

# Význam delécie a mutácie génu TP53 a ďalších prognostických markerov u pacientov s CLL

MUDr. Lucia Copáková, RNDr. Barbora Piačková, RNDr. Michaela Leitnerová

Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav, Bratislava

Chronická lymfocytová leukémia – B-CLL patrí medzi hematoonkologické ochorenia s relatívne vysokou incidenciou u dospelých pacientov. Kým časť z pacientov s B-CLL má relatívne indolentný priebeh ochorenia trvajúci aj roky, existuje aj skupina pacientov s B-CLL, ktorí majú agresívnejší priebeh choroby vyžadujúci špecifický manažment. K stratifikácii pacientov do rizikových skupín v značnej miere prispieva aj genetická analýza vybraných chromozómových aberácií. Práve týmto dobre známym a v praxi štandardne sledovaným chromozómovým aberáciám s jasným prognostickým významom bude venovaný tento článok.

**Kľúčové slová:** genetická analýza, chromozómové aberácie, prognostický význam.

## Chronic lymphocytic leukemia – genetics

Chronic lymphocytic leukemia – CLL is an hemato-oncological disease with relatively high incidence among adults. While the disease can be indolent during years in a group of patients, some of them has got aggressive form of illness where specific treatment management is needed. Genetic analysis of exact genetic aberrations mostly improves patient's stratification into the risk groups. This article will be devoted just to these well-known chromosomal aberrations with bright prognostic meaning routinely examined in daily practice.

**Key words:** genetic analysis, chromosomal aberrations, prognostic impact.

Onkológia (Bratisl.), 2014; roč. 9(2): 100–103

## Úvod

Význam genetiky pri diagnostike a monitoringu hematoonkologických ochorení má svoje pevné miesto. Úloha genetiky je vo vysokej miere asociovaná s možnosťou prognózovania ochorenia v závislosti od výskytu špecifických genetických aberácií. Inak to nie je ani v prípade chronickej lymfocytovej leukémie. Aktuálne vcelku ucelený koncept prognostických faktorov chronickej lymfocytovej leukémie prešiel svojím vývojom. V tomto článku sa budeme venovať genetickým nálezom, pričom podrobne rozoberieme ich význam a rovnako potrebu vyšetrovania aberácií génu *TP53* vrátane stanovenia mutačného statusu *TP53* génu.

Približne 40 – 50 % prípadov chronickej lymfocytovej leukémie je charakterizovaných prítomnosťou cytogenetickej aberácie. U pacientov s abnormálnym karyotypom je v 65 % prípadov detegovaná izolovaná chromozómová aberácia, v 25 % prípadov sa nachádzajú 2 abnormality súčasne a len 10 % prípadov má komplexné zmeny karyotypu.

Medzi v praxi etablované genetické prognostické faktory (obrázok 1) patrí nález delécie v oblasti 17p13 – génu *TP53*, delécie v oblasti 11q22-23 – génu *ATM*, delécie lokusu 13q14 a nález trizómie chromozómu 12. Tieto markery ochorenia sú najčastejšie vyšetřované metódou molekulovej cytogenetiky FISH (1). Vyšetřovaným materiálom je periférna krv a štandardne je zhodnotených 200 interfázových jadri.

## del 13q14

Delécie oblasti 13q14 patrí do skupiny prognosticky priaznivých chromozómových aberácií a zároveň predstavuje prvú najčastejšie sa vyskytujúcu chromozómovú aberáciu pri CLL (40 – 65 %). Priaznivý charakter delécie sa stráca v prítomnosti ďalšej chromozómovej aberácie. Obdobne sa kvantifikácia patologického klonu spája s predpokladom priaznivej (klon pod 80 % interfázových jadri) verzus nepriaznivej prognózy (klon nad 80 % interfázových jadri) pri nálezoch delécií lokusu 13q14.

V roku 2002 boli identifikované miR-15 a miR-16 ako potenciálne nádorové gény v patogenéze CLL. MicroRNA (miRNAs) je relatívne nedávno identifikovaná skupina regulátorov nekódujúcich RNA, typických dĺžkou 20 – 23 nt, pričom ich primárna funkcia spočíva v celení na mRNA, ktorých úloha je degradácia alebo inhibícia translácie (2). Ich regulačná funkcia zahŕňa množstvo

biologických procesov, ako je napríklad vývoj, diferenciácia, apoptóza, prežívanie, senescencia alebo metabolizmus (3).

Špecificky miR-15a a miR-16-1 lokalizované v oblasti 13q14 boli často deletované alebo „down“ regulované pri CLL a solídnych tumoroch a mnohé štúdie identifikovali práve tieto dve miRNA ako „hot-spot“ – najčastejšie postihnuté oblasti pri nádorovej transformácii. Použitím bioinformatických údajov sa zistilo, že sekvencie miR-15a a miR-16-1 a sekvencia mRNA *BCL2* génu majú komplementárnu homológiu, z čoho vyplýva, že onkoproteín *Bcl2* je cieľom posttranskripčnej represie tumorsupresorov miR-15a a miR-16-1 (4), pričom *Bcl2* je centrálny hráč v genetickom programe eukaryotických buniek pri inhibícii apoptózy (5). MiR-15a a miR-16-1 predstavujú teda negatívny regulátor *Bcl2*. Toto zistenie bolo prvým opísaným pri asociácii klinického ochorenia a miRNA.

**Obrázok 1.** Významné prognostické faktory



**Trizómia chromozómu 12**

Trizómia chromozómu 12 (obrázok 2) je po druhej najčastejšej aberácii, delícii génu *ATM*, tretia najčastejšie sa vyskytujúca chromozómová aberácia pri B-CLL asociovaná s intermediárnou prognózou ochorenia. Vyskytuje sa v 15 % – 20 % prípadov a z toho v 60 % ako izolovaná aberácia bez prídavných genetických alterácií. Trizómia chromozómu 12 signifikantne koreluje s atypickou morfológiou pri B-CLL v mnohých štúdiách (6). Atypická CLL sa môže vyskytovať v dvoch variantoch, a to ako dimorfný alebo pleomorfný variant (7). Typickým znakom pre atypickú dimorfnú formu je zvýšené množstvo prolymfocytov nad 10 % a zároveň menej ako 55 %. Pri atypickej pleomorfnéj forme je nápadná heterogénna populácia nádorových buniek, ako aj výskyt prolymfocytov, ktorý je v porovnaní s dimorfnou formou obvykle v nižšom percentuálnom zastúpení.

**del 11q22 – *ATM***

Do skupiny prognosticky nepriaznivých chromozómových aberácií patrí delícia génu *ATM*. Približne 10 – 20 % CLL pacientov má leukemické bunky s deléciou na dlhom ramienku chromozómu 11. Poškodená funkcia *ATM* spôsobuje dereguláciu bunkového cyklu a vedie k akumulácii malígnych B-buniek, ktoré sú náchylnejšie na vznik prídavných genetických aberácií. Rovnako je pri delícii génu *ATM* opisovaný agresívnejší priebeh, lymfadenopatia, jej výskyt je prednostne u mladších pacientov.

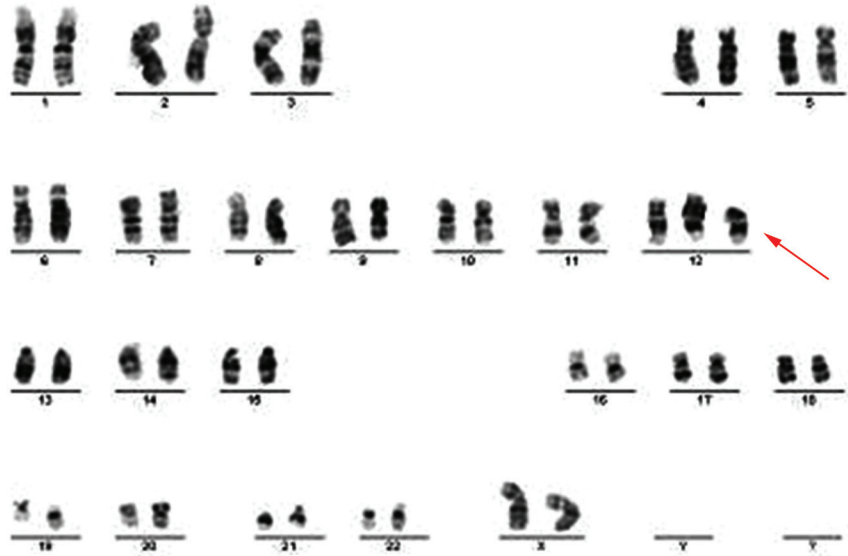
V regióne 11q22-23 je niekoľko zaujímavých kandidátnych génov, ako napríklad *ATM*, *FDX*, *MLL* a *RDX*, ktoré bývajú spájané s mnohými inými lymfoproliferatívnymi ochoreniami. Najčastejšie je pri CLL opisovaný gén *ATM* (ataxia-teleangiectasia mutated).

**Mutačný status *IgVH***

Medzi nezávislý prognostický marker ochorenia pri chronickej lymfocytovej leukémii, ktorý počas ochorenia zostáva stabilný, patrí mutačný stav génov kódujúcich variabilné oblasti génov pre ťažké reťazce imunoglobulínov – *IgVH* status.

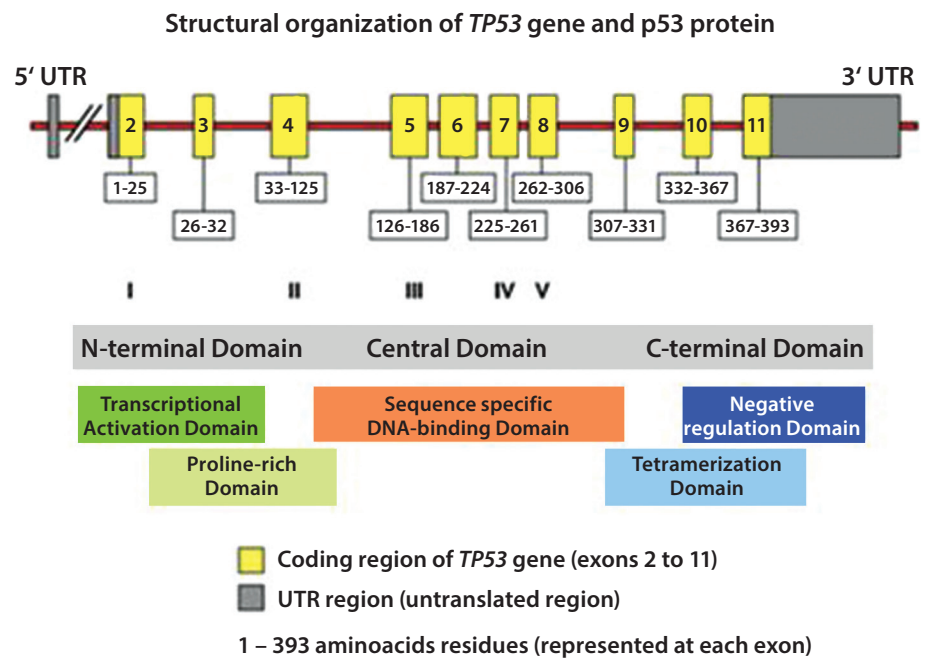
Štúdie expresie *IgVH* génových segmentov na podklade prezenie alebo absencie somatických mutácií poukázali na dva typy CLL. Približne 40 – 50 % pacientov produkuje leukemické klonu, ktorých expresia imunoglobulínových regiónov je odlišná od zárodočnej línie vo viac ako v 2 % v segmente ťažkého imunoglobulínového reťazca. Takáto individualita, odlišnosť od zárodočnej línie, predstavuje pre pacienta priaznivú prognózu ochorenia a hodnotí sa ako pozitívny mutačný status (8). Naopak, ≥ 98 %

**Obrázok 2.** Trizómia chromozómu 12, archív oddelenia lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav



Trizómia chromozómu 12 (47, XX, +12)

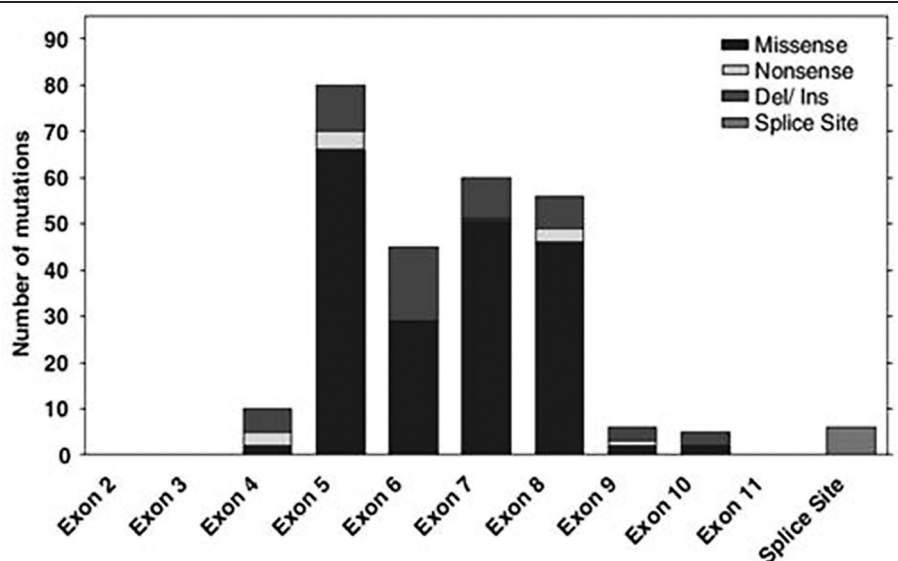
**Obrázok 3.** Štruktúrna organizácia *TP53* génu a p53 proteínu



homológia *IgVH* je nepriaznivým prognostickým markerom ochorenia s mediánom prežívania pacientov 8 – 10 rokov. Sekvenčná homológia 98 % predstavuje klinický „cut-off“ medzi dobrou (mutovaný status) a zlou (nemutovaný status) prognózou (9). Analýza *IgVH* segmentov preukázala prednostný výskyt špecifických VH segmentov v závislosti od mutačného statusu CLL. Pri nemutovaných CLL sa prednostne vyskytuje segment VH1-69 *IgH* génu na rozdiel od prípadov s pozitívnym mutačným statusom, kde sa vyskytuje segment VH3-21, ktorý má zlú prognózu (10). Avšak prítomnosť segmentu VH3-21 je asociovaná so zlou prognózou ochorenia nezávisle od výsledku mutačného statusu (11).

***TP53***

Pri potvrdení nálezu delície génu *TP53* metódou molekulevej cytogenetiky FISH je dôležitá aj kvantifikácia patologického klonu. Podľa multivariantných analýz je nález klonu s deléciou génu *TP53* pod 25 % interfázových jadier spájaný s priaznivejšou prognózou (3-ročné prežívanie, 92 % pacientov), u pacientov s del *TP53* v rozmedzí od 25 % do 74 % interfázových jadier je opisovaná intermediárna prognóza (3-ročné prežívanie, 67 %) a najmenej priaznivé vyhliadky sú u pacientov s deléciou *TP53* nad 74 % (3-ročné prežívanie, 40 %; p = 0,01) (12). Na druhej strane, nález izolovanej delície génu *TP53* verus delície génu *TP53* s inými abnormalitami

**Graf.** Distribúcia mutácií v jednotlivých exónoch génu *TP53* pri CLL (Zenz T. et al., 2010)

súčasne (komplexný karyotyp) nevedie k iným časom do progresie ochorenia alebo rozdielu v celkovom prežívaní.

*TP53* je tumor supresorový gén lokalizovaný na krátkom ramienku chromozómu 17 oblasti 17p13. Gén pokrýva 20 kb, s nekódujúcim prvým exónom a veľmi dlhým prvým intrónom – 10 kb. Tento gén kóduje p53 proteín, ktorý je zložený z 393 aminokyselín, je tvorený štyrmi hlavnými doménami: transkripčne aktívna doména (N-koniec), DNA-väzobná doména (centrálne časť), oligomerizačná doména (C-koniec) a regulačná doména (C-koniec) (obrázok 3).

Na molekulárnej úrovni je v čase stanovenia diagnózy dôležité sledovať mutačný status *TP53* génu, ktorý sa môže, ale aj nemusí, vyskytovať súčasne s deléciou génu *TP53* (detegovaná metódou FISH). Mutácie *TP53* génu sa môžu vyskytnúť aj v čase liečby, preto je dôležité ich vyšetriť aj pri progresii ochorenia, prípadne pri plánovanej zmene liečby. Približne 80 – 90 % všetkých mutácií génu je sústredených v DNA-väzobnej doméne. Tieto mutácie významne zvyšujú nádorový potenciál buniek pre neschopnosť p53 viazať sa na cieľovú DNA (13). Približne 75 % zo všetkých mutácií predstavuje missense mutácie, pri ktorých dochádza k aminokyselinovej zámene. Značná časť mutácií je lokalizovaná v typických „hot spot“ oblastiach (graf). Tieto mutácie potom priamo narušujú p53-DNA interakciu (DNA-kontaktné mutácie – mutácie na aminokyselinových zvyškoch 248 a 273) alebo spôsobujú konformačnú zmenu (konformačné mutácie – mutácie na aminokyselinových zvyškoch 175, 245, 249 a 282). Veľká časť mutácií vedie k vážnym funkčným poruchám p53 proteínu, avšak nie všetky missense mutácie sprostredkovávajú úplnú stratu funkcie, niektoré z nich

dokážu zachovať čiastočnú funkciu p53 proteínu. Niektoré mutácie môžu spôsobovať dominantne negatívny efekt na wild-type *TP53* gén. Niektoré *TP53* mutácie môžu spôsobovať aj vznik novej funkcie (gain of function), ktorá môže prispieť k rozvoju kancerogenézy. Experimentálne sa dokázalo, že mutácie s fenotypom – gain of function, sú prítomné práve pri ochorení CLL (14).

### p53 proteín

Proteín p53 má významnú funkciu v rámci bunkovej regulácie. Vysoká hladina wt p53 spôsobuje zastavenie bunkového cyklu alebo apoptózu. Pri genotoxickom strese slúži p53 ako „ochranná poistka“ a zamedzuje nahromadeniu mutácií a ich prenosu do dcérskych buniek. Z toho dôvodu sú bunky, ktorým chýba p53, geneticky menej stabilné a náchylné na tvorbu nádorov (15). Proteín p53 sa v bunkách vyskytuje len vo veľmi malom množstve a jeho polčas rozpadu je krátky, asi 20 minút.

K nahromadeniu a stabilizácii p53 dochádza pri genotoxickom strese, keď stresové signály iniciujú posttranslačné modifikácie p53 (fosforylácia, acetylácia, metylácia alebo ubiquitinácia), ktoré vedú k jeho aktivácii. Prenos aktivačného signálu na p53 zaisťujú proteínové kinázy, histón-acetyl-transferázy, metylázy a ubiquitín ligázy. A, naopak, p53 môže byť inaktívovaný, a to prostredníctvom fosfatáz alebo deacetyláz. Posttranslačné modifikácie ovplyvňujú stabilitu p53 v dvoch smeroch :

1. zvyšujú jeho „polčas rozpadu“ z 6 – 20 minút na hodiny, čím zvyšujú 3- až 10-krát jeho koncentráciu v bunke;
2. umožňujú väzbu p53 na špecifické sekvencie DNA, čím dochádza k regulácii transkripcie cieľových génov (16).

Medzi gény, ktoré boli identifikované ako cieľové pre p53, patrí napríklad *p21<sup>WAF-1</sup>* alebo *MDM2* (murine double minute 2). Indukcia *p21<sup>WAF-1</sup>* vedie k zastaveniu bunkového cyklu v G1 fáze, inhibuje CDK2/cyklínE a zamedzuje aktiváciu E2F-1, ktorý podporuje transkripciu génov potrebných na prechod z G1 do S fázy (17). Proteín mdm2 tvorí komplex s p53 a spätne inhibuje jeho transkripčnú aktivitu. Mdm2 pôsobí ako negatívny regulátor a funguje ako ubiquitín 3 ligáza, podieľa sa na degradácii p53, zaisťuje jeho nízku hladinu v zdravých bunkách a zároveň reguluje aj sám seba (18).

### Strata funkcie *TP53* génu

Prítomnosť aberácií génu *TP53* vedie u pacientov s B-CLL k agresívnejšiemu priebehu ochorenia a k rezistencii na terapiu. Gén *TP53* býva vo väčšine prípadov inaktívovaný deléciou jednej alely a mutáciou druhej alely, ale, samozrejme, sa vyskytujú aj samostatné delécie či mutácie bez poškodenia druhej alely. Použitím vhodných metód je v súčasnosti možné detegovať prítomnosť aberácií v géne *TP53*, ktoré nám umožnia zaradiť pacienta do „ultra high-risk“ CLL skupiny a zaujať k nemu správny postoj, čo sa týka liečby a progresie ochorenia (19). U každého pacienta je potrebné stanoviť *TP53* – mutačný status hneď v iniciálnej fáze ochorenia ešte pred podaním terapie a v prípade prítomnosti mutácie ju sledovať počas liečby. V prípade, že u pacienta nebola identifikovaná mutácia iniciálne, opakovane by mal byť mutačný status *TP53* vyšetrený až pred podávaním terapie, prípadne pri zmene terapie.

### Kedy vyšetrovať *TP53* gén pri CLL?

Usmernenia na vyšetrovanie *TP53* génu pri diagnóze CLL sú vypracované podľa najnovších odporúčaní (14). Vyšetrenie genetických alterácií (mutácie, delécie) *TP53* génu by malo byť realizované u všetkých pacientov, ktorí sú zahrnutí v klinických štúdiách, ďalej u pacientov mimo klinických štúdií, ktorí vyžadujú liečbu – či potrebu alogénnej transplantácie kmeňových buniek alebo inú intenzívnu terapiu na základe alemtuzumabu, prípadne iných liečebných molekúl.

Abnormality *TP53* génu by mali byť vyšetrené pred začatím liečby, lebo výsledky pri stanovení diagnózy sa môžu časom meniť vplyvom klonálnej evolúcie. U pacientov s B-CLL, ktorí boli vyšetrení pred liečbou s wt *TP53*, je potrebné vyšetrenie opakovať pred ďalšou terapiou, keďže výsledky môžu ovplyvniť výber a vplyv ďalšej terapie.

Pre samotné genetické vyšetrenie je dôležité odoslať vhodne zvolený materiál určený na

analýzu. Aj samotné percentuálne zastúpenie CLL buniek v periférnej krvi ovplyvňuje detekciu. Zvyčajne v prípadoch, keď pacient vyžaduje terapiu, budú prevládať CLL bunky v periférnej krvi, ale existujú aj výnimky. Ak je podiel leukemických buniek v periférnej krvi nižší ako 50 %, je vhodné použiť na analýzu bunky kostnej drene alebo lymfatické tkanivo, poprípade je možné použiť aj separované bunky s CD19+.

### Detekcia mutácií *TP53* génu (OLG, NOÚ)

Pri detekcii na oddelení lekárskej genetiky, NOÚ, využívame skríningovú techniku HRM (High resolution melting), ktorej nespornou výhodou je vysoká citlivosť, spoľahlivosť a rýchlosť identifikácie genetických variantov. Následne po záchyť pozitívnej zmeny metódou HRM pokračujeme v identifikácii samotnej zmeny – mutácie použitím metódy priameho sekvenovania. Citlivosť priameho sekvenovania je však obmedzená, a preto malé subklony s *TP53* mutáciou nie je možné detegovať.

### Záver

Vďaka progresu vedomostí a poznatkov genetiky v oblasti hematoonkologických ochorení je samotná diagnostika, ale aj liečba pacientov s CLL presnejšia a „šitá na mieru“. Tieto skutočnosti predstavujú pozitívne vyhliadky do budúcnosti aj pri rizikových pacientoch. Genetika sama

osebe je síce v poradí diagnostických metód doplnková, avšak marginálna pri samotnej stratifikácii ochorenia CLL do rizikových skupín ako aj sledovania jeho dynamiky, napríklad v prípadoch progresie s objavením sa klonovej evolúcie.

### Literatúra

- Dewald GW, Brockman SR, et al. Chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridisation: correlation with significant biological features in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol.* 2003;121(2):287–295.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522–531.
- Calin GA, Dumitru C, 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(24):15524–15529.
- Cimmino A, Calin GA, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(39):13944–139449.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Canc.* 2002;2(9):647–656.
- Criel A, Wlodarska I, Meeus P, Stul M, Louwagie A, van Hoof A, Hidajat M, Mecucci C, van den Berghe H. Trisomy 12 is uncommon in typical chronic lymphocytic leukemias. *Br J Haematol.* 1994;87(3):523–528.
- Kačírková P, Campř V. *Hematologický atlas krve a kostní dřeně.* Praha: Grada; 2007:268.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2001;194(11):1639–1647.
- Oscier DG, Gardiner AC, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood.* 2002;100(4):1177–1184.
- Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;99(6):2262–2264.
- Thorselius M, Krober A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of origin and mutational status. *Blood.* 2006;107(7):2889–2894.
- Constantine S, Tam, Tait D, Shanafelt, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood.* 2009;114:957–964.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999;18(53):7621–7636.
- Pospíšilová S, Gonzalez D, et al. ERIC recommendations on *TP53* mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2012;14.
- Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996;10(9):1054–1072.
- Overholtzer M, Rao PH, et al. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11547–11552.
- Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature.* 1993;366(6456):707–710.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992;69(7):1237–1245.
- Zenz T, Eichhorst B, et al. *TP53* mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4473–4479.

### MUDr. Lucia Copáková

Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav  
Klenová 1, 833 10 Bratislava  
lucia.copakova@nou.sk