proLékaře.cz | 25.11.2026

Exprese reverzní telomerázy u pacientů s chronickou B-lymfocytární leukemií

Plachý R., Pavlíček J., Jarošová M., Papajík T.
Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Souhrn
Chronická B-lymfocytární leukemie (B-CLL) představuje maligní onemocnění s velmi variabilním klinickým průběhem. Pro správnou a včasnou léčbu především rizikových pacientů je nezbytné toto onemocnění co nejpřesněji prognosticky charakterizovat. Podle recentních literárních údajů se zdá, že na prognózu může mít vliv i míra exprese genu hTERT, který kóduje katalytickou podjednotku reverzní telomerázy. V naší studii byla vyšetřena exprese genu hTERT u 47 pacientů s B-CLL. RNA byla získána z mononukleární frakce periferní krve z doby diagnózy. Kvantita transkriptů hTERT byla vztažena k expresi genu ABL. Exprese hTERT byla srovnána s mutačním stavem variabilních částí těžkých řetězců imunoglobulinů (IgV_H). Medián exprese hTERT u pacientů s nemutovanými řetězci IgV_H byl čtyřnásobný ve srovnání s mediánem exprese hTERT ve skupině s mutovanými řetězci IgV_H. Vysoká exprese hTERT statisticky signifikantně korelovala s nemutovaným stavem IgV_H ($p < 0,00001$). Celková shoda mezi mutačním stavem IgV_H a expresí hTERT byla 87 %. Naše výsledky naznačují, že exprese hTERT vykazuje vysokou konkordanci s mutačním stavem řetězců IgV_H. Pochopení role hTERT v patogenezi a progresi B-CLL by mohlo přispět k lepší prognostické stratifikaci nemocných s B-CLL.
Klíčová slova: reverzní telomeráza, hTERT, B-CLL, mutační status IgV_H

Summary
Plachý R., Pavlíček J., Jarošová M., Papajík T.: Expression of the hTERT gene in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is clinically heterogeneous disease. Therefore it is very important to identify all reliable molecular and cellular markers to predict the tendency for disease progression. One of the promising prognostic markers seems to be expression of hTERT gene, which encodes catalytic subunit of human telomerase. We performed real-time reverse transcription PCR to quantitate the amount of hTERT transcripts in mononuclear blood cells from 47 B-CLL patients. We used ABL gene as a housekeeping gene.We compared the expression of hTERT to the IgV_H mutational status. Median of hTERT expression was fourfold higher in the IgV_H unmutated group than in the IgV_H mutated group ($p<0.00001$). The level of hTERT expression discriminated the IgV_H unmutated from IgV_H mutated B-CLL in 87% cases. Our results suggests that hTERT expression strongly correlates with IgV_H mutational status. Full understanding of the hTERT role in pathogenesis and progression of B-CLL could contribute to better prognostic stratification of patients with B-CLL.
Key words: reverse telomerase, hTERT, B-CLL, mutational status of IgV_H

Transfuze Hematol. dnes, 14, 2008, No. 1, p. 10–12.

Úvod

Některé typy lidských nádorových buněk získávají „nesmrtelnost" aktivací reverzní telomerázy, jejíž exprese je u většiny normálních somatických buněk nedetekovatelná. Víme, že při každém buněčném dělení dojde ke zkrácení teloméry zhruba o 200 bp. Reverzní telomeráza představuje jaderný ribonukleoproteinový komplex, který je schopen udržovat délku telomér tím, že jeho katalytická podjednotka hTERT syntetizuje podle templátu předkládaného RNA podjednotkou hexamerové repetice TTAGGG, a tím zachovává délku telomery na konstantní hodnotě. Pokud délka teloméry klesne pod určitou limitní hodnotu, není buňka nadále schopna dělení. Délka telomér tedy hraje důležitou roli v regulaci buněčné proliferace. Aktivita reverzní telomerázy je fyziologicky vysoká u kmenových a zárodečných buněk. Zvýšená aktivita reverzní telomerázy byla také popsána u řady solidních nádorů a rovněž u hemato-onkologických onemocnění (1, 2). Role tohoto enzymu u pacientů s B-CLL je dosud sporná a vyžaduje hlubší zkoumání. V rámci předkládané pilotní studie jsme se rozhodli přispět do této diskuse a stanovili jsme molekulárně biologickými metodami expresi genu hTERT, který kóduje katalytickou podjednotku reverzní telomerázy. Expresi hTERT jsme porovnali s mutačním stavem IgV_H, který je hlavním molekulárně biologickým prognostickým markerem rutinně vyšetřovaným u pacientů s B-CLL.

proLékaře.cz | 25.11.2026

Materiály a metody

V rámci naší pilotní studie jsme vyšetřili expresi genu hTERT v periferní krvi u 47 nově diagnostikovaných pacientů s B-CLL. V souboru bylo 32 mužů a 15 žen (věk v době diagnózy: 41–78, medián 61,5 roku). Pacientů v klinickém stadiu Binet A bylo 32 %, ve stadiu Binet B 40 % a ve stadiu Binet C 28 %.

Příprava RNA a cDNA

Totální RNA byla získána z mononukleární frakce periferní krve. Extrakce RNA byla provedena pomocí Trizolu (Invitrogen). K reverzní transkripci byl použit Transcriptor (Roche). Pro přepis RNA do cDNA byly použity náhodné hexamery (Promega). Postup při izolaci RNA a reverzní transkripci se řídil doporučeními výrobců.

Real-time PCR

Kvantita transkriptů genu hTERT byla vztažena k expresi genu ABL. Pro kvantifikaci byl použit přístroj LightCycler (Roche). Sekvence primerů a hydrolyzačních sond jsou uvedeny v tabulce 1 (3). Reakční směs (celkový objem 20 µl) obsahovala 2 µl amplifikačního kitu LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche), 2 µl cDNA, 2 mM Mg^{2+}, 0,2 µM proby a 0,5 µM každého z primerů. Po úvodní inkubaci (10 min., 95 °C), následovalo 50 cyklů vlastní amplifikace (denaturace – 10 s, 95 °C, annealing – 10 s, 60 °C a extenze 6 s, 72 °C). Koncentrace transkriptů genu hTERT a ABL byly stanoveny na základě srovnání daných Cp čísel s průběhem příslušných standardních křivek. Každý vzorek byl vyšetřen v duplikátu. Expresní poměr hTERT/ABL byl pro lepší matematické zpracování vynásoben hodnotou 1000.

Mutační status IgV_H

Přestavby genů IgV_H příslušející patologickým klonům B lymfocytů byly nalezeny pomocí multiplexové PCR s využitím primerů uvedených v tabulce 2 (4, 5). Konkrétně, reakční směs (celkový objem 50 µl) obsahovala 2 µl cDNA, 1,5 mM Mg^{2+}, 20 pmol každého z primerů, 0,25 mM každého z dNTPs, 5 µl 10x PCR Buffer II a 2U AmpliTaq Gold DNA polymerázy (Applied Biosystems). Po úvodní inkubaci (5 min., 94 °C), následovalo 37 cyklů vlastní amplifikace (denaturace – 30 s, 94 °C, annealing – 30 s, 62 °C a extenze 45 s, 72 °C) a finální extenze (10 min., 72 °C). PCR byla provedena v termocykleru Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Pro přímé sekvenování PCR produktů byl využit kit BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). Samotné sekvenování bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Homologie řetězců IgV_H s germinálními sekvencemi byla stanovena s využitím databází IgBlast a IGMT. Hranice mezi mutovanými a nemutovanými sekvencemi byla vedena 98% homologií.

Tab. 1. Exprese hTERT: sekvence primerů a hydrolyzačních sond.

	hTERT
F	5´-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3´
R	5´-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3´
P	FAM5´-TTG CAA AGC ATT GGA ATC AGA CAG CAC-3´BHQ1
	ABL
F	5´-TCC TCC AGC TGT TAT CTG GAA GA-3´
R	5´-TGG GTC CAG CGA GAA GGT T-3´
P	FAM5´-CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT CAG GG-3´BHQ1

F – forward primer, R - reverzní primer, P – hydrolyzační sonda

Tab. 2. Mutační status IgV_H: sekvence primerů.

	IgV_H
$V_H1/7$	5´-CTC ACC ATG GAC TGG ACC TGG AG-3´
V_H2	5´-ATG GAC ACA CTT TGC T(A/C)C AC(G/A) CTC-3´
V_H3	5´-CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GG-3´
V_H4	5´-ACA TGA AAC A(C/T)C TGT GGT TCT TCC-3´
V_H5	5´-ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT(C/T) G-3´
V_H6	5´-ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC TTC-3´
J_H	5´-CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C-3´

V_Hx – rodinně specifický forward primer, J_H – konsensuální reverzní primer

Statistické zpracování

Pro posouzení vztahu mezi mutačním stavem IgV_H a expresí reverzní telomerázy byl použit software MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgie). Studované charakteristiky byly z hlediska statistického vztahu porovnány pomocí Fisherova exaktního testu, přičemž hladina statistické významnosti byla vedena hodnotou $p = 0,05$.

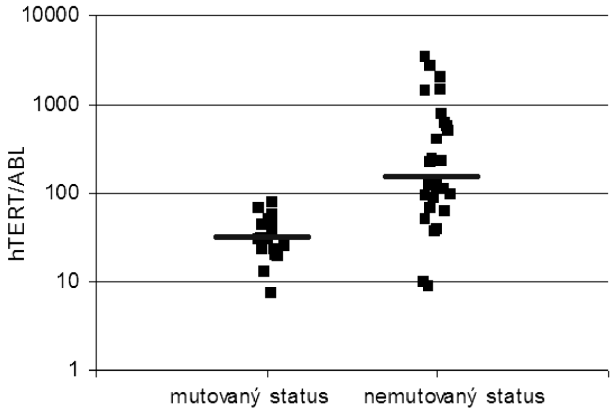
Výsledky

U všech 47 analyzovaných vzorků byla detekována nenulová exprese genu hTERT (rozpětí 7 – 3311, medián 67). Pacienti v klinickém stadiu Binet A měli medián exprese hTERT 30, pacienti ve stadiu Binet B 96 a pacienti ve stadiu Binet C 169. Při asociaci exprese hTERT s mutačním stavem IgV_H daného pacienta bylo zjištěno, že medián exprese hTERT u pacientů s nemutovaným stavem IgV_H (rozpětí 9-3311, medián 119) je přibližně čtyřnásobkem mediánu exprese hTERT u pacientů, kteří mají mutovaný status IgV_H (rozpětí 7-77, medián 29). Pro tuto asociační analýzu byl cut-off mezi vysokou a nízkou expresí hTERT veden hodnotou 49 (obr. 1). Za takto zvolených podmínek byla shoda mezi expresí hTERT a mutačním statutem IgV_H 87 % ($p < 0,00001$).

Diskuse

B-CLL je nejčastěji diagnostikovanou leukemií dospělého věku na západní polokouli. Díky moderním technologiím a detailnímu výzkumu nádorového B-lymfocytu jsme blíže skutečnému pochopení vzniku a patogenezi B-CLL. Zahrnutím hlavních biologických

proLékaře.cz | 25.11.2026



Obr. 1. Vztah mezi expresí genu hTERT a mutačním stavem IgV_H ($p < 0{,}00001$). Vodorovné čáry označují mediány exprese hTERT v příslušných kategoriích.

a genetických charakteristik choroby mezi prognostické faktory dosahujeme přesnější definice rizikových skupin nemocných, kteří potřebují intenzivní léčebný přístup a díky poznání změn genomu a proteomu leukemických buněk jsme i blíže k vývoji specifické a cílené terapie, jež by mohla přinést zásadní zlom v léčebném přístupu k této maligní chorobě.

Předkládaná pilotní studie zkoumá význam exprese genu hTERT coby potenciálního prognostického faktoru u pacientů s B-CLL. S využitím kvantitativní RT-PCR byla stanovena exprese hTERT u 47 pacientů. Výsledky byly korelovány s klinickými daty a mutačním stavem řetězů IgV_H. Zjistili jsme, že vyšší exprese hTERT souvisí s pokročilejším stadiem B-CLL a nemutovaným stavem IgV_H. Naše zjištění ukazují, že exprese hTERT může v budoucnosti sloužit jako vhodný molekulárně biologický marker B-CLL.

Vysoká aktivita telomerázy zjištěná metodou TRAP byla opakovaně prokázána u pacientů s pokročilým stadiem choroby a nepříznivými prognostickými faktory (6, 7). Analýza hTERT na úrovni transkriptů mRNA představuje alternativní přístup vyznačující se vyšší citlivostí a přesnější kvantifikací (3, 8).

Odlišná exprese hTERT u pacientů s mutovaným a nemutovaným stavem řetězců IgV_H může souviset s rozdílnou délkou telomér. Bylo opakovaně prokázáno, že pacienti s nemutovanými řetězci IgV_H mají kratší teloméry než pacienti s mutovanými řetězci IgV_H (7, 9). Vyšší exprese hTERT a vyšší aktivita telomerázy pak v případě krátkých telomér může signalizovat snahu patologických buněk prodloužit a zvýšit svůj proliferativní potenciál (8).

Studium a pochopení role hTERT je významné nejen z prognostického hlediska, ale také z pohledu terapeutického. hTERT má totiž kromě údržby délky telomér i řadu dalších významných vlastností např. kontroluje buněčné přežívání či má schopnost bránit apoptóze (9). Cíleným terapeutickým blokováním hTERT je tedy možné kontrolovat buněčnou proliferaci a apoptózu. Použití této strategie pro eradikaci patologických klonů B lymfocytů u pacientů s B-CLL je ve stadiu výzkumů (10).

Literatura

1. Huh HJ, Huh JW, Yoo ES et al. hTERT mRNA levels by real-time RT-PCR in acute myelogenous leukemia. Am J Hematol 2005; 79: 267–73.
2. Streutker CJ, Thorner P, Fabricius N et al. Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas. Pediatr Dev Pathol 2001; 4: 62–7.
3. Terrin L, Trentin L, Degan M et al. Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same IgVH mutation status and different outcome. Leukemia 2007; 21: 965–972.
4. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17: 2257–2317.
5. Thompsett AR, Ellison DW, Stevenson FK, et al. VH Gene Sequences From Primary Central Nervous System Lymphomas Indicate Derivation From Highly Mutated Germinal Center B Cells With Ongoing Mutational Activity. Blood 1999; 94: 1738–1746.
6. Bechter OE, Eisterer W, Pall G. Telomere length and telomerase activity predict survival in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 1998; 58: 4918–4922.
7. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by Ig V gene mutations. Blood 2004; 103: 375–382.
8. Tchirkov A, Chaleteix C, Magnac C, et al. hTERT expression and prognosis in B-chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol., 2004; 15: 1476–1480.
9. Hultdin M, Rosenquist R, Thunberg U, et al. Association between telomere length and V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. Br J Cancer 2003; 88: 593–598.
10. Cao Y, Li H, Deb S, et al. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. Oncogene 2002; 21: 3130–3138.
11. Deville L, Hillion J, Lanotte M, et al. Diagnostics, prognostic and therapeutic exploitation of telomeres and telomerase in leukemias. Curr Pharm Biotechnol 2006; 7: 171–83.

Mgr. Radek Plachý
Hemato-onkologická klinika FN a LF UP
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
plachy.r@centrum.cz

Práce je podporována granty: vnitřní grant LF UP 91110211 a IGA NR 9484-3.
Doručeno do redakce: 20. 10. 2008
Přijato: 14. 1. 2009