligních onemocnění, včetně CLL (Trentin et al. 1999). Snížená exprese CXCR3 u maligních B-lymfocytů je spojována s pokročilým stádiem CLL a zhoršenou prognózou pro pacienty (Ocaña et al. 2007). Naopak zvýšená exprese CXCR3 a snížená exprese CXCR4 jsou spojovány s obecně lepší prognózou. Přírodními ligandy CXCR3 v mikroprostředí CLL jsou CXCL9, CXCL10 a CXCL11, které jsou produkovány

aktivovanými T-lymfocyty, endoteliárními buňkami a makrofágy stimulovanými IFN $\gamma$  (Jones et al. 2000, Sauty et al. 1999). Po navázání CXCL9 na CXCR3 dochází k aktivaci mnoha signálních drah jako jsou Ras/ERK, Src a PI3-K/Akt, které regulují buněčný cyklus, buněčnou proliferaci a migraci (Bonacchi et al. 2001).

### 2.5.3. C-C chemokinový receptor 7

Chemokinový receptor CCR7 (CD197) je u maligních B-lymfocytů nadměrně exprimován. Zvýšená exprese CCR7 pomáhá k přežívání maligních B-lymfocytů a infiltraci těchto lymfocytů do lymfatických uzlin (Förster et al. 2008). Ligandy CCR7 jsou produkty stromatických buněk CCL19 a CCL21, které hrají ve fyziologických podmínkách důležitou roli při distribuci nezralých B a T buněk v těle. U CLL dochází po navázání CCL19/21 na CCR7 k aktivaci G-proteinu a jeho rozpadu na podjednotku  $\alpha$  a heterodimer  $\beta$  a  $\gamma$ . Podjednotka G-proteinu  $\alpha$  aktivuje systém kináz Ras/Raf a ty následně aktivují MAP kinázy a extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Podjednotka  $\alpha$  také aktivuje MAP kinázu p38. p38 společně s ERK 1/2 aktivují c-Jun N-terminal kinase (JNK). JNK je MAP kináza, která je charakteristická pro zprostředkování chemotaxe. Endocytóza B-lymfocytu je zajištěna díky CDK42/Rac. Buněčné přežívání a migraci buněk do sekundárních lymfatických orgánů je zprostředkováváno pomocí NF- $\kappa$ B (Till et al. 2002) (viz Obrázek 6). Zvýšená exprese CCR7 je pozorována u pacientů s expresí ZAP-70. Výzkumy také potvrdily, že právě ZAP-70 řídí expresi CCR7 přes ERK1/2 signální dráhu (Calpe et al. 2011).



Obrázek 6: Signální dráhy CCR7-CCL19/21 (převzato z Lijima et al. 2005).

#### **2.5.4. C-X-C chemokinový receptor 5**

Chemokinový receptor CXCR5 (CD185) je exprimován pouze u zralých B-lymfocytů, malých populací CD4+ a CD8+ T-lymfocytů a dendritických buněk (Muller et al. 2003). Ligandem CXCR5 je CXCL13, který je sekretován stromatickými buňkami v sekundárních lymfatických orgánech. Po navázání CXCL13 na CXCR5 dochází ke zvýšené migraci buněk B-lymfocytů, polymerizaci aktinu a aktivaci ERK 1/2 MAPK signální dráhy, viz výše (Davis et al. 2012).

### **2.6. Léčba chronické lymfocytární leukémie**

CLL je pomalu progredující onemocnění s pětiletým mediánem přežití 82 % CLL pacientů (American Cancer Society 2013). Léčebné postupy CLL prodělaly za posledních 10 let velké změny, ale navzdory množství nových terapeutických produktů, zůstává CLL nadále nevléčitelným onemocněním (Morrison et al. 2016b). Léčba je pro každého pacienta individuální a „šitá na míru“ podle jeho věku, prognostických faktorů a přidružených onemocnění a komplikací (viz výše). Zahájení léčby se v České republice řídí protokolem z National Cancer Institute-Working Group (Hallek et al. 2008). U pacientů ve věkovém rozmezí 60-65 let a mladších bez významných komorbidit je doporučena alogenní transplantace kostní dřeně, neboť transplantace je jedinou možnou nadějí na úplné vyléčení.

Léčba prošla v posledních desetiletích významnými změnami od léčby cytotoxickými léčivy, například chlorambucilem či cyklofosfamidem, až k terapii purinovými nukleosidovými analogy (fludarabin) či imunoterapeutiky (rituximab, ofatumumab, alemtuzumab). Použití kombinované terapie fludarabin, cyklofosfamid, rituximab (FCR) nebo bendamustin, rituximab (BR) je mnohonásobně účinnější a může vést ke kompletní nebo alespoň parciální remisi (Eichhorst et al. 2016). Nasazení správné terapie však stále záleží na aktuálním stavu pacienta, kdy je možno přejít od více agresivní, avšak účinnější kombinované terapie k monoterapii, která není natolik agresivní, ale zato méně účinná. V současné době má stále větší potenciál terapie pomocí inhibitorů BCR signální dráhy a BCL2 antagonistů. Mezi tyto terapeutika patří léčiva ibrutinib, idelalisib a venetoclax, kterými se budu v této práci podrobněji zabývat.

#### **2.6.1. Ibrutinib**

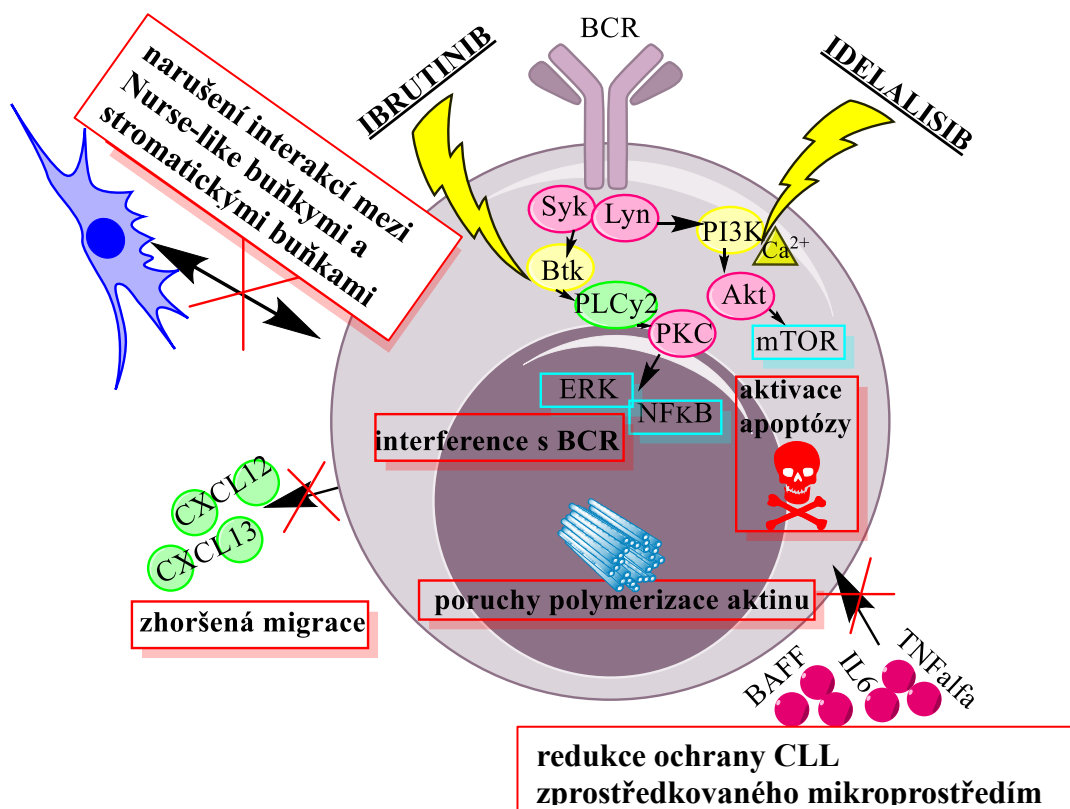
Ibrutinib je selektivní ireversibilní inhibitor BTK patřící do skupiny malých molekul. Mechanismus účinku ibrutinibu spočívá v kovalentní vazbě na proteinový komplex BTK (Cys 481 v ATP vazebné doméně kinázy), čímž znemožní její fosforylaci a zablokuje klíčovou

signální dráhu BCR. U B-lymfocytů se zablockovanou BTK signální dráhou je spuštěna apoptóza (mitochondriální apoptotická dráha). Ibrutinib je tedy látka, která na maligní B-lymfocyty působí tak, že podporuje jejich apoptózu, zabraňuje proliferaci a narušuje komunikaci s mikroprostředím prostřednictvím (Maffei et al. 2015) (viz Obrázek 7). Naneštěstí přibližně 30 % pacientů s CLL vykazuje primární rezistenci na ibrutinib, která může být způsobena mutací BTK (Byrd et al. 2013). Ibrutinib se využívá i při kombinované terapii například s rituximabem či idelalisibem.

## 2.6.2. Idelalisib

Idelalisib je selektivní inhibitor PI3K $\delta$  signální dráhy patřící do skupiny malých léčiv. Zablokováním PI3K $\delta$  dochází k blokaci BCR a následné apoptóze buňky (de Rooij et al. 2015) (viz Obrázek 7). Idelalisib se v terapii využívá u pacientů po relapsu nejčastěji v kombinované terapii s rituximabem či ibrutinibem.

Kombinace terapeutik ibrutinibu a idelalisibu spočívá v synergii, kdy Ibrutinib inhibuje BTK, ale kovalentně vázaný může také vázat a blokovat PIP<sub>3</sub>. Idelalisib je v tomto případě schopen inhibovat vazbu, která je zodpovědná za translokaci a aktivaci PLC- $\gamma$ 2 - substrátu BTK (de Rooij et al. 2015b).



Obrázek 7: Mechanismus účinku idelalisibu a ibrutinibu na CLL buňku (převzato z Maffei et al. 2015)

### **2.6.3. Venetoclax**

Venetoclax je novinkou v chemoterapii, která se doporučuje pacientům s CLL po relapsu, nereagujícím jedincům na léčbu nebo pacientům s CLL se shoršenou prognózou díky přidružené chromozomové aberaci del(17p). Venetoclax patří do skupiny malých léčiv podávaných per orálně. Jde o selektivní inhibitor antiapoptotických proteinů patřící do proteinové rodiny Bcl-2. Venetoclax se váže na antiapoptotický protein, který inhibuje. V tomto důsledku dochází ke zvýšení koncentrace proapoptických proteinů jako je například BIM (protein Bcl-2 rodiny), který spouští mitochondriální dráhu apoptózy aktivací kaspázy 9 (Center for drug evaluation and research 2015).

### **2.6.4. Rituximab**

Rituximab patří do skupiny imunoterapeutik, konkrétně se jedná o monoklonální protilátku proti znaku CD20. Rituximab byl prvním lékem svého typu, který byl schválen k léčbě rakoviny. Používá se jak v monoterapii, tak v kombinované terapii jako takzvaný „zlatý standard“ (FCR). Jeho hlavní nevýhodou je rezistence některých pacientů, kteří jsou refrakterní k rituximabu (Smith 2003).

Povrchový antigen CD20 je exprimován v různých vývojových stádiích B-lymfocytů až po plasmatickou buňku. Role CD20 v buněčné signalizaci není jasná, avšak signalizace přes CD20 je zapojena v diferenciaci B-lymfocytů (Reff et al. 1994, Tedder et al. 1985). Vazba rituximabu na CD20 na B-lymfocytu vede k aktivaci kaspázy-3 a následně apoptóze buňky (Alas et al. 2002).

## **2.7. Principy použitých metod**

### **2.7.1. Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je běžná metoda využívaná pro detekci CLL buněk. Simultánně měří a analyzuje fyzikální vlastnosti dané částice, zpravidla jedné buňky. U buněk lze měřit jejich relativní velikost, relativní granularitu a intenzitu fluorescence. Pomocí průtokové cytometrie je možné také buňky počítat nebo je v případě speciálních průtokových cytometrů třídit. Průtokový cytometr se skládá ze tří částí: optická část, fluidika a zobrazovací část.

V optické části se nacházejí lasery, optické filtry, dichroická zrcadla a fotonásobiče. Pomocí laseru dopadajícího na danou částici dojde k absorpci a následně emisi světla o větší vlnové délce a menší frekvenci. Tento paprsek je následně veden pomocí dichroických zrcadel a optických filtrů do příslušného optického filtru, který paprsek propustí. Poté je jeho signál

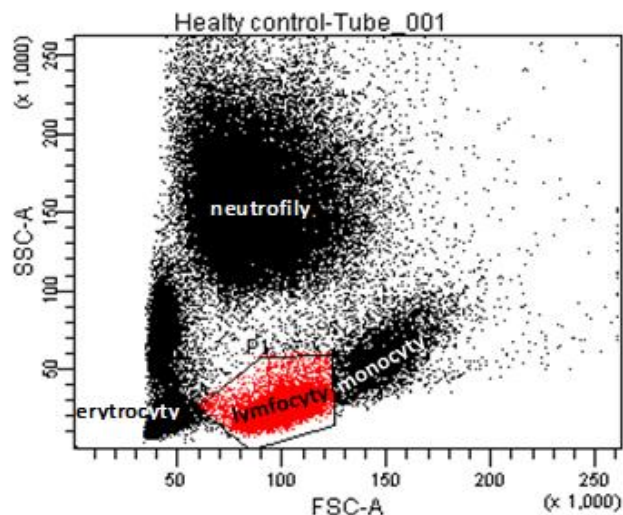


veden do odpovídajícího fotonásobiče. Z fotonásobiče je pak signál veden do daného detektoru, kde je zpracován (BD Biosciences, 2000). Různé cytometry se liší počtem laserů (1-7) a uspořádáním optických filtrů a detektorů (až 49 detektorů).

Laser průtokového cytometru je veden skrz úzký proud tekutiny (vzorek v unášecí kapalině). Pro optimální výsledek, je třeba, aby se buňka nacházela přímo uprostřed vodního paprsku. Pro dosažení tohoto cíle je průtokový cytometr složen z velice složitého hydraulického kapalinového systému, kde se využívá hydrodynamické fokusace. Hydrodynamická fokusace je jev, kdy dochází k soustředění vzorku do úzkého proudu pomocí unášecí kapaliny. Na tyto kapaliny je vyvíjen rozdílný tlak (tlak unášecí kapaliny je větší). Tlaky jednotlivých kapalin musí být předem dobře nastaveny, neboť nesmí docházet k turbulentnímu proudění a zároveň musí být tlak dostatečně velký na to, aby vyvolané zrychlení v průtokovém otvoru stimulovalo buňky pohybovat se jednotlivě a do ohniska světelného zdroje se tak dostávala vždy pouze jedna buňka (Doležel 2007).

Detektory převádí detekované světelné signály na elektrické impulzy, které jsou amplifikovány pomocí fotodiod. Tyto signály jsou dále digitalizovány a zpracovány pomocí softwaru.

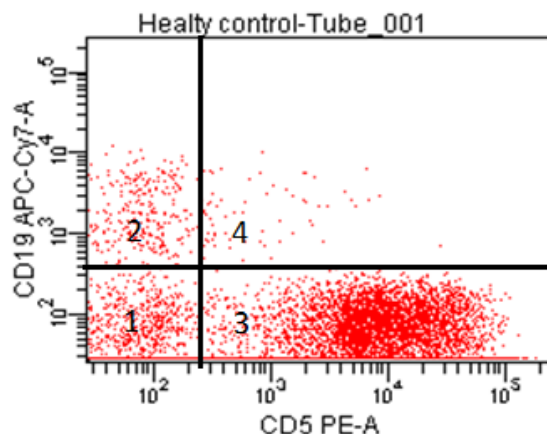
Po vložení vzorku do průtokového cytometru dochází k jeho hydrodynamické fokusaci do úzkého proudu, kterým v jednom bodě procházejí dva na sebe kolmé laserové paprsky. Tyto dva laserové paprsky měří přední (FSC) a boční rozptyl (SSC) světla. Díky FSC můžeme změřit velikost buňky, díky SSC měříme granularitu buňky (Doležel 2007b). Pomocí těchto dvou údajů jsme, například v periferní krvi, schopni od sebe odlišit jednotlivé buněčné populace ve dvouparametrovém bodovém grafu (dot-plot graf), který zobrazuje množství buněk pomocí hustoty bodů. Cílovou skupinu buněk, kterou chceme dále analyzovat, si lze označit výběrem skupinu buněk, kterou chceme dále analyzovat, si lze označit výběrem (tzv. *gate*) (viz Obrázek 8).



Obrázek 8: Dot-plot histogram periferní krve zdravého jedince. V červeném výběru (gate) je vyznačena populace lymfocytů.

Jednotlivé cílové buněčné populace je možné specificky barvit pomocí monoklonálních fluorescenčně značených protilátek. Fluorescenční barvy mají odlišná absorpční a emisní maxima, proto jsou detekována odlišnými detektory a dají se od sebe odlišit. Důležité je volit fluorescenční barvy tak, aby se jejich emisní maxima nepřekrývala. V cílové populaci buněk jsme tak schopni odlišit další buněčné populace, u které je možné stanovit relativní počty.

Jednotlivé intenzity fluorescenčních signálů je možné sledovat na histogramu (vyjádření závislosti intenzity fluorescence na počtu buněk). Pomocí dvouparametrových grafů (dot-plot grafů) si lze zobrazit dvě fluorescenční barvy přes sebe a identifikovat tak například populaci dvojitě pozitivních buněk. Před každým takovýmto měřením je nutné provést měření s negativní kontrolou s tzv. izotypovou kontrolou, podle které se odečte fluorescenční pozadí vznikající nespecifickými vazbami fluorescenčně značených protilátek. Poté můžeme zkoumanou populaci buněk v dot-plot grafu charakterizovat na základě rozmístění kvadrantů (viz Obrázek 9). Je nutné poznamenat, že před každým měřením nového vzorku je nutné provést měření s touto negativní kontrolou, nicméně zachovat primární nastavení, aby každé měření bylo provedeno za konstantních podmínek a dalo se následně vyhodnotit (McKacken 2015, navštíveno dne 22. 4. 2017). Intenzita fluorescence vyjadřuje hustotu exprese daného znaku na jednotlivých buňkách a je vyhodnocena softwarem, který spočítá MFI (mean fluorescence intensity). MFI je statistická hodnota, se kterou jsou porovnány jednotlivé vzorky mezi sebou a také vůči negativní kontrole.



Obrázek 9: Dot-plot histogram lymfocytů z periferní krve zdravého jedince. V kvadrantu 1 jsou patrné buňky negativní jak na povrchový marker CD5, tak na povrchový marker CD19. V kvadrantu 2 jsou patrné buňky, které jsou pozitivní pouze na povrchový marker CD19. V kvadrantu 3 jsou buňky pozitivní pouze na povrchový marker CD5. U buněk v kvadrantu 4 jsou přítomny oba povrchové markery (CD19 i CD5).

## 2.7.2. Kvantitativní PCR v reálném čase

Pro studium genové exprese je klíčová detekce na úrovni mRNA. Všechny metody kvantitativní qPCR využívají k detekci amplikonů nárůst fluorescence, která je detekována pomocí přístroje se zabudovaným fluorimetrem. qPCR se využívá při relativní i absolutní kvantifikaci genové exprese jednotlivých genů, genotypizaci a také například při určení typu a množství patogena (NCBI Project, navštíveno dne 11.4.2017).

Metoda qPCR byla v této práci využita při studiu genové exprese chemokinových receptorů.

### 2.7.2.1. Kvantitativní PCR v reálném čase s využitím TaqMan® sond

Technologie TaqMan využívá hydrolyzačních sond, které jsou kovalentně modifikovány na 5'-konci molekulou fluoroforu a na 3'-konci molekulou zhášече. Fluorofor a zhášеч dělí sekvence oligonukleotidu. Zhášеч je tedy v malé vzdálenosti od fluoroforu, čímž pohlcuje jeho emitovanou fluorescence. TaqMan sonda je navržena tak, aby byla komplementární k DNA regionu, který je amplifikován pomocí specifických primerů a *Taq* polymerázy. Díky 5'-3' exonukleázové aktivitě *Taq* polymerázy, je TaqMan sonda při prodlužování komplementárního vlákna DNA degradována. Po degradaci TaqMan sondy se zhášеч dostane do větší vzdálenosti od fluoroforu, takže není schopen pohlcovat fluorescence emitovanou tímto fluoroforem a dochází k zachycení fluorescence pomocí přístroje

(Heid 1996). Tento proces se opakuje v každém cyklu reakce, a zároveň neinterferuje s namnoženými PCR produkty (PREMIER Biosoft, navštíveno dne 22. 4. 2017).

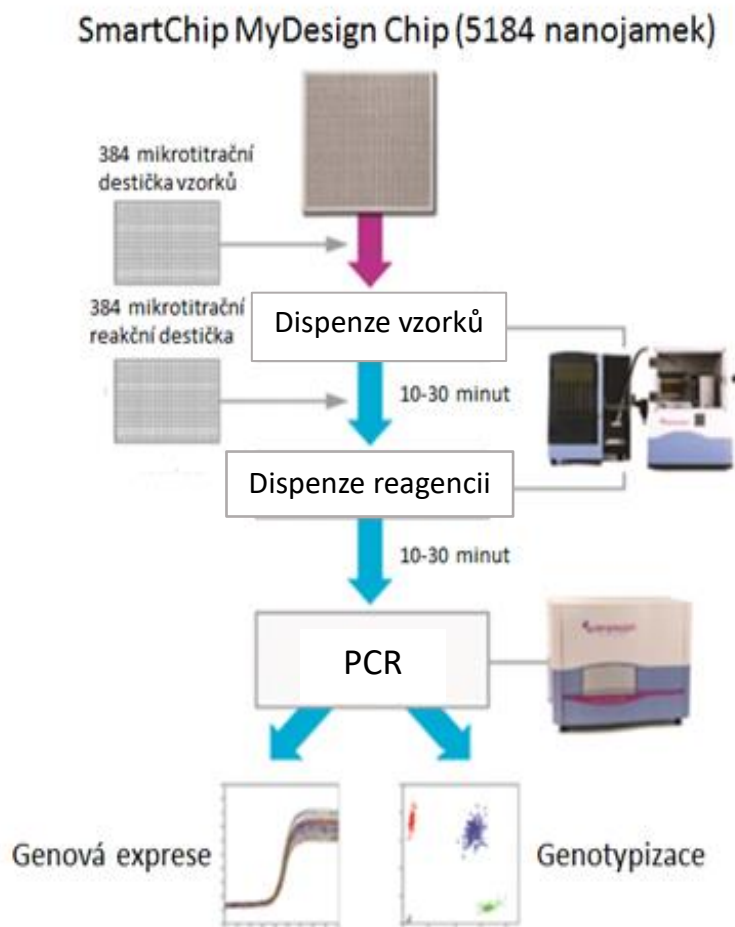
### **2.7.2.2. Kvantitativní PCR v reálném čase s využitím SYBR® Green**

SYBR Green je interkalační barvivo, které se váže do velkého žlábků dvouvláknové DNA (dsDNA). V PCR dochází k navázání SYBR Green v hybridizační a syntetické fázi. Po navázání barviva do dsDNA dochází k emisi zeleného záření, které je zachyceno pomocí přístroje. Na tomto principu lze tak provést kvantitativní i kvalitativní analýzu vzorku. Jde o relativně levnou metodu, která nepotřebuje návrh specifických prób, na druhou stranu však u této metody dochází k falešné pozitivitě vzorků v důsledku nespecifických vazeb a je nutno pečlivě a správně navrhování specifických primerů (Arya et al 2014).

### **2.7.2.3. Technologie WaferGen The SmartChip My Design™**

Technologie SmartChip využívá real-time PCR analýzy na 72x72 nanojamkovém čipu. Tato technologie je robustní metodou schopnou real time analýzy až 5184 vzorků v jednom běhu (cca 2 hodiny). V případě platformy The SmartChip My Design je čip dodáván bez PCR premixu a primerů. Všechny reagenty včetně cDNA jsou na čip dispenzovány ve dvou cyklech pomocí nanodispensoru (SmartChip™ TE MultiSample NanoDispenser) ve specifických objemech. Takto připravený SmartChip My Design™ je vložen do Real-Time PCR System (Bio-systems) cykléru, kde proběhne qPCR v určeném teplotním profilu. eplotním profilu. Postup analýzy na platformě WaferGen je znázorněn na Schéma 1 (WaferGen Biosystems 2016).

Schéma 1: Technologie WaferGen - postup práce s platformou WaferGen The SmartChip My Design.



### 2.7.3. Statistika

Porovnání expresí mezi jednotlivými skupinami a podskupinami CLL pacientů a kontrol bylo provedeno pomocí neparametrického U-testu (Mann–Whitney). Na analýzu dat byl použit statistický program GraphPad Prism 7.02 a hodnoty  $P \leq 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

Data z průtokového cytometru byla analyzována pomocí programu FlowJo V10 Software. Relativní hodnoty MFI u pacientů s CLL byly porovnány s kontrolní skupinou pomocí nepárového testu.

### **3. Cíl práce**

Cílem teoretické části diplomové práce byla literární rešerše zaměřena na studium chemokinových receptorů u chronické lymfocytární leukémie.

Cílem praktické části diplomové práce bylo charakterizovat diferenciální genové profily všech chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C v periferních mononukleárních buňkách pacientů s chronickou lymfocytární leukémií a u kontrolních jedinců. Dále pak provést subanalýzu, kdy byly srovnány genové expresní profily u pacientů s CLL rozdělených podle prognosticky významných cytogenetických aberací del(17p) a del(13q). V další části této práce bylo cílem studovat expresi vybraných deregulovaných chemokinových receptorů na proteinové expresní úrovni.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1. Vybavení laboratoře a materiál

Biologický materiál: Periferní krev pacientů s CLL a zdravých jedinců odebraná do zkumavky s EDTA.

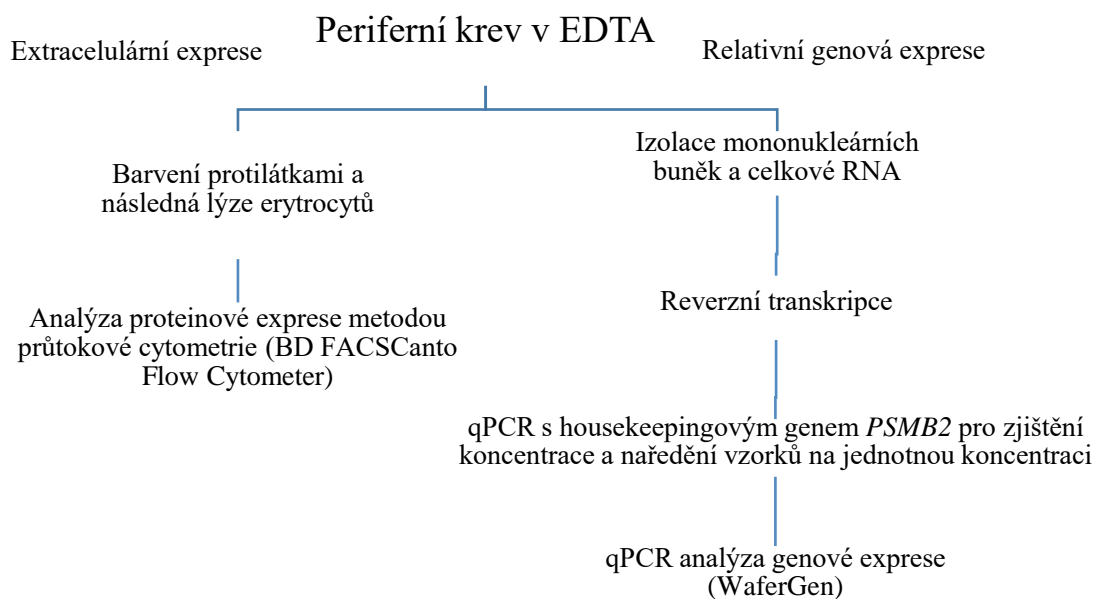
Izolace periferních mononukleárních buněk: Centrifuga chlazená (Sigma Laborzentrifugen), pasturová pipeta (Equmed, 3 ml), zkumavky (Gama, 15 ml), mikrozskumavky (Eppendorf, 1,5 ml), automatická pipeta (Eppendorf research plus, 0,1-10  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l), plastové špičky s filtrem (Eppendorf), flotační roztok (Sigma-Aldrich), PBS pufr (EXBIO Olomouc s.r.o.).

Izolace RNA: Centrifuga chlazená (Sigma Laborzentrifugen), mikrozskumavky Lobind (Eppendorf, 1,5 ml), automatická pipeta (Eppendorf research plus, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l), plastové špičky s filtrem (Eppendorf), 96% ethanol (FARGON), TRI Reagent® (SIGMA Aldrich), Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (The EPIGENETICS Company™), RNase inhibitor (Roche).

Reverzní transkripce a qPCR: Proužek 8 PCR 0,2 ml mikrozskumavek s vypouklými víčky (Vekon), kryo stojan na mikrozskumavky (Vekon), termocyklér (Eppendorf), stripy s víčky pro Rotor-Gene (IAB, 0,1 ml), Rotor-Gene Q (Qiagen), plastové špičky s filtrem (Eppendorf), automatická pipeta (Eppendorf research plus, 0,1-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l), 16 RotorGene Software 6.1.71 (Corbett Research), voda pro PCR (B. Braun), hořčnaté ionty (Thermo Scientific), PCR pufr (Thermo Scientific), Probe50 (Roche), StartTMTaqDNA polymeráza (Thermo Scientific), primery a sondy (Life Technologies, viz Tabulka 8), primery pro *PSMB2* (IDT), Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, kit č. 04897030001), SYBR Green (Roche), WaferGene (Life-systems), SmartChip™ My Design (Life-systems), SmartChip™ TE MultiSample NanoDispenser (Life-systems), GraphPad 7.02.

Průtoková cytometrie: BD FACSCanto™ Flow Cytometer (BD Bioscience), centrifuga (Eppendorf), pasturová pipeta (Equmed, 3 ml), zkumavky (Gama, 5 ml), BC FACSDiva software (Becton Dickinson), FlowJo V10 Software (LLC), lyzační roztok (Lékárna FNOL), fosfátový pufr (EXBIO Olomouc s.r.o.), protilátky (BioLegend, viz Tabulka 4).

## 4.2. Schéma pracovního postupu



## 4.3. Soubor pacientů a kontrol

Genová exprese chemokinových receptorů byla zkoumána na skupině 93 jedinců, z nichž 59 tvořilo skupinu pacientů s CLL a 34 zdravých jedinců tvořilo kontrolní skupinu (viz Tabulka 1). Skupina pacientů s CLL byla dále rozdělena dle přítomnosti specifických cytogenetických aberací: del(17p), del(13q) a del(13q14).

Tabulka 1: Soubor pacientů a kontrol, u kterých byla provedena analýza genové exprese chemokinových receptorů.

	celkem	ženy	muži
<b>CLL</b>	<b>59</b>	21	38
<b>del(17p)</b>	<b>15</b>	6	9
<b>del(13q14)</b>	<b>11</b>	3	8
<b>del(13q)</b>	<b>33</b>	12	21
<b>kontroly</b>	<b>34</b>	23	11
<b>celkový počet</b>	<b>93</b>	44	49

Expresce chemokinových receptorů pomocí průtokového cytometru byla zkoumána na skupině 97 jedinců, z nichž 73 osob tvořilo skupinu pacientů s CLL a 24 osob tvořilo kontrolní skupinu zdravých jedinců (viz Tabulka 2).



Tabulka 2: Soubor pacientů a kontrol, u kterých byla provedena analýza proteinové exprese chemokinových receptorů.

	<b>celkem</b>	<b>ženy</b>	<b>muži</b>
<b>pacienti s CLL</b>	<b>73</b>	31	42
<b>kontroly</b>	<b>24</b>	19	5
<b>celkový počet</b>	<b>97</b>	50	47

#### **4.4. Relativní genová exprese**

Genová exprese jednotlivých chemokinových receptorů byla zjištěna pomocí přístroje WaferGen The SmartChip My Design, který je schopen real-time analýzy většího množství genů v jednom běhu na jednom čipu. Výsledky z WaferGene byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny v programu GrafPad Prism 7.02.

##### **4.4.1. Izolace mononukleárních buněk a RNA**

Z 5 ml periferní krve v EDTA byly vyizolovány periferní mononukleární buňky (PBMC) pomocí hustotní gradientové centrifugace. Mononukleární buňky byly poté resuspendovány v 200  $\mu$ l TRI Reagent® roztoku. Následně byla vyizolována RNA pomocí Direct-zol™ RNA MiniPrep kitu. Z důvodu nestability molekuly RNA byl vzorek po izolaci uchován na ledě a použit k reverzní transkripci nebo zamražen na -80 °C.

##### **4.4.2. Reverzní transkripce**

Reverzní transkripce byla provedena pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Každý vzorek byl připravován v triplikátu v reakčním objemu 20  $\mu$ l. Do každé 0,2 ml zkumavky bylo napipetováno 5  $\mu$ l Template-primer mixu (viz Tabulka 3) a přidán příslušný vzorek RNA o objemu 8  $\mu$ l. Zkumavky byly poté centrifugovány a vloženy do termocykléru na teplotní profil 1 (viz Tabulka 4). Poté byly vzorky ponechány 5 minut při 4°C. Do všech zkumavek bylo následně přidáno 7  $\mu$ l RT-mixu (viz Tabulka 3), zkumavky byly centrifugovány a vloženy do termocykléru na teplotní profil 2 (viz Tabulka 4). Poté byly vzorky opět ponechány 5 minut při 4 °C. Každý vzorek připravován v triplikátu, byl poté smíchán do společné 1,5 ml zkumavky a doplněn 20  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O na celkový objem 80  $\mu$ l. Produkty získané ve formě cDNA byly skladovány při teplotě -20 °C.

Tabulka 3: Reakční mix pro reverzní transkripci.

Template-primer mix	
Reagencie	Objem na jednu reakci [μl]
Voda pro PCR	4
Anchored-oligo (dT)	1
<b>Celkem</b>	<b>5</b>
RT-mix	
Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer	4
Protector Rnase inhibitor (40U/μl)	0,5
Deoxynucleotide mix (10 mmol/l)	2
Transcriptor reverse transcriptase	0,5
<b>Celkem</b>	<b>7</b>

Tabulka 4: Teplotní profil pro reverzní transkripci.

Teplotní profil 1			
Krok	Teplota [°C]	Čas (minuty)	Počet cyklů
inkubace	65	10	1
Teplotní profil 2			
inkubace	50	60	1
inaktivace enzymu	85	5	1

#### 4.4.3. Kvantitativní PCR

Pro zjištění přesné koncentrace cDNA byla provedena qPCR s housekeepingovým genem *Proteasome subunit beta 2 (PSMB2)*, (viz Tabulka 8) pomocí TaqMan sondy (Proba 50) v termocykléru RotorGene Q (Qiagen) nastaveným na odpovídající teplotní profil (viz Tabulka 6). Nejprve byly všechny komponenty pro PCR reakci zvortexovány, vyjma enzymu, a centrifugovány. Do každé 0,1 ml PCR zkumavky bylo přidáno 20 μl reakčního mixu (viz Tabulka 5) a 5 μl příslušného vzorku cDNA. Pro měření fluorescence byl použit přístroj Rotor-GeneQ a pro vyhodnocení absolutní kvantifikace byla použita metoda druhé derivace (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research).

Tabulka 5: Reakční mix pro kvantitativní PCR s použitím TaqMan sond.

Reagencie	Objem na jednu reakci [ $\mu$ l]
Voda pro PCR	11,55
PCR pufr (10x)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	3,5
dNTPs (10 mmol/l)	1
Probe 50	1,25
Thermo-Start™ TaqDNA	0,2
<b>Celkem</b>	<b>20</b>

Tabulka 6: Časový a teplotní profil kvantitativní PCR s použitím TaqMan sond.

Krok	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	15 s	1
Denaturace	94	30 s	40
Navázání primerů	60	45 s	40
Syntéza DNA	72	60 s	40

Pro zjištění genové exprese pomocí přístroje WaferGene byly nejprve nařaděny vzorky cDNA na jednotnou koncentraci 20 ng/ $\mu$ l a primery pro amplifikaci studovaných genů (viz Tabulka 10) na koncentraci 1,5 mol/ $\mu$ l. cDNA a primery byly řádně vortexovány a centrifugovány při 21000 rcf po dobu 40 minut.

Uspořádání na SmartChipu bylo 12 esejí x 384 vzorků. Každý vzorek byl pipetován ve čtyřech opakováních. Celkový počet vzorků byl 96, z nichž jeden vzorek byla negativní kontrola (NK) a další 2 vzorky reakce referenční cDNA (refcDNA) o koncentracích 10 ng/ $\mu$ l a 5 ng/ $\mu$ l, zbylých 93 reakcí byly vlastní vzorky.

V prvním kroku byl připraven Sample-plate, kdy do každé jamky 96 jamkové destičky bylo napipetováno 25  $\mu$ l interkalačního barviva SYBR Green a 30  $\mu$ l cDNA. Destička byla zalepena filmem, vortexována a krátce centrifugována. Pomocí multikanálové pipety bylo 12,5  $\mu$ l směsi z každé jamky 96 jamkové destičky přeneseno do 384 jamkové destičky (vždy ve čtyřech opakováních). Takto připravený Sample-plate byl zalepen PCR fólií a uchován na ledu ve tmě.

V dalším kroku byl připraven Assay-plate. Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 50  $\mu$ l PrimerMixu o koncentraci příslušných primerů 1,5 mol/ $\mu$ l (viz Schéma 2).

Schéma 2: Uspořádání primerů v 96 jamkové destičce.

96 j.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PGK1	CCR1										
B	CXCR1	CCR2										
C	CXCR2	CCR3										
D	CXCR3	CCR4										
E	CXCR4											
F	CXCR5											
G	CXCR6											
H	CXCR7											

Dále pak byl připraven AssayMix (Light Cycler SYBR Green Master 1 V= 593,9  $\mu$ l/384 jamková destička + H<sub>2</sub>O V=53,36  $\mu$ l/384 jamková destička). Do každé jamky 384 jamkové destičky pak bylo pomocí multikanálové pipety napipetováno 12,6  $\mu$ l AssayMixu a následně 8,36  $\mu$ l primerů z 96 jamkové destičky (viz Schéma 3). 384 jamková destička byla zalepena speciálním filmem, zortexována a uchována ve tmě na ledu společně se Sampleplate.

Schéma č. 3: Uspořádání primerů v 384 jamkové destičce.

386 j.	1	2	3	4
A	PGK1	PGK1	CCR1	CCR1
B	PGK1	PGK1	CCR1	CCR1
C	CXCR1	CXCR1	CCR2	CCR2
D	CXCR1	CXCR1	CCR2	CCR2
E	CXCR2	CXCR2	CCR3	CCR3
F	CXCR2	CXCR2	CCR3	CCR3
G	CXCR3	CXCR3	CCR4	CCR4
H	CXCR3	CXCR3	CCR4	CCR4
I	CXCR4	CXCR4		
J	CXCR4	CXCR4		
K	CXCR5	CXCR5		
L	CXCR5	CXCR5		
M	CXCR6	CXCR6		
N	CXCR6	CXCR6		
O	CXCR7	CXCR7		
P	CXCR7	CXCR7		

V dalším kroku byl zapnut a také pročištěn SmartChip Nanodispensor, Sample-plate s Assay-plate byly centrifugovány při 2720 rcf po dobu 20 minut. Bylo provedeno nastavení SmartChip Nanodispensoru potřebné pro dispenzování. Po centrifugaci byl do přístroje vložen Smartchip a Sample-plate ve správné pozici a bylo spuštěno dispenzování vzorků trvající 1 hodinu. Po dokončení pipetování celého čipu byl čip osušen, přelepen speciální fólií (Intermediate) a utěsněn pomocí stěrky. Následovala 20-ti minutová centrifugace při 2720 rcf. Po odstranění fólie byl SmartChip opět vložen do nanodispensoru s Assay-plate. Bylo spuštěno dispenzování esejí po dobu 20 minut, po dokončení dispenzování byl opět Smartchip osušen, přelepen speciální fólií a centrifugován 20 minut při 2720 rcf. Takto připravený Smartchip včetně folie byl vložen do přístroje SmartCycler a spuštěna qPCR v teplotním profilu (Tabulka 7).

Výsledky exprese pacientů s CLL byly porovnány s housekeepingovým genem *Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)*. Všechny výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 7.02.

Tabulka 7: Časový a teplotní profil kvantitativní PCR s použitím interkalačního barviva SYBR Green.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
<b>Počáteční denaturace</b>	95	5 min	1
<b>Denaturace</b>	95	34 s	40
<b>Syntéza primerů a DNA</b>	60	64 s	1

Tabulka 8: Popis studovaných genů a použitých primerů pro qPCR.

Zkratka genu	Název genu	Referenční číslo	Sekvence
<i>PSMB2</i>	<i>proteasome subunit beta 2</i>	NM_002794	5'-GTGAGAGGGCAGTGGAAGCTC-3' 5'-GAAGGTTGGCAGATTCAGGA-3'
<i>PGK1</i>	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>	NM_000291	5'-CTCAACAACATGGAGATTGG-3' 5'-CTTTGGACATTAGGTCTTTGAC-3'
<i>CXCR3</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 3</i>	NM_001504	5'-CCCCAAGACCTCTATATTGC-3' 5'-TTGGTCCTGACGATCTTG-3'
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>	NM_003467	5'-AACTTCAGTTTGTGGCTG-3' 5'-GTGTATATACTGATCCCCTCC-3'
<i>CXCR5</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 5</i>	NM_001716	5'-AGTATCCTCATTTGGGGTAG-3' 5'-GCATTGGATGATTAGGATGG-3'
<i>CXCR1</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 1</i>	NM_000634	5'-TTAAGTCACTCTGATCTCTGAC-3' 5'-TGGTTTGATCTAACTGAAGC-3'

Pokračování tabulky 8: Popis studovaných genů a použitých primerů pro qPCR.

Zkratka genu	Název genu	Referenční číslo	Sekvence
<i>CXCR2</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 2</i>	NM_001557	5'-CCAGTCAGGATTTAAGTTTACC-3' 5'-GTTGATTTCCAGGGATTCTG-3'
<i>CXCR6</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 6</i>	NM_006564	5'-GGTGTTCATCAGAACAGAC-3' 5'-GAAAGACCTTGCTGAACTG-3'
<i>CXCR7</i>	<i>C-X-C motif chemokine receptor 7</i>	NM_020311.2	5'-GATGTGGGTTACAAAGCTG-3' 5'-AATCAAATGACCTCCGGG-3'
<i>CCR1</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 1</i>	NM_001295	5'-CCTTGGAAACCAGAGAGAAG-3' 5'-AATACCAAGGAGTACAGAGG-3'
<i>CCR2</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 2</i>	NM_001123396	5'-AAGCCTTTTTTCACATAGCTC-3' 5'-CTTTCACATTCTTTCCTGGTC-3'
<i>CCR3</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 3</i>	NM_001837	5'-CACTGCTGAGTTGTATTGG-3' 5'-GCTCTGGTATCAGCTTTTTTC-3'
<i>CCR4</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 4</i>	NM_005508.4	5'-GCTTTCAGAAAAGCAAGC-3' 5'-TGCTGTATATGCTTTCATCG-3'
<i>CCR5</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 5</i>	NM_00579.3	5'-TATTCTGTGTAGTGGGATGAG-3' 5'-TGCTGTTTCTTTTGAAGGAG-3'
<i>CCR6</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 6</i>	NM_004367.5	5'-TATGCTGGTGAACAGAAATG-3' 5'-CTCAATAAAGAAGGAGCTGTC-3'
<i>CCR7</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 7</i>	NM_001838	5'-TTGTCATTTTCCAGGTATGC-3' 5'-AATGATGGAGTACATGATAGGG-3'
<i>CCR8</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 8</i>	NM_005201.3	5'-GAACAAAGGCTGTCACTAAG-3' 5'-GTTTCCCAGAAGACTGAATAC-3'
<i>CCR10</i>	<i>C-C motif chemokine receptor 10</i>	NM_016602.2	5'-CTGCGAATCTAGAGGAGG-3' 5'-CACAGAGGTAGTCCCTTTAG-3'

#### 4.5. Proteinová exprese

Další část této diplomové práce byla zaměřena na analýzu proteinové exprese vybraných chemokinových receptorů na CLL buňkách (CD5+ CD19+ B-lymfocyty). Dalšími specifickými monoklonálními protilátkami s jinými fluorochromy byly označeny chemokinové receptory (CXCR3, CXCR4, CXCR5 a CCR7) exprimované na povrchu maligních B-lymfocytů. Pomocí průtokového cytometru byly odlišeny buněčné populace, na kterých byla určena relativní exprese chemokinových receptorů. Jednotlivé signály zaznamenané průtokovým cytometrem byly sledovány na histogramu jako závislost intenzity fluorochromu na počtu buněk. Pomocí dot-plot grafu bylo možné zobrazit dvě fluorescenční barvy zároveň, čímž je umožněna identifikace populací dvojitě pozitivních buněk.

Do 4 zkumavek bylo napipetováno po 50 µl periferní krve v EDTA. Do každé zkumavky obsahující krev bylo napipetováno po 1 µl příslušné protilátky (viz Tabulka 9 a' 10). Krev s protilátkami byla inkubována ve tmě při laboratorní teplotě 20 minut. Po inkubaci bylo do každé zkumavky přidáno pasteurovou pipetou 3 ml vychlazeného lyzačního roztoku. Vzorek s lyzačním roztokem byl důkladně promíchán převrácením zkumavky, následkem čehož došlo k lýze erytrocytů. Tento krok je klíčový pro průtokovou cytometrii, neboť nezlyzované erytrocyty by mohly způsobit vysoký signál na pozadí v dot-plot grafu. Zkumavky s lyzovanými erytrocyty byly centrifugovány při laboratorní teplotě na 350 rcf po dobu 7 minut. Supernatant byl odstraněn a do zkumavky se vzorkem byly přidány 3 ml PBS. Vzorek ve zkumavce byl opět promíchán a centrifugován 7 minut na 350 rcf.

Supernatant byl opět odstraněn a ke vzorku bylo přidáno cca 200 µl PBS. Takto připravený vzorek byl vortexován a změřen na průtokovém cytometru BD FACSCanto za použití softwaru BD FACSDiva. U změřených vzorků na průtokovém cytometru byla provedena analýza pomocí programu FlowJo V10 Software a výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 7.02. nepárovým testem.

Tabulka 9: Systém kombinací použitých protilátek.

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>	<b>APC-Cy7</b>
<b>zkumavka 1</b>	CD183 (CXCR3)	CD5	CD184 (CXCR4)	CD19
<b>zkumavka 2</b>	CD185 (CXCR5)	CD5	CD197 (CCR7)	CD19
<b>izotypová kontrola</b>	FITC IgG	PE IgG	APC IgG	APC-CY7 IgG

Tabulka 10: Popis studovaných protilátek.

<b>Protilátka</b>	<b>Fluorescenční značení</b>	<b>Klon</b>
<b>CD183</b>	FITC	G025H7
<b>CD185</b>	FITC	J252D4
<b>CD64</b>	FITC	10.I
<b>IgG1</b>	FITC	MOPC-21
<b>CD5</b>	PE	UCHT2
<b>CD62L</b>	PE	DREG-56
<b>IgG1</b>	PE	MOPC-21
<b>CD184</b>	APC	1265

Pokračování Tabulky 10: Popis studovaných protilátek.

<b>Protilátka</b>	<b>Fluorescenční značení</b>	<b>Klon</b>
<b>CD197</b>	APC	G043H7
<b>CXCR7</b>	APC	10D1-J16
<b>CD11b</b>	APC	CBRM1/5
<b>IgG1</b>	APC	MOPC-21
<b>CD197</b>	APC-Cy7	SJ25C1
<b>CD16</b>	APC-Cy7	B73.1
<b>IgG1</b>	APC-Cy7	MOPC-21

---



## 5. Výsledky

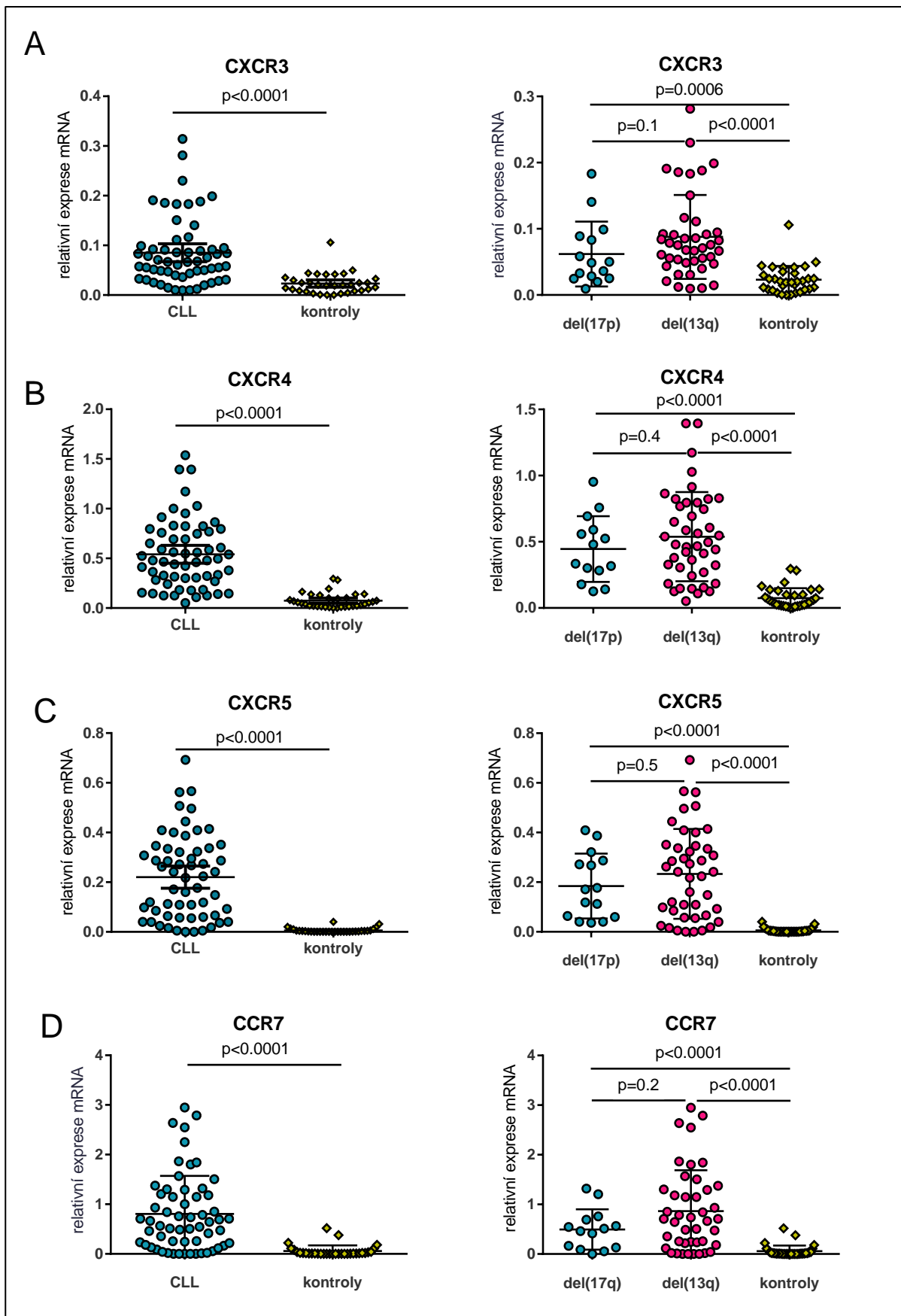
Vzorky krve pacientů s CLL [podskupiny pacientů s CLL: del(17p), del(13q), del(13q+14)] a kontrolních jedinců byly připraveny podle postupů popsanych v kapitole 4.4.1. a 4.4.2. Genová exprese byla měřena u 16 chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C (receptorů *CXCR1*, *CXCR2*, *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CXCR6*, *CXCR7*, *CCR1*, *CCR2*, *CCR3*, *CCR4*, *CCR5*, *CCR6*, *CCR7*, *CCR8* a *CCR10*), z nichž u některých již byl popsán vliv na prognózu CLL. Nicméně u většiny není genový expresní profil zatím znám. Všechny výsledky genové exprese byly vztaženy k referenčnímu genu *PGK1*. Na základě výsledků genové exprese a podkladů z literatury byly vybrány kandidátní chemokinové receptory *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5* a *CCR7*, jejíž exprese byla také testována i na proteinové úrovni.

### 5.1. Analýza genové exprese chemokinových receptorů

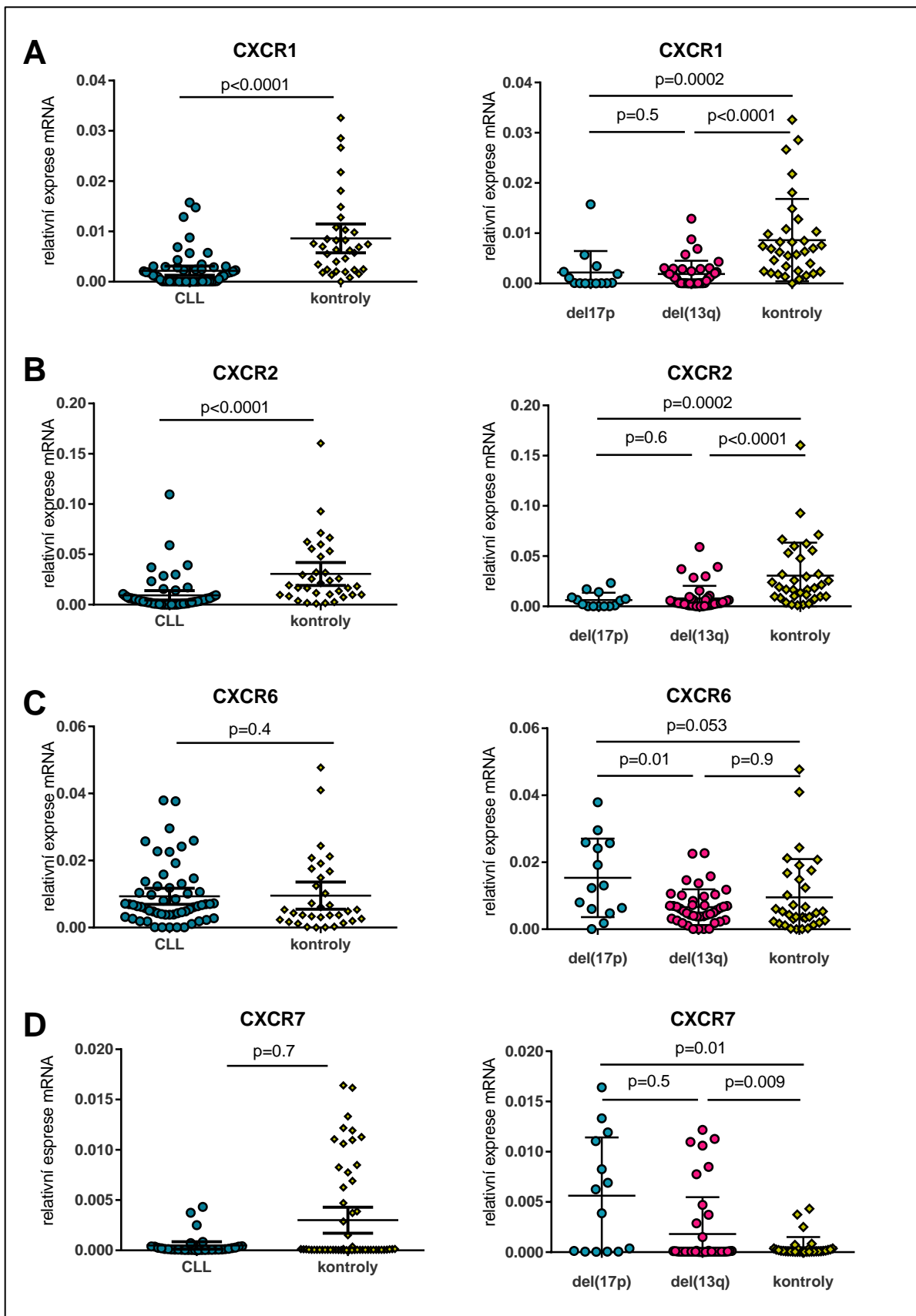
Mezi nejvíce deregulované geny patřily *CXCR1*, *CXCR2*, *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5* a *CCR7*, u kterých byla pozorována zvýšená genová exprese u skupiny pacientů s CLL oproti kontrolní skupině zdravých jedinců ( $P \leq 0,0001$ ). U těchto chemokinových receptorů nebyl pozorován rozdíl v genové expresi mezi skupinami CLL pacientů s delecemi del(17p) a del(13q) + (13q14) (viz Obrázek 10).

Dále bylo pozorováno zvýšení genové exprese pro tyto chemokinové receptory *CCR8* a *CCR10* u skupiny pacientů s CLL oproti kontrolní skupině ( $P \leq 0,05$ ). U CLL byla pozorována dále snížená genová exprese u chemokinových receptorů *CXCR1*, *CXCR2*, *CCR2*, *CCR4*, *CCR5* a *CCR6* ( $P \leq 0,05$ ) (viz Obrázek 11, 12, 13).

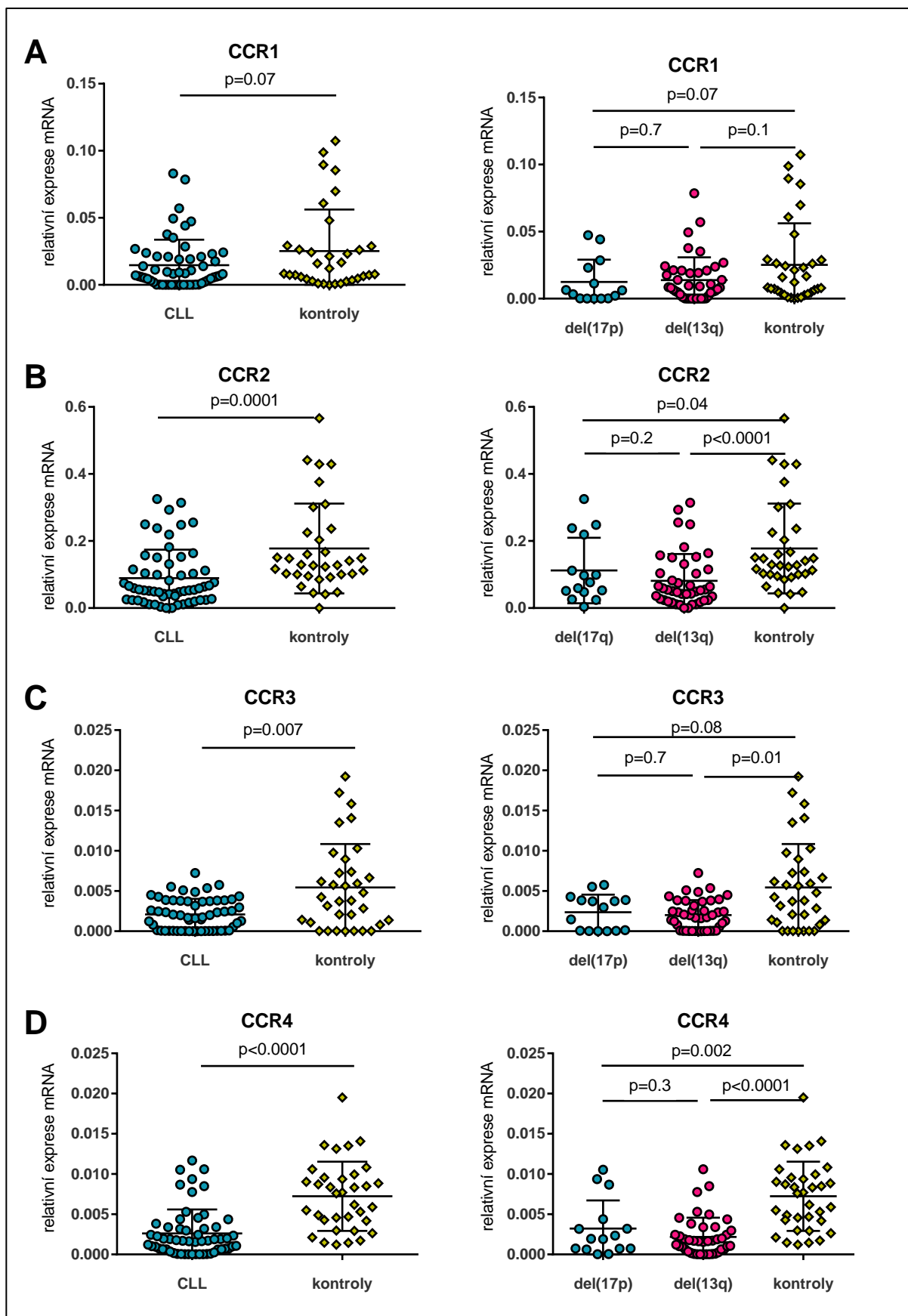
Mezi podskupinami CLL pacientů s delecemi del(17p) a del(13q)+del(13q14) nebyl pozorován žádný rozdíl v deregulaci genů u cílových molekul (viz Obrázek 11, 12, 13).



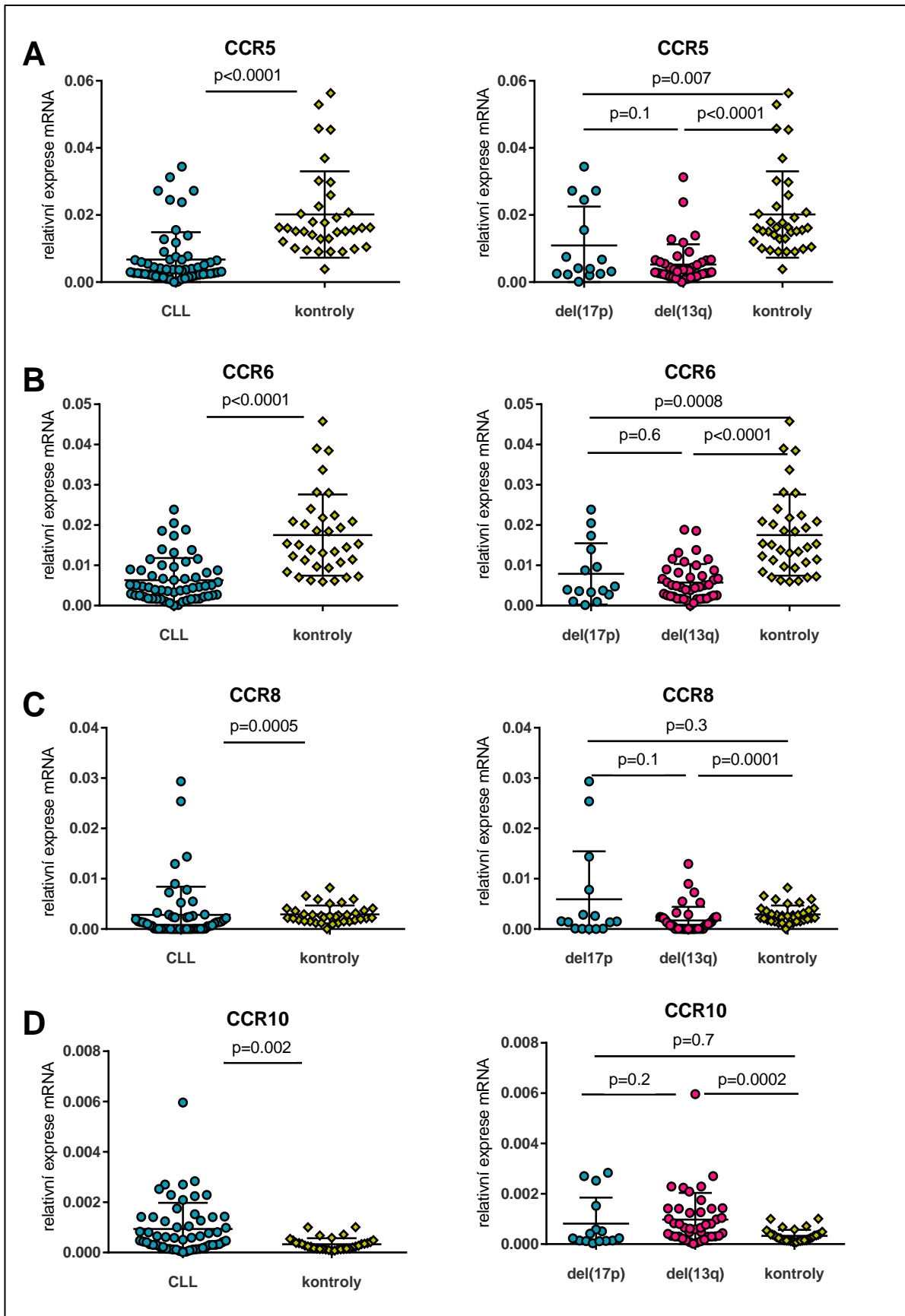
Obrázek 10: Porovnání genové exprese vybraných chemokinových receptorů (A) CXCR3, (B) CXCR4, (C) CXCR5 a (D) CCR7 mezi skupinou pacientů s CLL, jejími podskupinami a zdravými jedinci.



Obrázek 11: Porovnání genové exprese chemokinových receptorů (A) CXCR1, (B) CXCR2, (C) CXCR6 a (D) CXCR7 mezi skupinou pacientů s CLL, jejími podskupinami a zdravými jedinci.



Obrázek 12: Porovnání genové exprese u chemokinových receptorů (A) CCR1, (B) CCR2, (C) CCR3 a (D) CCR4 mezi skupinou pacientů s CLL, jejími podskupinami a zdravými jedinci.

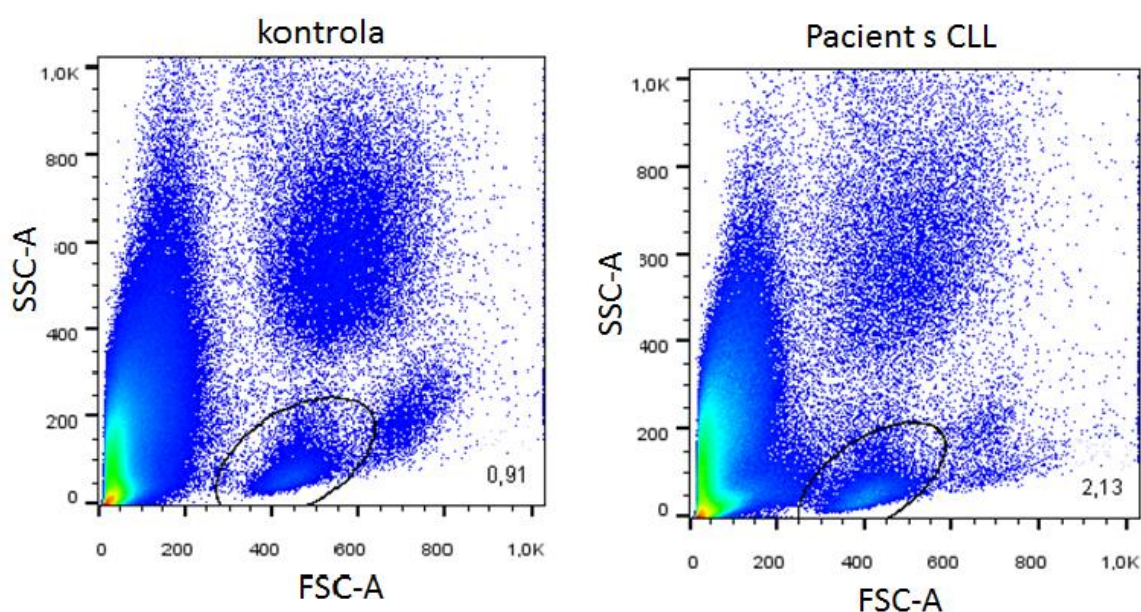


Obrázek 13: Porovnání genové exprese chemokinových receptorů (A) CCR5, (B) CCR6, (C) CCR8 a (D) CCR10 mezi skupinou pacientů s CLL, jejími podskupinami a zdravými jedinci.

## 5.2. Analýza proteinové exprese průtokovou cytometrií

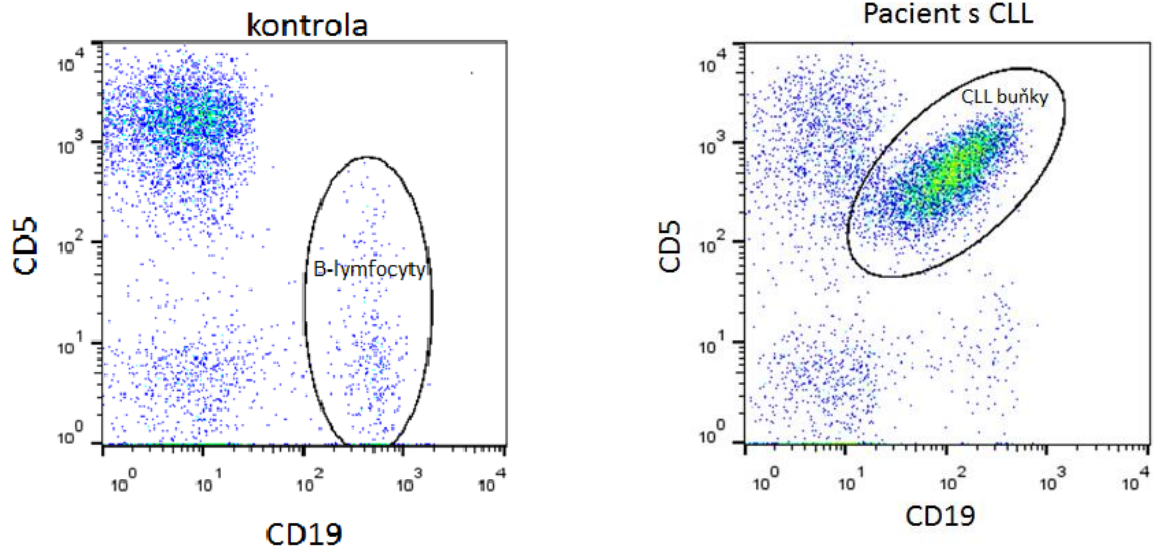
Studie exprese povrchových buněčných receptorů byla provedena u skupiny pacientů s CLL pro vybrané molekuly s výrazně zvýšenou genovou expresí (CXCR3, CXCR4, CXCR5 a CCR7). Příprava vzorků byla provedena dle postupu popsaném v kapitole 4.5. Pro porovnání rozdílů mezi zdravými jedinci a pacienty s CLL byly zvoleny specifické datovací strategie v průtokové cytometrii (viz Obrázky 14-17).

Již z SSC-FSC dot-plot grafu periferní krve CLL pacienta a zdravého jedince je patrný rozdíl. Populace lymfocytů se u obou případů zdají stejné, avšak u CLL pacientů bývá procentuálně více zastoupena. Populace monocytů a neutrofilů jsou naopak u CLL pacientů méně zastoupeny (viz Obrázek 14).



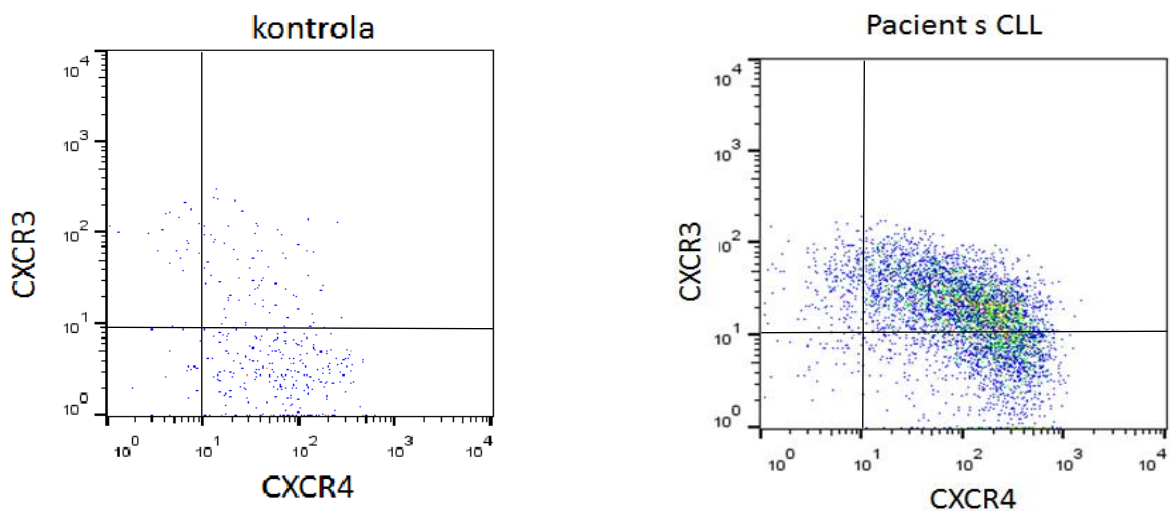
Obrázek 14: Dot-plot grafy periferní krve zdravého jedince (vlevo) a CLL pacienta (vpravo). Gate (kroužkem ohraničená část) představuje populaci lymfocytů.

Na Obrázku 15 v dot-plot grafu pacienta s CLL je patrná populace dvojité pozitivních lymfocytů CD5+/CD19+. Přítomnost těchto markerů v populaci lymfocytů označuje klony maligních B-lymfocytů, u kterých jsou markery CD5 a CD19 charakteristickým znakem. Naproti tomu u zdravého jedince je přítomna pouze populace normálních CD19+ B-lymfocytů s velice slabou pozitivitou znaku CD5. Povrchový marker CD5 je v populaci lymfocytů charakteristickým znakem pro T-lymfocyty.



Obrázek 15: Dot-plot graf lymfocytů zdravého jedince (vlevo) a CLL pacienta (vpravo) pozitivního na antigenní markery CD5/CD19.

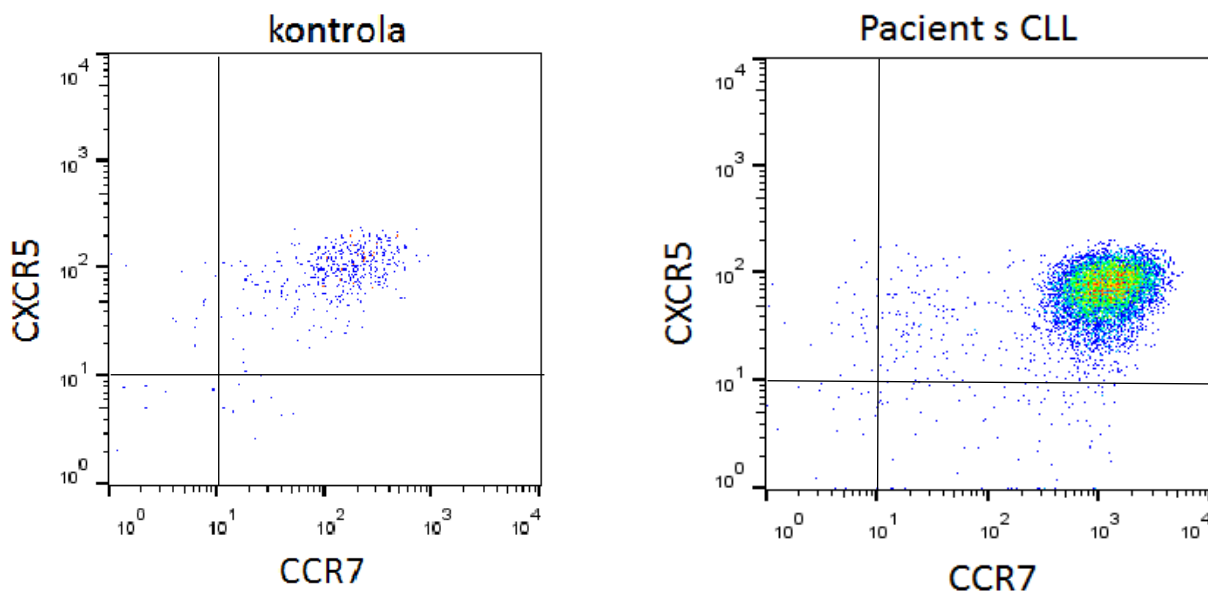
Na Obrázku 16 je u pacienta s CLL viditelná populace CLL buněk, která zahrnuje jak dvojité pozitivní buňky CXCR3/CXCR4, tak buňky pozitivní pouze na CXCR4 nebo, v menší míře, CXCR3. Chemokinový receptor CXCR4 je u maligních B-lymfocytů více zastoupen než CXCR3, neboť hraje jednu z nejdůležitějších rolí v patogenezi CLL, co se týče chemotaxe. Exprese CXCR3 nebo CXCR4 je u B-lymfocytů zdravých jedinců také prokázána, avšak jen v nízkých hladinách.



Obrázek 16: Dot-plot histogram lymfocytů zdravého jedince (vlevo) a CLL pacienta (vpravo) pozitivního na chemokinové receptory CXCR3 a CXCR4.

Na Obrázku 17 je u pacienta s CLL patrná velká populace CXCR5+/CCR7+ lymfocytů a jen malé množství CXCR5-/CCR7+ lymfocytů. Protože CCR7 se podílí na migraci maligních

buněk do lymfatických tkání, je většina maligních CXCR5+ B-lymfocytů také CCR7+. U zdravého jedince je také patrná populace populace CXCR5+/CCR7+ lymfocytů. Tyto biomarkery jsou přítomny i u zdravých B-lymfocytů, avšak s nižší intenzitou exprese.

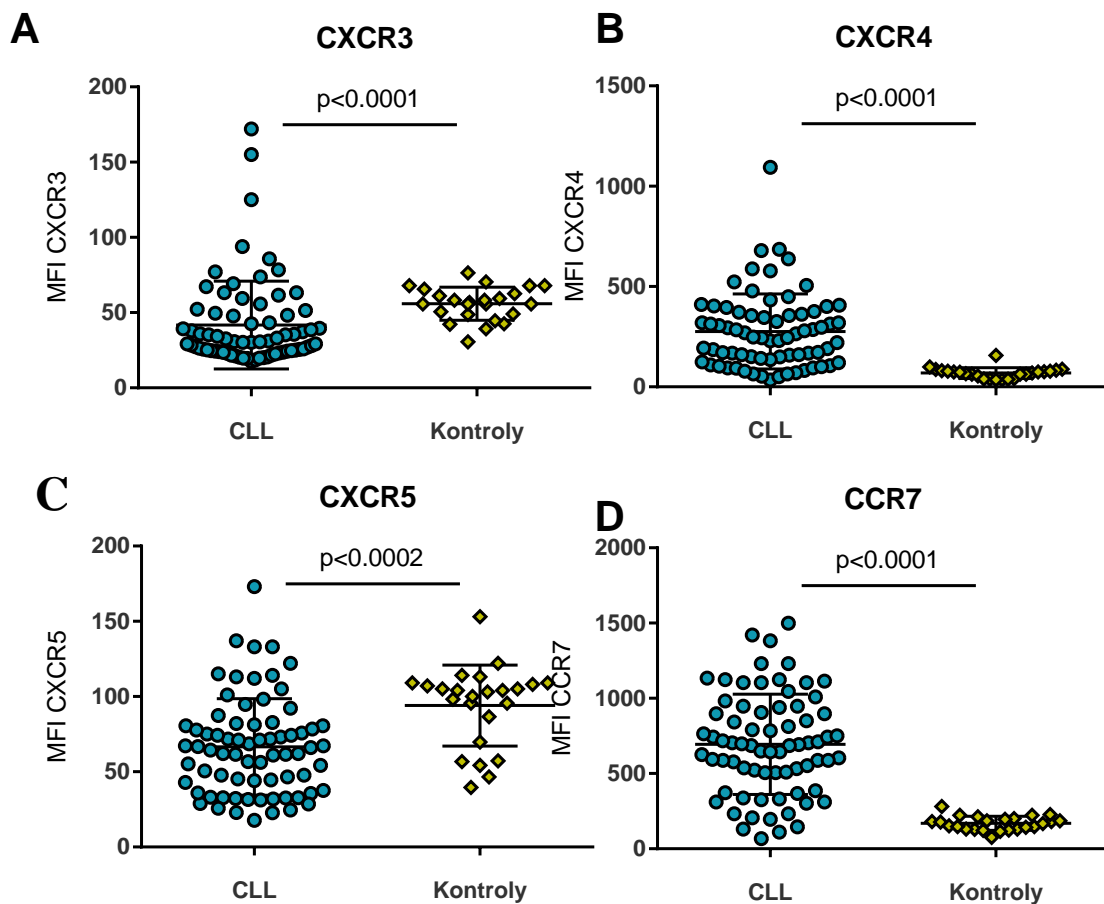


Obrázek 17: Dot-plot grafy lymfocytů zdravé kontroly (vlevo) a CLL pacienta (vpravo) pozitivního na chemokinové receptory CXCR5 a CCR7.

### 5.3. Proteinové expresní profily

MFI u chemokinových receptorů CXCR3 a CXCR5 byla u pacientů s CLL výrazně nižší (CXCR3  $P \leq 0,0001$ , CXCR5  $P \leq 0,0002$ ) než u kontrolní skupiny (viz Obrázek 18). Naopak u chemokinových receptorů CXCR4 a CCR7 byla MFI u skupiny CLL pacientů prokazatelně vyšší (CXCR5  $P \leq 0,0001$ , CCR7  $P \leq 0,0001$ ) než u kontrolní skupiny (viz Obrázek 18).





Obrázek 18: Porovnání relativní exprese - MFI chemokinových receptorů CXCR3, CXCR4, CXCR5 a CCR7 u pacientů s CLL a kontrolní skupiny. (A) Relativní MFI u CXCR3 pacientů s CLL a kontrolní skupin. (B) Relativní MFI u CXCR4 pacientů s CLL a kontrolní skupiny. (C) Relativní MFI u CXCR5 pacientů s CLL a kontrolní skupiny. (D) Relativní MFI u CCR7 pacientů s CLL a kontrolní skupiny.

#### 5.4. Shrnutí výsledků

Porovnáním výsledků analýzy genové exprese a proteinové expresní analýzy bylo zjištěno, že u pacientů s CLL je genová exprese chemokinových receptorů CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7, CCR8 a CCR10 zvýšená a u chemokinových receptorů CXCR1, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5 a CCR6 genová exprese snižena oproti kontrolní skupině. Mezi jednotlivými podskupinami pacientů s CLL nebyla zjištěna deregulace u studovaných chemokinových receptorů. Zvýšená genová exprese byla u chemokinových receptorů CXCR5 a CCR7 potvrzena i na proteinové úrovni (viz Tabulka 11).

Tabulka 11: Shrnutí výsledků z proteinové a genové exprese vybraných molekul u pacientů s CLL ve srovnání s kontrolní skupinou.

chemokinový receptor	genová exprese pacienti s CLL vs kontroly	genová exprese pacienti s CLL del(17p) vs kontroly	genová exprese pacienti s CLL del(13q)+del(13q14) vs kontroly	Proteinová exprese pacienti s CLL vs kontroly
<b>CXCR3</b>	↑ $P < 0,0001$	↑ $P = 0,0004$	↑ $P < 0,0001$	↓ $P < 0,0001$
<b>CXCR4</b>	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$
<b>CXCR5</b>	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$	↓ $P < 0,0002$
<b>CCR7</b>	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$	↑ $P < 0,0001$
<b>CXCR1</b>	↓ $P < 0,0001$	↓ $P = 0,0002$	↓ $P < 0,0001$	
<b>CXCR2</b>	↓ $P < 0,0001$	↓ $P = 0,0002$	↓ $P < 0,0001$	
<b>CXCR6</b>	n.s.	n.s.	n.s.	
<b>CXCR7</b>	n.s.	n.s.	n.s.	
<b>CCR1</b>	n.s.	n.s.	n.s.	
<b>CCR2</b>	↓ $P < 0,0001$	n.s.	↓ $P < 0,0001$	
<b>CCR3</b>	n.s.	n.s.	n.s.	
<b>CCR4</b>	↓ $P < 0,0001$	↓ $P = 0,0002$	↓ $P < 0,0001$	
<b>CCR5</b>	↓ $P < 0,0001$	n.s.	↓ $P < 0,0001$	
<b>CCR6</b>	↓ $P < 0,0001$	n.s.	↓ $P < 0,0001$	
<b>CCR8</b>	↑ $P < 0,0005$	n.s.	↑ $P = 0,0001$	
<b>CCR10</b>	↑ $P < 0,002$	n.s.	↑ $P = 0,0002$	

*Legenda: (↑ geny, popřípadě exprimované receptory, u kterých byla pozorována zvýšená exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. ↓ geny, popřípadě exprimované receptory, u kterých byla detekována snížená exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. n.s. geny, u kterých nebyla zaznamenána signifikantní deregulace.)*

## 6. Diskuse

V patogenezi CLL hraje důležitou roli mikroprostředí, jehož komponenty jsou, mimo jiné, i chemokinové receptory a chemokiny. Tyto proteiny se aktivně podílejí v procesech přežívání, proliferaci a zejména migraci maligních B-lymfocytů. Komplexní genový expresní profil chemokinových receptorů u pacientů s CLL není zatím znám. Proto bylo cílem této práce studovat genovou expresi 16 signálních chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C u CLL pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Následně byla provedena subanalýza, kdy genové expresní profily zkoumaných chemokinových receptorů byly porovnány mezi skupinami CLL pacientů s del(17p), del(13q) a del(13q14), u kterých je znám jejich významný prognostický dopad. Na základě výsledků genové exprese a podkladů z literatury byly vybrány kandidátní geny chemokinových receptorů *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CCR7*. Jejíž exprese byla ověřena i na proteinové úrovni.

Naše analýzy potvrdily zvýšenou genovou expresi chemokinových receptorů *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CCR7*, *CCR8* a *CCR10* u pacientů s CLL oproti kontrolní skupině.

Jedním z nejvíce deregulovaných chemokinových receptorů byl *CXCR4*, u něhož byla prokázána zvýšená exprese u pacientů s CLL i jejich podskupin oproti kontrolní skupině jak na genové, tak i na proteinové úrovni. Jedná se o klíčový chemokinový receptor, který se podílí na migraci maligních CLL buněk z periferní krve do sekundárních lymfatických orgánů a kostní dřeně (Burger et al. 2003, Davids & Burger 2012, Pepper et al. 2015). Zde jsou maligní B-lymfocyty v kontaktu s podpůrnými buňkami a mikroprostředím kostní dřeně a lymfatických uzlin, které jim poskytují signály, které řídí jejich růst, proliferaci, chrání je před apoptózou a pravděpodobně způsobují i jejich rezistenci k lékům. Zvýšená exprese *CXCR4* byla popsána zejména u pacientů s pokročilejšími stádii CLL a progresí nemoci (Davids & Burger 2012, Pepper et al. 2015). Nicméně bylo prokázáno, že se může vyskytovat i v nízkých hladinách v B-lymfocytech CD5+/CD38+, což je zapříčiněno BCR signální dráhou, která zpětnovazebnou inhibicí může snižovat expresi *CXCR4* (Bennet et al. 2007). Snížení exprese *CXCR4* na povrchu CLL buněk a narušení její signalizace a funkce je také jedním z mechanismů, které se uplatňují při léčbě BCR-inhibitory (Chen et al. 2016). Současné studie také naznačují využitelnost tohoto receptoru k cílené léčbě u nádorových onemocnění, jak bylo prokázáno u WZ811 - antagonisty receptoru *CXCR4* (Billard et al. 2016). První studie u CLL u myši ukazuje, že tento inhibitor *CXCR4* může být účinný také u pacientů s CLL a představuje novou léčebnou možnost pro CLL pacienty (Li et al. 2016). Přesto využití chemokinových receptorů

v léčbě komplikuje jejich redundance, vzájemné interakce, heterodimerizace, což brání ve vývoji léčby zacílené na chemokinovou síť (Ganghammer et al. 2016).

Další významně deregulovaný chemokinový receptor byl CXCR3, jehož genová exprese byla u všech podskupin pacientů s CLL zvýšená oproti kontrolní skupině. Jeho nadměrná exprese se však nepotvrdila na proteinové úrovni. Odlišnost proteinové exprese od genové může být dána tím, že genová exprese byla zkoumána na všech mononukleárních buňkách, kdežto proteinová exprese byla zkoumána pouze na CLL buňkách (dvojitě pozitivní B-lymfocyty CD5/CD19). Rozdíly mezi genovou a proteinovou expresí může být také dána tím, že dochází k řadě post-transkripčních změn a korelace mezi mRNA a proteinovou expresí je nestálá (Greenbaum et al. 2003). Zvýšená genová exprese chemokinového receptoru CXCR3 byla popsána u časných stádií CLL (Mahadevan et al. 2009). Naopak nízká exprese CXCR3 ( $MFI \leq 15$ ) byla asociována s pokročilým stádiem CLL a byla navržena jako nezávislý prognostický faktor asociovaný s horší prognózou (hazard ratio 24,5) (Ocaña et al. 2007b). Současná studie také uvádí, že CXCR3 exprese koreluje s kratší dobou do zahájení 1. linie léčby (time to first treatment, hazard ratio 2,6) a kratším přežíváním nemocných (Ganghammer et al. 2016). Dále autoři uvádí, že současná analýza CXCR3 a dalšího klíčového chemokinového receptoru CXCR4 výrazně zvyšuje jejich prediktivní hodnotu a hladiny obou receptorů jsou vhodné k identifikaci pacientů s nízkým či vysokým rizikem progresu onemocnění. Pacienti s vysokou expresí CXCR3 a současně nízkou expresí CXCR4 mají dobrou prognózu, naopak pacienti s nízkou CXCR3 a vysokou CXCR4 expresí mají horší prognózu (Ganghammer et al. 2016). V dalších studiích bude potřeba ověřit, zdali poměr CXCR3/CXCR4 může mít vliv na volbu léčby nebo léčebnou odpověď.

Dalším výrazně deregulovaným chemokinovým receptorem byl chemokinový receptor CXCR5, u kterého byla prokázána zvýšená genová exprese u pacientů s CLL a jejich podskupin ve srovnání se zdravými jedinci, avšak nebyla potvrzena na proteinové úrovni. U pacientů s CLL byla v maligních B-lymfocytech pozorována vysoká exprese CXCR5. Hladina exprese CXCR5 byla však stejná u maligních B-lymfocytů, tak i u zdravých CD5+ B-lymfocytů (Bürkle et al. 2007). Autoři prokázali, že stimulace CLL buněk pomocí ligandu CXCL13 indukuje polymerizaci aktinu, CXCR5 endocytózu, migraci a přežívání maligních buněk (Bürkle et al. 2007).

Zvýšená genová exprese u CLL pacientů a jejich podskupin byla také prokázána u chemokinového receptoru CCR7. Zvýšená exprese byla následně potvrzena i na proteinové úrovni u pacientů s CLL oproti kontrolní skupině zdravých jedinců. Exprese CCR7 korelovala s výskytem CLL a také se stádiem nemoci (Fulton 2009, Ghobrial et al. 2004).

Zvýšená genová exprese chemokinového receptoru byla u CCR8 byla popsána pouze v případě non-Hodkinova lymfomu (Chen et al. 2013). U chemokinového receptoru CCR10 nebyla popsána exprese u CLL ani na genové, ani na proteinové úrovni. Toto první popsání možné účasti CCR10 v patogenezi CLL určitě bude předmětem dalšího studia.

V případě dalších chemokinových receptorů CXCR1, CXCR2 a CCR4 byla zjištěna snížená genová exprese u všech podskupin pacientů s CLL oproti kontrolní skupině. Snížená exprese CCR6 u CLL na proteinové úrovni byla již v literatuře popsána (Wong 2004), u ostatních zkoumaných chemokinových receptorů nebyl dosud expresní profil studován. U subanalýzy nebyla prokázána deregulace mezi jednotlivými podskupinami pacientů s CLL.

Naše studie zaměřená na expresní profilování skupiny 16 signálních chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C potvrdila klíčovou roli sítě chemokinových receptorů u CLL. Pochopení příspěvku a v budoucnosti ověření jejich role může významně přispět k pochopení patogeneze tohoto závažného onemocnění, případně může sloužit k prognózování pacientů, v predikci vhodné léčby nebo léčebné odpovědi.

## 7. Závěr

Teoretická část předložené práce se zabývá studiem chronické lymfocytární leukémie, rolí mikroprostředí a zejména vlivem chemokinových receptorů na toto onemocnění.

V praktické části této práce byla provedena genová exprese u 16 genů chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C (*CXCR1*, *CXCR2*, *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CXCR6*, *CXCR7*, *CCR1*, *CCR2*, *CCR3*, *CCR4*, *CCR5*, *CCR6*, *CCR7*, *CCR8* a *CCR10*) v periferních mononukleárních buňkách získaných u CLL pacientů a zdravých jedinců. Zvýšená genová exprese u CLL byla pozorována u genů *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CCR7*, *CCR8* a *CCR10*. Naopak snížená genová exprese u pacientů s CLL byla pozorována u genů *CXCR1*, *CXCR2* a *CCR4*. U subanalýzy u podskupin pacientů CLL s del(17p) a del(13q) nebyl zjištěn rozdíl v genové expresi studovaných chemokinových receptorů. Dále byla v rámci praktické části této práce provedena studie exprese chemokinových receptorů *CXCR3*, *CXCR4*, *CXCR5* a *CCR7* i na proteinové úrovni pomocí průtokové cytometrie, která potvrdila zvýšenou expresi chemokinových receptorů *CXCR4* a *CCR7* na CLL buňkách.

V této práci jsou shrnuty výsledky genové exprese 16 chemokinových receptorů třídy C-C a C-X-C, z nichž některé doposud nebyly u CLL prozkoumány. Výsledky této studie mohou být přínosné pro další výzkum zaměřený na roli chemokinových receptorů a jejich ligandů v patogenezi tohoto onemocnění nebo pro studii využitelnosti profilů chemokinových receptorů k prognózování pacientů.

## 8. Literatura

Alas S., Ng C. P., Bonavida B. (2002): Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 8:836-45

American Cancer Society (2013): *Cancer Facts and Figures 2013*. American Cancer Society Atlanta, Georgia, USA

Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R. H. (2014): Basic principles of real-time quantitative PCR. Published online: <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>

Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., Davis Z., Plevova K., Nguyen-Khac F., Malcikova J., Anagnostopoulos A., Glide S., Mould S., Stepanovska K., Brejcha M., Belessi C., Davi F., Pospisilova S., Athanasiadou A., Stamatopoulos K., Oscier D. (2014): Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology*, 89:249-55

Balkwill F. (2004): Cancer and the chemokine network. *National Review Cancer*, 4:540–50

BD Biosciences (2000): *Introducing to flow cytometry: A learning guide*. MPN: 11-11032-01

Bennett F., Rawstron A., Plummer M., de Tute R., Moreton P., Jack A., Hillmen P. (2007): B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *British Journal of Hematology*, 139:600-4

Berndt S. I., Skibola C. F., Joseph V., Camp N. J., Nieters A., Wang Z., Cozen W., Monnereau A., Wang S. S., Kelly R. S., Lan Q., Teras L. R., Chatterjee N., Chung C. C., Yeager M., Brooks-Wilson A. R., Hartge P., Purdue M. P., Birmann B. M., Armstrong B. K., Cocco P., Zhang Y., Severi G., Zeleniuch-Jacquotte A., Lawrence C., Burdette L., Yuenger J., Hutchinson A., Jacobs K. B., Call T. G., Shanafelt T. D., Novak A. J., Kay N. E., Liebow M., Wang A. H., Smedby K. E., Adami H. O., Melbye M., Glimelius B., Chang E. T., Glenn M., Curtin K., Cannon-Albright L. A., Jones B., Diver W. R., Link B. K., Weiner G. J., Conde L., Bracci P. M., Riby J., Holly E. A., Smith M. T., Jackson R. D., Tinker L. F., Benavente Y., Becker N., Boffetta P., Brennan P., Foretova L., Maynadie M., McKay J., Staines A., Rabe K. G., Achenbach S. J., Vachon C. M., Goldin L. R., Strom S. S., Lanasa M. C., Spector L. G., Leis

J. F., Cunningham J. M., Weinberg J. B., Morrison V. A., Caporaso N. E., Norman A. D., Linet M. S., De Roos A. J., Morton L. M., Severson R. K., Riboli E., Vineis P., Kaaks R., Trichopoulos D., Masala G., Weiderpass E., Chirlaque M. D., Vermeulen R. C., Travis R. C., Giles G. G., Albanes D., Virtamo J., Weinstein S., Clavel J., Zheng T., Holford T. R., Offit K., Zelenetz A., Klein R. J., Spinelli J. J., Bertrand K. A., Laden F., Giovannucci E., Kraft P., Krickler A., Turner J., Vajdic C. M., Ennas M. G., Ferri G. M., Miligi L., Liang L., Sampson J., Crouch S., Park J. H., North K. E., Cox A., Snowden J. A., Wright J., Carracedo A., Lopez-Otin C., Bea S., Salaverria I., Martin-Garcia D., Campo E., Fraumeni J. F. Jr., de Sanjose S., Hjalgrim H., Cerhan J. R., Chanock S. J., Rothman N., Slager S. L. (2013): Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *National Genetics*, 45: 868–76

Billard M. J., Fitzhugh D. J., Parker J. S., Brozowski J. M., McGinnis M. W., Timoshchenko R. G., Serafin D. S., Lininger R., Klauber-Demore N., Sahagian G., Truong Y. K., Sassano M. F., Serody J. S., Tarrant T. K. (2016): G Protein Coupled Receptor Kinase 3 Regulates Breast Cancer Migration, Invasion, and Metastasis. *Public Library of Science One*, 11:e0152856

Binet J. L., Auquier A., Dighiero G. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48, P. 198-206

Bonacchi A., Romagnani P., Romanelli R. G., Efsen E., Annunziato F., Lasagni L., Francalanci M., Serio M., Laffi G., Pinzani M., Gentilini P., Marra F. (2001): Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276:9945-54

Borge M., Nannini P. R., Galletti J. G., Morande P. E., Ávalos J. S, Bezares R. F., Giordano M., Gamberale R. (2010): CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 95: 768-775

Brack C., Hiram M., Lenhard-Schuller R., Tonegawa S. (1978): A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15:1-14

Burger J. A., Burger M., Kipps T. J. (1999): Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 94:3658-67



Burger J. A., Gribben J. G. (2013): The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in Cancer Biology*, 24:71-81

Bürkle A., Niedermeier M., Schmitt-Gräff A., Wierda W. G., Keating M. J., Burger J. A. (2007): Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 110:3316-25

Byrd J. C., Furman R. R., Coutre S. E., Flinn I. W., Burger J. A., Blum K. A., Grant B., Sharman J. P., Coleman M., Wierda W. G., Jones J. A., Zhao W., Heerema N. A., Johnson A. J., Sukbuntherng J., Chang B. Y., Clow F., Hedrick E., Buggy J. J., James D. F., O'Brien S. (2013): Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 369:32-42

Calpe E., Codony C., Baptista M. J., Abrisqueta P., Carpio C., Purroy N., Bosch F., Crespo M. (2011): ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes towards CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*, 118:4401–10

Capalbo S., Trerotoli P., Ciancio A. (2000): Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *European Journal of Haematology*, 65:114–117

Center for drug evaluation and research (2015): Summary review. Application number: 208573Orig1s000

Cols M., Barra C. M., He B., Puga I., Xu W., Chiu A., Tam W., Knowles D. M., Dillon S. R., Leonard J. P., Furman R. R., Chen K., Cerutti A. (2012): Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *Journal of Immunology*, 188:6071-83

Crespo M., Bosch F., Villamor N., Bellosillo B., Colomer D., Rozman M., Marcé S., López-Guillermo A., Campo E., Montserrat E. (2003): ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 348:1764-75

Crowther-Swanepoel D., Wild R., Sellick G., Dyer M. J., Mauro F. R., Cuthbert R. J., Jonsson V., Matutes E., Dearden C., Wiley J., Fuller S., Catovsky D., Houlston R. S. (2008): Insight

into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) through analysis of IgVH gene usage and mutation status in familial CLL. *Blood*, 111:5691-5693

Davids M. S., Burger J. A. (2012): Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open Journal of Hematology*, 3

Davids M. S., Burger J. A. (2012): Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open Journal of Hematology*, 3(S1):-3

de Rooij M. F., Kuil A., Kater A. P., Kersten M. J., Pals S. T., Spaargaren M. (2015): Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. *Blood*, 125:2306-9

Dighiero G., Maloum K., Desablens B., Cazin B., Navarro M., Leblay R., Leporrier M., Jaubert J., Lepeu G., Dreyfus B., Binet J. L., Travade P. (1998): Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 338:1506-14

Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007): Flow cytometry with plant cells, Wiley-VCH(ed), *Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*:, pp. 22-25, betz-Druck GmbH, Darmstadt ,

Doubek M., Panovská A., Janča J. (2010): Co víme o incidence chronické lymfatické leukemie (CLL), a kde a jak jsou nemocní s CLL léčeni? *Transfúze Hematologie dnes*, 16:11–15

Eichhorst B., Fink A. M., Bahlo J., Busch R., Kovacs G., Maurer C., Lange E., Köppler H., Kiehl M., Sökler M., Schlag R., Vehling-Kaiser U., Köchling G., Plöger C., Gregor M., Plesner T., Trnecny M., Fischer K., Döhner H., Kneba M., Wendtner C. M., Klapper W., Kreuzer K. A., Stilgenbauer S., Böttcher S., Hallek M. (2016): First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncology*, 17:928-42

Fearon D. T., Carroll M. C. (2000): Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annual Review of Immunology*, 18:393-422

Fecteau J. F., Bharati I. S., O'Hayre M., Handel T. M., Kipps T. J., Messmer D. (2012): Sorafenib-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells is associated with

downregulation of RAF and myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1). *Molecular medicine*, 10;18:19-28

Fluckiger A. C., Li Z., Kato R. M., Wahl M. I., Ochs H. D., Longnecker R., Kinet J. P., Witte O. N., Scharenberg A. M., Rawlings D. J. (1998): Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> following B-cell receptor activation. *The EMBO Journal*, 17:1973–1985

Förster R., Davalos-Missslitz A. C., Rot A. (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *National Review of Immunology*, 8:362–71

Fulton A. M. (2009): Chemokine receptors in cancer. *Current Oncology reports*, 11:125-31

Ganghammer S., Gutjahr J., Hutterer E., Krenn P. W., Pucher S., Zelle-Rieser C., Jöhrer K., Wijtmans M., Leurs R., Smit M. J., Gattei V., Greil R., Hartmann T. N. (2016): Combined CXCR3/CXCR4 measurements are of high prognostic value in chronic lymphocytic leukemia due to negative co-operativity of the receptors. *Haematologica*, 101:99-102

Genevier H. C., Hinshelwood S., Gaspar H. B., Rigley K. P., Brown D., Saeland S., Rousset F., Levinsky R. J., Callard R. E., Kinnon C. (1994): Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *European Journal of Immunology*, 24:3100-5

Ghobrial I. M., Bone N. D., Stenson M. J., Novak A., Hedin K. E., Kay N. E., Ansell S. M. (2004): Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proceedings*, 79:318-25

Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M. (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4: 117

Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating M. J., Montserrat E., Rai K. R., Kipps T. J. (2008): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111:5446-56

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Research*,:986-94

Hoogeboom R., Wormhoudt T. A., Schipperus M. R., Langerak A. W., Dunn-Walters D. K., Guikema J. E., Bende R. J., van Noesel C. J. (2013): A novel chronic lymphocytic leukemia subset expressing mutated IGHV3-7- encoded rheumatoid factor B-cell receptors that are functionally proficient. *Leukemia*, 27:738-40

Chen L., Apgar J., Huynh L., Dicker F., Giago-McGahan T., Rassenti L., Weiss A., Kipps T. J. (2005): ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 105:2036-41

Chen Q., Zheng T., Lan Q., Lerro C., Zhao N., Qin Q., Hu X., Huang H., Liang J., Holford T., Leaderer B., Boyle P., Chanock S. J., Rothman N., Zhang Y. (2013): Single-nucleotide polymorphisms in genes encoding for CC chemokines were not associated with the risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 22:1332-5

Chen S. S., Chang B. Y., Chang S., Tong T., Ham S., Sherry B., Burger J. A., Rai K. R., Chiorazzi N. (2016): BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*,30:833–843

Chiorazzi N., Ferrarini M. (2003): B cell chronic lymphocytic leukemia: lesson learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annual Review of Immunology*, 21:841-894

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

Choi M. Y., Kashyap M. K., Kumar D. (2016): The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Practise and Research. Clinical Hematology*, 29:40-53

Iijima N., Yanagawa Y., Clingan J. M., Onoe, K. (2005) CCR7-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation Regulates Cell Migration in Mature Dendritic Cells. *International Immunology* 17:1201-1212

Jones D., Benjamin R. J., Shahsafari A., Dorfman D. M. (2000): The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 95:627-32

- Jou S. T., Carpino N., Takahashi Y., Piekorz R., Chao J. R., Carpino N., Wang D., Ihle J. N. (2002): Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Molecular and Cell Biology*, 22:8580-91
- Kienle D., Benner A., Kröber A., Winkler D., Mertens D., Bühler A., Seiler T., Jäger U., Lichter P., Döhner H., Stilgenbauer S. (2006): Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood*, 107:2090-3
- Kikushige Y., Ishikawa F., Miyamoto T., Shima T., Urata S., Yoshimoto G., Mori Y., Iino T., Yamauchi T., Eto T., Niino H., Iwasaki H., Takenaka K., Akashi K. (2011): Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 20:246-59
- Kipps T. J. (1993): Immunoglobulin genes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*, 19:615-25
- Kipps T. J. (2003): Immunology of chronic lymphocytic leukemia. *Current opinion in hematology*, 10:312-8
- Klein U., Lia M., Crespo M., Siegel R., Shen Q., Mo T., Ambesi-Impiombato A., Califano A., Migliozza A., Bhagat G., Dalla-Favera R. (2010): The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, 17:28-40
- Li S. H., Dong W. C., Fan L., Wang G. S. (2016): Suppression of chronic lymphocytic leukemia progression by CXCR4 inhibitor WZ811. *American Journal of Translational Research*, 8: 3812–3821
- Maffei R., Fiorcari S., Martinelli S., Potenza L., Luppi M., Marasca R. (2015): Targeting neoplastic B cells and harnessing microenvironment: the "double face" of ibrutinib and idelalisib. *Journal of Hematology and Oncology*, 8:60
- Mahadevan D., Choi J., Cooke L., Simons B., Riley C., Klinkhammer T., Sud R., Maddipoti S., Hehn S., Garewal H., Spier C. (2009): Gene Expression and Serum Cytokine Profiling of Low Stage CLL Identify WNT/PCP, Flt-3L/Flt-3 and CXCL9/CXCR3 as Regulators of Cell Proliferation, Survival and Migration. *Human Genomics and Proteomics*, 453-634

Maki G., Hayes G. M., Naji A., Tyler T., Carosella E. D., Rouas-Freiss N., Gregory S. A. (2008): NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia*, 22:998-1006

McCracken J. (2015): When to use (and not to use) flow cytometry isotype control. Published online: <http://expertcytometry.com/when-to-use-and-not-to-use-flow-cytometry-isotype-controls/>, navštíveno dne 22. 4. 2017

Milleck J., Kreuzer K. A., Med D., Assenmacher M., Schmitz J., Jaha P. S. (2012): Characterization of peripheral B cells expressing CLL-associated receptor tyrosine kinase ROR1 in healthy donors. Presented at Meeting American Society of Hematology in Atlanta

Morrison E. J., Flynn J. M., Jones J., Byrd J. C., Andersen B., L. (2016): Individual differences in physical symptom burden and psychological responses in individuals with chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology*, 95:1989-1997

Muller G., Hopken U. E., Lipp M. (2003): The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunology Review*, 195:117-135

Munk P. I., Reed J. (2008): Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leukemia and Lymphoma*, 45:2365-72

Murdoch C., Finn A. (2000): Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 95:3032-3043

NCBI Projects: TaqMan Gene Expression. Published online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>, navštíveno dne 22.4.2017

Nguyen P. H., Fedorchenko O., Rosen N., Koch M., Barthel R., Winarski T., Florin A., Wunderlich F. T., Reinart N., Hallek M. (2016): LYN Kinase in the Tumor Microenvironment Is Essential for the Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer cell*, 30:610-622

Nolz J. C., Tschumper R. C., Pittner B. T., Darce J. R., Kay N. E., Jelinek D. F. (2005): ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*, 19:1018-24

Ocaña E., Delgado-Pérez L., Campos-Caro A., Muñoz J., Paz A., Franco R., Brieva J. A. (2007): The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica*, 92:349–56

Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B. (2003): PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *National Review of Immunology*, 3:317-30

Ouillette P., Erba H., Kujawski L., Kaminski M., Shedden K., Malek S. N. (2008): Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Research*, 68: 1012–1021

Panovská A., Doubek M., Brychtová Y., Mayer J. (2013): Chronická lymfocytární leukemie – diagnostika a léčba. *Onkologie*, 7: 117–120

Papajík T., Vondráková V., Indrák K. (2002): Chronická lymfocytární leukémie. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně Doporučené postupy pro praktické lékaře, registrační číslo o/016/201, 8

Pepper C., Buggins A. G., Jones C. H., Walsby E. J., Forconi F., Pratt G., Devereux S., Stevenson F. K., Fegan C. (2015): Phenotypic heterogeneity in IGHV-mutated CLL patients has prognostic impact and identifies a subset with increased sensitivity to BTK and PI3K $\delta$  inhibition. *Leukemia*, 29:744–747

Petro J. B., Khan W. N. (2001): Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 276:1715-9

Preetish J., Kanti R. R. (2012): Overview of recent developments in chronic lymphocytic leukemia. *South Asian Journal of Cancer*, 1:84-89

PREMIER Biosoft: TaqMan® Probes. Published online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>, navštíveno dne 22.4.2017

Proudfoot A. E. (2002): Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *National Review of Immunology*, 2:106-115

- Puiggros A., Blanco G., Espinet B. (2014): Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International*, 43:59-83
- Purroy N., Abrisqueta P., Carabia J., Carpio C., Palacio C., Bosch F., Crespo M. (2015): Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget*, 6:7632-43
- Qin S., Rottman J. B., Myers P., Kassam N., Weinblatt M., Loetscher M., Koch A. E., Moser B., Mackay C. R. (1998): The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation*, 101:746-54
- Quijano S., López A., Rasillo A., Sayagués J. M., Barrena S., Sánchez M. L., Teodosio C., Giraldo P., Giralto M., Pérez M. C., Romero M., Perdiguer L., Orfao A. (2008): Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cytometry Society*, 74:139-49
- Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternack B. S. (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46:219-234
- Rassenti L. Z., Huynh L., Toy T. L., Chen L., Keating M. J., Gribben J. G., Neuberg D. S., Flinn I. W., Rai K. R., Byrd J. C., Kay N. E., Greaves A., Weiss A., Kipps T. J. (2004): ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 351:893-901
- Rassenti L. Z., Jain S., Keating M. J., Wierda W. G., Grever M. R., Byrd J. C., Kay N. E., Brown J. R., Gribben J. G., Neuberg D. S., He F., Greaves A. W., Rai K. R., Kipps T. J. (2008): Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 112:1923-30
- Rawstron A. C., Bennett F. L., O'Connor S. J., Kwok M., Fenton J. A., Plummer M., de Tute R., Owen R. G., Richards S. J., Jack A. S., Hillmen P. (2008): Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 359:575-83



Reff M. E., Carner K., Chambers K. S., Chinn P. C., Leonard J. E., Raab R., Newman R. A., Hanna N., Anderson D. R. (1994): Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 83:435–445

Richardson S. J., Matthews C., Catherwood M. A., Alexander H. D., Carey B. S., Farrugia J., Gardiner A., Mould S., Oscier D., Copplestone J. A., Prentice A. G. (2005): ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 107: 3584-92

Rolli V., Gallwitz M., Wossning T., Flemming A., Schamel W. W., Zürn C., Reth M. (2002): Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Molecular Cell*, 10:1057-69

Roos J., DiGregorio P. J., Yeromin A. V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J. A., Wagner S. L., Cahalan M. D., Velichelebi G., Stauderman K. A. (2005): STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *Journal of Cell Biology*, 169:435-45

Rossi D., Rasi S., Spina V., Brusca A., Monti S., Ciardullo C., Deambrogi C., Khiabani H., Serra R., Bertoni F., Forconi F., Laurenti L., Marasca R., Dal-Bo M., Rossi F. M., Bulian P., Nomdedeu J., Del Poeta G., Gattei V., Pasqualucci L., Rabadan R., Foà R., Dalla-Favera R., Gaidano G. (2013): Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121:1403-12

Rozman C., Montserrat E. (1995): Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 333:1052-1057

Sauty A., Dziejman M., Taha R. A., Iarossi A. S., Neote K., Garcia-Zepeda E. A., Hamid Q., Luster A. D. (1999): The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology*, 162:3549-58

Shanafelt T. D., Borah B. J., Finnes H. D., Chaffee K. G., Ding W., Leis J. F., Chanan-Khan A. A., Parikh S. A., Slager S. L., Kay N. E., Call T. G. (2015): Impact of ibrutinib and idelalisib on the pharmaceutical cost of treating chronic lymphocytic leukemia at the individual and societal levels. *Journal of Oncology Practise*, 11:252-8

Smida V. (2012): Chromosomal Abnormalities In Lymphoproliferative Disorders (Acute Lymphoblastic Leukemia, Chronic Lymphocytic Leukemia), published online: <http://www.doctortipster.com/9326-chromosomal-abnormalities-in-lymphoproliferative-disorders-acute-lymphoblastic-leukemia-chronic-lymphocytic-leukemia.html>, navštíveno dne 22.4.2017

Smith M. R. (2003): Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22:7359-68

Spaargaren M., Beuling E. A., Rurup M. L., Meijer H. P., Klok M. D., Middendorp S., Hendriks R. W., Pals S. T. (2003): The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *The Journal of Experimental Medicine*, 198:1539-50

Srinivasan L., Sasaki Y., Calado D. P., Zhang B., Paik J. H., DePinho R. A., Kutok J. L., Kearney J. F., Otipoby K. L., Rajewsky K. (2009): PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *The Cell*, 139:573-86

Stein H., Bonk A., Tolksdorf G., Lennert K., Rodt H., Gerdes J. (1980): Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 28:746-60

Stevenson F. K., Caligaris-Cappio F. (2004): Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103:4389-95

Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A. (2008): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition Volume 2 WHO

Tedder T. F., Boyd A. W., Freedman A. S., Nadler L. M., Schlossman S. F. (1985): The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. *Journal of Immunology*, 135:973-9

Teicher B. A. and Fricker S. P. (2010): CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer, *Clinical Cancer Research*, 16:2927-31

Teras L. R., DeSantis C. E., Cerhan J. R., Morton L. M., Jemal A., Flowers C. R. (2016): US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *A Cancer Journal for Clinicians*, DOI: 10.3322/caac.21357

ThermoFisher scientific: SYBR® products for Real Time PCR & Nucleic Acid. Published online: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/product-brand/sybr.html>, navštíveno dne 7. 2. 2017

Ticchioni M., Essafi M., Jeandel P. Y., Davi F., Cassuto J. P., Deckert M., Bernard A. (2007): Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*, 26: 7081–709

Till K. J., Lin K., Zuzel M., Cawley J. C. (2002): The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*, 99:2977–84

Trentin L., Agostini C., Facco M., Piazza F., Perin A., Siviero M., Gurrieri C., Galvan S., Adami F., Zambello R., Semenzato G. (1999): The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *Journal of Clinical Investigation*, 104:115-21

WaferGen Biosystems datasheet (2016): SmartChip™ Real-Time PCR System maximized reagents, high-throughput results.

Wang L., Lawrence M. S., Wan Y., Stojanov P., Sougnez C., Stevenson K., Werner L., Sivachenko A., DeLuca D. S., Zhang L., Zhang W., Vartanov A. R., Fernandes S. M., Goldstein N. R., Folco E. G., Cibulskis K., Tesar B., Sievers Q. L., Shefler E., Gabriel S., Hacohen N., Reed R., Meyerson M., Golub T. R., Lander E. S., Neuberger D., Brown J. R., Getz G., Wu C. J. (2011): SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 365:2497–50

Widhopf G. F., Goldberg C. J., Toy T. L., Rassenti L. Z., Wierda W. G., Byrd J. C., Keating M. J., Gribben J. G., Rai K. R., Kipp T. J. (2007): Nonstochastic pairing of immunoglobulin heavy and light chains expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells is predicated on the heavy chain CDR3. *Blood*, 111:3137–3144

Wiestner A. (2015): The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 100:1495–1507

Wong S., Fulcher D. (2004): Chemokine receptor expression in B-cell lymphoproliferative disorders. *Leukemia and Lymphoma*, 45:2491-6

Woyach J. A., Johnson A. J., Byrd J. C. (2012): The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 120:1175-1184

Yuille M. R., Houlston R. S., Catovsky D. (1998): Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 12:1696–1698

Zhang S., Kipps T. J. (2013): The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annual Review of Pathology*, 9:103-18

## 9. Seznam použitých zkratek

AKT	serin/threonin kináza ( <i>serine-threonine kinase</i> )
AMK	aminokyselina ( <i>amino acid</i> )
APC	alofykocyanin ( <i>allophycocyanin</i> )
BAFF	<i>B-cell activating factor receptor</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma</i>
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>
BCR	B-buněčný receptor ( <i>B-cell receptor</i> )
BTK	Brutonova tyrosinová kináza ( <i>Bruton tyrosine kinase</i> )
CCR	C-C motif chemokinový receptor ( <i>C-C motif chemokine receptor</i> )
CD	diferenční skupina ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CLL	chronická lymfocytární leukémie ( <i>chronic lymphocytic leukemia</i> )
CXCR	C-X-C motif chemokinový receptor ( <i>C-X-C motif chemokine receptor</i> )
DAG	diacylglycerol
del(11q)	delece na dlouhém raménku chromozomu 11
del(13q)	delece na dlouhém raménku chromozomu 13
del(17p)	delece na krátkém raménku chromozomu 17
del(6q)	delece na dlouhém raménku chromozomu 6
DLEU7	<i>deleted in lymphocytic leukemia, 7</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina ( <i>double stranded deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase-1</i>
FITC	fluorescenční izothiokyanát ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
FMC7	epitop CD20
FSC	přední rozptyl světla ( <i>forward scatter</i> )
GDP	guanosin difosfát ( <i>guanosine diphosphate</i> )
GTP	guanosin trifosfát ( <i>guanosine triphosphate</i> )
H	těžký řetězec imunoglobulinu ( <i>immunoglobuline heavy chain</i> )
HSC	hematopoetická kmenová buňka ( <i>haematopoetic stem cells</i> )

Ig	imunoglobulin ( <i>immunoglobuline</i> )
IgVH	variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu ( <i>immunoglobulin variable region heavy chain</i> )
Ig $\alpha$	$\alpha$ podjednotka imunoglobulinu ( <i>immunoglobulin subunit <math>\alpha</math></i> )
Ig $\beta$	$\beta$ podjednotka imunoglobulinu ( <i>immunoglobulin subunit <math>\beta</math></i> )
IP3	inositol-1,4,5- trisfosfát ( <i>inositol-1,4,5-trisphosphate</i> )
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motive</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kilodalton
L řetězec	lehký řetězec imunoglobulinu ( <i>immunoglobulin light chain</i> )
Lyn	tyrosinová kináza ( <i>thyrosine kinase</i> )
MAP	mitogenem aktivovaná kináza ( <i>mitogen activating kinase</i> )
MBL	monoklonální B-buněčná lymfocytóza ( <i>monoclonal B-cell lymphocytosis</i> )
MFI	průměrná hodnoty intenzity fluorescence ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
miR	minimální deletovaná oblast regionu ( <i>minimal deleted region</i> )
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MSC	mesenchymální stromatická buňka ( <i>mesenchymal stroma cell</i> )
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor kappa B ( <i>nuclear factor kappa B</i> )
NK buňky	přirozený zabíječ ( <i>natural killer cells</i> )
NLC	<i>nurse-like cell</i>
PAK	proteinkináza A ( <i>proteinkinase A</i> )
PBS	fosfátový pufr ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	fykoerytrin ( <i>phycoerithrin</i> )
PGK1	fosfoglycerát kináza 1 ( <i>phosphoglycerate kinase 1</i> )
PI3K	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza ( <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> )
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i> )
PIP3	fosfatidylinositol-1,4,5-trisfosfát ( <i>phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphate</i> )
PLC	fosfoinositid fosfolipáza ( <i>phosphoinositid phospholipase</i> )
PSMB2	proteazomová podjednotka beta 2 ( <i>proteasome ubunit beta 2</i> )
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce ( <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )

rcf	relativní centrifugační síla ( <i>relative centrifugal force</i> )
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROR1	tyrosin kinázový sirotčí receptor ( <i>receptor kinase-like orphan receptor 1</i> )
RT-PCR	reverzní transkripce-polymerázová řetězová reakce ( <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> )
SNP	jednonukleotidový polymorfismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SSC	boční rozptyl světla ( <i>side scatter</i> )
Syk	tyrosin kináza vyskytující se ve slezině ( <i>spleen tyrosine kinase</i> )
Taqpolymeráza	DNA polymeráza izolovaná z <i>Thermus aquaticus</i> ( <i>DNA polymerase isolated from Thermus aquaticus</i> )
TGF	transformující růstový faktor ( <i>tumor growth factor</i> )
TP53	gen pro protein p53 ( <i>tumor protein p53</i> )
ZAP70	protein kináza 70 asociována s zeta řetězcem ( <i>zeta-chain associated protein kinase</i> )