

Prognostyczna wartość mutacji *NOTCH1* i *MYD88* u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową

Ewelina Zakrzewska¹, Agnieszka Karczmarczyk³, Joanna Purkot³,
Paulina Własiuk^{2, 3}, Krzysztof Giannopoulos^{2, 3}, Elżbieta Starosławska¹

¹Medyczne Laboratorium Diagnostyczne, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej
im. św. Jana z Dukli w Lublinie

²Oddział Hematologiczny, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im. św. Jana z Dukli w Lublinie

³Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Praca finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (projekt MNmb 537)

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Zakrzewska E, Karczmarczyk A, Purkot J et al. Prognostic impact of *NOTCH1* and *MYD88* mutations in chronic lymphocytic leukemia patients. *JTM* 2019; 12 (3): 101–108. DOI: 10.5603/JTM.2019.0006.

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Wstęp. Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszą postacią białaczki u dorosłych. Chorzy z PBL stanowią heterogenną grupę kliniczną. Obecnie dostępne czynniki rokownicze nie są do końca skuteczne w prognozowaniu przebiegu PBL. Nowe mutacje molekularne, takie jak *NOTCH1* i *MYD88*, mogą częściowo wyjaśnić heterogenność PBL i być pomocne w klasyfikacji grup chorych już przy rozpoznaniu.

Materiał i metody. Mutację *NOTCH1* c.7544_7545delCT ($n = 200$) w domenie PEST (exon 34) i *MYD88* L265P ($n = 60$) oznaczano metodą ARMS. Ekspresję *MYD88* we krwi obwodowej ($n = 60$) i szpiku kostnym ($n = 92$) pacjentów z PBL i 25 zdrowych ochotników oceniano przy użyciu metody qRT-PCR.

Wyniki. Mutację w genie *NOTCH1* wykryto u 18/200 (9%) pacjentów z PBL. Pacjenci z mutacją *NOTCH1* należeli do grupy z bardziej agresywnym przebiegiem choroby: niezmutowanymi łańcuchami IGVH, ekspresją CD38 i ZAP-70. Mutację *MYD88* wykryto u 2/60 (3.3%) pacjentów z PBL i należeli oni do grupy ze zmutowanymi genami IGVH. Mediana ekspresji *MYD88* we krwi obwodowej pacjentów z PBL była istotnie wyższa niż u zdrowych ochotników, a także istotnie wyższa niż w szpiku kostnym (odpowiednio $p < 0,0001$ i $p = 0,0015$). Nie stwierdzono korelacji między ekspresją *MYD88* we krwi obwodowej i szpiku kostnym a ekspresją ZAP-70, CD38 oraz stanem mutacji IGVH.

Wnioski. Mutacje w genie *NOTCH1* są znacznie częściej wykrywane u pacjentów z niekorzystnymi parametrami komórek białaczkowych i mogą stanowić czynnik predykcyjny gorszego rokowania u pacjentów z PBL. Niezbędne są dalsze badania nad rolą mutacji *MYD88* jak czynnika prognostycznego i predykcyjnego u pacjentów z PBL.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka limfocytowa, *NOTCH1*, *MYD88*, czynniki prognostyczne, ARMS-PCR

J. Transf. Med. 2019; 12: 92–100

Adres do korespondencji: Dr n. med. Ewelina Zakrzewska, Medyczne Laboratorium Diagnostyczne, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej, ul. Jaczewskiego 7, 20–090 Lublin, tel.: 50 970 85 05, faks: 81 747 89 11; e-mail: evelin84@wp.pl

Wstęp

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest jedną z najczęstszych rodzajów białaczki u dorosłych i charakteryzuje się nagromadzeniem dojrzałych, lecz funkcjonalnie niekompetentnych limfocytów B CD5 + we krwi obwodowej i narządach limfatycznych [1]. Przebieg kliniczny choroby jest wysoce zmienny, od pacjentów z łagodną postacią choroby po przypadki szybkiej progresji prowadzącej do śmierci w ciągu roku od diagnozy lub wystąpienia zespołu Richtera (RS), czyli transformacji PBL do rozlanego chłoniaka z dużych komórek B [2–5]. Niejednorodność kliniczna PBL sprawia, że nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań nad identyfikacją nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych.

Obecnie dostępne czynniki rokownicze nie są do końca skuteczne w prognozowaniu przebiegu PBL, zwłaszcza kiedy chorobę rozpoznaje się we wczesnym stadium. Poszukuje się więc nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, dzięki którym będzie można sklasyfikować grupy chorych już przy rozpoznaniu. Aktualnie uznawane czynniki prognostyczne we wczesnych stadiach klinicznych są oparte na parametrach biologicznych komórek białaczkowych B, takich jak stan mutacji genów kodujących części zmienne łańcucha ciężkiego (IGVH, *immunoglobulin heavy chain variable region*), aberracje genowe, a także ekspresja CD38 na powierzchni komórek B oraz ekspresja cytoplazmatycznej kinazy ZAP-70 [6]. Ponadto Döhner i wsp. [7] w badaniu metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) wykazał obecność anomalii cytogenetycznych będących najczęściej delacjami ramion chromosomów u ponad 80% chorych z PBL. Poprzez integrację wyników cytogenetycznych z przebiegiem choroby opracowano model hierarchiczny, na podstawie którego wyróżniono pięć grup ryzyka.

Dzięki zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) ostatnio opisano nowe zmiany molekularne towarzyszące PBL. Zalicza się do nich zmiany w obrębie genów, takich jak: *NOTCH1* (*neurogenic locus notch homolog protein 1*), *SF3B1* (*splicing factor 3B subunit 1*), *ATM* (*ataxia-telangiectasia mutated*) występujące u 5–15% nowo zdiagnozowanych chorych oraz *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*), *BIRC3* (*baculoviral IAP repeat-containing protein 3 frequencies*) występujące u < 5% chorych z PBL w momencie rozpoznania. Te nowe mutacje mogą częściowo wyjaśnić biologiczne róż-

nicowanie PBL i pomóc w identyfikacji istotnych klinicznie grup pacjentów [8–11]. Podczas gdy mutację *NOTCH1* zidentyfikowano głównie u pacjentów z agresywnym przebiegiem choroby, rola *MYD88* nie została jeszcze w pełni wyjaśniona [12, 13]. Rossi i wsp. [14] wskazują na przewagę zintegrowanej klasyfikacji cytogenetyczno-molekularnej w prognozowaniu przeżycia nad dotychczasową klasyfikacją opartą wyłącznie na modelu cytogenetycznym Döhnera. W 2016 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wskazała, że nowo odkryte mutacje genetyczne mają potencjalne znaczenie kliniczne u pacjentów z PBL i mogą zostać wykorzystane do lepszego oznaczania profilu ryzyka cytogenetycznego [15]. Jednakże międzynarodowa grupa zajmująca się przewlekłą białaczką limfocytową (CLL-IPI) stworzyła w tym samym roku model prognostyczny, w który włączyła jedynie mutację *IGVH* i *TP53*, uznając jej potwierdzone znaczenie kliniczne. Pomimo istniejących badań dotyczących mutacji *NOTCH1*, *MYD88* oraz *SF3B1*, ich wartość prognostyczna nie została w pełni ustalona. Zatem niezbędne wydaje się określenie znaczenia klinicznego tych nowo odkrytych czynników prognostycznych [16].

Gen *NOTCH1* (*neurogenic locus notch homolog protein 1*), zlokalizowany na chromosomie 9q34.3, pełni fundamentalną rolę w hematopoezie [8]. Wykazano, że receptory NOTCH1 odgrywają istotną rolę w patogenezie niektórych nowotworów hematologicznych i litych [17, 18]. Domena zewnątrzkomórkowa (N-EC) zawiera 36-krotnie powtarzający się motyw epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), trzy powtórzenia bogate w cysteinę (LNR), które zabezpieczają przed niespecyficzną aktywacją ścieżki sygnałowej i domenę heterodimeryzacji. W cytoplazmatycznej części receptora (N-IC) można wyróżnić: domenę RAM (R) wiążącą białka CBF-1/RBP-Jk, sześć powtórzeń ankirynowych (ANK), dwa sygnały lokalizacji jądrowej (NLS, *nuclear localization signal*), domenę transaktywującą (TAD, *transactivation domain*) oraz sekwencję PEST (P), która jest bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę i odpowiada za degradację przez FBXW7 [19]. Większość mutacji w *NOTCH1* uszkadza C-końcową domenę PEST, która bierze udział w degradacji proteasomalnej aktywowanej formy *NOTCH1* [20]. W efekcie zmutowana, krótka domena PEST powoduje stabilizację aktywnej formy *NOTCH1*, upośledzenie degradacji cząsteczki, a tym samym zwiększenie przekaźnictwa sygnałów *NOTCH1* [21, 22]. Mutacje *NOTCH1* występują u 5–10% nowo zdiagnozowanych pacjentów z PBL

i u 15–20% z postępującym PBL oraz w nawrotach choroby [23, 24]. Mutacje te są związane z bardziej agresywną prezentacją kliniczną PBL, taką jak oporność na leczenie i transformacja w chłoniaka o wysokim stopniu złośliwości określana mianem zespołu RS. Mutacje *NOTCH1* w RS występują u 30% przypadków i są drugą, po *TP53*, najczęstszą zmianą genetyczną [8, 23]. Wyniki badań wykazały znacznie częstsze występowanie tej mutacji u pacjentów z trisomią chromosomu 12 (+12), niż u tych z samą aberracją cytogenetyczną (30%) [25]. Co więcej, pacjenci z mutacją *NOTCH1* wykazują znacznie krótsze całkowite przeżycie, dopełniając tym samym analizę pośredniego rokowania pacjentów z PBL z trisomią +12. Co ważne, wysoka częstotliwość mutacji *NOTCH1* u pacjentów z trisomią +12 jest powiązana z występowaniem nadekspresji genów związanych z cyklem komórkowym zlokalizowanych na chromosomie 12 [25]. *NOTCH1* może stanowić potencjalny marker niekorzystnego przebiegu choroby. Pacjenci z mutacją *NOTCH1* charakteryzują się znacznie krótszym całkowitym przeżyciem (21–45% po 10 latach) i szybszą progresją choroby w porównaniu z pacjentami z sekwencją *NOTCH1* typu dzikiego (56–66% po 10 latach) [8, 23]. Według Mansouri i wsp. mutacje *NOTCH1*, podobnie jak *TP53*, wydają się silnymi, niezależnymi markerami prognostycznymi złego rokowania [26].

MYD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) jest białkiem, które odgrywa kluczową rolę we wrodzonej i nabytej odporności immunologicznej i jest kodowane przez gen *MYD88* zlokalizowany na krótkim ramieniu (p) chromosomu 3 w pozycji 22 (3p22) [27]. *MYD88* jest białkiem adaptorowym pośredniczącym w aktywacji szlaku NF- κ B zależnej od receptorów Toll-podobnych (TLR, *toll-like receptors*) oraz receptorów dla IL-1 i IL-18 [28]. *MYD88* koordynuje także wiązanie wielopodjednostkowego kompleksu sygnałowego składającego się z różnych członków rodziny kinaz serynowo-treoninowych IRAK [29]. Najczęstszą mutacją jest zamiana pojedynczego nukleotydu (c.794T.C), która prowadzi do zmiany leucyny na prolinę w kodonie 265 (p.L265P) [30]. Zmiana ta wyzwała stałą, konstytutywną aktywację NF- κ B, umożliwiając zmutowanym komórkom proliferację i przeżycie. W badaniach Ngo i wsp. mutacje *MYD88* opisano u 39% pacjentów z chłoniakiem z dużych rozlanych komórek B (ABC-DLBCL), z pojedynczym podstawieniem L265P stanowiącym 75% wszystkich mutacji [31]. Mutacje w genie *MYD88* są spotykane u 2–10% chorych na CLL [8, 30] i prawie w 100% przypadków makroglobulinemii Waldenströma [32].

Mutacje *MYD88* u pacjentów z PBL występują z większą częstością u chorych ze zmutowaną konfiguracją *IGVH* [33]. W wielośrodkowym badaniu z udziałem 1039 pacjentów z PBL, Baliakas i wsp. [34] wykazali obecność mutacji w genie *MYD88* u 24/1080 (2,2%) przypadków, gdzie podstawienie L265P stanowiło 92% wszystkich mutacji. Analiza Xia i wsp. [33] w chińskiej populacji chorych z PBL ujawniła obecność mutacji *MYD88* (eksony 3-5) w 23 z 295 (8%) analizowanych przypadków. Mutacje te występowały częściej u pacjentów ze zmutowanym *IGVH* (2/115 vs. 21/172; $p = 0,001$). W innym badaniu obejmującym dużą grupę 1160 pacjentów nieleczonych z powodu PBL, Jeromin i wsp. [35], poszukując nowych markerów prognostycznych do analizy, włączyli stan mutacji *MYD88*. Mutację tę wykryto w 15 z 969 przypadków (1,5%) i także współwystępował u nich zmutowany gen *IGVH*.

Materiał i metody

Charakterystyka pacjentów

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa i szpik kostny 200 chorych na PBL. W okresie poprzedzającym badanie żaden z chorych nie był leczony. Grupa badawcza, u której oceniano mutację *NOTCH1*, obejmowała 88 kobiet i 112 mężczyzn w wieku 42–90 lat (mediana wieku 66 lat). Grupa badawcza, u której oceniano mutację *MYD88*, obejmowała 38 kobiet i 22 mężczyzn w wieku 50–84 lat (mediana wieku 67 lat). Analizując ocenę zaawansowania klinicznego choroby, stwierdzono, że 63 pacjentów znajdowało się w 0°, 33 w I°, 48 w II°, 12 w III°, a 20 w IV° zaawansowania choroby według Rai. Analizując ocenę zaawansowania klinicznego choroby u pacjentów, u których oceniano mutację *MYD88*, stwierdzono, że 18 pacjentów znajdowało się w 0°, 10 w I°, 14 w II°, 4 w III°, a 8 w IV° zaawansowania choroby według Rai.

Dodatkowo, we krwi obwodowej ($n = 60$) i szpiku kostnym ($n = 92$) pacjentów z PBL dokonano oceny ekspresji *MYD88* na poziomie mRNA. Szczegółową charakterystykę kliniczną pacjentów przedstawiono w tabeli 1.

Badania wykonano po uprzednim uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej do Spraw Nadzoru nad Badaniami Klinicznymi przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie (zgoda nr KE-0254/231/2015).

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej i izolacja DNA

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) od pacjentów z PBL izolowano przez wirowanie w gradencie gęstości Ficoll (Biochrom, Berlin,

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna pacjentów z CLL

Charakterystyka	<i>NOTCH1</i> mutacja	<i>MYD88</i> mutacja
Liczba pacjentów	200	60
Płeć		
Kobiety	88	38
Mężczyźni	112	22
Mediana wieku (zakres)	66 (42–90)	67 (50–84)
Stopień Rai		
0	63	18
1	33	10
2	48	14
3	12	4
4	20	8
Brak danych	24	6
ZAP-70 (wartość odcięcia 20%)		
Pozytywne	53	12
Negatywne	102	40
Brak danych	45	8
CD38 (wartość odcięcia 30%)		
Pozytywne	53	11
Negatywne	111	42
Brak danych	36	7
Stan mutacji <i>IGVH</i>		
Zmutowany	76	20
Niezmutowany	67	31
Brak danych	57	9

Niemcy). DNA z PBMC zostało wyizolowane przy użyciu kolumn QIAamp DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), zgodnie z zaleceniami producenta. Jakość i ilość otrzymanego DNA została obliczona fotometrycznie (OD 260/280) przy użyciu BioSpec-nano (Shimadzu, Kioto, Japonia).

Oznaczanie mutacji *NOTCH1* i *MYD88* metodą ARMS-PCR

Mutację *MYD88* L265P ($n = 60$) i *NOTCH1* c.7544_7545delCT ($n = 200$) w domenie PEST (exon 34) oceniono metodą ARMS-PCR (*Amplified Refractory Mutation System* Polymerase Chain Reaction). Reakcję dla *NOTCH1* prowadzono na płytce optycznej w objętości 20 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 3 startery: 2 przednie startery (forward) ForC — dla formy niezmutowanej i ForMUT — dla formy zmutowanej i jeden starter tylny (reverse) (Rev) oraz multipleks. Reakcje dla *MYD88* prze-

prowadzono w 2 próbkach, każda o objętości 20 μ l; pierwsza próbka zawierała multipleks, starter przedni i starter tylny dla genu typu dzikiego; druga próbka zawierała multipleks, starter przedni i starter tylny dla formy zmutowanej. Produkty ARMS-PCR rozdzielono metodą elektroforezy żelowej.

Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja i ocena ekspresji *MYD88* metodą ilościową RT-PCR w czasie rzeczywistym

RNA z PBMC zostało wyizolowane przy użyciu kolumn QIAamp RNA Kit (Qiagen, Venlo, Holandia), zgodnie z zaleceniami producenta. Jakość i ilość otrzymanego mRNA została obliczona fotometrycznie (OD 260/280). 1 μ g mRNA zostało odwrotnie przepisane przy użyciu QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta w 20 μ l cDNA. Do ilościowej reakcji RT-PCR użyto 1 μ l cDNA każdej próbki.

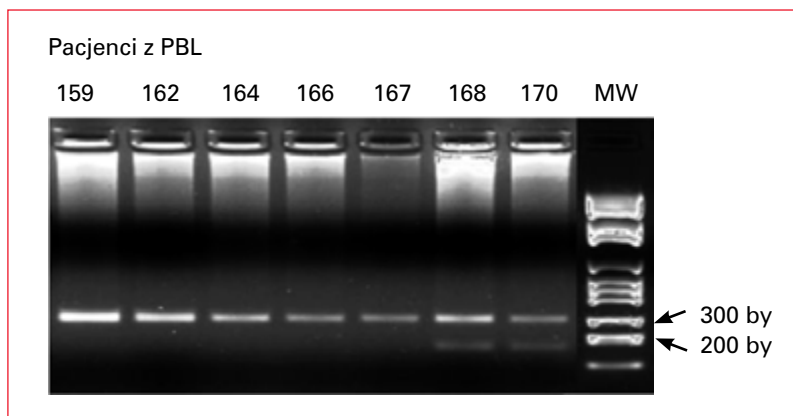
Stosując metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym (*Real Time PCR*), zbadano ekspresję *MYD88* na poziomie mRNA we krwi obwodowej ($n = 60$) i szpiku kostnym ($n = 92$) pacjentów z PBL i 25 zdrowych ochotników. RT-PCR przeprowadzono przy użyciu TaqMan Gene Expression Assay zgodnie z protokołem producenta (Applied Biosystems, Foster City). Jako gen konstytutywny został użyty gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3 fosfoglicerynowego (*GAPDH*). Procedurę PCR wykonano w aparacie ABI Prism 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). Warunki reakcji: denaturacja wstępna 95°C 10 minut, 40 cykli: 95°C 15s, 60°C 60s. Po przeprowadzonej analizie wyznaczano cykle progowe *Ct* (*copy threshold*) reakcji amplifikacji genów badanych oraz kontrolnych. Poziom ekspresji badanego genu wyrażano jak $1/\Delta Ct$, gdzie ΔCt stanowiła różnicę pomiędzy wartościami *Ct* genu analizowanego i genu referencyjnego *GAPDH*.

Cytometryczna ocena ZAP-70 i CD38

Ekspresję ZAP-70 i CD38 oceniono za pomocą cytometrii przepływowej. Na podstawie wartości odcięcia ZAP-70 wynoszącej 20% pacjentów z PBL zaklasyfikowano do podgrupy ZAP-70 dodatniej ($\geq 20\%$) lub ZAP-70 ujemnej ($< 20\%$). W przypadku CD38 wartość odcięcia zdefiniowano jako 30%, a pacjentów zaklasyfikowano do podgrupy CD38 dodatniej ($\geq 30\%$) lub CD38 ujemnej ($< 30\%$).

Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu GraphPad Prism 5 (La Jolla, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Do oceny różnic między podgrupami zastosowano testy Manna-Whitneya



Rycina 1. Wykrywanie obecności mutacji *NOTCH1* c.7544_7545delCT metodą ARMS. Przykładowe wyniki ARMS przedstawiające obecność mutacji c.7544_7545delCT u 2 pacjentów z PBL (numery 168, 170) oraz jej brak u 5 pacjentów z PBL (numery 159, 162, 164, 166, 167). Próbkę ujemną charakteryzuje prążek o masie 284 pz. Próbkę dodatnie wykazują dodatkowy zmutowany prążek o masie 183 pz. MW — wzorzec mas cząsteczkowych

i Kruskala-Wallisa. Korelacje zmiennych obliczono z użyciem współczynnika korelacji rang Spearmana.

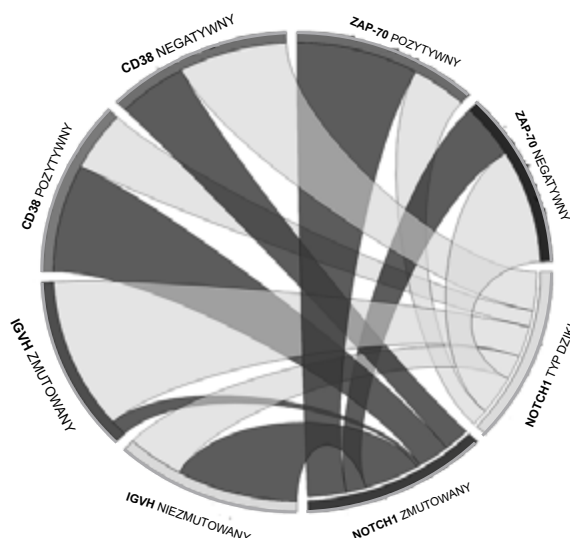
Wyniki

Mutacja *NOTCH1*

Mutację 7544_7545delCT w genie *NOTCH1* wykryto u 18/200 (9%) pacjentów z PBL i należeli oni do grupy z bardziej agresywnym przebiegiem choroby. U chorych ze stwierdzoną mutacją istotnie częściej współwystępował niezmutowany gen *IGHV* ($n = 17$ spośród 18, 94%) w porównaniu z pacjentami z sekwencją *NOTCH1* typu dzikiego ($n = 50$ spośród 112, 44%); ($p = 0.0001$). Mutacja ta była znacznie częściej związana z wysokim poziomem ekspresji CD38: 10/18 (55%) pacjentów z mutacją *NOTCH1* w porównaniu z 43/141 (30%) z genem typu dzikiego ($p = 0,02$). Ekspresja ZAP-70 była również znacznie wyższa u pacjentów ze zmutowanym genem *NOTCH1* ($n = 12$ spośród 18, 66%) niż u osób z genem *NOTCH1* typu dzikiego ($n = 41$ spośród 136, 30%) ($p = 0,0008$). Przykładowe wyniki ARMS przedstawiające obecność mutacji *NOTCH1* c.7544_7545delCT zobrazowano na rycinie 1. Związek między statusem mutacji genu *NOTCH1* a charakterystyką kliniczną pacjentów z PBL przedstawiono na rycinie 2.

Mutacja *MYD88*

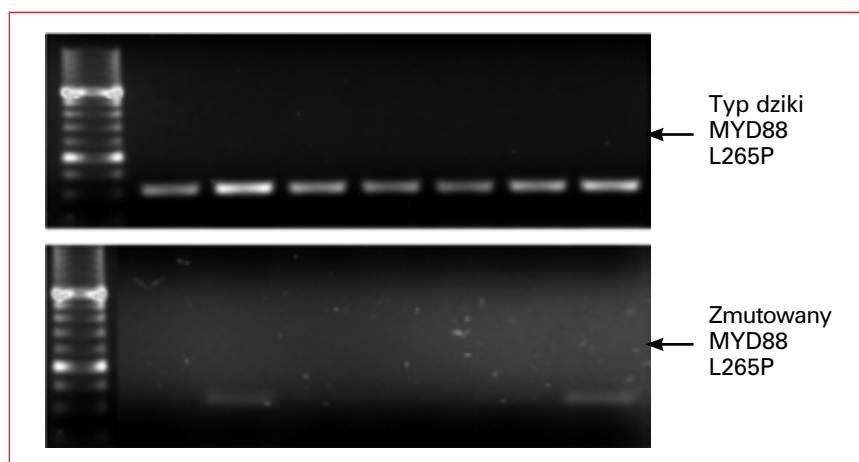
Mutację L265P (exon 5) w genie *MYD88* wykryto u 2/60 (3,3%) pacjentów z PBL. Pacjenci z mutacją *MYD88* należeli do grupy ze zmutowanymi genami *IGHV*. Mediana ekspresji *MYD88* we krwi obwodowej ($1/\Delta Ct$) pacjentów z PBL wynosiła 0,178 i była istotnie wyższa niż w szpiku kostnym



Czynniki prognostyczne	Procent pacjentów z PBL		Wartość P
	NOTCH1-zmutowany	NOTCH1-typ dziki	
IGHV-UM/ /IGHV-M	94/6	44/56	0,0001
ZAP-70 _{poz.} / /ZAP-70 _{neg.}	66/34	30/70	0,0008
CD38 _{poz.} / /CD38 _{neg.}	55/45	30/70	0,02

Rycina 2. Związek między statusem mutacji genu *NOTCH1* a charakterystyką kliniczną pacjentów z PBL (przy użyciu programu Circos) [36]

(0,160), a także istotnie wyższa niż u zdrowych ochotników (0,128). Różnice te osiągnęły istotność statystyczną (odpowiednio $p = 0.0015$ i p



Rycina 3. Wykrywanie obecności mutacji *MYD88* L265P metodą AS-PCR. Przykładowe wyniki AS-PCR przedstawiające obecność mutacji L265P u 2 pacjentów z PBL i 5 pacjentów z PBL z sekwencją *MYD88* typu dzikiego

< 0,0001). Mediana ekspresji *MYD88* ($1/\Delta Ct$) w szpiku kostnym była istotnie wyższa u pacjentów z PBL w stadium Rai I (0,172) niż u pacjentów w stadium II (0,152) i III (0,155) (odpowiednio $p = 0,03$ i $p = 0,04$). Nie stwierdzono korelacji między ekspresją *MYD88* we krwi obwodowej i szpiku kostnym a ekspresją ZAP-70, CD38 oraz stanem mutacji *IGVH*. Przykładowe wyniki ARMS przedstawiające obecność mutacji L265P zobrażowano na rycinie 3. Charakterystykę ekspresji mRNA *MYD88* u pacjentów z PBL przedstawiono na rycinie 4A, 4B i 4C.

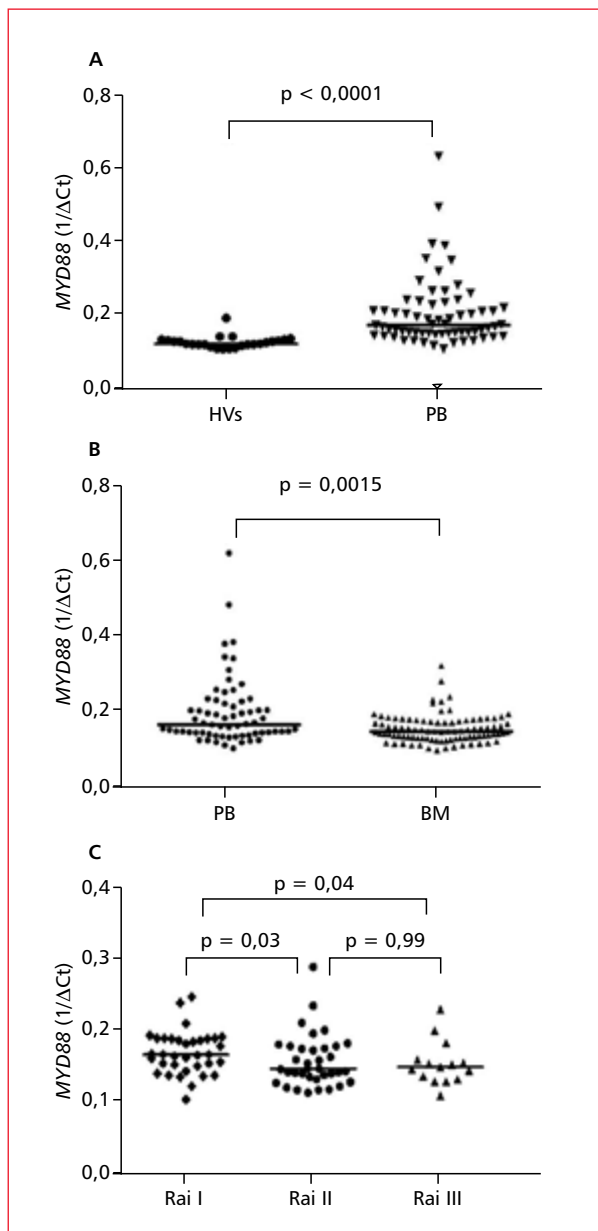
Dyskusja

Dzięki rozwojowi nowoczesnych metod biologii molekularnej udało się zidentyfikować wartość rokowniczą nieznaną wcześniej czynników, a przydatność kolejnych jest weryfikowana w licznych badaniach naukowych. Ponieważ PBL wciąż pozostaje chorobą nieuleczalną, nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań, w których zostanie oceniona wartość prognostyczna nowych czynników. Od 2000 roku stratyfikacja pacjentów z PBL jest możliwa dzięki modelowi cytogenetycznemu przedstawionemu przez Döhnera i wsp. [7]. Koncentruje się na aberracjach chromosomowych, które są wykrywalne u ponad 80% pacjentów z CLL. Dodatkowych informacji dostarczają zmiany molekularne, które mogą mieć również znaczenie prognostyczne. Aktualizacja klasyfikacji nowotworów limfoidalnych Światowej Organizacji Zdrowia w 2016 roku wykazała potencjalne znaczenie kliniczne zmian molekularnych, takich jak *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *ATM* i *BIRC3* [15]. Zaproponowano włączenie niektórych z tych zmian do zaktualizowanego profilu

modelu cytogenetycznego, opartego na obecności aberracji cytogenetycznych ocenianych metodą FISH [34]. W 2016 roku Międzynarodowa Grupa zajmująca się przewlekłą białaczką limfocytową (CLL-IPI) stworzyła model prognostyczny łączący parametry biochemiczne, genetyczne i kliniczne. Obejmuje on pięć niezależnych czynników: wiek, stężenie beta 2-mikroglobuliny, stopień zaawansowania klinicznego, stan mutacji *IGVH* i stan mutacji *TP53*. Poza zaburzeniami w genie *TP53*, wartość prognostyczna pozostałych mutacji *NOTCH1* i *SF3B1* nie została w pełni ustalona [16].

Wartość prognostyczna czynników molekularnych, takich jak *NOTCH1* i *MYD88*, została potwierdzona przez kilka grup badawczych, ale nadal nie są one stosowane w praktyce klinicznej [11–14, 34]. Uważa się, że zmiany te mogą stanowić jeden z mechanizmów wyjaśniających niejednorodność grupy i stanowić potencjalny cel terapeutyczny w PBL [11].

Według wiedzy autorów niniejszego artykułu, jako pierwsi dokonali oni oceny występowania analizowanych mutacji w populacji polskich pacjentów. W badaniach przeprowadzonych przez nich, podobnie jak w pracach innych autorów, mutację *NOTCH1* wykryto u 9% pacjentów z PBL [11, 24]. Wykazano, że częstość występowania mutacji może wzrastać wraz z progresją choroby, nawet do 20% podczas nawrotu [9, 30]. Mutacje w genie *NOTCH1* są związane ze złym rokowaniem. Wyniki badania potwierdziły niekorzystne znaczenie rokownicze mutacji *NOTCH1*. U pacjentów ze stwierdzoną mutacją istotnie częściej współwystępował niezmutowany gen *IGVH* [11, 30, 37–39] jak również wysoka ekspresja CD38 oraz ZAP-70. Wyniki badań wykazały, że mutacje te znacznie częściej obecne



Rycina 4. Charakterystyka ekspresji mRNA *MYD88* u pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (PBL). **A.** Ekspresja *MYD88* we krwi obwodowej zdrowych ochotników (ZO) i pacjentów z PBL. **B.** Ekspresja *MYD88* we krwi obwodowej (KO) i szpiku kostnym (SZK) pacjentów z PBL. **C.** Ekspresja *MYD88* w szpiku kostnym pacjentów z PBL w odniesieniu do stadium choroby

były u pacjentów w zaawansowanym stadium klinicznym, głównie włączonych lub leczonych w badaniach klinicznych [34]. Stwierdzono pozytywną korelację występowania mutacji *NOTCH1* z trisomią +12 i negatywną z izolowaną del(13q). Co więcej, w badaniach Rossi i wsp. i Oscier i wsp. [11, 24] chorzy z mutacją *NOTCH1* wykazywali

znamiennie krótsze przeżycie, ale nie stanowiła ona niezależnego wskaźnika przeżycia [5].

Wyniki badania przeprowadzonego przez autorów niniejszego artykułu wykazały istotnie wyższą ekspresję *MYD88* we krwi obwodowej pacjentów z PBL niż u zdrowych ochotników, a także istotnie wyższą niż w szpiku kostnym (odpowiednio $p < 0,0001$ i $p = 0,0015$). Nie stwierdzono korelacji między ekspresją *MYD88* we krwi obwodowej i szpiku kostnym a ekspresją *ZAP-70*, *CD38* oraz stanem mutacji *IGVH*. Poza ekspresją *MYD88* autorzy niniejszego artykułu dokonali oceny stanu mutacji *MYD88*. W badanej populacji częstość mutacji *MYD88* wynosiła 3,3% i osoby z tą mutacją należały do grupy ze zmutowanymi genami *IGVH*. Dane autorów niniejszego artykułu są sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami Xia i wsp., którzy wykazali częstsze występowanie mutacji *MYD88* u pacjentów ze zmutowanym *IGVH* [33].

Jeromin i wsp. w badaniu na dużej grupie pacjentów z PBL wykazali obecność mutacji *MYD88* u 1,5% przypadków i była ona również związana ze zmutowanymi *IGVH* [35]. Ponieważ rola mutacji *MYD88* jako czynnika prognostycznego pozostaje niejasna, nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań klinicznych na dużych grupach chorych.

Wnioski

Mutacje w genie *NOTCH1* są znacznie częściej wykrywane u pacjentów z niekorzystnymi parametrami komórek białaczkowych i mogą stanowić czynnik predykcyjny gorszego rokowania u pacjentów z PBL. Niewątpliwie mutacje te mogą być pomocne w identyfikacji pacjentów z grup wysokiego ryzyka, a w połączeniu z uznanymi przez CLL-IPI negatywnymi czynnikami rokowniczymi mogą dostarczyć dodatkowych informacji na temat rokowania choroby. Niezbędne są dalsze badania nad rolą mutacji *MYD88* jak czynnika prognostycznego i predykcyjnego u pacjentów z PBL.

Piśmiennictwo

- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 352(8): 804–815, doi: [10.1056/NEJMra041720](https://doi.org/10.1056/NEJMra041720), indexed in Pubmed: [15728813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15728813/).
- Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, et al. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood.* 2009; 114(10): 2044–2050, doi: [10.1182/blood-2009-04-214346](https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214346), indexed in Pubmed: [19553638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19553638/).
- Shanafelt TD, Jenkins G, Call TG, et al. Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2009; 115(2): 363–372, doi: [10.1002/cncr.24004](https://doi.org/10.1002/cncr.24004), indexed in Pubmed: [19090008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19090008/).

4. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. 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*. 2008; 111(12): 5446–5456, doi: [10.1182/blood-2007-06-093906](https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906), indexed in Pubmed: [18216293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18216293/).
5. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. 2008; 371(9617): 1017–1029, doi: [10.1016/s0140-6736\(08\)60456-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60456-0).
6. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351(9): 893–901, doi: [10.1056/NEJMoa040857](https://doi.org/10.1056/NEJMoa040857), indexed in Pubmed: [15329427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15329427/).
7. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343(26): 1910–1916, doi: [10.1056/NEJM200012283432602](https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602), indexed in Pubmed: [11136261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11136261/).
8. 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(7): 1389–1401, doi: [10.1084/jem.20110921](https://doi.org/10.1084/jem.20110921), indexed in Pubmed: [21670202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670202/).
9. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011; 44(1): 47–52, doi: [10.1038/ng.1032](https://doi.org/10.1038/ng.1032), indexed in Pubmed: [22158541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22158541/).
10. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol*. 2010; 151(4): 404–406, doi: [10.1111/j.1365-2141.2010.08368.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08368.x), indexed in Pubmed: [20813007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20813007/).
11. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 119(2): 521–529, doi: [10.1182/blood-2011-09-379966](https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379966).
12. Cortese D, Sutton LA, Cahill N, et al. On the way towards a 'CLL prognostic index': focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*. 2014; 28(3): 710–713, doi: [10.1038/leu.2013.333](https://doi.org/10.1038/leu.2013.333), indexed in Pubmed: [24217197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24217197/).
13. 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(3): 437–441, doi: [10.3324/haematol.2011.060129](https://doi.org/10.3324/haematol.2011.060129), indexed in Pubmed: [22207691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22207691/).
14. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013; 121(8): 1403–1412, doi: [10.1182/blood-2012-09-458265](https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-458265), indexed in Pubmed: [23243274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23243274/).
15. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20): 2375–2390, doi: [10.1182/blood-2016-01-643569](https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569), indexed in Pubmed: [26980727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26980727/).
16. International CLL-IPi working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPi): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016; 17(6): 779–790, doi: [10.1016/S1470-2045\(16\)30029-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30029-8), indexed in Pubmed: [27185642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27185642/).
17. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009; 113(4): 856–865, doi: [10.1182/blood-2008-02-139725](https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-139725), indexed in Pubmed: [18796623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18796623/).
18. Hajdu M, Sebestyén A, Barna G, et al. Activity of the notch-signalling pathway in circulating human chronic lymphocytic leukaemia cells. *Scand J Immunol*. 2007; 65(3): 271–275, doi: [10.1111/j.1365-3083.2006.01897.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01897.x), indexed in Pubmed: [17309782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17309782/).
19. Gianfelici V. Activation of the NOTCH1 pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2012; 97(3): 328–330, doi: [10.3324/haematol.2012.061721](https://doi.org/10.3324/haematol.2012.061721), indexed in Pubmed: [22383743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22383743/).
20. Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, et al. A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation. *Br J Haematol*. 2009; 146(6): 689–691, doi: [10.1111/j.1365-2141.2009.07816.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07816.x), indexed in Pubmed: [19604236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19604236/).
21. Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev*. 2011; 25(2): 83–90, doi: [10.1016/j.blre.2010.09.004](https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.09.004), indexed in Pubmed: [20965628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20965628/).
22. Pear WS, Aster JC. T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a human cancer commonly associated with aberrant NOTCH1 signaling. *Curr Opin Hematol*. 2004; 11(6): 426–433, indexed in Pubmed: [15548998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15548998/).
23. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 119(2): 521–529, doi: [10.1182/blood-2011-09-379966](https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379966).
24. Oscier DG, Rose-Zerilli M, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2012; 121(3): 468–475, doi: [10.1182/blood-2012-05-429282](https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-429282).
25. 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(3): 437–441, doi: [10.3324/haematol.2011.060129](https://doi.org/10.3324/haematol.2011.060129), indexed in Pubmed: [22207691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22207691/).
26. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013; 27(2): 512–514, doi: [10.1038/leu.2012.307](https://doi.org/10.1038/leu.2012.307), indexed in Pubmed: [23138133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23138133/).
27. Amaya-Chanaga CI, Rassenti LZ. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016; 29(1): 79–89, doi: [10.1016/j.beha.2016.08.005](https://doi.org/10.1016/j.beha.2016.08.005), indexed in Pubmed: [27742074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27742074/).
28. Iwasaki A, Medzhitov R, Iwasaki A, et al. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010; 327(5963): 291–295, doi: [10.1126/science.1183021](https://doi.org/10.1126/science.1183021), indexed in Pubmed: [20075244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20075244/).
29. Vandenbon A, Teraguchi S, Akira S, et al. Systems biology approaches to toll-like receptor signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012; 4(5): 497–507, doi: [10.1002/wsbm.1178](https://doi.org/10.1002/wsbm.1178), indexed in Pubmed: [22714995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22714995/).
30. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, et al. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol*. 2014; 5: 367, doi: [10.3389/fimmu.2014.00367](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00367), indexed in Pubmed: [25132836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25132836/).
31. Ngo VuN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011; 470(7332): 115–119, doi: [10.1038/nature09671](https://doi.org/10.1038/nature09671), indexed in Pubmed: [21179087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21179087/).

32. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012; 367(9): 826–833, doi: [10.1056/NEJMoa1200710](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200710), indexed in Pubmed: [22931316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22931316/).
33. Xia Yi, Fan L, Wang Li, et al. Frequencies of SF3B1, NOTCH1, MYD88, BIRC3 and IGHV mutations and TP53 disruptions in Chinese with chronic lymphocytic leukemia: disparities with Europeans. *Oncotarget.* 2015; 6(7): 5426–5434, doi: [10.18632/oncotarget.3101](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3101), indexed in Pubmed: [25605254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605254/).
34. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. European Research Initiative on CLL (ERIC). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2015; 29(2): 329–336, doi: [10.1038/leu.2014.196](https://doi.org/10.1038/leu.2014.196), indexed in Pubmed: [24943832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24943832/).
35. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia.* 2014; 28(1): 108–117, doi: [10.1038/leu.2013.263](https://doi.org/10.1038/leu.2013.263), indexed in Pubmed: [24113472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24113472/).
36. Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009; 19(9): 1639–1645, doi: [10.1101/gr.092759.109](https://doi.org/10.1101/gr.092759.109), indexed in Pubmed: [19541911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19541911/).
37. Chiaretti S, Marinelli M, Giudice ID, et al. NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leukemia & Lymphoma.* 2014; 55(12): 2785–2792, doi: [10.3109/10428194.2014.898760](https://doi.org/10.3109/10428194.2014.898760).
38. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013; 45(5): 526–530, doi: [10.1038/ng.2584](https://doi.org/10.1038/ng.2584), indexed in Pubmed: [23502782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23502782/).
39. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011; 475(7354): 101–105, doi: [10.1038/nature10113](https://doi.org/10.1038/nature10113), indexed in Pubmed: [21642962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21642962/).