

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)**Acta Haematologica Polonica**journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem**Praca poglądowa/Review**

Cytogenetyczne i molekularne uwarunkowania agresywnej postaci przewlekłej białaczki limfocytowej



Cytogenetic and molecular determinants of aggressive form of chronic lymphocytic leukemia

Anna Grenda*, Michał Budzyński, Agata A. Filip

Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Kierownik: dr hab. n. med.
Agata A. Filip, Lublin, Poland

INFORMACJE O ARTYKULE**Historia artykułu:**

Otrzymano: 22.01.2013

Zaakceptowano: 10.06.2013

Dostępne online: 19.06.2013

Słowa kluczowe:

- przewlekła białaczka limfocytowa
- aberracje chromosomowe
- mikroRNA
- nowe mutacje

Keywords:

- Chronic lymphocytic leukemia
- Chromosomal aberrations
- MicroRNAs
- Novel mutations

A B S T R A C T

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) mainly affects people older than 60 years. Accumulation of morphologically mature but dysfunctional B-lymphocytes in the bone marrow, lymph nodes and peripheral blood is a characteristic feature of this disease. Chromosomal aberrations are observed in lymphocytes of most CLL patients. Typical alterations include deletions of 13q14 and 11q, trisomy 12, and deletions of 17p. Altered expression of the genes located within involved regions, i.e. *microRNA15/16* (13q14.3), *ATM* (11q22-q23) or *TP53* (17p13) may be associated with the development and progression of the disease. Cryptic mutations may also contribute to leukemogenesis. Among others, they affect *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* and *BIRC* genes.

CLL is a disease with heterogeneous course. There are two clinical forms – indolent and aggressive. The former is characterized by long time to first treatment and demise usually occurs because of coexisting diseases or is associated with leukemia-dependent immunodeficiency. Rapid clinical course and short overall survival, sometimes in spite of appropriate treatment implementation, is typical for aggressive form of CLL. For patients with this form, the moment of treatment initiation and the choice of first-line therapy are especially important, and depend inter alia on prognostic and predictive factors.

Established poor prognostic factors in CLL include chromosomal aberrations, i.e., deletion of 17p or 11q, high ZAP-70 kinase expression, mutations/deletions of *TP53*, and lack of mutation of immunoglobulin heavy chain variable region genes (*IgVH*).

In this paper we tried to point out the importance of some of the prognostic and predictive factors used routinely in the diagnostic management of CLL. Prognostic and predictive potential of *microRNA* expression level and recently described cryptic changes in the *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* and *BIRC3* have also been presented.

© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Zakład Genetyki Nowotworów UM, ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin, Polska. Tel.: +48 509277187.

Adres email: an.grenda@gmail.com (A. Grenda).

Wstęp

Dostępne techniki badawcze umożliwiają poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych, które mogą przyczynić się do szybszego rozpoznania PBL oraz do udoskonalenia istniejących i opracowania nowych strategii terapeutycznych. Dzięki metodom cytogenetycznym możliwe jest wykrycie aberracji chromosomowych, a nowoczesne narzędzia diagnostyczne pozwalają na precyzyjną identyfikację zmian w genomie na poziomie molekularnym. Mają one niejednokrotnie strategiczne znaczenie przy ocenie przebiegu choroby, a docelowo przy doborze indywidualnego leczenia dla chorych. Od czasu opracowania przez Rai i wsp. w 1975 roku klasyfikacji zaawansowania PBL na podstawie limfocytozy, zajęcia organów limfatycznych, anemii oraz trombocytopenii, opisano i zwalidowano szereg nowych czynników prognostycznych [1]. Uzupełniają one klasyfikację Rai, ułatwiają podejmowanie decyzji o rozpoczęciu leczenia i o wyborze strategii terapeutycznych. Bardzo istotną klinicznie jest identyfikacja *del(17p)* w limfocytach chorego na PBL, ponieważ jej obecność wiąże się z szybką progresją, agresywnym przebiegiem choroby i słabą odpowiedzią na standardowe schematy leczenia [1-3]. Niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi są także mutacje w obrębie genów *TP53* i *NOTCH1* oraz delecja 11q [4-6]. Dzięki pozyskaniu takich informacji istnieje sposobność szczegółowej analizy każdego przypadku PBL i indywidualnego doboru terapii [7].

Coraz większego znaczenia prognostycznego w PBL nabierają mikroRNA, samodzielnie lub w powiązaniu z określonymi aberracjami chromosomowymi. Przykładem jest skupisko genów *miR-15/16*, których obniżona ekspresja jest obserwowana u chorych z utratą fragmentu chromosomu 13q14 [8]. MikroRNA-15a/16 są negatywnymi regulatorami ekspresji genu *BCL2*, którego rola w przedłużaniu przeżycia limfocytów PBL jest znana od dawna [8]. Izolowana delecja 13q14 jest korzystnym czynnikiem rokowniczym, ale chorzy z tego typu

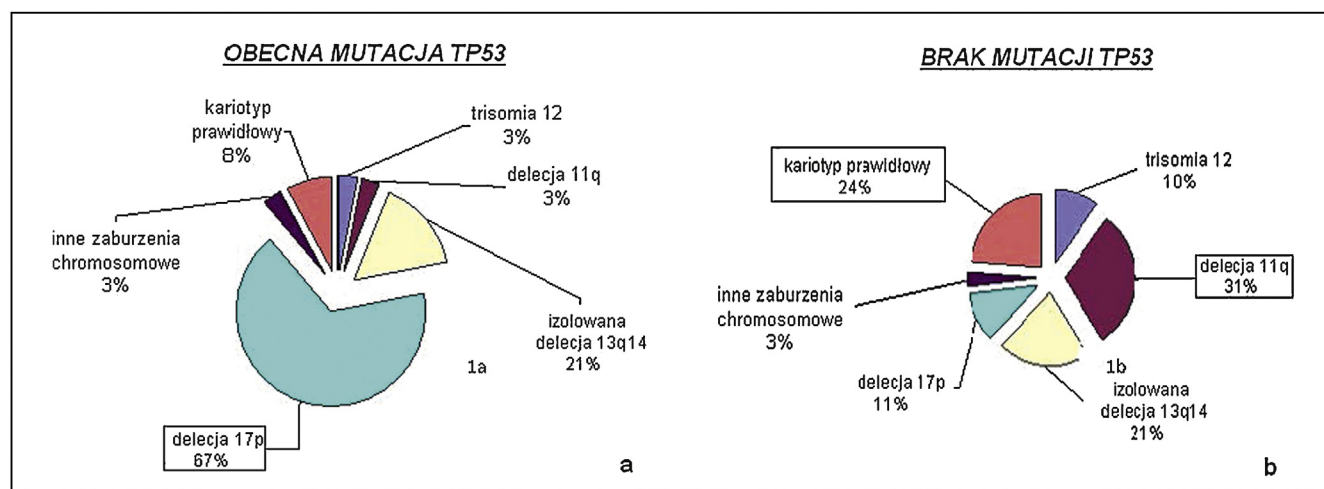
zaburzeniem stanowią heterogenną grupę, ze względu na możliwość występowania dodatkowych aberracji i różnic w ilości komórek białaczkowych z *del(13q14)*. W związku z tym profil ekspresji genów zaangażowanych w apoptozę, proliferację, funkcje cytoszkieletu czy metabolizm ubiquityny jest zróżnicowany u chorych w tej grupie. U osób z większą liczbą komórek z *del(13q14)* zaobserwowano nadekspresję genów zaangażowanych w proliferację, a obniżoną ekspresję genów zaangażowanych w zahamowanie cyklu komórkowego. Dane wskazują zatem, że liczba komórek z izolowaną aberracją 13q14 ma znaczenie przy szacowaniu ogólnego czasu przeżycia, jak również czasu do progresji choroby [9]. Pewne znaczenie prognostyczne mają także nietypowe dla PBL aberracje chromosomowe, takie jak *t(14;18)* czy *t(1;6)* [10, 11].

W niniejszej pracy starano się przedstawić cytogenetyczne i molekularne uwarunkowania wskazujące na agresywny przebieg PBL, związany z czasem do rozpoczęcia leczenia i skróconym czasem całkowitego przeżycia.

Delecja 17p oraz mutacja *TP53* jako najistotniejsze z czynników prognostycznych związanych z agresywnym przebiegiem PBL

Delecja krótkiego ramienia chromosomu 17 i mutacja genu *TP53* (*locus* 17p31.1) zaliczane są do niekorzystnych czynników rokowniczych. Zmiany te wskazują na skrócony czas całkowitego przeżycia i wiążą się z opornością na chemioterapeutyki, co znacznie utrudnia leczenie [12]. U ok. 44% chorych z opornością na leczenie fludarabiną obserwuje się *del(17p)* lub mutację *TP53* [12].

W przypadku *TP53* stwierdza się mutacje nonsensowne zlokalizowane w kodonach 173, 220, 248 i 273. Występować mogą również zmiany typu przesunięcia ramki odczytu (*frame-shift*), z których dwie, stanowiące 18% wszystkich występujących mutacji, to Y220C oraz p.R209KfsX6 [12].



Ryc. 1 – Profil genomowy chorych na PBL wykazujących oporność na leczenie fludarabiną w obecności mutacji *TP53* (1a) oraz przy braku mutacji *TP53* (1b) (wg Zenz i wsp., 2009, modyfikacja) [12]

Fig. 1 – Genomic profile of CLL patients resistant to fludarabine in the presence of *TP53* mutations (1a) and in the absence of *TP53* mutations (1b) (according to Zenz et al., 2009, modified) [12]

Wykazano, że u co najmniej 50% osób z PBL bez delekcji 17p obecna jest homozygotyczna mutacja TP53, spowodowana disomią jednorodzielską (UPD; *uniparental disomy*) [12].

Mutacje w TP53 mogą występować z lub bez del(17p), jednak u większości chorych mutacjom TP53 towarzyszą delekcje fragmentu krótkiego ramienia chromosomu 17 (Ryc. 1a) [12, 13]. Obie te zmiany rokują niepomyślnie – wiążą się ze skróconym czasem całkowitego przeżycia (OS; *overall survival*) oraz złą odpowiedzią na leczenie [12]. Jednak oporność na chemioterapię może rozwinąć się także u chorych z dzikim typem TP53. W takiej sytuacji często występują delekcje 11q lub – co ciekawe – prawidłowy kariotyp (Ryc. 1b).

Obecność mutacji TP53 może stanowić niezależny czynnik wskazujący na gorsze rokowanie dla chorych na PBL, wykazujących oporność na fludarabinę [4, 14]. Sugeruje się, że występowanie tej mutacji powinno być sprawdzane przed rozpoczęciem leczenia, a jeśli u danego chorego zostanie ona potwierdzona, warto zastosować inne strategie terapeutyczne, aby uniknąć lekooporności [14]. Diagnostyka zmian w TP53 powinna obejmować eksony od 4 do 9 jako miejsca, gdzie najczęściej dochodzi do uszkodzeń. Wczesna identyfikacja mutacji może przyspieszyć decyzję o zastosowaniu metod terapeutycznych, takich jak leczenie biologiczne (przeciwciała monoklonalne przeciw CD52) i ewentualne alloprzeszczepienie komórek macierzystych w fazie pierwszej remisji [4, 15].

Z agresywną formą PBL oporną na leczenie wiązany jest również określony profil ekspresji mikroRNA. U ponad 30% chorych opornych na fludarabinę zaobserwowano obniżoną ekspresję miR-34a w porównaniu z chorymi odpowiadającymi na leczenie [12]. Niższa ekspresja mikroRNA-34a występuje u osób z delecją 17p, zarówno w obecności mutacji TP53 jak i przy jej braku [16]. Rossi i wsp. potwierdzili, że miR-34a jest transaktywowane przez białko TP53, ale ze względu na obniżenie ekspresji miR-34a także u chorych z dzikim TP53 należy wnioskować, że istnieją inne mechanizmy wpływające na niską ekspresję mikroRNA-34a [16]. Przez swoje zaangażowanie w szlaki działania białka TP53, cząsteczka mikroRNA-34a staje się ważnym elementem procesów mających na celu zapobieganie podziałom komórki w przypadku uszkodzenia materiału genetycznego. Sugeruje się, że obniżenie ekspresji tego mikroRNA może się przyczyniać do akumulacji białaczkowych limfocytów [12]. Na podstawie analizy poziomu ekspresji miR-34a można prognozować czas do podwojenia ilości limfocytów (LDT; *lymphocyte doubling time*) oraz czas całkowitego przeżycia. Badania dużych grup chorych pozwolą na sprawdzenie, czy poziom ekspresji miR-34a stanie się również samodzielnym czynnikiem szacowania czasu przeżycia bez leczenia (TFS; *treatment free-survival*) [17].

Określone delekcje, mutacje poszczególnych genów oraz w przyszłości, być może, poziom ekspresji wybranych mikroRNA są niezwykle istotne jako czynniki diagnostyczne i prognostyczne, ponieważ zdiagnozowanie PBL nie musi oznaczać rozpoczęcia leczenia, dopiero przekształcanie się jej w postać agresywną jest sygnałem do rozpoczęcia terapii oraz wyboru rodzaju chemioterapeutyku. Analiza ekspresji miRNA może ułatwić podejmowanie takich decyzji, dlatego prowadzone są intensywne badania, które mają na celu wyjaśnienie, jak zmienia się profil ekspresji mikroRNA w trakcie choroby i jak charakteryzuje poszczególne jej

stadia, włącznie z etapami przekształcania się PBL w agresywną postać.

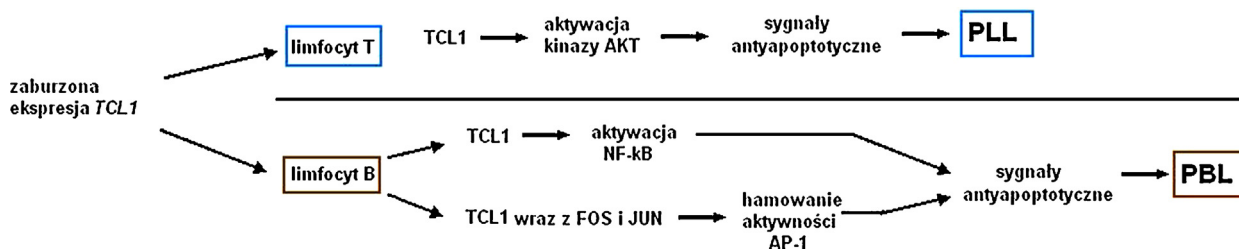
Jak wykazali Rossi i wsp., cząsteczkami, których geny ulegają nadekspresji w przypadku chorych opornych na terapię z del(17p), są miR-15a, miR-21, miR-155, natomiast obniżeniu ulegają wspomniana wcześniej miR-34a oraz miR-181, miR-497 [16]. W przypadku mikroRNA-497 wskazuje się na znacznie obniżony poziom ekspresji, zarówno wtedy, gdy del(17p) występuje jako izolowana aberracja, jak też wtedy, gdy obecne są aberracje współlistniejące [16]. Sugeruje się, że genami docelowymi dla tych miRNA są geny zaangażowane między innymi w kontrolę cyklu komórkowego czy kontrolę cyklu dobowego komórki [12]. Wydaje się, że łączna ocena kariotypu w poszukiwaniu delekcji 17p oraz badanie ekspresji miR-21 mogą być pomocne w różnicowaniu chorych z grup niskiego i wysokiego ryzyka, co mogłoby ułatwić decyzję o rozpoczęciu leczenia oraz o rodzaju terapii. Niezbędne są jednak dalsze badania w tym zakresie. Na dzień dzisiejszy największe znaczenie w praktyce klinicznej dotyczącej PBL mają mutacje TP53 i delekcja 17p, jako zmiany, które wskazują na agresywną postać PBL. Są jednym z ważniejszych czynników rokowniczych wraz z obecnością kinazy ZAP-70, niezmutowanej formy genów IgVH, predysponujących do zastosowania strategii terapeutycznych obejmujących przeciwciała monoklonalne oraz alloprzeszczepienie komórek macierzystych, szczególnie u tych chorych, u których widoczna jest oporność na leczenie analogami purynowymi.

Obniżona ekspresja niektórych mikroRNA oraz delekcje 11q u chorych z agresywną postacią PBL

Badania wskazują, że przy szacowaniu TFS czy OS przydatna może być ocena poziomu ekspresji miR-29c oraz miR-223. Wykazano, że te mikroRNA mogą potencjalnie stanowić czynniki prognostyczne, pomocne w określaniu przebiegu PBL i w doborze leczenia spersonalizowanego. Dowiedziono, że obniżeniu ekspresji mikroRNA-29c oraz mikroRNA-223 towarzyszy podwyższenie ekspresji onkogenu TCL1 (*T-cell leukemia/lymphoma 1*) [18]. Wskazuje to na gorsze rokowanie oraz agresywniejszy przebieg choroby [18]. Niższa ekspresja miR-223 jest również obserwowana w przypadku MBCL (*monoclonal B-cell lymphocytosis*) oraz SMZL (*splenic marginal zone lymphoma*), przy czym nie stwierdza się istotnej różnicy w ekspresji tego mikroRNA między PBL a MBCL czy SMZL. Nie obserwuje się również związku pomiędzy ekspresją miR-223 a występowaniem aberracji chromosomowych, takich jak del(13q14), del(11q22), del(17p13) czy +12 [19].

Wskazuje się natomiast na powiązania między del(11q), obniżoną ekspresją miR-29 i miR-181 oraz ekspresją onkogenu TCL1 [20]. Badania wykazały, że u chorych z agresywną postacią PBL dochodzi do częstszych delekcji 11q w porównaniu z osobami z łagodnym przebiegiem choroby [20].

Związek pomiędzy TCL1, delecją 11q oraz cząsteczkami miR-29 i miR-181 sugeruje, że na długim ramieniu chromosomu 11 mogą znajdować się geny czynników regulujących ekspresję miR-29 oraz miR-181. Gdy dochodzi do ubytku fragmentu 11q, prawdopodobnie te geny są tracone, a co za tym idzie, zmniejsza się ilość czynników stymulujących



Ryc. 2 – Schemat przedstawiający potencjalną funkcję onkogeną TCL1 w limfocytach T i B.

Nadekspresja onkogenu TCL1 wiązana jest głównie z białaczką prolimfocytową z komórek T (PLL-T). Przyjmuje się, że nadekspresja TCL1 w przypadku przewlekłej białaczki limfocytowej prowadzi do akumulacji białaczkowych limfocytów i prawdopodobnie ma związek z bardziej agresywną postacią choroby (wg Pekarsky i wsp., 2010, modyfikacja) [21] NF-κB – nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, FOS – FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, JUN – jun proto-oncogene, AP-1 – activator protein 1

Fig. 2 – Diagram showing the potential oncogenic function of TCL1 in T and B lymphocytes. Overexpression of TCL1 oncogene is associated mainly with T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL). It is assumed that the overexpression of TCL1 leads to the accumulation of leukemic cells in chronic lymphocytic leukemia. It is probably related to a more aggressive form of the disease (according to Pekarsky et al., 2010, modified) [21]

ekspresję tych dwu miRNA. Skutkuje to niedoborem mikroRNA-29 oraz mikroRNA-181, co z kolei może prowadzić do nadekspresji onkogenu TCL1 [20].

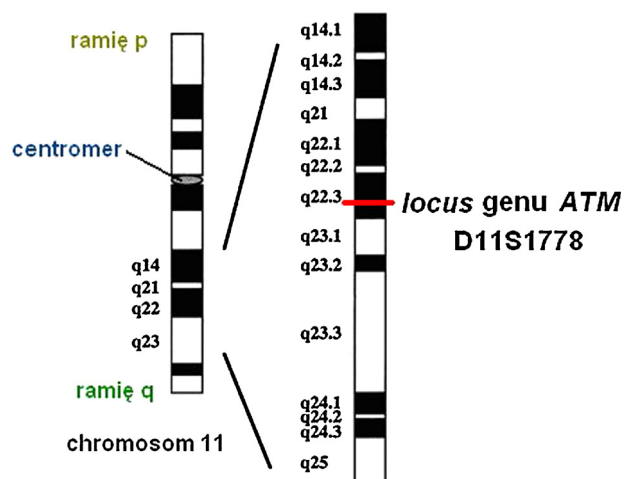
Onkoproteina TCL1 (p14) jest koaktywatorem kinazy AKT. Bierze udział w jej fosforylacji i aktywacji. AKT jest strategiczną cząsteczką szlaku przekazywania komórkowych sygnałów antyapoptotycznych [20]. Jej nadaktywność, wynikająca między innymi z nadmiernej stymulacji przez TCL1, może przyczynić się do akumulacji białaczkowych limfocytów (Ryc. 2).

Ponieważ miR-29 oraz miR-181 mogą regulować ekspresję onkogenu TCL1, terapia mająca na celu przywrócenie ekspresji czy uzupełnianie niedoborów tych mikroRNA jest warta rozważenia u chorych z nadekspresją TCL1 [20].

Delecje 11q22-q23 są na drugim miejscu pod względem częstości występowania aberracji chromosomowych u chorych na PBL i obserwuje się je u ok. 20% z nich [7]. Niemal u wszystkich chorych z tego rodzaju zaburzeniem notowane jest znaczne powiększenie węzłów chłonnych zarówno obwodowych, brzusznych jak i śródpiersiowych. Delecja 11q wiąże się z ryzykiem agresywnego przebiegu choroby, który może wyrażać się przez szybszą progresję i skrócony czas do rozpoczęcia leczenia. Wskazuje się, że del(11q) stanowi ważny czynnik niepomyślnego rokowania, zwłaszcza u osób poniżej 55. roku życia, ponieważ właśnie w tej grupie chorych dochodzi do znacznego skrócenia czasu przeżycia [6]. Ubytek fragmentu długiego ramienia chromosomu 11 wiąże się z agresywniejszym przebiegiem PBL prawdopodobnie dlatego, że delecja 11q22-q23 obejmuje gen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) [7] (Ryc. 3).

Kinaza ATM jest głównym czynnikiem integrującym sygnały, które mają na celu włączenie mechanizmów zapobiegających podziałom komórek z dwułańcuchowymi uszkodzeniami DNA [22]. Reguluje również szlaki sygnalizacyjne białka supresorowego TP53 [7]. Delecja fragmentu 11q22-q23 skutkuje brakiem białka ATM, co może wpływać na zakłócenie kontroli cyklu komórkowego i destabilizację genomu. Brak kinazy ATM przyczynia się do nieprawidłowości w procesach apoptozy i senescencji komórek, czyli upośledzenia

mechanizmów chroniących przed zwiększaniem ilości komórek z defektem w materiale genetycznym [7]. Wynikiem tego może być nagromadzenie się komórek z uszkodzonym DNA, o nieograniczonych zdolnościach podziałowych, które będą stopniowo wypierały komórki prawidłowe. Niedawno stwierdzono, że polimorfizmy genu ATM w intronach 15 i 61 również mogą zakłócać ekspresję genu ATM [23]. Jednonukleotydowe zmiany (SNP; *single nucleotide polymorphism*) mogą doprowadzić do eliminacji grup metylowych w każdym z obu wymienionych intronów, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju PBL. Nie do końca jest jasne, dlaczego tak się dzieje. Być może zmiana we wzorze metylacji prowadzi do subtelnych zakłóceń w ekspresji genu, które skutkują większą podatnością na rozwój PBL [23]. Nie obserwuje się natomiast wyciszenia ekspresji genu ATM przez hipermetylację regionów promotorowych.



Ryc. 3 – Lokalizacja chromosomowa genu kinazy ATM, którego utrata może wskazywać na agresywną postać PBL (wg Stilgenbauer i wsp., 1996, modyfikacja) [22]

Fig. 3 – Chromosomal location of ATM kinase gene which deletion may indicate an aggressive form of CLL (according to Stilgenbauer et al., 1996, modified) [22]

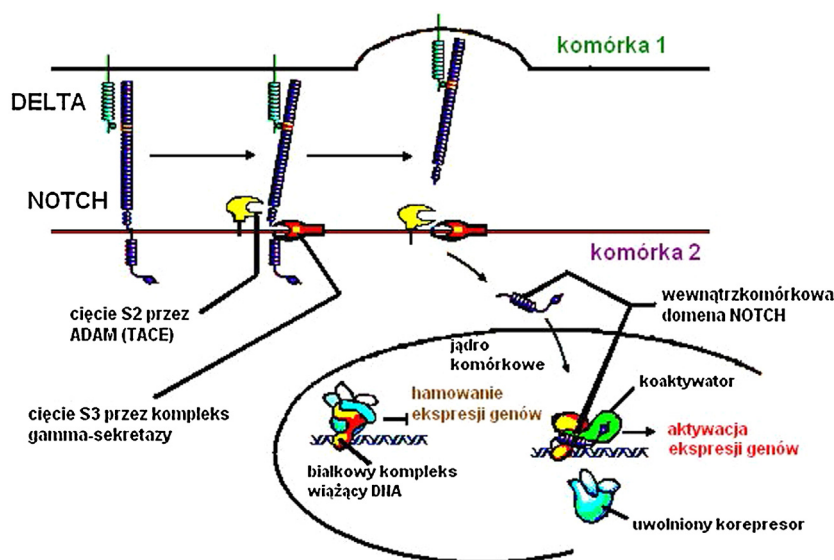
Trisomia 12 i mutacje genu NOTCH1 jako czynniki związane z agresywną postacią PBL

Obecność dodatkowej kopii chromosomu 12 jest klasyfikowana na trzecim miejscu pod względem częstości występowania zaburzeń chromosomowych u chorych z PBL. Stwierdzono, że w 70% przypadków jest to samodzielna aberracja, natomiast w pozostałych obserwuje się aberracje współistniejące [5]. Del Guidice i wsp. wykazali, że u osób z izolowaną trisomią 12 częściej występują mutacje genu NOTCH1 (*Notch homolog 1, translocation-associated – Drosophila*) w porównaniu z chorymi z innymi zaburzeniami chromosomowymi [5]. Mutacje NOTCH1 (locus 9q34.3) to w większości delecje z przesunięciem ramki odczytu. Występują one z jednakową częstością u mężczyzn i u kobiet [5, 24]. Sądzi się, że mogą być ważnym czynnikiem prognostycznym wskazującym na agresywny przebieg choroby u obydwu płci [5]. Agresywna postać PBL u osób z mutacją NOTCH1 najprawdopodobniej ma związek ze wzmożoną proliferacją komórkową, wynikającą między innymi z działania nieprawidłowego białka NOTCH1 [5]. Jest ono receptorem przez błonowy biorącym udział w promowaniu podziałów komórkowych. Aktywacja receptorów NOTCH odbywa się poprzez ich oddziaływanie ze specyficznymi ligandami (DELTA-like, JAGGED), zlokalizowanymi na sąsiednich komórkach. Interakcje te zapoczątkowują serie zdarzeń, prowadzących do odcięcia części wewnątrzkomórkowej receptora NOTCH i jego szybkiej wędrówki do jądra

komórkowego, gdzie może stymulować ekspresję genów. Tak więc NOTCH1 działa jako receptor przez błonowy, jak również czynnik transkrypcyjny. Bierze on udział w inicjacji transkrypcji genu MYC, a także innych zaangażowanych we wzrost, podziały komórkowe, różnicowanie oraz apoptozę [25, 26] (Ryc. 4).

Wewnątrzkomórkowa domena NOTCH wraz z czynnikami transkrypcyjnymi oraz innymi białkami tworzą wieloskładnikowe kompleksy, biorące udział w aktywacji pierwszego etapu ekspresji genów. Proces transkrypcji jest ułatwiony dzięki udziałowi acetylotransferazy histonowej oraz kompleksowi remodelującemu chromatynę. Wpływają one na inicjację oraz na elongację transkrypcji przez rozluźnienie chromatyny, co umożliwia polimerazie i białkom pomocniczym dostęp do sekwencji transkrybowanych genów [27]. Przy terminacji transkrypcji do kompleksów białkowych wiążących DNA rekrutowane są korepresory, a kinazy (CDK8; *cyclin-dependent kinase-8*) oraz ligazy SEL10 E3 modyfikują wewnątrzkomórkową domenę NOTCH, w taki sposób, aby była dostępna dla proteasomów, w których jest degradowana przy udziale ubikwityny. Korepresory angażują deacetylazę histonową (HDAC) i inne kofaktory prowadzące do kondensacji chromatyny [27].

Mutacje NOTCH1 dotyczą głównie domeny PEST, która jest składową wewnątrzkomórkowej części receptora, pełniącą funkcję czynnika transkrypcyjnego. Mają one charakter aktywujący i prowadzą do upośledzenia mechanizmów ubikwitynacji i degradacji zmutowanego NOTCH1, co prawdopodobnie



Ryc. 4 – Schemat działania receptora NOTCH. Przez błonowy receptor NOTCH wiąże ligand DELTA-like, zlokalizowany na sąsiedniej komórce. Skutkuje to reakcją enzymatyczną z udziałem metaloproteinazy ADAM17 (TACE; *TNF- α -converting enzyme*) prowadzącą do odcięcia zewnątrzkomórkowej domeny NOTCH. Druga reakcja z udziałem kompleksu enzymatycznego γ -sekretazy uwalnia wewnątrzkomórkową domenę NOTCH, która, przechodząc do jądra, staje się czynnikiem transkrypcyjnym. Nie łączy się on bezpośrednio z DNA, a z białkowym kompleksem inicjującym transkrypcję i wraz z przyłączonym koaktywatorem stymuluje ekspresję genów docelowych (wg Bray, 2006, modyfikacja) [27]

Fig. 4 – Scheme of the NOTCH receptor mechanism of action. Transmembrane receptor binds NOTCH DELTA-like ligand, located on the neighboring cell. This results in the enzymatic reaction involving metalloproteinase ADAM17 (TACE, *TNF- α -converting enzyme*), which leads to cutting of the extracellular domain of NOTCH. The second reaction with the γ -secretase enzyme complex releases the intracellular domain of NOTCH, which translocates to the nucleus and acts as transcription factor. It does not directly bind DNA, but the protein complex that initiates transcription. The intracellular domain of NOTCH with the attached coactivator stimulates the expression of target genes (according to Bray, 2006, modified) [27]

skutkuje nadmierną stymulacją genów przyczyniających się do przekształcania PBL w bardziej agresywną postać [24, 28].

Jedne z najnowszych badań wskazują na duże znaczenie predykcyjne mutacji NOTCH1. Rossi i wsp. stwierdzili, że występują one u ok. 11% chorych z PBL [29]. Okazuje się, że dwunukleotydowe delecje w tym genie wiążą się ze skróconym OS oraz TFS. Mutacje te pociągają za sobą również duże ryzyko postępu choroby i transformacji PBL w zespół Richtera [24, 29]. Mutacji genu NOTCH1 rzadko towarzyszy delecja 13q14. Zauważono również, że przy mutacji NOTCH1 wraz z +12 nie obserwuje się delecji czy mutacji TP53, co może oznaczać wzajemne wykluczenie występowania uszkodzeń w tych dwu genach [5, 30].

Badania wskazują, że mutacja NOTCH1 może stanowić samodzielny czynnik rokowniczy, a zastosowanie systemu ARMS (*amplification refractory mutation system*), bazującego na reakcji PCR, jest badaniem o 100-procentowej czułości i specyficzności. Takie postępowanie ułatwia szybkie wykrywanie mutacji i pozwala uniknąć czasochłonnego oraz kosztownego sekwencjonowania DNA w celu poszukiwania mutacji [30]. Wykorzystanie tej techniki diagnostycznej byłoby bardzo pożądane, ponieważ czas potrzebny do rozpoznania postaci choroby (łagodna/agresywna) uległby znacznemu skróceniu. Diagnostyka w kierunku mutacji NOTCH1 z zastosowaniem techniki ARMS jest mniej pracochłonna, tańsza i mniej skomplikowana w porównaniu z określaniem statusu mutacji genów *IgVH* czy badaniem ekspresji kinazy ZAP-70 [30]. Oscier i wsp. wskazują, że istnieje znacząca korelacja pomiędzy brakiem somatycznych mutacji *IgVH* i nadekspresją kinazy ZAP70 a mutacjami NOTCH, co dodatkowo potwierdza, że identyfikacja mutacji NOTCH1 u chorych z PBL pozwala na przewidywanie szybkiego postępu choroby i prawdopodobieństwa transformacji w zespół Richtera [24]. Znajomość następstw mutacji NOTCH1 na poziomie molekularnym otwiera możliwość opracowania leków, które mogłyby działać na zasadzie inhibitorów zmutowanego receptora NOTCH1, nadmiernie stymulującego ekspresję genów antyapoptotycznych u chorych z PBL.

Komórki z mutacją NOTCH1 i trisomią 12 jako izolowaną aberracją mogą podlegać selekcji klonalnej i intensywnemu rozrostowi dzięki wzajemnej komunikacji stymulowanej białkami sygnalizacyjnymi, których geny znajdują się m.in. na chromosomie 12. Ze względu na jego dodatkową kopię, powstaje więcej białek, które wzmagają intensywność sygnałów podziałowych płynących do białczkowych limfocytów B, wrażliwszych na stymulację zewnętrzną [5].

W przypadku chorób nowotworowych obecność aneuploidii świadczy o destabilizacji genomu: może mieć związek z zaawansowanym stadium, szybkim postępowaniem choroby, gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia. Można to tłumaczyć, między innymi, zwiększoną ekspresją genów zlokalizowanych na dodatkowych chromosomach [25]. Potwierdzono, że przy trisomii chromosomu 12 nadekspresji ulegają geny ANAPC5 (*anaphase promoting complex subunit 5*), GLIPR1 (*GLI pathogenesis-related 1*), TIMELESS (*timeless homolog - Drosophila*) i SLC2A6 (*solute carrier family 2 [facilitated glucose transporter] member 6*) [5].

Jako dodatkowe zaburzenia chromosomowe u chorych z +12 mogą wystąpić t(14;18)(q32;q21), +18, del(13q14), del(6q21) oraz +19 [10].

Niespecyficzne zaburzenia chromosomowe wskazujące na przekształcenie się PBL w postać agresywną

Wśród wspomnianych wcześniej zaburzeń chromosomowych współistniejących z trisomią 12 wymieniona została translokacja t(14;18)(q32;q21). Jest ona charakterystyczna dla osób cierpiących na chłoniaka grudkowego, ale może pojawiać się u chorych z przewlekłą białaczką limfocytową [10]. Lau i wsp. wskazują, że również t(8;14)(q24.1;q11.2), która jest charakterystycznym zaburzeniem dotyczącym nowotworów z komórek T, może wystąpić u chorych z PBL [10]. Nietypową translokację opisali również Michaux i wsp. Stwierdzili oni, że u nieznacznego odsetka chorych na PBL może pojawić się t(1;6)(p35.3;p25.2) [11]. We wszystkich przypadkach z tą rearanżacją obserwowano brak somatycznej mutacji części zmiennej łańcuchów ciężkich immunoglobulin oraz charakterystyczne dla PBL aberracje chromosomowe: del(11q), +12 lub del(17p) [11]. Sugeruje się, że takie niespecyficzne, dodatkowe translokacje u chorych z PBL mogą wynikać z dużej niestabilności genetycznej obserwowanej, gdy dochodzi do szybkiej progresji choroby i transformacji w zespół Richtera. Identyfikacja takich zmian pozwala kwalifikować chorych do podgrupy PBL charakteryzującej się dużym ryzykiem szybkiego postępu choroby, koniecznością wcześniejszego rozpoczęcia leczenia, a także znacznie skróconym czasem przeżycia [10, 11].

Nowe, submikroskopowe zmiany genomu w PBL

Obecnie jedną ze strategii postępowania w badaniach nad PBL jest analiza roli mutacji czy delecji nowych genów w powstawaniu i przebiegu choroby, w odniesieniu do znanych prognostycznych czynników cytogenetycznych i molekularnych. Najnowsze dane wskazują, że takie podejście prowadzi do identyfikacji zmian mutacyjnych czy delecji genów do tej pory niewiązanych z etiologią PBL. Rossi i wsp. wykazali, że z agresywną postacią PBL wiążą się mutacje i delecje genu *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat containing 3*), zlokalizowanego w regionie 11q22.2 [31]. U 24% chorych opornych na leczenie fludarabiną obecne są pojedyncze mutacje *BIRC3* lub mutacje z towarzyszącą delecją drugiego allela genu. Nie stwierdzono natomiast zmian *BIRC3* u osób z dobrą odpowiedzią na chemioterapeutyki [31]. Zaobserwowano także wzajemne wykluczenie mutacji/delecji *BIRC3* oraz zaburzeń w genie *TP53*. Wnioskuje się, że uszkodzenia *BIRC3* w PBL mogą stanowić niezależny czynnik rokowniczy wskazujący na niepomyślne rokowanie i skrócony OS (mediana 3,1 roku) podobnie jak zaburzenia *TP53* (mediana 2,9 roku) [31].

Do genów, których mutacje opisano ostatnio w komórkach PBL, należą również *NOTCH* (*Notch homolog 1, translocation-associated - Drosophila*) i *SF3B1* (*splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa*) [32]. Najnowsze badania Rossi i wsp. sugerują, że analiza zmian mutacyjnych czy delecji genów *BIRC3*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, wraz z jednoczesną diagnostyką w kierunku aberracji chromosomowych z zastosowaniem metody FISH (*fluorescence in situ hybridization*), może ułatwiać przewidywanie czasu przeżycia czy podejmowanie decyzji

terapeutycznych, zwłaszcza u osób z agresywną postacią PBL [32]. Taka strategia badawcza może przyczynić się również do bardziej precyzyjnej stratyfikacji chorych, którzy bardzo dobrze rokują, oraz tych, u których przewiduje się szybki postęp choroby i wczesny zgon. Proponowany podział oparty na analizie powiązań między uszkodzeniami genów lub ich delecjami a aberracjami chromosomowymi wstępnie pozwala wyróżnić cztery prognostyczne podgrupy chorych:

- grupa osób **wysokiego** ryzyka, u których występują zaburzenia TP53 i/lub BIRC3 (dziesięcioletni czas przeżycia tylko u 29% chorych),
- grupa osób **średniego** ryzyka, u których występują zaburzenia NOTCH1 i/lub SF3B1 i/lub del11q22-q23 (dziesięcioletni czas przeżycia u 37% chorych),
- grupa osób **niskiego** ryzyka, u których obecna jest trisomia chromosomu 12 lub brak jest uszkodzeń molekularnych i cytogenetycznych (dziesięcioletni czas przeżycia u 57% chorych),
- grupa osób **bardzo niskiego** ryzyka, u których obecna jest del13q14, a czas przeżycia chorych nie jest znacząco różny od czasu przeżycia w ogólnej populacji [32].

Przedstawiona wstępna klasyfikacja powstała na podstawie wyników badań retrospektywnych, przeprowadzonych na dużej grupie chorych (1274 osób), niemniej wymaga walidacji w dużych badaniach wieloośrodkowych, aby stwierdzić, czy będzie można ją stosować w codziennej praktyce klinicznej.

Podsumowanie

Ze względu na to, że przewlekła białaczka limfocytowa charakteryzuje się dużą heterogennością, określanie nowych czynników prognostycznych oraz szukanie zależności między nimi może być znaczącym wkładem w rozwinięcie bardziej precyzyjnych metod diagnozowania i określania „indywidualnego wzoru” przebiegu PBL u poszczególnych chorych. Powiązania między statusem mutacji IgVH, ekspresją ZAP70, aberracjami chromosomowymi, zmianami w ekspresji genów związanych z PBL czy zmianami w ekspresji mikroRNA ułatwią podejmowanie decyzji terapeutycznych i udoskonalą metody leczenia PBL o agresywnym przebiegu.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca została wykonana w ramach projektów naukowych MNsd 230 oraz MNsd 231 Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
- [2] Rudenko HC, Else M, Dearden C, et al. Characterising the TP53-deleted subgroup of chronic lymphocytic leukemia: an analysis of additional cytogenetic abnormalities detected by interphase fluorescence in situ hybridisation and array-based comparative genomic hybridisation. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1879-1886.
- [3] Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009;23:117-124.
- [4] Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1458-1461.
- [5] Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica* 2012;97:437-441.
- [6] Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997;89:2516-2522.
- [7] Kiefer Y, Schulte C, Tiemann M, Bullerdiek J. Chronic lymphocytic leukemia-associated chromosomal abnormalities and miRNA deregulation. *The Application of Clinical Genetics* 2012;5:21-28.
- [8] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524-15529.
- [9] Hernández JA, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2009;94:364-371.
- [10] Lau LC, Lim P, Lim YC, et al. Occurrence of trisomy 12, t(14;18)(q32;q21), and t(8;14)(q24.1;q11.2) in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;185:95-101.
- [11] Michaux L, Wlodarska I, Rack K, et al. Translocation t(1;6)(p35.3;p25.2): a new recurrent aberration in "unmutated" B-CLL. *Leukemia* 2005;19:77-82.
- [12] Zenz T, Häbe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114:2589-2597.
- [13] Zenz T, Häbe S, Kröber A, et al. TP53 Mutation and 17p deletion are associated with poor survival in patients with CLL irrespective of the inactivation of the other allele by deletion or TP53 mutation: Results from a single center analysis. *Haematologica* 2007;92:35.

- [14] Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28:4473-4479.
- [15] Zenz T, Gribben JG, Hallek M, et al. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood* 2012;119:4101-4107.
- [16] Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* 2010;116:945-952.
- [17] Asslaber D, Piñón JD, Seyfried I, et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;115:4191-4197.
- [18] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood* 2009;113:5237-5245.
- [19] Zhou K, Yi S, Yu Z, et al. MicroRNA-223 expression is uniformly down-regulated in B cell lymphoproliferative disorders and is associated with poor survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012;53:1155-1161.
- [20] Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 2006;66:11590-11593.
- [21] Pekarsky Y, Zanesi N, Croce CM. Molecular basis of CLL. *Semin Cancer Biol* 2010;20:370-376.
- [22] Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.2-q23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11837-11841.
- [23] Martín-Guerrero I, Enjuanes A, Richter J, et al. A putative "hepitype" in the ATM in gene associated with chronic lymphocytic leukemia risk. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;11:887-895.
- [24] Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013;121:468-475.
- [25] Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:18261-18266.
- [26] Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Hansson Semin Cancer Biol* 2004;14:320-328.
- [27] Bray SJ. Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Molecular Cell Biology* 2006;7:678-689.
- [28] Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208:1389-1401.
- [29] Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-529.
- [30] López C, Delgado J, Costa D, et al. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;23:1-9.
- [31] Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2854-2862.
- [32] Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:1403-1412.