proLékaře.cz | 9.11.2026

Detekce poškození genu *TP53* u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií

Kantorová B., Pavlíček J., Plachý R., Papajík T., Jarošová M.
Hemato-onkologická klinika FN a LF UP v Olomouci

Souhrn
Chronická lymfocytární leukemie (CLL) patří v mnoha západních zemích mezi nejčastěji se vyskytující maligní lymfoproliferativní onemocnění starších dospělých. Prognóza tohoto heterogenního onemocnění je založena na řadě klinických a biologických markerů. Významným prognostickým markerem CLL je také detekce poškození genu *TP53*. Práce přináší výsledky retrospektivní analýzy výskytu změn v genu *TP53* u souboru 72 pacientů s CLL. Pomocí přímého sekvenování a analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (hrMCA) byly změny genu *TP53* detekovány u 46 (64 %) vyšetřených pacientů. Přímým sekvenováním exonů 2-10 kódující oblasti genu *TP53* bylo u 45 (62 %) pacientů nalezeno 59 změn. Po vyloučení polymorfismů bylo mezi těmito změnami u 20 (28 %) pacientů identifikováno 23 mutací. Jednalo se o substituce (83 % mutací) a delece (17 % mutací). Funkčním důsledkem substitucí byly záměnové (90 %), nesmyslné (5 %) a tiché mutace (5 %). Mutace byly z 91 % lokalizovány v DNA-vazebné doméně (exony 5-8) genu *TP53*. 87 % mutací bylo detekováno u pacientů s rizikovým onemocněním. Byl prokázán statisticky významný vztah mezi výskytem mutací v genu *TP53* a delecí 17p (P < 0,000001). Byla také pozorovaná korelace mezi přítomností mutací v genu *TP53* a stadiem onemocnění podle Bineta (P = 0,027). Pomocí hrMCA analýzy DNA-vazebné oblasti genu *TP53* (exony 5-8) bylo u 26 (36 %) pacientů detekováno 32 nespecifických PCR produktů. Ve srovnání s přímým sekvenováním je tato metodika citlivější a také méně časově a laboratorně náročná. Problematická standardizace hrMCA ovšem prozatím znemožňuje její rutinní využití při detekci změn genu *TP53* u pacientů s CLL.
Klíčová slova: gen *TP53*, chronická lymfocytární leukemie, přímé sekvenování, analýza křivek tání s vysokým rozlišením

Summary
Kantorová B., Pavlíček J., Plachý R., Papajík T., Jarošová M.: The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of adult leukemia in the Western countries. CLL is a heterogeneous disease characterized by a number of clinical and biological prognostic markers, one of the most important being mutations of the *TP53* gene. To study the *TP53* gene, we retrospectively investigated 72 patients with CLL using direct sequencing and high-resolution melting curve analysis (hrMCA). We found modifications of the *TP53* gene in 46 (64%) patients. We detected 59 modifications of the *TP53* gene (exons 2-10) in 45 (62%) patients by direct sequencing. Among these modifications, we identified 23 mutations in 20 (28%) patients. These were substitutions (83% of the mutations) and deletions (17% of the mutations). The substitutions comprised missense (90%), nonsense (5%) and silent mutations (5%). Ninety one percent of the mutations were located in the DNA-binding domain (exons 5-8) of the *TP53* gene. We detected 87% of the mutations in patients with high-risk disease. We showed a statistical relationship between mutations in the *TP53* gene and chromosome 17p deletion (P < 0.000001). We also observed correlation between mutations in the *TP53* gene and Binet stage of CLL (P = 0.027). We found 32 aberrant PCR products of the *TP53* gene (exons 5-8) in 26 (36%) patients by hrMCA. The method is more sensitive and faster than direct sequencing. However, our experience suggests that due to problems with standardization, hrMCA is not suitable for routine detection of modifications of the gene *TP53* in patients with CLL.
Key words: gene *TP53*, chronic lymphocytic leukemia, direct sequencing, high-resolution melting curve analysis

Transfuze Hematol. dnes, 16, 2010, No. 2, p. 71–77.

Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je na západní polokouli nejčastěji diagnostikovanou leukemií dospělé populace. Heterogenní klinický průběh a odlišné biologické vlastnosti onemocnění u jednotlivých pacientů představují závažný problém při volbě optimální léčby. Ačkoliv je v dnešní době u CLL známo mnoho prognostických markerů, u řady z nich chybí standardizovaná detekční metodika (1, 2, 3).

Gen *TP53* kóduje významný nádorový supresor, podílející se zejména na regulaci buněčného cyklu. Ztráta funkce proteinu p53 byla pozorována u mnoha solidních tumorů a hematologických malignit (IARC TP53 Database, 2008 R13). Gen *TP53* se nachází na krátkém rameni chromozomu 17, v pruhu 17p13.1. Delece této genové oblasti patří mezi významné nepříznivé prognostické markery CLL (4, 5). Nejčastěji detekovanými změnami genu *TP53* jsou substituce, lokalizované zejména v DNA-vazebné doméně. Jejich funkčním důsledkem bývají zpravidla záměnové mutace. U řady nádorových onemocnění včetně CLL je výskyt mutací v genu *TP53* spojen s nepříznivou prognózou (6, 7).

proLékaře.cz | 9.11.2026

V současné době je stanovení změn v genu *TP53* založeno především na přímém sekvenování, které je však značně časově a laboratorně náročné a je nahrazováno jinými detekčními přístupy (7, 8, 10–12, 18). Řada pracovišť pro určení genových změn a zejména substitucí využívá analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (hrMCA) (9–12). Cílem této práce bylo stanovit význam rutinního vyšetření genu *TP53* pomocí analýzy hrMCA u pacientů s CLL jako alternativní metody k přímému sekvenování.

Metodika

Charakteristika pacientů

Vyšetřovaný soubor tvořilo 72 pacientů s CLL, kteří byli diagnostikováni a léčeni v letech 2000–2008 na HOK FN a LF UP v Olomouci. Věk pacientů v době diagnózy se pohyboval v rozmezí 35–81 let (medián 58 let). Do souboru bylo zahrnuto 26 žen a 46 mužů. Stadium onemocnění podle Bineta bylo známo u 67 pacientů. V době odběru biologického materiálu se 44 (66 %) těchto pacientů nacházelo v pokročilém stadiu onemocnění (Binet B/C). Pomocí FISH analýzy byly u 63 (88 %) ze 72 vyšetřených pacientů detekovány následující cytogenetické abnormality: 13q- (51 % pacientů, zpravidla v kombinaci s 11q- a/nebo 17p-), 11q- (42 % pacientů), 17p- (25 % pacientů), +12 (6 % pacientů), 6q- (3 % pacientů), 2p+ (4 % pacientů), komplexní karyotyp (3 % pacientů). Mutační status genu *IgVH* byl určen u 70 pacientů, přičemž nemutovaný stav genu *IgVH* byl prokázán u 52 (74 %) pacientů.

Vyšetřovaný pacientský soubor byl z hlediska porovnání četnosti výskytu mutací v genu *TP53* v závislosti na charakteru onemocnění rozdělen na dvě skupiny. První skupinu (skupina A) tvořilo 38 pacientů s rizikovou CLL (kombinace nepříznivých chromozomových změn a/nebo nemutovaného stavu genu *IgVH*). Do druhé skupiny (skupina B) bylo zahrnuto 34 pacientů, kteří byli vybráni náhodně, bez ohledu na stadium a klinický průběh onemocnění (klinická a laboratorní charakteristika souboru pacientů viz tab. 1).

Izolace DNA, RNA a přepis do cDNA

Biologický materiál tvořily DNA a RNA izolované z leukocytů, mononukleárních buněk a buněk CD19+ periferní krve, případně kostní dřeně pacientů. Pro izolaci DNA byly použity fenol-chloroformová extrakce (13) a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). RNA byla získána pomocí TRIZOL Reagent (Invitrogen) nebo fenol-chloroformovou extrakcí s guanidin izothiokyanátem (14). Reverzní transkripcí byla z izolované pacientské RNA obdržena cDNA (15).

Přímé sekvenování

Výchozím materiálem pro přímé sekvenování byly pacientské cDNA a DNA. Na úrovni cDNA byla pomocí primerů *TP53* F/R (16) amplifikována oblast exonů 2–10 genu *TP53* (délka PCR produktu 1150 bp). Reakce probíhala za následujících podmínek: 94 °C 4 min. (1x); 94 °C 40 s, 57 °C 40 s, 72 °C 2,15 min. (35x); 72 °C 10 min. (1x) (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems). Účinnost amplifikace byla ověřena na 1–2% agarózovém gelu a purifikované PCR produkty (QIAquick® Gel Extraction Kit; Qiagen) sloužily jako templát pro sekvenační PCR (BigDye® Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems).

Analýza DNA byla použita při ověření výsledků metody hrMCA. Pomocí specifických primerů (10) byly amplifikovány oblasti exonů 5, 6, 7, 8 genu *TP53* (délka PCR produktů 285, 258, 219 a 287 bp). Reakce probíhaly za stanovených podmínek (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems) (10). PCR produkty byly přímo použity pro sekvenační PCR (BigDye® Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems).

PCR produkt velikosti 1150 bp byl amplifikován pomocí forward primerů *TP53* F1, *TP53* F2 (16) a *TP53* F3 (5´-CTCTGACTGTACCACCATCCAC-3´). PCR produkty odpovídající exonům 5, 6, 7, 8 byly resekvenovány v obou směrech za použití specifických primerů (10). Sekvenační PCR probíhala za standardních podmínek (Alpha™ Unit Block Assembly for DNA Engine® Systems; BIO-RAD). Sekvenační PCR produkty byly purifikovány podle standardní etanolové metody nebo pomo-

Tab. 1. Klinická a laboratorní charakteristika vyšetřovaných pacientů s CLL.

Prognostické markery CLL	Pacienti s rizikovou CLL (skupina A)	Náhodně vybraní pacienti s CLL (skupina B)
Věkový medián	57,5 let	58 let
Počet mužů	25/38 (66 %)	21/34 (62 %)
Stadium onemocnění podle Bineta		
A	9/37 (24 %)	28/37 (76 %)
B/C	14/30 (47 %)	16/30 (53 %)
Chromozomové změny(1)		
příznivé – izolovaná 13q- nebo normální karyotyp	3/38 (8 %)	17/34 (50 %)
nepříznivé - 17p-, 11q-, 6q-, 2p+, komplexní karyotyp	35/38 (92 %)	14/34 (41 %)
17p-	16/38 (42 %)	3/34 (9 %)
Mutační status genu *IgVH*		
mutovaný	5/38 (13 %)	13/32 (41 %)
nemutovaný	33/38 (87 %)	19/32 (59 %)

(1)nezařazena +12 z důvodu nejednoznačného prognostického významu

proLékaře.cz | 9.11.2026

Tab. 2. Charakteristika pacientů s rizikovou CLL (skupina A) z hlediska výskytu mutací v genu *TP53* určených přímým sekvenováním a aberantních PCR produktů detekovaných analýzou hrMCA.

	Sekvenování				hrMCA
Pacient	Lokalizace mutace exon	Charakterizace mutace na genové úrovni*	Charakterizace mutace na proteinové úrovni*	Predikovaná zbytková aktivita p53 (%)*	Lokalizace změny exon
4A	(-)	(-)	(-)	(-)	7
5A	7	c.711G>T(1)	p.M237I	0,43	7
8A	7	c.722C>A	p.S241Y	6,57	7
10A	5	c.536A>T	p.H179L	21,26	5b
11A	6 8	c.584T>A c.820G>T	p.I195N p.V274F	10,54 0,84	6 8
12A	8	c.818G>A(1)	p.R273H	1,01	8
14A	6 8	c.578A>T c.818G>A(1)	p.H193L p.R273H	11,02 1,01	6 8
15A	7	c.707A>G(1)	p.Y236C	0,70	7
20A	7	c.773A>C	p.E258A	0,00	7
21A	(-)	(-)	(-)	(-)	7
27A	5	c.503A>T	p.H168L	9,78	5b
28A	5	c.499C>T	p.Q167X	0,00	5b
30A	5	c.[527G>T;528C>T]	p.C176F	22,88	5b
31A	4 (-)	c.96_116del (-)	p.S33QfsX5 (-)	ND (-)	(-) 7
32A	6	c.589G>A	p.V197M	5,55	6
33A	8	c.817C>T(1)	p.R273C	0,91	8
34A	(-)	(-)	(-)	(-)	7
35A	(-)	(-)	(-)	(-)	6
36A	7	c.[743G>T;744G>T]	p.R248L	0,00	7
37A	(-) 8	(-) c.814G>A(1)	(-) p.V272M	(-) 8,79	6 8
38A	4 8	c.119T>C c.885T>C	p.M40T p.P295P	49,60 ND	(-) 8

Vysvětlivky: (1) „hot spot" mutace; (-) nepřítomnost sledovaného znaku; ND nedostupná data; * mutační charakterizace pomocí programu MUT-TP53 a IARC TP53 Database, 2008 R13

Tab. 3. Charakteristika náhodně vybraných pacientů s CLL (skupina B) z hlediska výskytu mutací v genu *TP53* určených přímým sekvenováním a aberantních PCR produktů detekovaných analýzou hrMCA.

	Sekvenování				hrMCA
Pacient	Lokalizace mutace exon	Charakterizace mutace na genové úrovni*	Charakterizace mutace na proteinové úrovni*	Predikovaná zbytková aktivita p53 (%)*	Lokalizace změny exon
7B	(-) 8	(-) c.843_860del	(-) p.R282RfsX58	(-) ND	6(P) 8
19B	5-6	c.375_673del	p.T125_V225del	ND	5a,5b, 6
24B	(-)	(-)	(-)	(-)	6(P)
29B	8	c.889delC	p.H297TfsX48	ND	8
31B	(-)	(-)	(-)	(-)	5a

Vysvětlivky: (P) pravděpodobný nález polymorfismu c.639A>G, R213R; (-) nepřítomnost sledovaného znaku; ND nedostupná data; * mutační charakterizace pomocí programu MUT-TP53 a IARC TP53 Database, 2008 R13

cí komerčního kitu Agencourt® CleanSEQ (Beckmann Coulter Company).

Sekvence byly analyzovány na ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a vyhodnoceny pomocí Sequencing Analysis Software v5.3.1 (Applied Biosystems). Revidované sekvence byly v programu Biology Workbench 3.2. (SDSC) porovnány se sekvencemi referenčními (NCBI GenBank®: NM_000546.3, NC_000017: c7531642-7512445; www.ncbi.nlm.nih.gov). Detekované sekvenční změny byly charakterizovány pomocí programu MUT-TP53 (http://p53.free.fr/). Funkční důsledek mutací byl určen na základě IARC TP53 Database, 2008 R13 (www-p53.iarc.fr).

Analýza křivek tání s vysokým rozlišením (hrMCA)

Výchozím materiálem pro analýzu hrMCA byla DNA pacientů. Pro amplifikaci oblasti exonů 5, 6, 7, 8 (délka PCR produktů 136 bp, 190 bp, 222 bp, 200 bp, 245 bp) byly použity specifické páry primerů. Exon 5 byl rozdělen na dva úseky (označené exon 5a a exon 5b) a amplifikován pomocí dvou párů primerů (10). Podmínky reakce byly optimalizovány na základě doporučení výrob-

proLékaře.cz | 9.11.2026

Tab. 4. Mediány teplot tání PCR produktů stanovené pomocí analýzy hrMCA.

Charakteristika pacientů	Jednotlivé exony skupin pacientů	Medián Tm standardních PCR produktů (95% CI)	Tm nespecifických PCR PCR produktů
Pacienti s rizikovou CLL (skupina A)	Exon 5a	89,60 (89,530-89,620)	88,94^{PK}
	Exon 5b	91,14 (91,102-91,190)	90,94; 91,09; 91,17; 91,42^{PK}
	Exon 6	86,53 (86,504-86,572)	86,4; 86,43; 86,43; 86,47^{PK}; 86,52; 86,54
	Exon 7	88,46 (88,405-88,546)	88,03; 88,19; 88,3; 88,41^{PK}; 88,41; 88,59^{PK}; 88,93; 88,97; 89,07
	Exon 8	88,32 (88,300-88,360)	88,07; 88,11^{PK}; 88,15; 88,18^{PK}; 88,37; 88,4
Náhodně vybraní pacienti s CLL (skupina B)	Exon 5a	89,03 (89,006-89,064)	89,01^{PK}; 89,09
	Exon 5b	91,22 (91,110-91,240)	90,99^{PK}; 91,11
	Exon 6	86,38 (86,350-86,384)	86,28; 86,4^{PK}; 86,48; 86,58
	Exon 7	87,93 (87,894-87,970)	88,08^{PK}; 88,14^{PK}
	Exon 8	88,18 (88,126-88,220)	87,54; 87,93^{PK}; 88,08

Vysvětlivky: ^{PK} pozitivní kontrola; CI konfidenční interval; Tm teploty tání

ce (LightCycler® 480 Real-Time PCR System; Roche Applied Science). Vyhodnocení křivek tání a určení teplot tání PCR produktů bylo provedeno pomocí LightCycler® 480 Software 1.5.0 (Roche Applied Science).

Statistické analýzy

Korelace mezi přítomností mutací, případně polymorfismů v genu *TP53* a stadiem CLL podle Bineta byla stanovena pomocí Chí-kvadrát testu. Za použití Fisherova exaktního testu byl určen vztah mezi výskytem mutací v genu *TP53* a pohlavím, delecí 17p, případně mutačním statutem genu *IgVH* (MedCalc Statistical Software 10.3; MedCalc Software). Statisticky významný vztah mezi proměnnými byl prokázán, pokud bylo $P < 0,05$.

Výsledky

Ve vyšetřovaném souboru 72 pacientů byly pomocí přímého sekvenování a analýzy hrMCA detekovány změny genu *TP53* celkem u 46 (64 %) pacientů.

Pomocí přímého sekvenování oblasti kódující sekvence genu *TP53* (exony 2-10) bylo nalezeno 59 změn u 45 (62 %) pacientů. Mezi těmito změnami bylo u 33 (46 %) pacientů určeno 36 polymorfismů následujících typů: c.108G>A, P36P; c.215G>C, R72P; c.639A>G, R213R. Kromě polymorfismů bylo v genu *TP53* u 20 (28 %) pacientů detekováno 23 mutací. Jednalo se o substituce (83 % mutací) a delece (17 % mutací). Substituce byly příčinou vzniku záměnových (90 %), nesmyslných (5 %) a tichých mutací (5 %). V rámci záměnových mutací byly identifikovány také tzv. hot spot mutace, lokalizované v kodonech 236, 237, 272 a 273 (charakteristika pacientů z hlediska záchytu mutací viz tab. 2, 3). Detekované mutace se nacházely v oblasti DNA-vazebné domény genu *TP53*, odpovídající exonům 5–8 (91 % mutací) a v exonu 4 (9 % mutací). 87 % mutací bylo nalezeno u pacientů s rizikovým onemocněním (skupina A). U náhodně vybrané skupiny pacientů s CLL (skupina B) bylo v genu *TP53* identifikováno 13 % mutací, přičemž se jednalo pouze o delece.

Věkový medián 20 pacientů s detekovanou mutací genu *TP53* byl 59,5 let. 14 (70 %) pacientů tvořili muži, zbývajících 6 (30 %) ženy. Ve skupině pacientů s mutací genu *TP53* se jich 14 (74 %) nacházelo v pokročilém stadiu CLL (Binet B/C). Stadium A onemocnění podle Bineta bylo prokázáno u 5 (26 %) pacientů. Mezi pacienty s detekovanou mutací genu *TP53* byly zaznamenány následující cytogenetické změny: 17p- u 17 (85 %) pacientů, 13q- u 11 (55 %) pacientů, 11q- u 2 (10 %) pacientů, +12 u 1 (5 %) pacienta, 2p+ u 1 (5 %) pacienta, komplexní karyotyp u 1 (5 %) pacienta. U 16 (80 %) pacientů s prokázanou mutací genu *TP53* byl určen nemutovaný stav genu *IgVH*. Mutovaný stav genu *IgVH* byl stanoven u 4 (20 %) pacientů.

Na základě statistické analýzy byla prokázána korelace mezi přítomností mutací v genu *TP53* a delecí 17p ($P < 0,000001$) a také mezi výskytem mutací v genu *TP53* a stadiem CLL podle Bineta ($P = 0,027$). Nebyl prokázán vztah mezi přítomností mutací v genu *TP53* a pohlavím ($P = 0,591$) a také nebyla potvrzena souvislost mezi výskytem mutací v genu *TP53* a mutačním statutem genu *IgVH* ($P = 0,559$). Statisticky významná nebyla ani korelace mezi stadiem onemocnění podle Bineta a polymorfismem c.215G>C, R72P v genu *TP53* ($P = 0,503$).

Pomocí hrMCA analýzy exonů 5, 6, 7 a 8 genu *TP53* bylo u 26 (36 %) pacientů detekováno 32 nespecifických PCR produktů (viz tab. 2, 3). 75 % těchto PCR produktů bylo určeno u pacientů s rizikovou CLL (skupina A). Zbývajících 25 % aberantních PCR produktů bylo nalezeno u náhodně vybraného souboru pacientů (skupina B).
Mezi nespecifickými a standardními PCR produkty nebyly pozorovány významné rozdíly ve stanovených teplotách tání (viz tab. 4). Všechny aberantní PCR produkty byly určeny podle odlišných profilů (amplituda a/nebo tvar) příslušných křivek tání.

Diskuse

Přítomnost mutací v genu *TP53* je nepříznivým prognostickým markerem řady lidských nádorových onemocnění. Mnoho současných studií potvrdilo klinický význam sledování poškození genu *TP53* také u pacientů s CLL (7, 8, 17). Často se však liší v používané detekční

proLékaře.cz | 9.11.2026

metodice (4, 7, 18). Standardním přístupem, rutinně využívaným pro určení změn genu *TP53* je přímé sekvenování. Tato metoda je však v současnosti do určité míry nahrazována jinými přístupy (7, 12). Důvodem je zejména časová, laboratorní náročnost a také poměrně nízká citlivost přímého sekvenování (10, 17). Při detekci genových změn u pacientů s CLL je možné citlivost sekvenační analýzy zvýšit použitím genetického materiálu izolovaného z leukemických B-lymfocytů (CD19+ buněk). Stanovení změn v kódující oblasti genu *TP53* na úrovni cDNA umožňuje snížit laboratorní náklady. Při použití tohoto přístupu je možné detekovat také alternativní transkripty genu *TP53*, které mohou být prognosticky významné (18, 19). Z důvodu minimalizace laboratorních nákladů je navíc řada pracovišť zaměřena pouze na analýzu oblasti DNA-vazebné domény, kde je lokalizováno zhruba 94 % dosud publikovaných mutací genu *TP53* (IARC TP53 Database, 2008 R13). Také v našem případě byla většina mutací genu *TP53* (91 %) detekována v DNA-vazebné doméně (exony 5-8). Nález prognosticky nepříznivých změn mimo tuto oblast ovšem současně prokázal význam analýzy celé genové sekvence (6).

Mutace v genu *TP53* jsou běžně detekovány u 10–15 % pacientů s CLL. Nárůst jejich výskytu je přitom zpravidla pozorován u pacientů s rizikovým onemocněním, intenzivně léčených a v pokročilém stadiu CLL (7, 8, 17). Tuto skutečnost prokázaly také naše výsledky, kdy byly mutace genu *TP53* nalezeny u 20 (28 %) vyšetřených pacientů, a to převážně s rizikovou CLL.

Nejčastěji identifikovanými změnami genu *TP53* jsou substituce, které tvoří u pacientů s CLL přibližně 82 % všech mutací (IARC TP53 Database, 2008 R13). U našeho souboru bylo zastoupení těchto mutací obdobné, vyskytovaly se v 83 %, a to pouze u pacientů s rizikovou CLL. Substituce detekované v genu *TP53* jsou zpravidla příčinou záměnových mutací. U pacientů s CLL se jejich četnost pohybuje kolem 89 % (IARC TP53 Database, 2008 R13). Také u našeho souboru pacientů byly funkčním důsledkem substitucí nejčastěji záměnové mutace, které tvořily 90 % těchto změn. Mezi nimi byly identifikovány rovněž tzv. hot spot mutace, které jsou zpravidla spojeny s klinicky agresivním průběhem CLL (6). Ve vyšetřovaném souboru byly „hot spot" mutace lokalizovány v kodonech 236, 237, 272 a 273, které často podléhají mutacím nejen u pacientů s CLL, ale také u řady dalších nádorových onemocnění. Všechny detekované substituce s výjimkou c.885T>C, p.P295P u pacienta č. 38A jsou popsány v literatuře (podle IARC TP53 Database, 2008 R13). Kromě substitucí byly u vyšetřovaných pacientů nalezeny také delece, které však tvořily pouze 17 % mutací, což je v souladu s publikovanými daty (7, 17). Tyto delece byly pozorovány zejména u náhodně vybraných pacientů a nebyly dosud literárně popsané (podle IARC TP53 Database, 2008 R13).

Zbytková aktivita proteinu p53, predikovaná na základě výsledků funkčního testu FASSAY (IARC TP53 Database, 2008 R13), se u naší skupiny pacientů s detekovanou mutací genu *TP53* pohybovala v rozmezí 0,00 – 49,60 %. V případě „hot spot" mutací, které jsou typické pro progresivní charakter onemocnění, se jednalo o hodnoty 0,43 – 8,79 %. Je nutno podotknout, že se tyto hodnoty týkají především skupiny pacientů s rizikovou CLL, protože přesný funkční důsledek určených delecí není prozatím znám. Krátké delece identifikované u pacientů č. 31A, 7B a 29B vedly k posunu čtecího rámce, vzniku STOP kodonu a následně zkráceného proteinu. Lze předpokládat, že největší vliv na omezení funkce proteinu p53 bude mít delece detekovaná u pacienta č. 31A (riziková CLL). Na rozdíl od delecí zasahujících exon 8 u pacientů č. 7B a 29B je její začátek lokalizován v exonu 4 genu *TP53* a záhy vede ke vzniku STOP kodonu. U pacienta č. 19B byla v DNA-vazebné doméně, která je nezbytná pro vazbu proteinu na promotory cílových genů, nalezena delece exonů 5 a 6 genu *TP53*. Přesnou lokalizaci této rozsáhlé mutace na DNA úrovni se však dosud nepodařilo určit. Na základě těchto výsledků je zřejmé, že detekované mutace vedly ke značnému omezení funkce proteinu p53. Zároveň bylo potvrzeno, že mutace genu *TP53* stanovené u pacientů s rizikovou CLL měly většinou více nepříznivý důsledek na proteinovou funkci ve srovnání s mutacemi detekovanými u náhodně vybraného souboru pacientů.

Poškození genu *TP53* je zpravidla pozdní událostí ve vývoji CLL. Vyskytuje se zejména u pacientů v pokročilé fázi onemocnění, s nepříznivými chromozomovými změnami a také nemutovaným stavem genu *IgVH* (17). V našem případě se v pokročilém stadiu CLL (Binet B/C) nacházelo 14 (74 %) pacientů s mutací genu *TP53*. V souladu s publikovanými daty (7,17) byla u většiny, a to 17 (85 %) vyšetřených pacientů s mutací genu *TP53* detekována delece 17p. U zbývajících 3 (15 %) pacientů byly zaznamenány delece 11q a 13q. Recentní publikace uvádějí, že ačkoliv je přítomnost mutací v genu *TP53* bez výskytu 17p- u pacientů s CLL poměrně vzácná, je také spojena s nepříznivou prognózou (7, 17). Nemutovaný stav genu *IgVH* byl stanoven u 16 (80 %) pacientů s mutací genu *TP53*. I když je zvýšený výskyt nemutovaného stavu genu *IgVH* u pacientů s prokázanými mutacemi genu *TP53* literárně popsaný (7, 17), u našeho souboru je zřejmě podmíněn cíleným výběrem analyzovaných pacientů.

Kromě mutací byly v genu *TP53* nalezeny u 33 (46 %) vyšetřených pacientů také polymorfismy. Nejčastěji se jednalo o substituci c.215G>C, R72P. Tato nukleotidová varianta je u pacientů s CLL často detekována, avšak její význam na prognózu onemocnění nebyl dosud potvrzen (20, 21), co ukázaly rovněž naše výsledky. Prognostický význam polymorfismů c.639A>G, R213R (20) a c.108G>A, P36P není u CLL dostatečně prostudován. V našem případě nebyl určen z důvodu nízkého počtu vstupních dat.

Na základě statistické analýzy byl u vyšetřených pacientů prokázán vztah mezi výskytem mutací v genu *TP53* a stadiem CLL podle Bineta ($P = 0,027$) a také mezi přítomností mutací v genu *TP53* a delecí 17p ($P < 0,000001$). Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanou literaturou (17). Statisticky významná korelace mezi výskytem mutací v genu *TP53* a mutačním statutem genu *IgVH* nebyla prokázána ($P = 0,559$). Pravděpodobným důvodem je výše zmíněný selektivní výběr pacientů a tím zkreslení výsledku statistické analýzy.

proLékaře.cz | 9.11.2026

Pro stanovení změn genu *TP53* je používána řada metodik. Kromě přímého sekvenování a FISH analýzy, prováděných standardně na řadě pracovišť, se v současné době dostávají do popředí další detekční přístupy. Jedná se zejména o funkční analýzu (FASSAY) (18, 22), denaturační vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (DHPLC) (7, 17, 23), metodu MLPA (24) a také hrMCA (10–12). V našem případě byla ke stanovení změn v genu *TP53* použita analýza hrMCA. Přednostmi této metodiky jsou zejména vysoká citlivost a jednoduché provedení, díky čemu je v současnosti využívána řadou laboratoří při mutační analýze (9), včetně detekce změn genu *TP53* u pacientů s nádorovým onemocněním prsu (10–12).

Pomocí hrMCA analýzy oblasti DNA-vazebné domény (exony 5-8) genu *TP53* bylo u 26 (36 %) vyšetřených pacientů nalezeno 32 nespecifických PCR produktů. Ve srovnání s přímým sekvenováním dané oblasti bylo navíc detekováno 7 aberantních PCR produktů. Příčinou je pravděpodobně větší citlivost analýzy hrMCA (10,12). Vzhledem k tomu, že nebylo možné na základě naměřených teplot tání odlišit standardní a nespecifické PCR produkty, analýza se opírala pouze o vyhodnocení profilu křivek tání. Ačkoliv je tento přístup využíván při mutační analýze řadou laboratoří (10–12), naše zkušenosti poukazují na velkou subjektivnost hodnocení a tedy možnost rozdílné interpretace získaných výsledků. Standardizace metodiky hrMCA je navíc znesnadněna problematickou volbou vhodných pozitivních kontrol. Mutace v genu *TP53* totiž u většiny pacientů s CLL představují sekundární změny s výskytem na různých genových místech (IARC TP53 Database, 2008 R13). Z výsledků naší práce vyplývá, že využití hrMCA pro rutinní detekci změn genu *TP53* u pacientů s CLL není zatím vhodné.

Závěr

Práce potvrdila nepříznivý význam výskytu mutací v genu *TP53* u pacientů s CLL. Analýza kódující oblasti genu *TP53* odhalila mutace u 20 (28 %) vyšetřených pacientů, a to převážně s rizikovým onemocněním. Kromě mutací popsaných v literatuře byly v genu *TP53* nalezeny také dosud nepublikované změny. Jednalo se o substituci c.885T>C, p.P295P a všechny detekované delece (podle IARC TP53 Database, 2008 R13). Určené mutace mají prokazatelný význam na proteinové úrovni. Vliv polymorfismů genu *TP53* na prognózu CLL nebyl potvrzen. Ačkoliv je přímé sekvenování standardní metodou pro určení změn v genu *TP53*, je nezbytné optimalizovat další detekční přístupy.

Literatura

1. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. Hematology 2006: 279-284.
2. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. British Journal of Haematology 2004; 125: 294-317.
3. Dighiero G. Chronic lymphocytic leukemia: CLL biology and prognosis. Hematology 2005: 278-284.
4. Döhner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood 1995; 85:1580-1589.
5. Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P, Döhner H. Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Annals of Hematology 1998; 76: 101-110.
6. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 Database. Human Mutation 2007; 28: 622-629.
7. 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.
8. Thornton P D, Gruszka-Westwood A M, Hamoudi R A, et al. Characterisation of *TP53* abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. The Hematology Journal 2004; 5: 47-54.
9. Wittwer C T, Reed G H, Gundry C N, Vandersteen J G, Pryor J R. High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clinical Chemistry 2003; 49: 853-860.
10. Krypuy M, Ahmed A A, Etemadmoghadam D, et al. High resolution melting for mutation scanning of *TP53* exons 5-8. BioMed Central Cancer 2007; 7: 168-181.
11. Bastien R, Lewis T B, Hawkes J E, et al. High-throughput amplicon scanning of the TP53 gene in breast cancer using High-resolution fluorescent melting curve analyses and automatic mutation calling. Human Mutation 2008; 29: 757-764.
12. Garritano S, Gemignani F, Voegele C, et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the *TP53* locus. BioMed Central Genetics 2009; 10: 5-16.
13. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, et al. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997; 74: 1245-1249.
14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987; 162: 156-159.
15. Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York, 2001.
16. Malcikova J, Smardova J, Pekova S, et al. Identification of somatic hypermutations in the *TP53* gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Molecullar Immunology 2008; 45: 1525-1529.
17. Zenz T, Kröber A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. Blood 2008; 112: 3322-3329.
18. Trbusek M, Malcikova J, Smardova J, et al. Inactivation of p53 and deletion of *ATM* in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. Leukemia 2006; 20: 1159-1161.
19. Pekova S, Cmejla R, Smolej L, Kozak T, Spacek M, Prucha M. Identification of a novel, transactivation-defective splicing variant of p53 gene in patients with chronic lymphocytic leukemia. Leukemia Research 2008; 32: 395-400.
20. Kochethu G, Delgado J, Pepper Ch, et al. Two germ line polymorphisms of the tumor suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lmphocytic leukaemia. Leukemia Research 2006; 30: 1113-1118.
21. Lahiri O, Harris S, Packham G, Howell M. p53 pathway gene single nucleotide polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics 2007; 179: 36-44.
22. Flaman J-M, Frebourg T, Moreau V, et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995; 92: 3963-3967.
23. Keller G, Hartmann A, Mueller J, Höfler H. Denaturing high pres-

proLékaře.cz | 9.11.2026

sure liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of somatic *p53* mutations. Laboratory Investigation 2001; 81: 1735-1737.
24. Coll-Mulet L, Santidrian A F, Cosialls A M, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. British Journal of Haematology 2008; 142: 793-801.

Mgr. Barbara Kantorová
Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: barborakantorova@seznam.cz

Práce byla realizována s podporou grantů IGA NR 9484-3 a MSM 619 895 92 05.

Doručeno do redakce: 7. 12. 2009
Přijato po recenzi: 25. 2. 2010

Výběr z tisku a zprávy o knihách

Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study

Alix E. Seif, Catherine S. Manno, Cecilia Sheen, Stephan A. Grupp and David T. Teachey
Divisions of Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Children´s Hospital of Philadelphia, PA, and Department of Pediatrics, New York University School of Medicine, New York
Blood, 18 March 2010, Vol. 115, Number 11, pp. 2142-2145

Autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (ALPS) je syndrom porušené lymfocytové homeostázy způsobený defektem Fas – zprostředkované apoptózy. Klinické projevy zahrnují autoimunitní cytopenie, organomegalii, lymfadenopatii a zvýšené riziko malignity. Podobné klinické projevy jsou u Evansova syndromu (ES). Autoři předpokládali, že část pacientů s ES může mít ALPS. K potvrzení své hypotézy provedli studii souboru 45 dětských pacientů z 22 ústavů s ES (průměrný věk při diagnóze 7,1 roků). K určení prevalence ALPS vyhodnotili počet dvojitě negativních T-lymfocytů v periferní krvi (DNTs) s fenotypem $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\text{-}\alpha/ß^+$ jako screening ALPS u pacientů s Evansovým syndromem a vyšetřili Fas – zprostředkovanou apoptózu in vitro. U 21 pacientů (47 %) ze 45 celkem zařazených pacientů zjistili zvýšený počet DNTs a defektní Fas – zprostředkovanou apoptózu v souhlase s diagnózou ALPS. Klinické faktory pro predikci defektní Fas – zprostředkované apoptózy byly: závažnost cytopenií (vyžadujících léčbu imunosupresivy alespoň dvakrát za rok), přítomnost lymfadenopatie a zvýšení IgG. U 4 pacientů z 21 však nebyla klinicky zjistitelná lymfoproliferace. Zda tito pacienti měli frustní formu ALPS nebo ALPS-like syndrom, je diskutabilní. Specifické cytopenie a hematologické protilátky nebyly směrodatné pro ALPS, ani ANA, APLA nebo hepatomegalie. Autoři shrnuli v závěru: (1) signifikantní procento pediatrických pacientů s ES má ALPS, (2) závažnost a přítomnost cytopenií predikuje diagnózu, (3) některé děti bez klasických známek lymfoproliferace jsou také v riziku. Vzhledem k významným rozdílům v terapii ALPS a ES doporučují, aby všechny děti s ES byly podrobeny screeningu ALPS pomocí DNTs jako součást jejich diagnostického vyhodnocení.

Prof. MUDr. Otto Hrodek, DrSc.