

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Teodora Ž. Karan-Đurašević

**MOLEKULARNA OSNOVA HRONIČNE
LIMFOCITNE LEUKEMIJE: KORELACIJA
IZMEĐU MUTACIONOG STATUSA TEŠKIH
LANACA IMUNOGLOBULINA I EKSPRESIJE
APOPTOTSKIH GENA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Teodora Z. Karan-Djurasevic

**MOLECULAR BASIS OF CHRONIC
LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: CORRELATION
BETWEEN THE IMMUNOGLOBULIN HEAVY
CHAIN MUTATIONAL STATUS AND THE
EXPRESSION OF APOPTOTIC GENES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI:

- dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
- dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA:

- dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
- dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
- dr Nataša Tošić, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu hematologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Najveću zahvalnost dugujem dr Sonji Pavlović koja mi je ukazala ogromno poverenje i pružila neiscrpnu podršku u toku rada na ovoj tezi. Zahvaljujem se i Prof. dr Dušanki Savić-Pavićević i dr Nataši Tošić na savetima i kritičkom čitanju ove teze. Hvala i svim kolegama sa IMGGI na svakodnevnoj pomoći i korisnim savetima.

MOLEKULARNA OSNOVA HRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE: KORELACIJA IZMEĐU MUTACIONOG STATUSA TEŠKIH LANACA IMUNOGLOBULINA I EKSPRESIJE APOPTOTSKIH GENA

Rezime

Hronična limfocitna leukemija (HLL), najčešći tip leukemije u Evropi i Severnoj Americi, se manifestuje kao klonska ekspanzija zrelih CD5⁺ CD19⁺ CD23⁺ sIgM^{+/-} B limfocita i karakteriše se izuzetno heterogenim kliničkim tokom.

Leukemični, kao i normalni B limfociti, na svojoj površini eksprimiraju imunoglobulinski antigenski receptor. Struktura varijabilnog regiona njegovog teškog lanca (IGH) je determinisana specifičnim rearanžmanima između *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena, koji se odvijaju tokom diferencijacije B ćelija. Nakon susreta sa antigenom, B limfociti ulaze u proces afinitetnog sazrevanja u germinalnim centrima sekundarnih limfnih folikula, tokom koga dolazi do akumulacije somatskih hipermutacija u *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanima.

Pokazano je da je mutacioni status rearanžiranih gena za varijabilni region teških lanaca imunoglobulina (*IGHV*) najpouzdaniji molekularni marker u HLL, koji definiše dva podtipa bolesti: M-HLL i N-HLL. Pacijenti sa malim procentom ili bez *IGHV* mutacija (N-HLL) obično imaju mnogo agresivniji tok bolesti i lošiju prognozu od pacijenata sa mutiranim *IGH* rearanžmanima (M-HLL). Razlike u *IGHV* genskom repertoaru između M-HLL i N-HLL klonova, populacione varijacije u učestalosti određenih *IGHV* gena u HLL rearanžmanima kao i ekspresija visoko homologih, "stereotipnih" rearanžmana, ukazuju na ulogu antigenske stimulacije u patogenezi HLL.

HLL se smatra tipičnim primerom maligniteta uzrokovanog poremećajima u procesu apoptoze. U HLL su detektovane genetičke promene i aberantna ekspresija brojnih proteina regulatora apoptoze, koji su uključeni kako u spoljašnji tako i u unutrašnji put aktivacije ovog procesa.

Smatra se da je smanjeni apoptotski potencijal HLL klonova uzrokovan, između ostalog, i poremećajima u ekspresiji proteina Bcl2 familije.

U ovom radu je analiziran *IGHV* mutacioni status i genski repertoar *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana kod pacijenata obolelih od HLL. Pored toga, analizirana je ekspresija gena *Bcl2* familije, kao osnovnih regulatora unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze, u cilju utvrđivanja njihove uloge u apoptotskoj rezistenciji HLL B limfocita. qRT-PCR metodom je merena ekspresija *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* gena, i ispitivana asocijacija nivoa njihove ekspresije sa odabranim kliničkim i molekularnim prognostičkim faktorima (*IGHV* mutacionim statusom, ekspresijom CD38 i lipoprotein lipaze).

Bcl2L12 je novi član Bcl2 familije apoptotskih proteina čija pro- ili anti-apoptotska funkcija još uvek nije razjašnjena. Pored analize ekspresije *Bcl2L12* gena u HLL, jedan od ciljeva ovog rada je bilo i definisanje promotorskog regiona i mesta starta transkripcije *Bcl2L12*, što je neophodno za proučavanje mehanizama njene transkripcione regulacije.

Određivanjem *IGHV* mutacionog statusa je pokazano da 55.3% analiziranih pacijenata pripada M-HLL, a 44.7% N-HLL podtipu, kao i da u N-HLL preovlađuju pacijenti sa progresivnim oblikom bolesti. U analiziranim rearanžmanima su sa najvećom frekvencom bili zastupljeni geni *IGHV3* familije (55.7%), a zatim *IGHV1* (27.3%), *IGHV4* (12.5%), *IGHV5* (2.3%), *IGHV2* (1.1%) i *IGHV6* (1.1%) geni. Pokazano je prisustvo tzv. "stereotipnih" rearanžmana kod 15.3% pacijenata, predominantno u N-HLL podtipu. Na osnovu određenih frekvenci *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena i genskih familija je zaključeno da je *IGH* genski repertoar leukemičnih klonova kod pacijenata iz Srbije veoma sličan repertoaru detektovanom kod pacijenata iz zemalja mediteranskog područja, sa izuzetkom gena *IGHV4* familije koji su kod pacijenata u ovoj studiji zastupljeni sa manjom učestalošću.

Analizom ekspresije *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* su detektovani znatno viši nivoi ekspresije sva tri gena kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole, pri čemu je povećanje ekspresije bilo najizraženije u slučaju *Bcl2* gena. Povišena ekspresija *Bcl2* je pokazala asocijaciju sa nepovoljnim prognostičkim parametrima: progresivnim tipom bolesti, visokim nivoom serumskog β 2-mikroglobulina i povišenim nivoom ekspresije gena za lipoprotein lipazu (*LPL*). Ekspresija *Bax* je pokazala korelaciju samo sa ekspresijom *LPL*, dok je ekspresija *Bcl2L12* bila

relativno homogena među HLL pacijentima i, kao takva, nije ispoljila značajnu asocijaciju sa većinom kliničkih i molekularnih prognostičkih faktora. Ekspresija *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* je bila viša u grupi N-HLL pacijenata u odnosu na M-HLL pacijente, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost.

Kloniranjem fragmenata 5' kraja *Bcl2L12* gena i funkcionalnom analizom reporterskih konstrukata, detektovan je region koji ispoljava jaku promotorsku aktivnost. Ovaj region se prostire od 338 nukleotida uzvodno, do 148 nizvodno od početka kodirajućeg dela egzona 1, a esejom usporene elektroforetske pokretljivosti ("EMSA") je pokazano da se za njega vezuju Sp1 i GATA-1 transkripcioni faktori. Metodom elongacije reverznog prajmera ("primer extension") je određen položaj starta transkripcije *Bcl2L12* gena, 33 nukleotida uzvodno od translacionog start kodona.

ključne reči: hronična limfocitna leukemija, *IGHV* mutacioni status, apoptoza, *Bcl2*, *Bax*, *Bcl2L12*

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 616-097:577.218]:616-006.4(043.3)

MOLECULAR BASIS OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: CORRELATION BETWEEN THE IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN MUTATIONAL STATUS AND THE EXPRESSION OF APOPTOTIC GENES

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common type of leukemia in Western countries, manifests as clonal expansion of mature CD5⁺ CD19⁺ CD23⁺ sIgM^{low} B lymphocytes and it is characterized by an extremely heterogeneous clinical course.

Leukemic, as well as normal B lymphocytes, express immunoglobulin antigenic receptor at their surface. The structure of its heavy chain (IGH) variable region is being formed during B-cell differentiation, through rearrangements between *IGHV*, *IGHD* and *IGHJ* genes. After antigen encounter, B lymphocytes undergo the process of affinity maturation in germinal centers of secondary lymphoid follicles, during which *IGHV-IGHD-IGHJ* rearrangements accumulate somatic hypermutations.

It has been shown that the mutational status of rearranged immunoglobulin heavy variable genes (*IGHV*) represents the most reliable molecular marker in CLL, which defines two CLL subsets: M-CLL and U-CLL. The patients without or with a small percentage of *IGHV* mutations (U-CLL) usually have more aggressive disease and inferior prognosis in comparison to patients expressing mutated *IGH* rearrangements (M-CLL). Biased *IGHV* gene repertoire between M-CLL and U-CLL clones, population differences in *IGHV* gene usage, as well as the expression of highly homologous, "stereotyped" rearrangements, strongly imply the role of antigenic stimulation in pathogenesis of CLL.

CLL typifies the malignancy caused by defective apoptosis. Genetic alterations and aberrant expression of numerous proteins involved in extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis regulation have been described in CLL. Reduced apoptotic capacity of CLL clones is, in part, caused by disturbances in the expression of *Bcl2* family proteins.

In this study, we analyzed *IGHV* mutational status and gene repertoire of *IGHV-IGHD-IGHJ* rearrangements in CLL patients. Furthermore, the expression of *Bcl2* family genes, the key regulators of intrinsic apoptotic pathway, has been studied, in order to elucidate their role in resistance of CLL B lymphocytes to apoptosis. The expression levels of *Bcl2*, *Bax* and *Bcl2L12* genes were measured by qRT-PCR, and association of their expression with clinical and molecular prognostic factors (*IGHV* mutational status, expression of CD38 and lipoprotein lipase) was analyzed.

Bcl2L12 is a novel member of *Bcl2* family of apoptotic proteins, whose pro- or anti-apoptotic function has not been elucidated yet. Besides the expression analysis of *Bcl2L12* gene in CLL, one of the aims of this dissertation was defining the promoter region and transcription start site of *Bcl2L12*, which is essential for the study of mechanisms involved in its transcriptional regulation.

The analysis of *IGHV* mutational status showed that 55.3% of patients enrolled in this study belonged to M-CLL, and 44.7% to U-CLL subset, and that in U-CLL predominated patients with the progressive form of the disease. The most frequently expressed genes were those belonging to *IGHV3* family (55.7%), followed by *IGHV1* (27.3%), *IGHV4* (12.5%), *IGHV5* (2.3%), *IGHV2* (1.1%) i *IGHV6* (1.1%) genes. The presence of "stereotyped" rearrangements was detected in 15.3% of patients, predominantly in U-CLL subset. Based on the determined frequencies of *IGHV*, *IGHD* and *IGHJ* genes and gene families, we concluded that the *IGH* gene repertoire of leukemic clones of Serbian CLL patients closely resembles the repertoire observed in patients from Mediterranean countries, with the exception of *IGHV4* family, which was underrepresented in our cohort.

The expression analysis of *Bcl2*, *Bax* and *Bcl2L12* showed that those three genes were overexpressed in CLL patients compared to healthy controls, and that elevation of expression level was the most prominent in the case of *Bcl2* gene. High expression levels of *Bcl2* were associated with unfavorable prognostic parameters: progressive form of the disease, elevated β 2-microglobulin and high expression of lipoprotein lipase gene (*LPL*). The expression of *Bax* was correlated only with the expression of *LPL*, while the expression of *Bcl2L12* turned out to be relatively homogenous among CLL patients and, as such, failed to show association with the majority of clinical and molecular prognostic factors. Expression levels of *Bcl2*, *Bax* and *Bcl2L12*

were higher in U-CLL in comparison to M-CLL group of patients, but this difference did not reach statistical significance.

Cloning of fragments corresponding to 5' end of *Bcl2L12* gene and functional analysis of reporter constructs, led to identification of a region which exerts high promoter activity. This region extends from 338 nucleotides upstream, to 148 nucleotides downstream relative to the beginning of exon 1 coding sequence, and electromobility shift assay ("EMSA") showed that it binds Sp1 and GATA-1 transcription factors. Transcription start site of *Bcl2L12* gene was determined by primer extension assay, which showed that it is located 33 nucleotides upstream of translation start codon.

key words: chronic lymphocytic leukemia, *IGHV* mutational status, apoptosis, *Bcl2*, *Bax*, *Bcl2L12*

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 616-097:577.218]:616-006.4(043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
HRONIČNA LIMFOCITNA LEUKEMIJA.....	1
<i>IGHV</i> MUTACIONI STATUS KAO PROGNOŠTIČKI MARKER U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI.....	3
Imunoglobulinski geni.....	3
<i>IGH</i> lokus	4
Imunoglobulinski geni u razviću B limfocita.....	6
Somatske hipermutacije.....	8
Genški repertoar i mutacioni status gena za varijabilni region <i>IGH</i> u hroničnoj limfocitnoj leukemiji	9
Stereotipni B ćelijski receptori u hroničnoj limfocitnoj leukemiji	11
Asocijacija <i>IGHV</i> mutacionog statusa sa drugim molekularnim markerima u HLL.....	14
Hromozomske aberacije	14
CD38	15
ZAP-70.....	17
Lipoprotein lipaza.....	19
B ćelijski receptor u hroničnoj limfocitnoj leukemiji	20
APOPTOZA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI	21
Bcl2 familija proteina.....	24
Bcl2 i Bax u hroničnoj limfocitnoj leukemiji.....	27
Bcl2	27
Bax	28
Bcl2/Bax odnos	29
Bcl2L12 u hroničnoj limfocitnoj leukemiji.....	29

CILJ RADA	32
MATERIJAL I METODE	34
MATERIJAL	34
BIOLOŠKI MATERIJAL	34
Ispitanici	34
Ćelijske linije.....	35
Bakterijski soj.....	35
PLAZMIDNI VEKTORI	35
PRAJMERI.....	35
ANTITELA	39
METODE	39
IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI.....	39
IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ĆELIJA IZ PERIFERNE KRVI	40
IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ĆELIJA I ĆELIJA U KULTURI.....	41
REVERZNA TRANSKRIPCIJA (RT)	42
REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK (PCR).....	42
RT-PCR amplifikacija <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> rearanžmana.....	43
PCR amplifikacija potencijalnih promotorskih regiona <i>Bcl2L12</i> gena	45
ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU	47
ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU	48
PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA	48
SEKVENCIRANJE PCR PRODUKATA/PLAZMIDNIH KONSTRUKATA.....	49
Sekvenciranje <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> rearanžmana	51
Sekvenciranje plazmidnih konstrukata.....	52
ANALIZA SEKVENCI <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> REARANŽMANA	52
Kompozicija <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> rearanžmana i <i>IGHV</i> mutacioni status	52
Analiza stereotipnih <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> rearanžmana	52

ANALIZA EKSPRESIJE GENA POMOĆU "REAL TIME" PCR (qPCR) METODE.....	53
Komparativna ddCt metoda.....	58
Merenje ekspresije apoptotskih gena qRT-PCR metodom.....	58
Merenje ekspresije <i>LPL</i> gena qRT-PCR metodom	59
KLONIRANJE POTENCIJALNIH PROMOTORSKIH FRAGMENTA <i>Bcl2L12</i> GENA	
U REPORTERSKI VEKTOR	60
KULTIVISANJE BAKTERIJA	62
PRIPREMANJE <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ĆELIJA	63
TRANSFORMACIJA <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ĆELIJA.....	64
DETEKCIJA PLAZMIDNOG KONSTRUKTA	64
Brza liza ("lysis gel electrophoresis").....	65
Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali ("mini prep").....	66
Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	67
Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali	68
ĆUVANJE TRANSFORMANATA	70
USLOVI GAJENJA ĆELIJA U KULTURI.....	70
Zamrzavanje ćelija	71
Odmrzavanje ćelija.....	72
Subkultivacija ćelija	72
Brojanje ćelija.....	73
TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA	73
PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA.....	75
β -GALAKTOZIDAZNI ESEJ	75
CAT ELIZA ESEJ	76
IZOLACIJA NUKLEARNIH PROTEINA.....	77
ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NUKLEARNIH PROTEINA.....	78
ANALIZA INTERAKCIJE DNK I NUKLEARNIH PROTEINA	78
<i>In silico</i> analiza potencijalnog promotorskog regiona <i>Bcl2L12</i> gena.....	78
Analiza direktne interakcije DNK i nuklearnih proteina.....	79

Obeležavanje dvolančane probe	79
Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti ("EMSA").....	80
ODREĐIVANJE STARTA TRANSKRIPCije <i>Bcl2L12</i> GENA METODOM	
ELONGACIJE REVERZNOG PRAJNERA ("PRIMER EXTENSION")	81
Radioaktivni "primer extension" esej.....	81
Neradioaktivni "primer extension" esej	82
STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	83
REZULTATI	85
ANALIZA <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> REARANŽMANA	85
<i>IGHV</i> mutacioni status; asocijacija sa kliničkim parametrima.....	86
Mutacioni status i <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> genski repertoar.....	88
<i>IGHV</i> geni.....	94
<i>IGHD</i> i <i>IGHJ</i> geni	96
Karakteristike VH CDR3	98
Populacione karakteristike analiziranih <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> rearanžmana	100
Asocijacija <i>IGHV</i> mutacionog statusa sa drugim molekularnim prognostičkim markerima	101
Ekspresija CD38.....	101
Ekspresija lipoprotein lipaze (<i>LPL</i>).....	102
EKSPRESIJA APOPTOTSKIH GENA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI	104
Ekspresija <i>Bcl2</i> gena	106
Ekspresija <i>Bax</i> gena.....	108
Analiza odnosa ekspresije <i>Bcl2</i> i <i>Bax</i> gena	109
Ekspresija <i>Bcl2L12</i> gena	111
Usporedna analiza ekspresije <i>Bcl2</i> , <i>Bax</i> i <i>Bcl2L12</i> gena	112
ANALIZA PROMOTORA I STARTA TRANSKRIPCije <i>Bcl2L12</i> GENA.....	113
Funkcionalna analiza potencijalnog promotorskog regiona -247/+105 <i>Bcl2L12</i> gena	115

Priprema CAT konstrukta.....	115
Merenje promotorske aktivnosti -247/+105 regiona	116
Funkcionalna analiza drugih potencijalnih promotorskih regiona <i>Bcl2L12</i> gena	116
Priprema CAT konstrukata.....	117
Merenje promotorske aktivnosti potencijalnih promotorskih regiona	117
<i>In silico</i> analiza 5' kraja <i>Bcl2L12</i> gena i uzvodnog regiona	118
Funkcionalna analiza potencijalnih promotorskih regiona -667/+105 i +345/+830 <i>Bcl2L12</i> gena ...	118
Priprema CAT konstrukata.....	119
Merenje promotorske aktivnosti -667/+105 i +345/+830 regiona	119
Analiza starta transkripcije <i>Bcl2L12</i> gena.....	120
Radioaktivni "primer extension" esej.....	120
Neradioaktivni "primer extension" esej	121
Analiza vezivanja transkripcionih faktora za +345/+830 promotorski regiona <i>Bcl2L12</i> gena	122
<i>In silico</i> analiza +345/+830 promotorskog regiona.....	122
Analiza interakcije promotorskog regiona <i>Bcl2L12</i> gena i transkripcionih faktora.....	123
 DISKUSIJA	 125
ANALIZA <i>IGHV-IGHD-IGHJ</i> REARANŽMANA	125
EKSPRESIJA APOPTOTSKIH GENA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI	130
ANALIZA PROMOTORA I STARTA TRANSKRIPCije <i>Bcl2L12</i> GENA.....	135
 ZAKLJUČCI	 139
 LITERATURA	 142

UVOD

HRONIČNA LIMFOCITNA LEUKEMIJA

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je maligno oboljenje hematopoetskog tkiva, koje se manifestuje kao klonska ekspanzija zrelih CD5⁺ CD19⁺ CD23⁺ sIgM^{+/-} B limfocita, što dovodi do njihove akumulacije u krvi, kostnoj srži i sekundarnim limfnim organima.

HLL je najčešći tip leukemije u Evropi i Severnoj Americi, gde čini oko 20-30% svih dijagnostikovanih leukemija adultnog doba, dok je u Azijskim zemljama izuzetno retka (oko 3% svih leukemija) [<http://seer.cancer.gov>; Tamura *et al.* 2001].

HLL se najčešće javlja kod starijih osoba; medijana starosti pacijenata pri postavljanju dijagnoze je 65-70 godina, a samo jedna trećina pacijenata je mlađa od 60 godina. Bolest je dva do tri puta češća kod muškaraca nego kod žena [Rozman and Montserrat 1995].

Etiologija HLL je nepoznata. Pojava bolesti kod više članova iste porodice, kao i kod jednojajčanih blizanaca, ukazuje na ulogu genetičkih faktora u nastanku bolesti, mada geni odgovorni za naslednu predispoziciju za HLL nisu identifikovani [Yuille *et al.* 2000; Crowther-Swaneapoel and Houlston 2009].

HLL se karakteriše izuzetno heterogenim kliničkim tokom i prognozom. Kod nekih pacijenata bolest ima indolentan tok, bez ili sa minimalnim simptomima, najčešće ne zahteva lečenje, a dužina preživljavanja ovih pacijenata je nalik zdravim kontrolama slične starosti. Drugi pacijenti, međutim, imaju veoma agresivnu bolest koja brzo progredira, terapija je neophodna ubrzo nakon postavljanja dijagnoze, a preživljavanje je znatno kraće. Kod oko 50% pacijenata bolest napreduje između ove dve krajnosti.

Prognoza HLL se procenjuje prema stadijumima bolesti definisanim na osnovu kliničkih karakteristika. Najčešće su u upotrebi dve podele bolesti na stadijume, prema Raiju [Rai *et al.* 1975] i prema Bineu [Binet *et al.* 1981]. Ova dva sistema definišu stadijum niskog rizika (Rai 0, Bine A), stadijum srednjeg rizika (Rai I/II, Bine B) i stadijum visokog rizika (Rai III/IV, Bine C). Međutim, velika heterogenost kliničkog toka postoji i među pacijentima u okviru iste prognostičke grupe. Glavno ograničenje Rai i Bine sistema je u tome što se na osnovu njih ne može predvideti progresija bolesti u stadijumima niskog rizika. To je od izuzetne važnosti zato što kod većine pacijenata (oko 80%) bolest biva dijagnostikovana baš u ranim stadijumima. Zbog toga su mnoga istraživanja usmerena ka pronalaženju kliničkih i bioloških faktora koji bi imali prognostički značaj i omogućili precizniju klasifikaciju pacijenata. Trenutno dostupni prognostički faktori u HLL mogu se podeliti u četiri grupe:

- kliničke karakteristike pacijenata
- laboratorijski parametri koji reflektuju tumorsko opterećenje ili agresivnost bolesti: broj limfocita, vreme udvostručenja broja limfocita ("lymphocyte doubling time"; LDT)
- serumski markeri: CD23, β 2-mikroglobulin, laktat dehidrogenaza (LDH), timidin kinaza
- molekularni markeri

Tokom proteklih petnaest godina je otkriven veći broj molekularnih markera koji pokazuju asocijaciju sa tokom bolesti, odgovorom na terapiju i prognozom HLL. U ove prognostičke markere spadaju: hromozomske aberacije, genetičke abnormalnosti i aberantna ekspresija mnogih gena (*TP53*, *ATM*, *CLLU1*, *MCL1*, *TCL1*, *hTERT*), ekspresija CD38, ZAP-70, lipoprotein lipaze, i drugi [Byrd *et al.* 2004].

Od svih do danas identifikovanih molekularnih markera, mutacioni status gena za varijabilni region teških lanaca imunoglobulina (*IGHV*) se pokazao kao najpouzdaniji prognostički marker u HLL. *IGHV* mutacioni status ispoljava snažnu i konzistentnu asocijaciju sa tokom i prognozom HLL, stabilan je tokom vremena i može se odrediti u bilo kom trenutku bolesti.

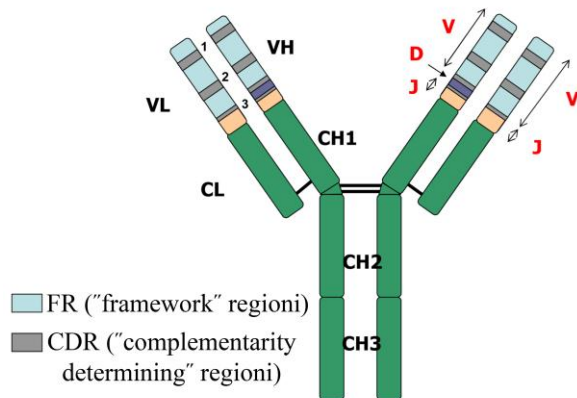
IGHV MUTACIONI STATUS KAO PROGNOŠTIČKI MARKER U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI

Imunoglobulinski geni

HLL B limfociti, kao i normalni B limfociti, na svojoj površini eksprimiraju B ćelijski receptor ("B cell receptor"; BcR), odgovoran za prepoznavanje velikog broja stranih antigena. BcR se sastoji od dve komponente: imunoglobulinske, koja prepoznaje i vezuje antigen, i signalne, koja se sastoji od heterodimernog koreceptora CD79A/CD79B i odgovorna je za transmisiju signala sa aktiviranog BcR u unutrašnjost ćelije.

Imunoglobulinski molekul (IG) je heterodimer koji se sastoji od 2 identična teška (H) lanca i 2 identična laka (L) lanca (kapa ili lambda), povezana disulfidnim vezama. Svaki lanac sadrži varijabilni N-terminalni domen, odgovoran za prepoznavanje antigena i konstantni, C-terminalni region koji kod H lanaca definiše izotipove imunoglobulina sa različitim efektorskim funkcijama.

Varijabilni domen teških lanaca (VH) kodiraju 3 grupe gena: *V* ("variable"), *D* ("diversity") i *J* ("joining"), dok V domen lakih lanaca (VL) kodiraju samo *V* i *J* geni. V domen sadrži 4 relativno konzervisana FR regiona ("framework region"; FR1-4) koji održavaju strukturu domena, između kojih se nalaze 3 visoko varijabilna CDR regiona ("complementarity determining region"; CDR1-3) koji direktno interaguju sa antigenom (Slika 1). CDR3 je glavna determinanta antigenske specifičnosti; nalazi se na mestu spajanja *V*, (*D*) i *J* gena i, stoga, pokazuje najveći stepen varijabilnosti [Lefranc and Lefranc 2001]. Konstantni region je kodiran *C* genima.



Slika 1. Shematski prikaz molekula imunoglobulina [<http://www.ericll.org>]

Geni koji kodiraju teške lance imunoglobulina se nalaze u okviru *IGH* lokusa lociranog na hromozomu 14 (14q32.33). *IGK* lokus sadrži gene koji kodiraju kapa L lance i nalazi se na hromozomu 2 (2p11.2), dok *IGL* lokus sadrži gene koji kodiraju lambda L lance i nalazi se na hromozomu 22 (22q11.2).

IGH lokus

Većina gena koji kodiraju teške lance imunoglobulina (*IGH*) je locirana na hromozomu 14q32.33 i organizovana u 4 klastera, *V*, *D*, *J* i *C* u 5'-3' orijentaciji (Slika 2). *IGH* lokus obuhvata ukupno 123-129 *IGHV* gena, u zavisnosti od haplotipa, a 38-46 gena je funkcionalno. Na osnovu homologije nukleotidne sekvence, ovi funkcionalni geni su podeljeni u 6-7 familija (*IGHV1-IGHV7*) [Lefranc and Lefranc 2001].

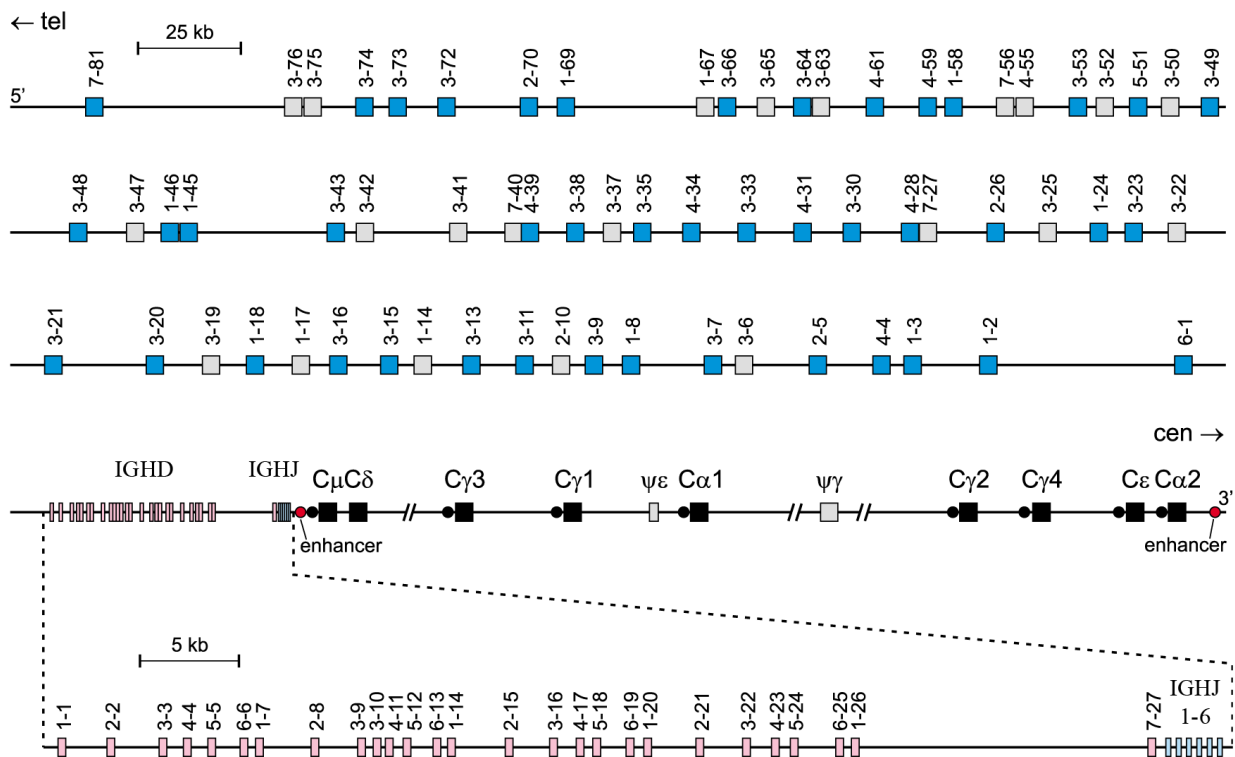
Velikom repertoaru *IGHV* gena doprinosi i činjenica da su mnogi od njih polimorfni, kako po pitanju broja kopija, tako i po pitanju nukleotidne sekvence. Ukupan broj *IGHV* gena u ćeliji je različit kod različitih individua usled alelskog polimorfizma koji je rezultat insercije/delecije 6 *IGHV* gena. Na primer, insercija fragmenta od 50kb koji obuhvata 5 *IGHV* gena je prisutna kod 45% pripadnika bele rase. Pored toga, alelske varijante koje se razlikuju u pojedinačnim nukleotidnim supstitucijama su detektovane kod mnogih *IGHV* gena, pa tako neki (*IGHV1-69*,

IGHV4-34) imaju i do 13 alela. Pored funkcionalnih gena, *IGH* lokus sadrži i ORF ("open reading frame") za 4 potencijalna gena, kao i 79 pseudogena.

Nizvodno od *IGHV* klastera locirano je 27 *IGHD* gena, od kojih je 23 funkcionalno i svrstano u 7 familija (*IGHD1- IGH7*), a za njima sledi 9 *IGHJ* gena (6 funkcionalnih). Kao u slučaju *IGHV* gena, i kod *IGHD* i *IGHJ* gena su opisane alelske varijante.

Na 3' kraju *IGH* lokusa se nalazi 11 *IGHC* gena, od kojih su 2 pseudogeni.

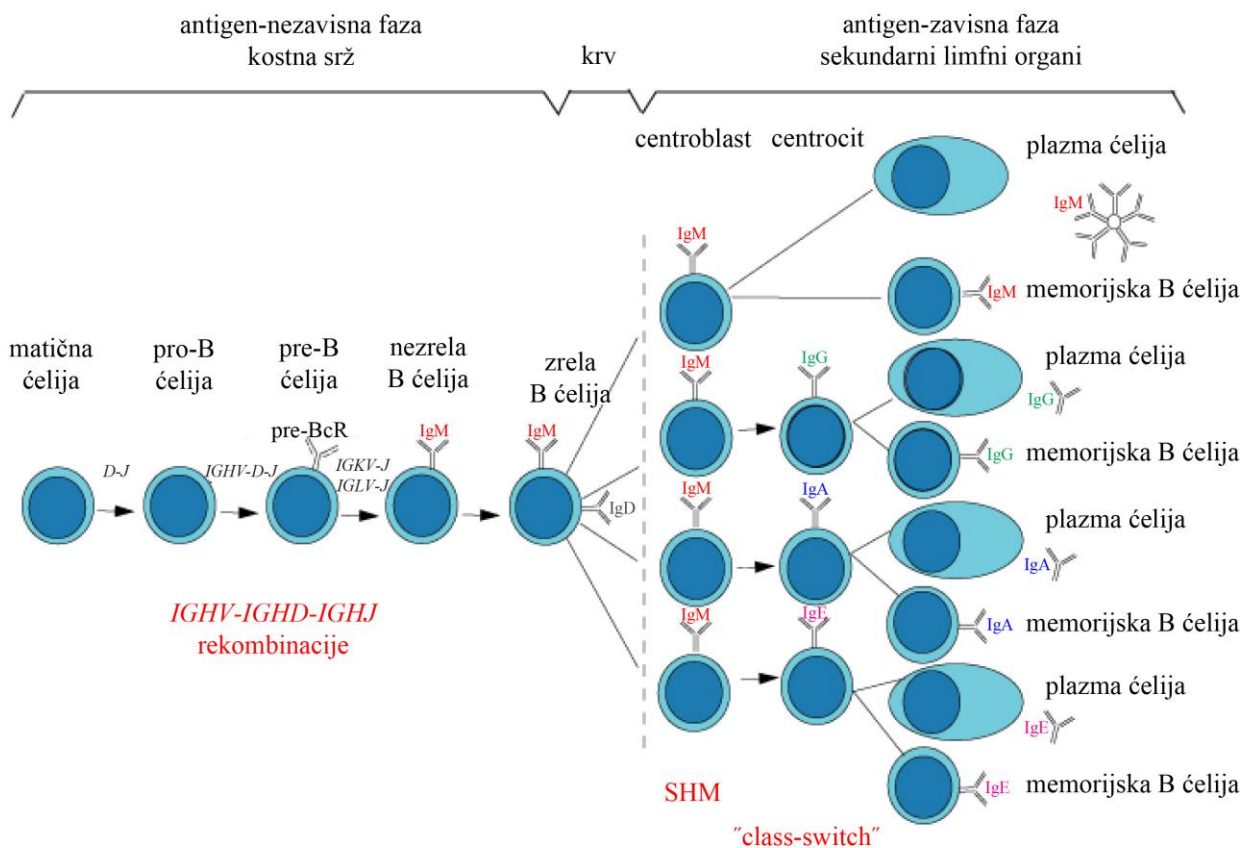
Još 35 gena, uključujući *IGHV* i *IGHD*, je nađeno na hromozomima 15 i 16; oni se nazivaju "orfon" i ne doprinose *IGH* genskom repertoaru B limfocita.



Slika 2. Shematski prikaz *IGH* lokusa. Od *IGHV* gena su prikazani samo funkcionalni geni (plavo) i pseudogeni koji mogu da se rearanžiraju (sivo) [van Dongen *et al.* 2003].

Imunoglobulinski geni u razviću B limfocita

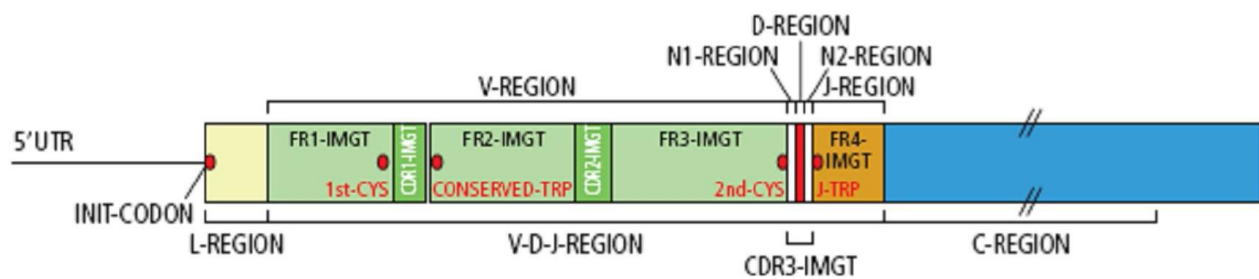
Diferencijacija B limfocita je kompleksan proces koji se sastoji iz dve faze (Slika 3). U prvoj, koja se dešava u kostnoj srži (i fetalnoj jetri) i nezavisna je od prisustva antigena, dolazi do kombinovanja *V*, (*D*) i *J* gena putem DNK rekombinacija i ekspresije jedinog membranskog vezanog IG na površini svakog B limfocita.



Slika 3. Diferencijacija B limfocita [<http://www.ericll.org>]

Proces somatskih DNK rekombinacija započinje na *IGH* lokusu, a zatim se odvija na lokusima za L lance; prvo se rekombinuju geni na *IGK* lokusu, a u slučaju da je dobijeni rearanžman neproduktivan, rearanžira se *IGL* lokus.

Na *IGH* lokusu prvo dolazi do rearanžiranja nasumično odabranog *IGHD* i *IGHJ* gena; nastali *IGHD-IGHJ* rearanžman se zatim kombinuje sa nasumično odabranim *IGHV* genom [Hozumi *et al.* 1976; Shatz *et al.* 2005]. Tokom rekombinacije, sekvence između rearanžiranih gena bivaju deletirane. Finalni *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžman se transkribuje u primarni transkript koji uključuje i C region; procesom splajsinga se uklanjaju intronske sekvence, a ujedno dolazi i do spajanja *IGHV-IGHD-IGHJ* gena sa *IGHC* genom ($C\mu$ ili $C\delta$) (Slika 4). Sličan proces se odvija i u okviru *IGK*, odnosno *IGL* lokusa.



Slika 4. Shematski prikaz *IGH* transkripta. Označene su pozicije konzervisanih amino-kiselina koje, prema IMGT ("The International ImMunoGeneTics Information System"), definišu granice VH CDR regiona: "1st-CYS" - kodon za konzervisani cistein na poziciji 23; "conserved-TRP" - kodon za konzervisani triptofan na poziciji 41; "2nd-CYS" - kodon za konzervisani cistein na poziciji 104; "J-TRP" - kodon za konzervisani triptofan na poziciji 118. N1 i N2 regioni nastaju delecijom nukleotida sa krajeva gena koji se rearanžiraju, koja je praćena nasumičnom adicijom nukleotida (broj deletiranih i dodatih nukleotida je varijabilan). L region kodira signalni peptid koji se nakon translacije iseca sa polipeptidnog lanca [<http://www.ericll.org>].

Dok se rekombinacija između *IGHD* i *IGHJ* gena odvija na oba *IGH* alela, rekombinacija *IGHD-IGHJ* rearanžmana sa *IGHV* genom se dešava na samo jednom alelu. Samo u slučaju da je dobijeni *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžman neproduktivan, dolazi do rekombinacije i na drugom *IGH* alelu [Jung *et al.* 2006]. Ovim mehanizmom "alelskog isključivanja" se obezbeđuje da B limfocit produkuje samo jedan tip H lanaca i time bude specifičan za samo jedan tip antigena. Ukoliko rekombinacija ni na jednom alelu ne dovede do nastanka produktivnog rearanžmana, B ćelije umiru apoptozom. U veoma retkim slučajevima se dešava da kontrola "alelskog isključivanja" zataji, pa B limfocit eksprimira dva različita funkcionalna H lanca. "Alelsko isključivanje" je prisutno i u rekombinaciji gena za L lance.

Nakon uspešnih rekombinacija lokusa za H i L lance imunoglobulina, sintetisani IG lanci formiraju IgM koji u asocijaciji sa CD79A/CD79B koreceptorom formira BcR ekspimiran na površini ćelije. Ovi nezreli B limfociti napuštaju kostnu srž i migriraju u slezinu gde sazrevaju u naivne B ćelije.

Druga faza diferencijacije B limfocita se odvija u perifernim limfnim organima gde se naivne B ćelije susreću sa antigenom. Aktivacija BcR, u kombinaciji sa aktivacijom CD40 receptora i sekrecijom citokina od strane T "helper" limfocita, dovodi do formiranja sekundarnih folikula, a u njima do organizovanja visoko specijalizovanih struktura, tzv. "germinalnih centara" [McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams 2005]. U germinalnim centrima, tokom proliferacije B limfocita, dolazi do njihove dalje diverzifikacije putem uvođenja somatskih hipermutacija u IG V domene, kao i "class-switch" rekombinacija tokom kojih se C region zamenjuje drugim izotipom [Meffre *et al.* 2000; Besmer *et al.* 2004]. Kao rezultat ovih procesa dolazi do produkcije B limfocita sa visokim afinitetom i specifičnošću za određeni antigen, koji se diferenciraju u memorijske B ćelije ili IG-sekretujuće plazma ćelije. Ćelije koje proizvode IG sa niskim afinitetom za antigen ili ne proizvode IG, umiru apoptozom u germinalnom centru.

Somatske hipermutacije

Somatske hipermutacije (SHM) se uglavnom sastoje od pojedinačnih nukleotidnih supstitucija [Klein *et al.* 1998] koje se dešavaju sa frekvencom od oko 10^{-5} do 10^{-3} po baznom paru po ćelijskoj deobi, što je stopa oko 10^6 puta veća od stope spontanijih mutacija u drugim ćelijama. Zbog specifičnog mehanizma kojim se generišu SHM, a koji uključuje AID enzim ("activation-induced cytidine deaminase"), neophodno je da se tokom replikacije DNK odvija i transkripcija rearanžiranog IG lokusa [Peled *et al.* 2008].

Uvođenje SHM počinje nizvodno od IG promotora i obuhvata region dugačak 1.5 do 2Kb. Najveću frekvencu mutacije dostižu u IGHV-IGHD-IGHJ regionu, dok C region nije zahvaćen. SHM se najčešće uvode u (A/T)A i G(C/T)(A/T), kao i njima komplementarne reverzne motive, pri čemu su tranzicije mnogo češće od transverzija. Mutacije se dešavaju na oba lanca DNK i mogu biti lokalizovane kako u FR, tako i u CDR regionima. Mutacije koje dovode do zamene amino-kiseline na datoj poziciji mogu povećati afinitet IG za antigen, pa se zato akumuliraju u

CDR sekvencama. S druge strane, u FR regionima su favorizovane mutacije koje ne dovode do zamene amino-kiseline, kako bi se sačuvala struktura domena [Dörner *et al.* 1998; DiNoia and Neuberger 2007].

U retkim slučajevima može doći do uvođenja insercija ili delecija jednog ili više nukleotida u rearanžiranu IG sekvencu [Wilson *et al.* 1998]. Ukoliko se pri tome ne poremeti okvir čitanja, rearanžman ostaje produktivan.

Treba naglasiti da se proces uvođenja SHM može odvijati i izvan germinalnih centara, pa čak i u odsustvu T "helper" limfocita.

Genski repertoar i mutacioni status gena za varijabilni region IGH u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Dugo vremena se, na osnovu imunofenotipa HLL ćelija, smatralo da je HLL leukemija naivnih B limfocita. Ovo shvatanje je iz korena promenjeno kada je otkriveno da HLL B limfociti oko 50% pacijenata nose mutirane *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmane. Analize SHM statusa rearanžiranih gena za varijabilni region teških lanaca imunoglobulina (*IGHV*) su pokazale da se mogu razlikovati 2 podtipa HLL: mutirani, M-HLL podtip i nemutirani, N-HLL podtip, koji se odlikuju potpuno različitim kliničkim tokom i prognozom bolesti [Damle *et al.* 1999; Hamblin *et al.* 1999]. Kao referentna vrednost ("cut-off") za razlikovanje mutiranih od nemutiranih rearanžmana je odabrana vrednost od 98% identičnosti sekvence rearanžiranog gena i odgovarajućeg nerearanžiranog ("germline") gena. "Cut-off" vrednost od 98% je originalno izabrana kako bi se izbegla mogućnost da potencijalni polimorfizmi, koji mogu dovesti do 2% različitosti nukleotidne sekvence, budu protumačeni kao somatske hipermutacije. U kasnijim studijama su testirane i druge "cut-off" vrednosti (97%, 95%) [Lin *et al.* 2002; Kröber *et al.* 2002], ali se pokazalo da "cut-off" vrednost od 98% ipak najbolje diskriminiše mutirane od nemutiranih rearanžmana i danas je opšteprihvaćena. Ipak, s obzirom da je ova referentna vrednost aproksimativna, neophodan je dodatni oprez pri klasifikaciji pacijenata kod kojih je procenat identičnosti blizu 98% ($\pm 0.2\%$).

IGHV mutacioni status ispoljava snažnu korelaciju sa tokom i prognozom bolesti, što ga je učinilo najinformativnijim prognostičkim markerom u HLL. Kod M-HLL pacijenata bolest najčešće ima indolentni tok, potrebe za terapijom su minimalne ili se terapija uopšte ne primenjuje, za razliku od N-HLL pacijenata kod kojih je bolest najčešće progresivna i zahteva lečenje ubrzo nakon postavljanja dijagnoze. Dužina preživljavanja i vreme od postavljanja dijagnoze do progresije bolesti je značajno kraće kod N-HLL nego kod M-HLL pacijenata [Damle *et al.* 1999; Hamblin *et al.* 1999; Kröber *et al.* 2002]. Prognostičkoj vrednosti *IGHV* mutacionog statusa doprinosi i činjenica da su navedene korelacije nezavisne od kliničkog stadijuma bolesti, kao i da je mutacioni status konstantan, pa se može odrediti u bilo kom trenutku bolesti.

Analize *IGHV* genskog repertoara su pokazale da se on značajno razlikuje kod HLL B limfocita u odnosu na normalne B limfocite [Schroeder and Dighiero 1994]. Pored toga, pokazano je i da se genski repertoar razlikuje u M-HLL i N-HLL podtipu. Na primer, *IGHV3* familija je najčešća *IGHV* familija u *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanima normalnih B limfocita [Brezinschek *et al.* 1997], dok je kod HLL B limfocita detektovana povećana frekvenca *IGHV1* familije, a smanjena frekvenca *IGHV3* familije. Primećena je i povećana frekvenca pojedinačnih gena, npr *IGHV1-69*, *IGHV4-34* i *IGHV3-7*, kao i određenih *IGHV-IGHD-IGHJ* kombinacija u odnosu na repertoar normalnih B ćelija. Pored toga, geni *IGHV1* familije su prisutni predominantno u rearanžmanima N-HLL klonova, dok su *IGHV3* i *IGHV4* geni predominantni u M-HLL klonovima. Pokazano je, takođe, da među *IGHV* familijama postoji hijerarhija u stepenu mutiranosti (*IGHV3*>*IGHV4*>*IGHV1*). Razlika u količini akumuliranih SHM je još vidljivija na nivou pojedinačnih gena, pa tako *IGHV1-69* najčešće nosi samo nekoliko mutacija, dok su *IGHV3-7*, *IGHV3-23* i *IGHV4-34* visoko mutirani. [Fais *et al.* 1998].

Primećene su i populacione, odnosno geografske varijacije u učestalosti određenih *IGHV* gena u rearanžmanima HLL B limfocita. Na primer, u grupi skandinavskih pacijenata [Tobin *et al.* 2002] *IGHV3-21* je bio najzastupljeniji *IGHV* gen, dok je u drugim studijama on veoma retko detektovan. Takođe je pokazana i smanjena frekvenca *IGHV1* gena i povećana frekvenca *IGHV4* gena kod pacijenata iz Azijskih zemalja u odnosu na pacijente iz Evrope i Amerike [Farsanghi *et al.* 2007; Hojjat-Farsanghi *et al.* 2009; Chen *et al.* 2008; Koiso *et al.* 2006].

Preferencijalna zastupljenost određenih gena i genskih familija u *IGH* rearanžmanima u HLL ukazuje na ulogu sredinskih i/ili genetičkih faktora u oblikovanju *IGHV-IGHD-IGHJ* genskog repertoara leukemičnih B limfocita.

Stereotipni B ćelijski receptori u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Jedinstvena karakteristika *IG* repertoara u HLL je postojanje tzv. "stereotipnih B ćelijskih receptora". Naime, pokazano je da HLL B limfociti 25-30% pacijenata na svojoj površini eksprimiraju visoko homologe, skoro identične imunoglobulinske molekule [Widhopf *et al.* 2004; Messmer *et al.* 2004; Tobin *et al.* 2004; Stamatopoulos *et al.* 2007; Murray *et al.* 2008].

Ekspresija skoro identičnih BcR je krajnje neočekivana, kada se imaju u vidu brojni mehanizmi koji doprinose ogromnom diverzitetu imunoglobulina (nasumično kombinovanje velikog broja *V*, (*D*) i *J* gena, delecija i adicija nukleotida na krajevima gena koji se rekombinuju, uvođenje SHM, kombinovanje H i L lanaca). Izračunato je da je verovatnoća da dva nezavisna B ćelijska klona eksprimiraju identičan IG praktično zanemarljiva i iznosi $1:10^{-9}$ do $1:10^{-12}$.

Do danas je opisano preko 100 potvrđenih i potencijalnih klastera stereotipnih receptora u HLL. Prvi set kriterijuma za definisanje klastera je predložen od strane Messmer i saradnika [Messmer *et al.* 2004] i podrazumevao je sledeće:

- prisustvo istih *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena kod svih članova klastera
- isti okvir čitanja *IGHD* gena kod svih članova klastera
- identičnost amino-kiselinske sekvence VH CDR3 $\geq 60\%$ među članovima klastera

Ovi kriterijumi su kasnije dopunjeni [Darzentas *et al.* 2010] i identifikovani su konsenzus motivi u okviru VH CDR3 karakteristični za svaki klaster.

Da bi klaster bio potvrđen, neophodno je da dati rearanžman bude detektovan kod najmanje tri HLL pacijenta. Najčešći klasteri stereotipnih BcR su prikazani u Tabeli 1.

Treba naglasiti da, dok u normalnom *IG* repertoaru nije detektovano preferencijalno sparivanje određenih H i L lanaca [Brezinschek *et al.* 1998], u mnogim klasterima stereotipnih receptora su definisani i stereotipni rearanžmani lakih lanaca, iako je poznato da antigenska specifičnost *IG* prvenstveno zavisi od strukture VH CDR3 [Xu and Davis 2002].

Tabela 1. Najčešći tipovi stereotipnih BcR u HLL

klaster	<i>IGHV</i> gen	<i>IGHD</i> gen	okvir čitanja <i>IGHD</i> gena	<i>IGHJ</i> gen	broj amino kis. u VH CDR3	predominantni <i>IGKV/IGLV</i> gen
#1	<i>IGHV1-2</i> <i>IGHV1-3</i> <i>IGHV1-18</i> <i>IGHV1-8</i> <i>IGHV5-a</i> <i>IGHV7-4-1</i>	<i>IGHD6-19</i>	3	<i>IGHJ4</i>	13-14	<i>IGKV1-39/IGKV1D-39</i>
#2	<i>IGHV3-21</i>	-	-	<i>IGHJ6</i>	9	<i>IGLV3-21</i>
#3	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD2-2</i>	3	<i>IGHJ6</i>	20-22	<i>IGKV1-39/IGKV1D-39</i> <i>IGKV3-11</i>
#4	<i>IGHV4-34</i>	<i>IGHD5-5</i> <i>IGHD4-17</i> <i>IGHD3-10</i>	1 3 3	<i>IGHJ6</i>	20	<i>IGKV2-30</i>
#5	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD3-10</i>	3	<i>IGHJ6</i>	20-21	<i>IGKV1-33/IID-33</i> <i>IGLV3-21</i>
#6	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD3-16</i>	2	<i>IGHJ3</i>	20-21	<i>IGKV3-20</i>
#7	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD3-3</i>	2	<i>IGHJ6</i>	22-25	<i>IGLV3-9</i>
#8	<i>IGHV4-39</i>	<i>IGHD6-13</i>	1	<i>IGHJ5</i>	18-19	<i>IGKV1-39/IGKV1D-39</i>
#12	<i>IGHV1-2</i> <i>IGHV1-46</i>	<i>IGHD3-22</i>	2	<i>IGHJ4</i>	19	<i>IGKV3-15</i>
#13	<i>IGHV4-59</i>	<i>IGHD2-15</i>	2	<i>IGHJ2</i>	18	<i>IGKV3-20</i>
#16	<i>IGHV4-34</i>	<i>IGHD2-15</i>	2	<i>IGHJ6</i>	24	<i>IGKV3-20</i>
#28	<i>IGHV1-2</i>	<i>IGHD1-26</i>	1	<i>IGHJ4</i>	17-18	<i>IGKV4-1</i>
#59	<i>IGHV1-69</i> <i>IGHV1-58</i>	<i>IGHD3-3</i>	2	<i>IGHJ4</i>	12	<i>IGKV2-28/2D-28</i>

Stereotipni VH CDR3 su nađeni kako u mutiranim, tako i u nemutiranim rearanžmanima, ali su mnogo češći u N-HLL podtipu. Pokazano je da samo 10% mutiranih rearanžmana pripada nekom od stereotipnih klastera, dok među nemutiranim rearanžmanima sa 100% *IGHV* identičnosti ova frekvencija premašuje 40%. Pored toga, stereotipni VH CDR3 su mnogo češće prisutni u rearanžmanima koji sadrže gene *IGHV1* i *IGHV4* familije, nego u rearanžmanima sa *IGHV3* genima. Konačno, neki *IGHV* geni su izuzetno česti u stereotipnim rearanžmanima (*IGHV1-69*, *IGHV1-2*, *IGHV1-3*, *IGHV4-39* i *IGHV3-48*), dok su drugi relativno retko uključeni (*IGHV3-7*, *IGHV3-74* i *IGHV2-5*) [Stamatopoulos *et al.* 2007; Murray *et al.* 2008].

Stereotipni BcR su karakteristika HLL B limfocita; VH CDR3 homologe nekom od stereotipnih klastera su detektovani u manje od 1% normalnih B ćelijskih klonova [Stamatopoulos *et al.* 2007].

Stereotipni BcR su pokazali snažnu korelaciju sa tokom bolesti i drugim kliničkim karakteristikama HLL. Tipičan primer je klaster #2 (*IGHV3-21/IGHJ6/IGLV3-21*) koji je asociran sa progresivnim fenotipom bolesti i lošom prognozom bez obzira na mutacioni status [Ghia *et al.* 2005; Thorselius *et al.* 2006]. Asocijacija sa agresivnom bolešću i nepovoljnim prognostičkim markerima je pokazana i kod klastera #1 i #8 [Stamatopoulos *et al.* 2007; Ghiotto *et al.* 2004]. Zanimljivo je da pacijenti koji ekspimiraju ove stereotipne BcR imaju lošiju prognozu od pacijenata koji ekspimiraju iste *IGHV* gene i istog mutacionog statusa, ali u heterogenim rearanžmanima. Nasuprot navedenim klasterima, klaster #4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*) je asociran sa indolentnim tokom bolesti [Stamatopoulos *et al.* 2007; Bomben *et al.* 2009].

Specifičan *IGHV-IGHD-IGHJ* repertoar M-HLL i N-HLL B limfocita, kao i ekspresija stereotipnih BcR u oba podtipa, upućuju na zaključak da su i jedne i druge HLL ćelije bile u kontaktu sa antigenom, zbog čega je napušteno shvatanje da je N-HLL leukemija naivnih B ćelija. Međutim, još uvek nije jasna priroda tih antigena ili klasa strukturno sličnih epitopa, kao i njihova uloga u leukemogenezi. Naime, moguće je da se kontakt sa antigenom dešava pre maligne transformacije; aktivacija BcR stimuliše ćelije da proliferišu, a tokom ubrzanih ćelijskih deoba povećava se rizik za nastanak genetičkih lezija i leukemogenezu. Druga mogućnost je da prisustvo odgovarajućeg antigena dovodi do selekcije klona koji je već maligno transformisan

[Chiorazzi *et al.* 2005]. Konačno, neki eksperimentalni podaci ukazuju na kontinuiranu interakciju BcR sa antigenom, kako pre tako i nakon leukemijske transformacije [Sutton *et al.* 2009].

Asocijacija *IGHV* mutacionog statusa sa drugim molekularnim markerima u HLL

Hromozomske aberacije

Za razliku od drugih tipova leukemija (akutna limfoblastna leukemija, akutna mijeloidna leukemija, hronična mijeloidna leukemija), u HLL nije detektovana jedinstvena citogenetička promena koja bi imala dijagnostički značaj. Ipak, klonalne hromozomske aberacije su prisutne kod više od 80% HLL pacijenata i definišu grupe pacijenata sa različitim tokom i prognozom bolesti, kao i odgovorom na terapiju. Najčešće hromozomske aberacije u HLL, i njima obuhvaćeni geni, su prikazane u Tabeli 2.

Tabela 2. Najčešće hromozomske aberacije u HLL

hromozomska aberacija	% pacijenata	gen(i) u minimalnom regionu obuhvaćenom aberacijom
delecija 13q14	50	<i>RFP2, DLEU1, DLEU2, miR-15a, miR-16-1, DLEU7</i>
trizomija 12q13	15-30	<i>CDK4, GLI, MDM2, drugi</i>
delecija 11q22-q23	15-20	<i>ATM</i>
delecija 17p13	10-20	<i>TP53</i>

Na osnovu ukupnog preživljavanja pacijenata pokazano je da najnepovoljniji prognostički impakt ima delecija 17p13, zatim delecija 11q22-q23, pa trizomija 12q13. Delecija 13q14, kada je to jedina hromozomska aberacija, je povezana sa najpovoljnijom prognozom i preživljavanjem dužim čak nego u slučaju pacijenata sa normalnim kariotipom [Döhner *et al.* 2000],

Delecije su detektovane u homo- i heterozigotnom stanju. U slučaju homozigotnih delecija 17p13 i 11q22-q23, koje obuhvataju tumor-supresorske gene, često je drugi alel inaktiviran mutacijama. Rezidualni *ATM* ("ataxia telangiectasia mutated") alel je mutiran kod 20-36% nosilaca 11q22-q23 delecije [Austen *et al.* 2007], dok je rezidualni *TP53* alel inaktiviran mutacijama kod 80-90% nosilaca delecije 17p13. Genetičke abnormalnosti *TP53* su asocirane sa lošom prognozom bolesti bez obzira da li je u pitanju monoalelski (samo delecija, samo mutacija) ili bialelski (delecija i mutacija) defekt [Malcikova *et al.* 2009].

Učestalost hromozomskih aberacija korelira sa *IGHV* mutacionim statusom. Naime, nepovoljne hromozomske aberacije (delecija 17p13, delecija 11q22-q23 i trizomija 12q13) su mnogo češće u N-HLL podtipu, dok su aberacije sa povoljnijim prognostičkim impaktom (delecija 13q14) češće u M-HLL podtipu [Kröber *et al.* 2002; Oscier *et al.* 2002; Lin *et al.* 2002]. Pored toga, kod N-HLL pacijenata je detektovan povećan rizik za sticanje nepovoljnih hromozomskih aberacija tokom trajanja bolesti, iako je klonska evolucija podjednako zastupljena u oba HLL podtipa [Stilgenbauer *et al.* 2007].

Hromozomske aberacije u HLL su karakteristične za kasnije stadijume bolesti i smatra se da nemaju ključnu ulogu u inicijalnim događajima koji dovode do leukemogeneze, ali značajno utiču na progresiju bolesti. Asimetričnom distribucijom hromozomskih aberacija u M-HLL i N-HLL bi mogle, makar delimično, da se objasne razlike u kliničkom toku ova dva HLL podtipa. Međutim, s obzirom da oko 60% pacijenata nemutiranog *IGHV* statusa nema nepovoljne hromozomske aberacije, jasno je da oba prognostička markera imaju nezavisan uticaj na kliničke karakteristike bolesti.

CD38

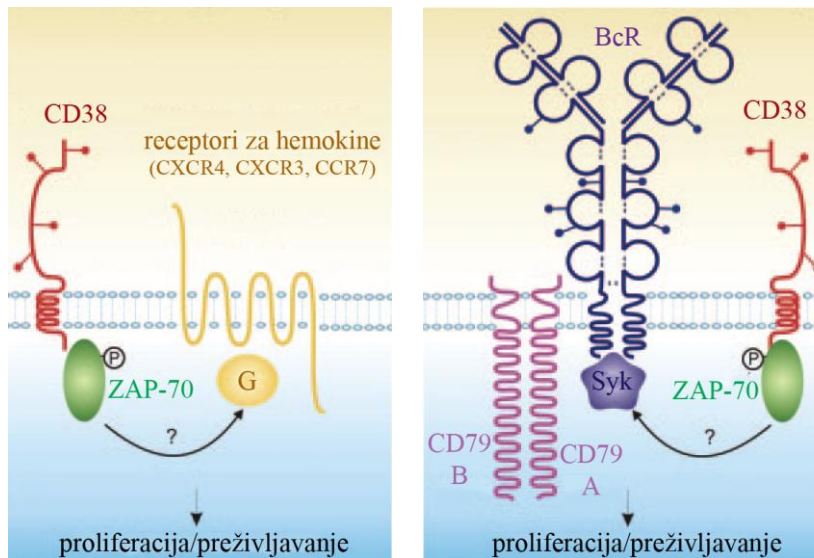
CD38 je monomerni membranski glikoprotein tipa II koji se sastoji od kratkog intracelularnog domena, jednog transmembranskog α heliksa i relativno velikog ekstracelularnog domena (Slika 5). Ekspresija CD38 je strogo regulisana tokom diferencijacije B limfocita: B ćelijski prekursori u kostnoj srži eksprimiraju visok nivo CD38; u naivnim B limfocitima ekspresija se održava na niskom nivou sve do njihove aktivacije prilikom susreta sa antigenom; maksimalna ekspresija se dešava prilikom ulaska ćelija u germinalne centre, zatim opada tokom diferencijacije centroblasta

i centrocita, da bi u memorijskim ćelijama bila potpuno odsutna, a u terminalno diferenciranim plazma ćelijama ponovo aktivirana [Malavasi *et al.* 2008].

CD38 je plejotropni molekul koji ima i receptorsku i enzimatsku funkciju. Ekstracelularni domen CD38 pripada familiji adenzin difosfat (ADP) ribozil ciklaza koje sintetišu univerzalni sekundarni mesendžer cADPR (ciklična ADP riboza) iz ekstraćelijskog nikotinamid adenin dinukleotida (NAD). cADPR je uključen u regulaciju brojnih fizioloških procesa u ćeliji, među kojima je i proliferacija. Enzimatsku funkciju CD38 ispoljava u dimernoj ili multimernoj konfiguraciji [Guse 2002]. Kao receptor, CD38 interaguje sa ligandom CD31/PECAM-1 koga ekspimiraju T limfociti, B limfociti i druge ćelije imunog sistema, kao i endotelske ćelije. Vezivanje liganda dovodi do pokretanja signalne kaskade tipične za aktivaciju receptora, koja uključuje povećanje koncentracije intracelularnog Ca^{2+} , fosforilaciju tirozinskih ostataka niza signalnih molekula i transkripciju gena što dovodi, između ostalih efekata, i do proliferacije i migracije ćelija [Deaglio *et al.* 2010]. Pored toga, funkcija CD38 je modulirana i lateralnim interakcijama sa drugim membranskim proteinima i to adhezionim molekulima, receptorima za hemokine i BcR [Deaglio *et al.* 2006].

Ekspresija CD38 na površini HLL B limfocita se pokazala kao nezavisan negativni prognostički marker u hroničnoj limfocitnoj leukemiji, asociiran sa progresivnim tokom bolesti, kraćim vremenom od postavljanja dijagnoze do prve terapije ("time to treatment"; TTT) i kraćim preživljavanjem pacijenata [Damle *et al.* 1999; Ghia *et al.* 2003; Dürig *et al.* 2002]. Pored toga, u nekim studijama je pokazana snažna asocijacija pozitivnog CD38 statusa sa nemutiranim *IGHV* statusom [Damle *et al.* 1999; Kröber *et al.* 2002], tako da je CD38 status predložen kao surogat marker za *IGHV* mutacioni status. Međutim, korelacija CD38 statusa i *IGHV* mutacionog statusa nije apsolutna i varira u zavisnosti od "cut-off" vrednosti odabrane za definisanje CD38 pozitivnosti (30%, 20%, 7% CD38-pozitivnih ćelija). U nekim studijama je čak pokazano da CD38 status nije pouzdan prediktor *IGHV* mutacionog statusa, bez obzira na odabran "cut-off" nivo [Jelinek *et al.* 2001], tako da je njegova vrednost kao surogat-markera i dalje diskutabilna. Ipak, bez obzira na kriterijume za definisanje CD38 statusa, CD38-pozitivnost je nedvosmisleno povezana sa nepovoljnom prognozom, iako neki podaci ukazuju na to da CD38 status može da varira tokom bolesti [Hamblin *et al.* 2002].

Uloga CD38 u patogenezi HLL još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da CD38/CD31 osa predstavlja ključnu signalnu kaskadu kojom HLL ćelije primaju signale za proliferaciju, preživljavanje i migracije, što doprinosi većoj agresivnosti CD38-pozitivnih klonova. U pokretanju ove signalne kaskade centralno mesto zauzimaju lateralne interakcije CD38 sa receptorima za hemokine i B ćelijskim receptorima, kao i interakcija sa ZAP-70 proteinom (Slika5) [Deaglio *et al.* 2006].



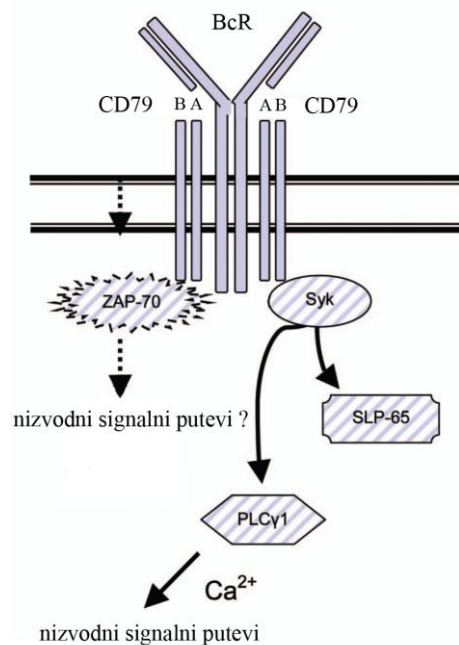
Slika 5. Uloga CD38 u proliferaciji i preživljavanju HLL B limfocita. Levo: aktivacija CD38 je preko fosforilacije ZAP-70 i G proteina povezana sa signalnim putevima hemokinskih receptora; desno: aktivacija CD38, preko ZAP-70 i Syk proteina dovodi do pojačavanja signala sa aktiviranog BcR [Deaglio *et al.* 2006].

ZAP-70

ZAP-70 ("zeta-chain associated protein kinase") je član Syk familije tirozin-kinaza i asociran je sa zeta lancem T ćelijskog receptorskog kompleksa ("T cell receptor"; TcR). Aktivacija TcR prilikom susreta sa antigenom dovodi do aktivacije ZAP-70 koji fosforiliše niz signalnih intermedijera čime se aktiviraju nizvodne signalne kaskade, a krajnji rezultat je indukcija proliferacije i diferencijacije T limfocita. Analognu funkciju u B limfocitima ima protein Syk, pripadnik iste familije [Steinberg *et al.* 2004].

ZAP-70 se prvenstveno eksprimira u T limfocitima; prolazna ekspresija je detektovana u ranim fazama diferencijacije B limfocita, dok je u nezrelim i zrelim B ćelijama potpuno odsutna [Crespo *et al.* 2006]. Zbog toga je iznenađujuće bilo otkriće da se ZAP-70 eksprimira u HLL B limfocitima. Naime, analize ekspresionih profila M-HLL i N-HLL B limfocita su pokazale da je samo manji broj gena diferencijalno eksprimiran u ova dva podtipa, a među njima i ZAP-70 [Rosenwald *et al.* 2001]. Brojne studije su dokazale da je ZAP-70 preferencijalno eksprimiran u nemutiranom HLL podtipu, kao i da je njegova prediktivna moć *IGHV* mutacionog statusa visoka, pa je predložen kao surogat-marker za *IGHV* mutacioni status [Crespo *et al.* 2003; Catherwood *et al.* 2006]. Pored toga, ekspresija ZAP-70 se pokazala i kao nezavisan prognostički marker, asociran sa nepovoljnim kliničkim karakteristikama i lošom prognozom bolesti. Pokazana je i snažna i konzistentna korelacija ZAP-70 ekspresije i CD38-pozitivnog statusa [Orchard *et al.* 2004; Durig *et al.* 2003].

Postoji nekoliko modela kojima se objašnjava uloga ZAP-70 u HLL B limfocitima. Po jednom od njih, ZAP-70 u HLL ćelijama ima ulogu adaptorskog molekula koji dovodi do pojačavanja signala sa aktiviranog BcR (Slika 6). Pored toga, kao što je već objašnjeno, ZAP-70 je uključen i u signalne puteve koji se aktiviraju vezivanjem liganda za CD38 [Orchard *et al.* 2005].



Slika 6. Uloga ZAP-70 u HLL B limfocitima. ZAP-70 je asociran sa BcR i nakon aktivacije BcR biva fosforilisan; pored toga, ZAP-70 moduliše funkciju Syk koji je i inače uključen u signalizaciju sa aktiviranog BcR [Orchard *et al.* 2005].

Lipoprotein lipaza

Lipoprotein lipaza (LPL) je enzim koji ima centralnu ulogu u metabolizmu lipida putem hidrolize cirkulišućih triglicerida. Ekspirira se predominantno u adipoznom tkivu, srčanom mišiću, skeletnim mišićima i makrofagima, dok u normalnim T i B limfocitima nije detektovan [Mead *et al.* 2002; Preiss-Landl *et al.* 2002].

Međutim, pokazano je da se *LPL* ekspirira u leukemičnim B ćelijama, i jedan je od gena koji su diferencijalno ekspirirani u M-HLL i N-HLL B limfocitima [Rosenwald *et al.* 2001]. Visok nivo ekspresije *LPL* je pokazao korelaciju sa nemutiranim *IGHV* statusom, kao i drugim negativnim prognostičkim markerima (ZAP-70, CD38, hromozomskim aberacijama), a pokazao se i kao pouzdan nezavisan prognostički marker asociran sa kraćim vremenom od postavljanja dijagnoze do prve terapije i kraćim preživljavanjem pacijenata [Heintel *et al.* 2005; van't Veer *et al.* 2006; Nüchel *et al.* 2006; Nikitin *et al.* 2007].

Od svih molekularnih markera, ekspresija LPL je ispoljila najveću prediktivnu moć *IGHV* mutacionog statusa. Činjenica da se ekspirira isključivo u HLL B limfocitima, a ne i u normalnim mononuklearnim ćelijama, olakšava njegovu kvantifikaciju, pa je LPL trenutno najbolji kandidat za surogat-marker *IGHV* mutacionog statusa.

Značaj ekspresije LPL u HLL B limfocitima još uvek nije razjašnjen. Moguće je da ona samo reflektuje visok nivo energetskog metabolizma u proliferišućim ćelijama, a možda je i indukovana stimulacijom BcR [Pallasch *et al.* 2008]. Konačno, moguće je da LPL ima direktni onkogeni potencijal koji do sada nije definisan.

IGHV mutacioni status je ispoljio asocijaciju sa ekspresijom još nekih gena čija se uloga u patogenezi HLL i prognostički značaj intenzivno istražuju. U tu grupu spadaju: *ADAM29*, *hTERT* (telomeraza), *MCLI* ("myeloid cell leukemia sequence-1"), *TCLI* ("T cell leukemia/lymphoma 1"), *CLLUI* ("chronic lymphocytic leukemia upregulated 1 gene") i drugi.

B ćelijski receptor u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Biološki smisao molekularnih markera koji su identifikovani u HLL je i dalje u velikoj meri nejasan, i predmet je brojnih istraživanja. *IGHV* mutacioni status je marker koji je ispoljio najснаžniju korelaciju sa tokom i prognozom bolesti, i omogućio stratifikaciju pacijenata uprkos izrazito heterogenim kliničkim karakteristikama.

Centralnu ulogu u biologiji HLL B limfocita ima B ćelijski receptor. Akumulacija *IGHV* somatskih hipermutacija u BcR je rezultat događaja koji se odvijaju u germinalnim centrima nakon susreta sa antigenom i njihovo prisustvo u M-HLL, a odsustvo u N-HLL, ukazuje na različit stepen maturacije leukemične matične ćelije. Pored toga, ograničen *IGHV-IGHD-IGHJ* repertoar BcR verovatno reflektuje antigenski selektivni pritisak pri razvoju kako M-HLL tako i N-HLL, mada su priroda i ishod antigenske stimulacije različiti u ova dva podtipa [Fais *et al.* 1998]. Danas je uglavnom prihvaćeno shvatanje da N-HLL nastaje klonskom ekspanzijom B ćelija koje su aktivirane T-nezavisnim antigenima (superantigeni) izvan germinalnih centara, dok M-HLL nastaje od ćelija koje su se susrele sa T-zavisnim antigenima i prošle kroz procese maturacije u germinalnim centrima [Chiorazzi *et al.* 2003; Stevenson *et al.* 2004].

Sposobnost HLL B limfocita da transdukuju signale sa aktiviranog BcR je različita u M-HLL i N-HLL. Pokazano je da je signalni kapacitet BcR kodiranog nemutiranim *IG* genima jači nego u slučaju mutiranog BcR [Zupo *et al.* 2002; Lanham *et al.* 2003]. Ipak, signalizacija sa BcR nije potpuno odsutna kod mutiranih receptora, s obzirom da je ona, makar na niskom nivou, neophodna za opstanak B ćelija. Zato se smatra da je funkcija BcR u M-HLL ekvivalentna onoj u anergičnim B limfocitima; ona obezbeđuje signale dovoljne za preživljavanje ćelija, ali ne i za značajnu proliferaciju. Ovom modelu ide u prilog i činjenica da je sa nemutiranim *IGHV* statusom asocirana ekspresija stereotipnih BcR, CD38 i ZAP-70, za koje je pokazano da povećavaju signalni kapacitet BcR makar do nivoa aktiviranih ćelija, a verovatno i do nivoa koji dovodi do proliferacije. Pored toga, pokazano je da se ekspresija mnogih gena koji su jače eksprimirani u N-HLL nego u M-HLL, indukuje tokom aktivacije BcR. Različit odgovor BcR na aktivaciju antigenom kod N-HLL i M-HLL B limfocita je verovatno odraz njihovog različitog stupnja diferencijacije, kao i prirode antigena. Većim stepenom anergije M-HLL B limfocita bi se

mogle objasniti povoljnije kliničke karakteristike M-HLL, s obzirom da anergične ćelije slabije odgovaraju na signale za proliferaciju i preživljavanje koji se pokreću antigenskom stimulacijom BcR.

Na kraju, treba imati u vidu da dugovečnosti HLL B limfocita i njihovoj akumulaciji doprinose i signali iz mikrosredine različiti od antigena, kao i poremećaji procesa apoptoze karakteristični za HLL.

APOPTOZA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI

Hronična limfocitna leukemija se smatra tipičnim primerom maligniteta uzrokovanog poremećajima u procesu apoptoze. Cirkulišući HLL B limfociti se nalaze u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa i njihova postepena akumulacija u krvi, kostnoj srži i sekundarnim limfnim organima, koja se dešava tokom bolesti, je pripisana primarno njihovoj sposobnosti da izbegnu apoptozu.

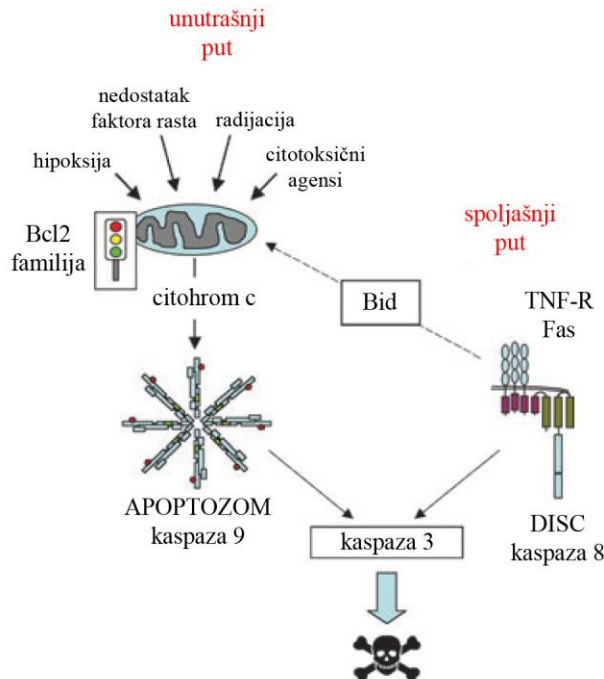
Treba naglasiti da su rezultati novijih studija delimično izmenili gledište da je HLL bolest pasivne akumulacije leukemičnog klona. Naime, pokazano je da leukemične ćelije kontinuirano proliferišu u tzv. proliferacionim centrima, lociranim u kostnoj srži, slezini i limfnim čvorovima, i umiru apoptozom. Merenja ćelijske kinetike *in vivo* su pokazala da, iako je tempo ovih događaja sporiji nego kod normalnih B limfocita, ipak je značajno brži nego što se ranije pretpostavljalo [Messmer *et al.* 2005; Defoiche *et al.* 2008]. Uprkos tome, deregulisana apoptoza se i dalje smatra jednom od glavnih karakteristika HLL.

Jedinstven mehanizam kojim bi se objasnila rezistencija HLL B limfocita na apoptozu još uvek nije identifikovan. Kontrola apoptoze u HLL ćelijama je kompleksan proces koji je rezultat kombinovanog dejstva dve komponente: signala koje ćelije primaju iz mikrosredine i genetičkih i/ili epigenetičkih promena apoptotske mašinerije u samim leukemičnim B limfocitima. Obe komponente pokazuju visok stepen heterogenosti među pacijentima.

Uticaj mikrosredine najbolje ilustruje činjenica da HLL B limfociti spontano ulaze u proces apoptoze prilikom *ex vivo* kultivacije [Collins *et al.* 1989; Ghia and Caligaris-Cappio 2000], što

ukazuje na značaj humoralnih faktora i/ili ćelijskih interakcija na njihov opstanak *in vivo*. U proliferacionim centrima HLL ćelije interaguju sa T limfocitima (najčešće CD4⁺) i različitim ćelijama strome, i te interakcije stimulišu proliferaciju a inhibiraju apoptozu. Citokini (IL-4, IFN- α , IFN- γ) i hemokini (CXCL12) koje sekretuju ove ćelije indukuju pojačanu ekspresiju anti-apoptotskih gena (*Bcl2*, *MCL1*, *survivin*) čime se favorizuje opstanak leukemičnih ćelija. Pored toga, antigenska stimulacija takođe može dovesti do ulaska HLL B limfocita u ćelijski ciklus u proliferacionim centrima [Caligaris-Cappio 2003].

U HLL su detektovane genetičke promene i aberantna ekspresija brojnih proteina regulatora apoptoze, koji su uključeni kako u spoljašnji, tako i u unutrašnji put aktivacije ovog procesa (Slika 7).



Slika 7. Putevi aktivacije apoptoze. Unutrašnji i spoljašnji put aktivacije apoptoze konvergiraju u aktivaciji efektorskih kaspaza (kaspaze 3, 6, 7) koje dovode do biohemijskih i morfoloških promena karakterističnih za apoptozu. Spoljašnji put započinje vezivanjem liganda za tzv. "receptore smrti" na površini ćelije (Fas, TNF-R, TRAIL-R), što dovodi do formiranja DISC-a ("death-inducing signaling complex") i aktivacije inicijatorske kaspaze 8. Unutrašnji put aktiviraju različiti stimulusi koji menjaju permeabilitet mitohondrijalne membrane i indukuju oslobađanje citohroma c iz mitohondrija; citohrom c, zajedno sa adapterskim molekulom Apaf-1, formira apoptozom u kome dolazi do aktivacije inicijatorske kaspaze 9. U nekim slučajevima, aktivacija kaspaze 8 dovodi do aktivacije Bid, koji takođe može da indukuje oslobađanje citohroma c. Bcl2 familija proteina ima ključnu ulogu u kontroli unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze [Packham and Stevenson 2005].

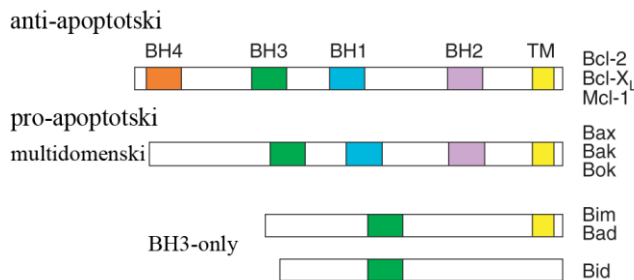
HLL B limfociti imaju smanjenju sposobnost apoptotskog odgovora na oštećenja DNK usled relativno čestog gubitka funkcionalnih *TP53* i *ATM* gena putem delecija (17p13 i 11q22-q23) i mutacija [Pettit *et al.* 2001]. Genetičke abnormalnosti oba gena, bilo da su prisutne kao monoalelski ili bialelski defekt, asocirane su sa progresivnim tokom bolesti i kraćim preživljavanjem pacijenata. Treba imati u vidu da p53 protein, pored uloge u odgovoru na oštećenja DNK putem regulacije transkripcije gena odgovornih za zaustavljanje ćelijskog ciklusa i reparaciju DNK, učestvuje u regulaciji apoptoze i putem direktne interakcije sa proteinima Bcl2 familije, kao i putem regulacije transkripcije *Bax*, *Fas* i drugih apoptotskih gena [Vaseva and Moll 2009].

Uloga Fas/FasL sistema u regulaciji apoptoze u HLL nije u potpunosti razjašnjena. Fas receptor (Fas/APO-1/CD95) pripada superfamiliji TNF ("tumor necrosis factor") receptora, dok njegov ligand, FasL, pripada familiji TNF citokina. Vezivanje FasL za Fas indukuje apoptozu različitih tipova ćelija koje ekspimiraju Fas i FasL na svojoj površini a to su, između ostalih, i aktivirani T i B limfociti. U HLL B limfocitima se transkribuju geni za Fas i FasL, ali je ekspresija Fas i FasL na površini ćelija izuzetno niska, pa su one rezistentne na Fas-indukovanu apoptozu. Eksperimentalno je pokazano da aktivacija B limfocita *in vitro* indukuje ekspresiju Fas na površini ćelija, ali ova rezistencija i dalje perzistira. Mehanizam kojim bi se objasnio ovaj fenomen je i dalje nepoznat, naročito kada se ima u vidu da mutacije *Fas* gena nisu detektovane u HLL [Wang *et al.* 1997; Panayiotidis *et al.* 1995]. Međutim, primećeno je da aktivirani HLL B limfociti otpuštaju solubilne (s) forme Fas i FasL; kod HLL pacijenata su detektovani povišeni nivoi serumskog sFas, koji su korelirali sa progresijom bolesti i kasnijim kliničkim stadijumima. Na osnovu toga je predložen model kojim bi se mogla objasniti rezistencija HLL B limfocita na Fas-indukovanu apoptozu: a) aktivirane B ćelije ekspimiraju FasL i otpuštaju sFasL, što indukuje apoptozu normalnih aktiviranih citotoksičnih T limfocita koji ekspimiraju Fas receptor; b) aktivirane B ćelije produkuju sFas koji blokira aktivnost FasL na površini T limfocita. Na taj način HLL B limfociti izbegavaju indukciju apoptoze od strane citotoksičnih T limfocita, što dovodi do akumulacije leukemičnih ćelija i progresije bolesti [Cheng *et al.* 1994; Osorio *et al.* 2001].

Najveću pažnju u izučavanju apoptoze u HLL privukla je Bcl2 familija proteina, kako zbog njihove centralne uloge u regulaciji apoptoze, tako i zbog činjenice da su u HLL detektovane genetičke i epigenetičke promene, kao i aberantna ekspresija brojnih članova ove familije.

Bcl2 familija proteina

Bcl2 familija je grupa evolutivno konzerviranih pro- i anti-apoptotskih proteina koji učestvuju u regulaciji unutrašnjeg (mitohondrijskog) puta aktivacije apoptoze. Do danas je identifikovano preko 20 članova ove familije koji se karakterišu prisustvom makar jednog od četiri konzervirana α -helikalna BH ("Bcl2 homology") domena (Slika 8). BH domeni su mesta međusobne interakcije Bcl2 proteina i omogućavaju formiranje homo- i hetero- dimera, što je jedan od glavnih mehanizama njihovog delovanja u procesu apoptoze. Ključnu ulogu u tim interakcijama ima BH3; on je visoko konzervisan, sadrže ga svi članovi Bcl2 familije, a činjenica da postoje članovi koji sadrže samo ovaj domen ("BH3-only") i svi su pro-apoptotski, ukazuje na njegovu funkciju "domena smrti" [Thomadaki and Scorilas 2006].



Slika 8. Shematski prikaz strukture Bcl2 familije proteina. Anti-apoptotski proteini (Bcl2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-W) sadrže sva 4 BH domena i C-terminalni transmembranski (TM) domen; pro-apoptotski proteini se dele na multidomenske (Bax, Bak, Bok), koji sadrže BH3 i TM domen, i "BH3-only" (Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Hrk, Noxa, Puma) koji sadrže samo BH3 domen [Packham and Stevenson 2005].

U odsustvu apoptotskog signala, pro- i anti-apoptotski proteini su lokalizovani u različitim ćelijskim kompartmentima: anti-apoptotski članovi su integrisani u membranu mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i nukleusa, dok su pro-apoptotski članovi lokalizovani u citosolu.

Anti-apoptotski članovi formiraju jonske kanale koji stabilizuju membranu mitohondrija, čime se sprečava oslobađanje citohroma c.

Apoptotska funkcija Bcl2 familije proteina je regulisana putem nekoliko mehanizama, koji su sumirani na Slici 9:

- *transkripcija*

Sposobnost ćelije da odgovori na apoptotski stimulus zavisi od relativnog odnosa pro- i anti-apoptotskih proteina, a on je u najvećoj meri rezultat regulacije njihove ekspresije na transkripcionom nivou. Na primer, ekspresija mnogih pro-apoptotskih (Bax), ali i anti-apoptotskih članova (Bcl-X_L, Mcl-1, A1) se povećava prilikom odgovora na apoptotski stimulus [Miyashita and Reed 1995; Gross *et al.* 1999]. Povećana ekspresija anti-apoptotskih članova, prvenstveno Bcl2, je detektovana u mnogim kancerima.

- *dimerizacija*

Proteini Bcl2 familije funkcionišu ili nezavisno ili u kombinaciji, zahvaljujući njihovoj sposobnosti da formiraju homo- i hetero-dimere. Tipičan primer je interakcija Bcl2 i Bax; homodimerizacijom Bax generiše se signal za smrt ćelije, dok se heterodimerizacijom Bax i Bcl2 inhibira pro-apoptotska funkcija Bax; interakcija Bcl-X_S i Bcl2 onemogućava interakciju Bcl2 sa Bax, čime je očuvana njegova pro-apoptotska funkcija. Detektovane su i druge interakcije članova Bcl2 familije: Bcl2/Bcl2, Bcl2/Bcl-X_L, Bcl2/Mcl-1, Bcl-X_L/Bcl-X_L, Bcl-X_L/Bax, Bcl-X_L/Mcl-1, Bax/Mcl-1, itd. [Sato *et al.* 1994].

- *fosforilacija*

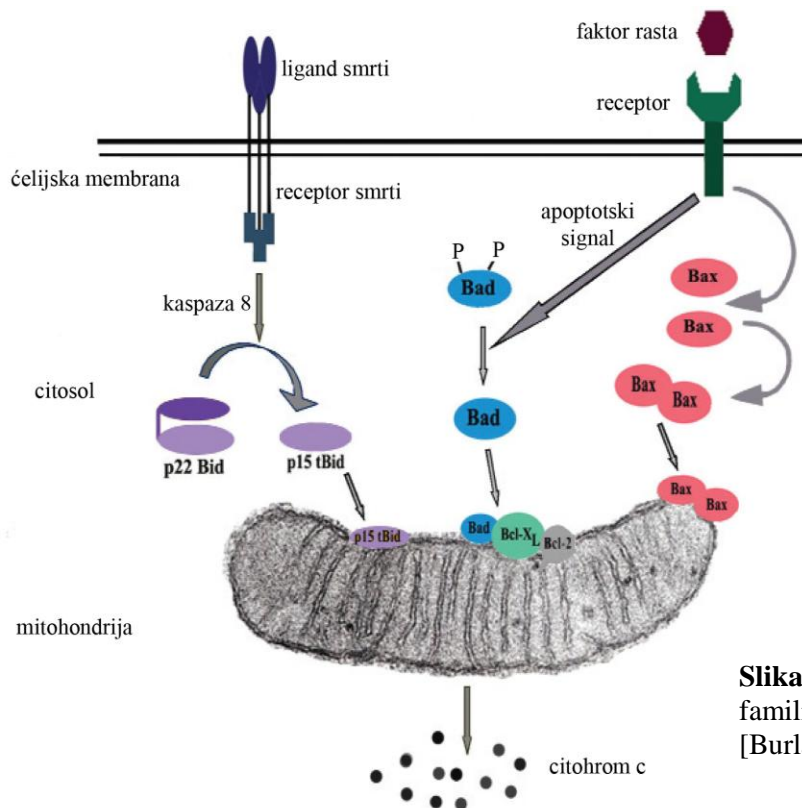
Funkcija Bad je regulisana primarno putem fosforilacije, što utiče na njegove protein-protein interakcije i subcelularnu lokalizaciju. Apoptotski signali dovode do defosforilacije Bad i njegove translokacije iz citosola u mitohondriju u asocijaciji sa Bcl2/Bcl-X_L heterodimerima, što dovodi do oslobađanja citohroma c i aktivacije kaskade kaspaza; prisustvo faktora rasta indukuje fosforilaciju Bad, što dovodi do njegove inaktivacije i premeštanja u citosol [Zha *et al.* 1997]. Bcl2 takođe postoji u fosforilisanom i defosforilisanom stanju; fosforilacija je neophodna za njegovu anti-apoptotsku funkciju [Ito *et al.* 1997].

- *proteoliza*

Proteolitičko sečenje N terminusa je jedan od mehanizama aktivacije proteina Bcl2 familije. Tipičan primer je Bid: apoptotski stimulus aktivira kaspazu 8 koja uklanja N-terminalni region p22 Bid prevodeći ga u p15 Bid; p15 Bid se premešta iz citosola u mitohondriju, gde interaguje sa mitohondrijalnim proteinima (Bax, Bak) i indukuje apoptozu [Korsmeyer *et al.* 2000]. Pokazano je da isecanje N terminusa može prevesti Bcl-X_L i Bcl2 u pro-apoptotske molekule [Cheng *et al.* 1997; Clem *et al.* 1998].

- *translokacija*

Apoptotski stimulus indukuje translokaciju pro-apoptotskih molekula (Bax, Bim) iz citosola u membranu mitohondrija. Na primer, u normalnim uslovima Bax je u monomernoj formi lociran u citosolu; apoptotski signal dovodi do akumulacije Bax-Bax homodimera i njihove insercije u mitohondrijalnu membranu, što dovodi do formiranja pora i oslobađanja citohroma c [Wolter *et al.* 1997].



Slika 9. Shematski prikaz uloge Bcl2 familije proteina u regulaciji apoptoze [Burlacu 2003]

Bcl2 i Bax u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Bcl2

Bcl2 protein ("B-cell CLL/lymphoma 2") je tipičan anti-apoptotski član Bcl2 familije. Ekspimiraju se u mnogim tipovima ćelija, uključujući B i T limfocite. Bcl2 je kodiran genom koji je lociran na hromozomu 18q21.3 i sastoji se od 3 egzona (egzon 1 i 3' deo egzona 3 su nekodirajući); alternativnim splajsingom nastaju dva transkripta, Bcl2 α i Bcl2 β [Tsujimoto and Croce 1986]. Bcl2 α transkript kodira izoformu od 239 amino-kiselina koja sadrži C-terminalni hidrofobni domen neophodan za lokalizaciju proteina u membrani mitohondrija i njegovu anti-apoptotsku funkciju. Bcl2 β transkript kodira izoformu od 205 amino-kiselina kojoj nedostaje transmembranski domen i lokalizovana je u citosolu. Bcl2 α i Bcl2 β transkripti imaju i različite 3' netranslirajuće regione ("3'-untranslated region"; 3'-UTR) što dovodi do različite post-transkripcione regulacije. Bcl2 β 3'-UTR se sastoji od 95 bp i znatno je kraći od Bcl2 α 3'-UTR (5279 bp). Dugački 3'-UTR Bcl2 α transkripta sadrži vezujuća mesta za miR15 i miR16 [Cimmino *et al.* 2005], kao i AU-bogati region koji prepoznaje RNK-vezujući protein nukleolin, čijim se vezivanjem povećava stabilnost Bcl2 α iRNK (Sengupta *et al.* 2004). Obe izoforme sadrže funkcionalne BH1-4 domene i imaju antiapoptotsku funkciju [Tanaka *et al.* 1993].

Leukemični B limfociti većine HLL pacijenata (preko 80%) ekspimiraju visok nivo Bcl2 proteina [Mariano *et al.* 1992]. Ekspresija je najčešće viša nego u normalnim B limfocitima, pa čak i ćelijama koje sadrže t(14;18) translokaciju koja dovodi Bcl2 gen u blizinu imunoglobulinskog promotora i odgovorna je za visoku ekspresiju Bcl2 u B-ćelijskim limfomima. Ova translokacija, međutim, nije karakteristična za HLL, i smatra se da je za prekomernu ekspresiju Bcl2 odgovorna hipometilacija njegovog promotorskog regiona, detektovana kod većine pacijenata [Hanada *et al.* 1993].

Povišen nivo Bcl2 je u nekim studijama pokazao jasnu asocijaciju sa nepovoljnim kliničkim prognostičkim faktorima, kasnijim stadijumima bolesti, rezistencijom na hemoterapiju i kraćim preživljavanjem HLL pacijenata [Robertson *et al.* 1996; Faderl *et al.* 2002]. Nedavno je otkriven novi regulatorni polimorfizam -938C>A u promotoru Bcl2 gena koji dovodi do povećanja ekspresije, i čije je prisustvo asocirano sa progresivnim tokom bolesti i kraćim preživljavanjem

[Nüchel *et al.* 2007]. Međutim, u drugim studijama Bcl2 ekspresija nije pokazala prognostički značaj [Pepper *et al.* 1996; Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Pepper *et al.* 1997; Molica *et al.* 1998]. Ipak, rezultat koji je zajednički svim ovim studijama je povećana ekspresija Bcl2, velika heterogenost nivoa ekspresije Bcl2 među pacijentima, kao i preklapanje sa zdravim kontrolama.

Bax

Bax protein ("Bcl2-associated X protein") je tipičan pro-apoptotski član Bcl2 familije. Ekspimiraju se u mnogim tipovima ćelija, uključujući B i T limfocite. Bax je kodiran genom koji je lociran na hromozomu 19q13.3-q13.4 i sastoji se od 6 egzona; alternativnim splajsingom nastaje 8 transkripata (α , β , γ , δ , ω , ϵ , σ , ψ) [Oltvai *et al.* 1993; Apte *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1998; Shi *et al.* 1999; Schmitt *et al.* 2004; Cartron *et al.* 2002], koji su diferencijalno ekspimirani u različitim tkivima. Bax izoforme kodirane ovim transkriptima sadrže različite kombinacije BH domena; neke sadrže transmembranski domen, a neke ne. Ipak, sve izoforme imaju pro-apoptotsku funkciju.

Bax- α (Bax) je glavni proteinski produkt *Bax* gena. Ova izoforma se sastoji od 192 amino-kiseline i sadrži BH1-3 domene, neophodne za homo- i hetero-dimerizaciju, kao i C-terminalni hidrofobni domen neophodan za inserciju u membranu mitohondrija [Thomadaki and Scorilas 2006].

Kao i u slučaju Bcl2, ekspresija Bax nije pokazala konzistentu asocijaciju sa kliničkim karakteristikama HLL. U nekim studijama je detektovana asocijacija povišenog nivoa Bax sa indolentnim tokom bolesti ili odgovorom na hemoterapiju [Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Molica *et al.* 1998; Pepper *et al.* 1996]. Međutim, u drugim studijama to nije potvrđeno, a nije pokazana ni asocijacija sa drugim kliničkim parametrima. Starczynski i saradnici [Starczynski *et al.* 2005] su pokazali da je promotorski polimorfizam -248G>A, koji dovodi do smanjene ekspresije *Bax* gena, asociiran sa kasnijim stadijumima bolesti, rezistencijom na hemoterapiju i kraćim preživljavanjem pacijenata, ali ni ovi rezultati nisu potvrđeni u drugim studijama [Skogsberg *et al.* 2006].

Bcl2/Bax odnos

Relativni odnos ekspresije i/ili aktivnosti različitih anti- i pro-apoptotskih članova Bcl2 familije je ključna determinanta sposobnosti ćelije da uđe u proces apoptoze. U skladu sa tim shvatanjem, i imajući u vidu funkcionalni antagonizam Bcl2 i Bax, pretpostavlja se da je njihov relativni odnos, pre nego individualna ekspresija, značajan za preživljavanje HLL B limfocita.

Povišen Bcl2/Bax odnos kod HLL pacijenata je detektovan u mnogim studijama, iako je pokazivao znatnu heterogenost među pacijentima i preklapanje sa zdravim kontrolama [Pepper *et al.* 1997; Saxena *et al.* 2004]. Povišen Bcl2/Bax odnos je pokazao asocijaciju sa progresivnim tokom bolesti [Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Molica *et al.* 1998] i rezistencijom na hemoterapiju [Pepper *et al.* 1996]. Ipak, u nekim studijama povećanje Bcl2/Bax odnosa nije koreliralo sa nepovoljnim prognostičkim parametrima (izuzev hemorezistencije) [Kitada *et al.* 1998], a detektovana je i korelacija povećanog nivoa Bcl2 sa povećanjem ekspresije Bax [Faderl *et al.* 2002].

Treba imati u vidu da u kontroli unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze u HLL učestvuju i drugi proteini. Kitada i saradnici [Kitada *et al.* 1998] su detektovali povećane nivoe Bcl2, Mcl-1, Bax, Bak, Bag-1 i kaspaze-3 u HLL B limfocitima u odnosu na kontrolnu ćelijsku liniju koja sadrži t(14;18) translokaciju, čime su pokazali da u HLL dolazi do povećanja ekspresiju kako pro- tako i anti-apoptotskih proteina. Ipak, njihovi relativni odnosi su takvi da favorizuju preživljavanje ćelija u odnosu na apoptozu.

Bcl2L12 u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Bcl2L12 protein ("Bcl2-like 12") je novootkriveni član Bcl2 familije, čija pro- ili anti-apoptotska funkcija još uvek nije razjašnjena. Bcl2L12 je kodiran genom koji je lociran na hromozomu 19q13.3-q13.4 i sastoji se od 7 egzona; alternativnim splajsingom nastaju tri transkripta: klasična forma Bcl2L12 (*Bcl2L12 v.1*) koja sadrži svih 7 egzona; *Bcl2L12-A* transkript (*Bcl2L12 v.2*),

kome nedostaje egzon 3; treća varijanta (*Bcl2L12 v.3*) koja je ista kao klasična forma, ali joj nedostaje prva amino-kiselina kodirana egzonom 3 [Scorilas *et al.* 2001; Thomadaki and Scorilas 2006].

Klasična izoforma Bcl2L12 je protein od 334 amino-kiseline koji sadrži konzervisani BH2 domen. Konzervisani BH1, BH3 i BH4 domeni nisu prisutni, mada je detektovan region sličan BH3 domenu. Pronađen je samo još jedan član Bcl2 familije koji ne sadrži BH3 domen; to je BOO/DIVA protein koji ima anti-apoptotsku funkciju, a mehanizam njegovog delovanja ne uključuje dimerizaciju. Bcl2L12 protein sadrži prolinom-bogate regione; identifikovano je jedno PPPP mesto, pet PP mesta kao i osam PXXP motiva. Prolinom-bogati motivi su mesta interakcije sa SH3 domenom tirozin-kinaza, što možda ukazuje na funkciju Bcl2L12 u povezivanju signalnih puteva apoptotskih proteina i onkoproteina koji sadrže SH3 domen (c-src, c-abl). Identifikovana su i mesta za potencijalne post-translacione modifikacije: O-glikozilaciju, fosforilaciju i N-miristoilaciju.

Bcl2L12-A izoforma je protein od 176 amino-kiseline koji sadrži pet PP mesta, dva PXXP motiva i nedostaje mu BH2 domen.

Sve tri izoforme su eksprimirane u većini humanih tkiva, uključujući i limfoidna i hematopoetska. Klasična Bcl2L12 izoforma je predominantna u većini tkiva, izuzev u skeletnim mišićima, fetalnoj jetri i kičmenoj moždini [Scorilas *et al.* 2001].

Najnovija istraživanja [Kontos and Scorilas 2012] su pokazala postojanje još 10 alternativnih transkripata *Bcl2L12* gena, diferencijalno eksprimiranih u različitim tkivima. Sve izoforme kodirane ovim transkriptima bi, po predikciji, trebalo da sadrže C terminus drugačiji od C termina klasične izoforme i svima bi nedostajao BH2 domen. Nedostatak BH2 domena bi mogao da ima veliki uticaj na funkcionalnost Bcl2L12 izoformi, s obzirom da je na primeru Bcl-G proteina, koji takođe nema BH1 i BH4 domene, pokazano da delecija BH2 domena pojačava njegovu pro-apoptotsku aktivnost [Guo *et al.* 2001]. Fiziološki značaj novih izoformi tek treba da se ispita.

Pozicija promotora *Bcl2L12* gena, kao i mehanizmi regulacije njegove transkripcije, za sada nisu poznati.

Lokalizacija Bcl2L12 proteina u ćeliji trenutno nije u potpunosti jasna. Iako je prvobitno detektovan u citosolu i mitohondrijama [Toumelin *et al.* 2006], studije na humanim astrocitima i ćelijama glioma su pokazale da je Bcl2L12 protein predominantno prisutan u citosolu i nukleusu, dok u mitohondrijama nije detektovan [Stegh *et al.* 2007]. I druge studije su pokazale da su Bcl2L12 i Bcl2L12-A izoforme uglavnom lokalizovane u nukleusu različitih humanih ćelijskih linija [Hong *et al.* 2010].

Funkcija Bcl2L12 proteina je do sada najviše izučavana na ćelijama glioblastoma. U ovim ćelijama je detektovano pro-nekrotičko i snažno anti-apoptotsko dejstvo Bcl2L12 u kasnijim fazama apoptoze, bez obzira na vrstu apoptotskog stimulusa. Pokazano je da svoju funkciju Bcl2L12 ispoljava nizvodno od mitohondrija, direktno se vezujući za prokaspazu 7, čime sprečava njenu aktivaciju. Takođe je pokazano da Bcl2L12 inhibira i kaspazu 3 ali drugačijim, najverovatnije indirektnim mehanizmom [Stegh *et al.* 2007; Stegh *et al.* 2008]. Pored toga, nuklearni Bcl2L12 protein interaguje sa tumor-supresorskim p53 proteinom, čime onemogućava njegovo vezivanje za promotorske regione niza target gena; na taj način, Bcl2L12 inhibira p53 put aktivacije apoptoze u ćelijama glioblastoma [Stegh *et al.* 2010].

Aberantna ekspresija *Bcl2L12* gena je detektovana u nekoliko tipova kancera (kancer dojke, kolona, želuca, glioblastom, akutna mijeloidna leukemija). U kanceru kolona, želuca i dojke povišena ekspresija *Bcl2L12* u odnosu na zdravo tkivo je korelirala sa manje agresivnim formama bolesti i dužim preživljavanjem pacijenata, što možda ukazuje na pro-apoptotsku funkciju ovog gena [Thomadaki *et al.* 2007; Kontos *et al.* 2008; Floros *et al.* 2010]. S druge strane, u akutnoj mijeloidnoj leukemiji povišena ekspresija *Bcl2L12* je pokazala asocijaciju sa nepovoljnim kliničkim karakteristikama bolesti [Thomadaki *et al.* 2012]. Izgleda da ekspresija i funkcija Bcl2L12 u velikoj meri zavise od tipa ćelije, vrste apoptotskog stimulusa i puta aktivacije apoptoze.

Do sada je objavljena samo jedna studija u kojoj je analizirana ekspresija *Bcl2L12* gena u hroničnoj limfocitnoj leukemiji [Papageorgiou *et al.* 2011]. Rezultati ove studije su pokazali povišenu ekspresiju *Bcl2L12* u HLL B limfocitima u odnosu na normalne B limfocite. Visok nivo ekspresije *Bcl2L12* je pokazao asocijaciju sa kasnijim stadijumima bolesti i kraćim preživljavanjem pacijenata, ali ne i sa serumskim i molekularnim prognostičkim markerima.

CILJ RADA

Imunoglobulinski B ćelijski receptor (BcR) je ključni signalni molekul kako normalnih, tako i leukemičnih B limfocita, koji učestvuje u regulaciju procesa proliferacije, diferencijacije, anergije i apoptoze. U hroničnoj limfocitnoj leukemiji (HLL), koja se odlikuje velikom kliničkom heterogenošću, struktura i mutacioni status BcR su od izuzetnog prognostičkog i terapijskog značaja. Činjenica da *IGHV* mutacioni status i kompozicija *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana snažno koreliraju sa kliničkim karakteristikama bolesti, kao i postojanje populacionih razlika u *IGHV-IGHD-IGHJ* genskom repertoaru HLL B limfocita, podržavaju hipotezu o ulozi antigenske stimulacije u patogenezi HLL.

HLL B limfociti se odlikuju rezistencijom na apoptozu koja je uzrokovana kako signalima iz mikrosredine, tako i poremećajima apoptotskih signalnih puteva u samim leukemičnim ćelijama. Smatra se da su razlike u apoptotskom potencijalu HLL klonova makar delimično uzrok heterogenosti kliničkog toka bolesti i odgovora na terapiju među pacijentima. S obzirom na prognostički značaj *IGHV* mutacionog statusa, izučavanje njegove asocijacije sa mehanizmima regulacije apoptoze bi moglo da doprinese razumevanju procesa koji leže u osnovi različitog fenotipa M-HLL i N-HLL, a time i razvoju terapijskih pristupa specifičnih za određeni podtip hronične limfocitne leukemije.

Bcl2L12 je novi član Bcl2 familije regulatora apoptoze, čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena. Regulacija ekspresije Bcl2L12 je veoma kompleksna, na šta ukazuje postojanje velikog broja tkivno-specifičnih izoformi. Transkripcija *Bcl2L12* gena do sada nije izučavana.

Stoga su ciljevi ovog rada bili sledeći:

1. analiza *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana kod pacijenata obolelih od hronične limfocitne leukemije

- određivanje *IGHV* mutacionog statusa i analiza njegove asocijacije sa kliničkim parametrima
 - analiza *IGHV-IGHD-IGHJ* genskog repertoara *IGH* rearanžmana i određivanje frekvence *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena i genskih familija
 - analiza VH CDR3 regiona i određivanje prisustva stereotipnih *IGH* rearanžmana
 - analiza asocijacije *IGHV* mutacionog statusa sa drugim molekularnim prognostičkim markerima (ekspresijom CD38 i *LPL*)
2. analiza ekspresije gena *Bcl2* familije, kao osnovnih regulatora unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze, u cilju utvrđivanja njihove uloge u apoptotskoj rezistenciji HLL B limfocita
- merenje ekspresije *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* gena kod pacijenata obolelih od hronične limfocitne leukemije
 - analiza asocijacije nivoa ekspresije *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* gena sa kliničkim parametrima, kao i serumskim i molekularnim prognostičkim markerima
3. određivanje promotorskog regiona i mesta starta transkripcije *Bcl2L12* gena, u cilju proučavanja mehanizama njegove transkripcione regulacije

MATERIJAL I METODE

MATERIJAL

BIOLOŠKI MATERIJAL

Ispitanici

U ovu studiju je uključeno 85 pacijenata obolelih od hronične limfocitne leukemije (HLL), dijagnostikovanih na Klinici za hematologiju, Kliničkog Centra Srbije u Beogradu. Dijagnoza je postavljena na osnovu standardnih citomorfoloških, citohemijskih, citogenetičkih i imunofenotipskih kriterijuma. Kontrolnu grupu sačinjavalo je 10 zdravih individua. Studija je odobrena odlukom Etičkog odbora Kliničkog Centra Srbije.

Od kliničkih i hematoloških parametara evidentiranih u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i tokom praćenja bolesti, u ovom radu su korišćeni: pol, starost pacijenata pri postavljanju dijagnoze, Bine stadijum na početku bolesti, vreme udvostručenja broja limfocita ("lymphocyte doubling time"; LDT), serumski laktat dehidrogenaza (LDH), serumski β 2-mikroglobulin, ekspresija CD38 (određena tehnikom protočne citofluorimetrije) i vreme od postavljanja dijagnoze do prve terapije ("time to first treatment"; TTT).

Sveži uzorci periferne krvi su uzeti na 3.8% Na-citratu kao antikoagulansu u odnosu 9:1, i transportovani do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde je vršena izolacija DNK i RNK.

Ćelijske linije

U eksperimentima tranzijentne transfekcije, kao i za dobijanje ekstrakata nuklearnih proteina za EMSA eksperimente, korišćena je humana K562 ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije [Lozzio and Lozzio 1975].

U qRT-PCR eksperimentima je, kao kalibrator, korišćena humana HL-60 ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije [Gallagher *et al.* 1979].

Bakterijski soj

U eksperimentima kloniranja je korišćen bakterijski soj *DH5 α Escherichia coli* [Grant *et al.* 1990].

PLAZMIDNI VEKTORI

Za kloniranje potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena korišćen je pCATbasic vektor (Promega). Kao pozitivna kontrola u eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćen je pBLCAT5 vektor [Boshart *et al.* 1992]. Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 plazmid (Amersham Pharmacia).

PRAJMERI

Nazivi i sekvence prajmera korišćenih u PCR reakcijama, reakcijama sekvenciranja i "primer extension" eksperimentima navedeni su u tabelama 3 - 8 (F = "forward" prajmer; R = "reverse" prajmer).

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i sekvenciranje *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
VH1aL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACT GGA CCT GGA GG - 3'
VH1bL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACT GGA CCT GGA G(C/A) - 3'
VH2aL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACA CAC TTT GCT (A/C)AC - 3'
VH2bL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACA TAC TTT GTT CCA C - 3'
VH3aL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC - 3'
VH3bL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA CCA TGG A(A/G)(C/T) T(G/T)(G/T) G(G/A)C T(G/C/T)(A/C/T) GC - 3'
VH4L	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGA AAC ACC TGT GGT TCT T - 3'
VH5L	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG GGT CAA CCG CCA TC - 3'
VH6L	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGT CTG TCT CCT TCC TC - 3'
JH1-2	5' - TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC - 3'
JH3	5' - TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC - 3'
JH4-5	5' - TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC - 3'
JH6	5' - TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC - 3'
VLJH	5' - GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG - 3'

Napomena:

- VH1-6L prajmeri su oligonukleotidi komplementarni "leader" sekvencama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije; u slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3*, za amplifikaciju se koriste 2 VH prajmera (aL i bL) u ekvimolarnim koncentracijama.
- JH1-6 prajmeri su oligonukleotidi komplementarni *IGHJ* genima
- VLJH prajmer je oligonukleotid komplementaran konzervisanom regionu na 3' kraju *IGHJ* gena, koji pokazuje visok stepen homologije kod svih 6 *IGHJ* gena

Tabela 4. Prajmeri korišćeni u qRT-PCR eksperimentima merenja ekspresije apoptotskih gena (SYBR Green tehnika)

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Bcl2-F	5' - TCG CCC TGT GGA TGA CTG A - 3'
Bcl2-R	5' - CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC - 3'
Bax-F	5' - TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC - 3'
Bax-R	5' - TCA CCC AAC CAC CCT GGT CTT - 3'
Bcl2L12-F	5' - CCC TCG GCC TTG CTC TCT - 3'
Bcl2L12-R	5' - GGG CCA CCA AAG CAT AGA AG - 3'
Abl-F	5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'
Abl-R	5' - GAC GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'

Tabela 5. Prajmeri i probe korišćeni u qRT-PCR eksperimentima merenja ekspresije *LPL* gena (TaqMan tehnika)

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
LPL-F	5' - CAG CAG CAA AAC CTT CAT GGT - 3'
LPL-R	5' - AGT TTT GGC ACC CAA CTC TCA - 3'
Abl-F	5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'
Abl-R	5' - GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'
Naziv probe	Sekvenca probe
LPL-P	5' - 6-FAM - CCA TGG CTG GAC GGT AAC AGG AAT GT - TAMRA - 3'
Abl-P	5' - 6-FAM - CCA TTTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T - TAMRA - 3'

Napomena: FAM = fluorescentna reporterska boja; TAMRA = "kvenčerska" boja

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Bcl2L12 -667 Fc	5' - cca <u>agc ttg</u> gAG CTC CAA CCC TGC TT - 3'
Bcl2L12 -247 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg ACC TGG CCT GGA GTT TCC GCA C - 3'
Bcl2L12 -130 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg CGA GAG GCT CTC TAA TCA GCT AGG - 3'
Bcl2L12 +68 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg CGT GTA AGC CTC TAC CTC CTG C - 3'
Bcl2L12 +123 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg CCC TAC AGA AGA TCT CCC AAA AC - 3'
Bcl2L12 +196 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg TCC TCC AGG ACA GAG CAC GC - 3'
Bcl2L12 +266 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg CTC TAG AAC CCC CTC AGT GT - 3'
Bcl2L12 +345 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg CCA GCG TCG GCC ACT GTA - 3'
Bcl2L12 +485 Fc	5' - ccc <u>aag ctt</u> ggg TTA CCT ACG ATG GAA GGT CGG - 3'
Bcl2L12 +105 Rc	5' - gct <u>cta gag</u> cCT ACA TTG GGG TAA GTG CAG G - 3'
Bcl2L12 +752 Rc	5' - gct <u>cta gag</u> cCC CAG <u>CAT GCC</u> TCT GGC CGG - 3'
Bcl2L12 +830 Rc	5' - tgc <u>act gca</u> gtg caG CAC TGG GCC GGG TC - 3'

Napomena:

- prajmeri su dizajnirani na osnovu objavljene sekvence *Bcl2L12* gena (GenBank: AF289220.1); pozicije prajmera su numerisane u odnosu na poziciju nukleotida koji je označen kao +1 nukleotid od strane Scorilas i saradnika [Scorilas *et al.* 2001]
- malim slovima su označeni "repići" dodati na 5' kraj prajmera; podvučeni regioni predstavljaju mesta sečenja restriktionih enzima *HindIII* (AAGCTT), *XbaI* (TCTAGA), *SphI* (GCATGC) i *PstI* (CTGCAG)

Tabela 7. Prajmeri korišćeni u neradioaktivnom "primer extension" eseju

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
VIC-CAT R	5' - VIC - GCT TCC TTA GCT CCT GAA AAT CTC G - 3'
CAT R	5' - GCT TCC TTA GCT CCT GAA AAT CTC G - 3'

Napomena:

- CAT R i VIC-CAT R su oligonukleotidi komplementarni sekvenci koja se nalazi između polilinkerskog regiona i *CAT* gena u pCATbasic plazmidu
- VIC = fluorescentna boja

Tabela 8. Prajmer korišćen u radioaktivnom "primer extension" eseju

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Bcl2L12 +752 R	5' – CCC AGC ATG CCT CTG GCC GG - 3'

ANTITELA

Tabela 9. Antitela korišćena u "super-shift" eksperimentima

Naziv antitela	Proizvođač	Kat. broj	Poreklo
Sp1 (PEP2)	Santa Cruz Biotechnology	sc-59x	zec, poliklonsko IgG
GATA-1(H200X)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13053x	zec, poliklonsko IgG

METODE

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI

Za izolaciju DNK iz krvi korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Protokol:

- na dno tube sipati 20 µl Qiagen proteaze, dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem
- inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C kako bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina
- dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem

- ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm)/1 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća)
- odbaciti tubu sa filtratom, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW1 i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm)/1 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća)
- odbaciti tubu sa filtratom, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW2 i centrifugirati na 20000 g (14000 rpm)/3 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća)
- na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK
- centrifugiranjem na 6000 g (8000 rpm)/1 min dobija se eluat u kome je rastvorena DNK
- koncentraciju i čistoću DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ČELIJA IZ PERIFERNE KRVI

Protokol:

- uzorak krvi razblažiti fiziološkim rastvorom u odnosu 1:1
- na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)
- 4 ml razblaženog uzorka pažljivo naneti na površinu Ficoll-Paque PLUS, pazeći da se slojevi ne pomešaju
- centrifugirati na 1500 rpm/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
- nakon centrifugiranja, u novu sterilnu epruvetu pipetom prebaciti interfazu ("buffy coat") koja sadrži mononuklearne ćelije

- isprati dva puta 1 x PBS puferom pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄); nakon svakog ispiranja centrifugirati na 1500 rpm/15 min
- talog mononuklearnih ćelija resuspendovati u TRI reagent-u (Sigma-Aldrich)

IZOLACIJA RNK IZ MONONUKLEARNIH ĆELIJA I ĆELIJA U KULTURI

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija i ćelija u kulturi je korišćen TRI reagent (Sigma-Aldrich). TRI reagent predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski i saradnika [Chomczynski and Sacchi 1987].

Protokol:

- u 1 ml TRI reagent-a resuspendovati maksimalno 1×10^7 ćelija i lizirati provlačenjem kroz iglu promera 0.7 mm
- liziran uzorak ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min
- dodati 200 μ l hloroforma, snažno promućkati, a zatim uzorak ostaviti da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi
- nakon centrifugiranja na 12000 rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini
- vodenu fazu prebaciti u novu tubu i dodati 0.5 ml izopropanola; promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK)
- centrifugirati na 12000 rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola
- centrifugirati na 12000 rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi
- talog RNK rastvoriti u "RNAse-free" vodi

- koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem na spektrofotometru

REVERZNA TRANSKRIPCija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Protokol:

- smešu finalnog volumena 11 μ l koja sadrži 2 μ g RNK i 2 μ l 1 x "random-hexamer" prajmera inkubirati 5 min/70°C, a zatim ohladiti na ledu
- dodati smešu finalnog volumena 9 μ l koja sadrži 4 μ l 5 x RT pufera (Fermentas) , 20 U "Ribo-Lock" RNaznog inhibitora (Fermentas), 2 μ l dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 10 min/25°C, a zatim 1h/42°C
- reakciju zaustaviti inkubacijom 10 min/70°C

REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK (PCR)

PCR ("polymerase chain reaction") je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida (prajmeri) komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava, koji su međusobno suprotno orijentisani ("forward" i "reverse" prajmer) i dugački najčešće 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora da sadrži komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matricu (DNK koja se kopira), prajmere (oligonukleotide komplementarne krajevima sekvence koja se kopira), nukleotide (gradivne elemente DNK), *Taq* polimerazu (termostabilnu DNK polimerazu koja katalizuje ugradnju

nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), jone magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

RT-PCR ("reverse transcriptase polymerase chain reaction") je varijanta PCR metode u kojoj se, kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence, koristi cDNK.

RT-PCR amplifikacija *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

IGHV-IGHD-IGHJ rearanžmani su umnožavani RT-PCR metodom, kako bi se analizirali samo rearanžmani koji se zaista eksprimiraju u ćeliji. U najvećem broju slučajeva korišćena je multipleks RT-PCR metoda.

Reakciona smeša finalnog volumena 100 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 200 ng cDNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 200 μ M
- 60 pmol VHL prajmera
- 60 pmol JH prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

VHL prajmer je oligonukleotidni miks dobijen mešanjem "leader" prajmera specifičnih za svaku *IGHV* gensku familiju u ekvimolarnom odnosu (npr. po 10 pmol VH1aL, VH1bL, VH2aL, VH2bL, VH3aL, VH3bL i po 20 pmol VH4L, VH5L i VH6L prajmera).

JH prajmer je takođe oligonukleotidni miks dobijen mešanjem prajmera specifičnih za svaki *IGHJ* gen u ekvimolarnom odnosu (npr. po 20 pmol JH1-2 i JH4-5, i po 10 pmol JH3 i JH6).

Temperaturni profil reakcije:

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 40 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/59°C – aniling
 - 1.5 min/72°C – elongacija
3. 7 min/72°C – finalna elongacija

Analiza dobijenih RT-PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu ili 8 % poliakrilamidnom gelu.

U slučajevima kada je elektroforetskim razdvajanjem detektovano prisustvo dva umesto jednog klonalnog RT-PCR produkta ("bialelski rearanžman"), dva *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana su ponovo umnožavana RT-PCR reakcijama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije ("family-specific" RT-PCR). Na ovaj način se izbegava isecanje i elucija traka sa agaroznog gela, što je naročito značajno u slučajevima kada su dva klonalna rearanžmana približno jednake dužine.

Reakciona smeša finalnog volumena 100 µl je sadržala sledeće komponente:

~ *IGHV1L / IGHV2L / IGHV3L "family-specific" RT-PCR*

- 200 ng cDNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 200 µM
- 15 pmol VH1aL / VH2aL / VH3aL prajmera
- 15 pmol VH1bL / VH2bL / VH3bL prajmera

- 30 pmol JH prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

~ *IGHV4L / IGHV5L / IGHV6L "family-specific" RT-PCR*

- 200 ng cDNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 200 μ M
- 30 pmol VH4L / VH5L / VH6L prajmera
- 30 pmol JH prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

Temperaturni profil "family-specific" RT-PCR reakcija je bio isti kao u slučaju multipleks RT-PCR reakcije.

Produkti svih šest pojedinačnih RT-PCR reakcija su analizirani elektroforezom na 4% agaroznom gelu ili 8 % poliakrilamidnom gelu.

Dobijeni RT-PCR produkti su prečišćeni na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), a koncentracija i čistoća su izmerene na spektrofotometru.

Oba lanca na ovaj način umnoženih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana su zatim sekvencirana upotrebom odgovarajućih prajmera

PCR amplifikacija potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena

U cilju kloniranja i funkcionalne analize potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena, isti su prethodno umnoženi PCR metodom. Kao matrica za PCR amplifikaciju odabranih fragmenata služila je DNK izolovana iz krvi zdrave kontrole.

Kombinacije "forward" (F) i "reverse" (R) prajmera korišćene u ovim eksperimentima navedene su u Tabeli 10.

Reakciona smeša finalnog volumena 50 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 20 ng DNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- $MgCl_2$ finalne koncentracije 0.5 mM
- dNTP finalne koncentracije 200 μ M
- 50 pmol "forward" prajmera
- 50 pmol "reverse" prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

Temperaturni profil reakcije:

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/62°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Tabela 10. Kombinacije "forward" (F) i "reverse" (R) prajmera korišćene za amplifikaciju potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena

F prajmer	R prajmer	Dužina PCR produkta (bp)
Bcl2L12 -667 Fc	Bcl2L12 +105 Rc	792
Bcl2L12 -247 Fc	Bcl2L12 +105 Rc	374
Bcl2L12 -247 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	1021
Bcl2L12 -130 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	904
Bcl2L12 +68 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	707
Bcl2L12 +123 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	652
Bcl2L12 +196 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	579
Bcl2L12 +266 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	509
Bcl2L12 +345 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	430
Bcl2L12 +345 Fc	Bcl2L12 +830 Rc	512
Bcl2L12 +485 Fc	Bcl2L12 +752 Rc	289

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu [Sambrook *et al.* 1989] odgovarajuće koncentracije (1 – 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova korišćen je 1 x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA pH=8). U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum-bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom.

Elektroforeza je tekla u 1 x TAE puferu, pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom, a trajni zapis rezultata je dobijen fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike (BioDocAnalyze System). Veličina fragmenata DNK je određena pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU

Fragmenti DNK su razdvajani na nedenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu sledećeg sastava: akrilamid : N,N-metilenbisakrilamid = 29 : 1, 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8, 0.1% amonijumpersulfat, 0.1% TEMED. Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1 x TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8).

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom [Radojkovic and Kusic 2000].

Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0.5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojeni 0.1% rastvorom AgNO₃ 10 minuta, uz neprekidno mućkanje na klackalici. Višak AgNO₃ je uklanjan ispiranjem najpre u bi-distilovanoj vodi, a zatim u razvijaču sledećeg sastava: 1.5% NaOH, 0.01% NaBH₄ i 0.048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču držani 15-20 minuta, do pojave traka. Razvijanje je stopirano potapanjem gelova u 0.75% rastvor Na₂CO₃.

PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKATA

Za prečišćavanje produkata dobijenih PCR reakcijama korišćen je QIAquick PCR Purification kit (Qiagen).

Protokol:

- pomešati PCR reakcionu smešu i pufer PB u odnosu 1:5
- dodati 10 µl 3M Na-acetata pH=5
- naneti uzorak na QIAquick kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati na 17900 g (13000 rpm)/1 min (adsorpcija DNK)
- odbaciti filtrat, naneti 750 µl pufera PE na kolonicu i centrifugirati na 17900 g (13000 rpm)/1 min (ispiranje DNK od nečistoća)
- odbaciti filtrat i ponoviti centrifugiranje na 17900 g (13000 rpm)/1 min

- prebaciti kolonicu u novu tubu, naneti 30 μ l pufera EB i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK
- centrifugiranjem na 17900 g (13000 rpm)/1 min dobija se eluat u kome je rastvoren prečišćeni PCR produkt
- koncentraciju i čistoću DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

SEKVENCIRANJE PCR PRODUKATA / PLAZMIDNIH KONSTRUKATA

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminator v.3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se, pored deoksinukleotida, koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi [Sanger *et al.* 1977]. DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera, sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR), tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su svi dideoksinukleotidi obeleženi istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj, umesto u četiri odvojene PCR reakcije.

Prvo je PCR reakcijom umnožen region DNK koji treba da se sekvencira. Nakon provere PCR produkta elektroforezom, vršeno je njegovo prečišćavanje na koloni. Koncentracija i čistoća prečišćenih PCR produkata merena je na spektrofotometru.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp) / 150-300 ng plazmidnog konstrukta

- 3.2 pmol prajmera
- 3 μ l Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1. 1 min/96⁰C
2. 25 ciklusa:
 - 10 sek/96⁰C
 - 5 sek/50⁰C
 - 4 min/60⁰C
3. ∞ /4⁰C

Produkti PCR reakcije za sekvenciranje su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom.

Protokol:

- u uzorke dodati 40 μ l Na-acetata, promućkati i centrifugirati na 13000 rpm/20 min
- ukloniti supernatant i talogu dodati 200 μ l 70% etanola
- centrifugirati na 13000 rpm /10 min
- ukloniti supernatant i ponoviti prethodni korak još jednom
- talog u potpunosti osušiti, rastvoriti 25 μ l Hi-Di formamida i celokupnu količinu naneti u bunarić na mikrotitarskoj ploči

Dobijeni rezultati su analizirani programom Sequencing Analysis v.5.2 [<http://www.appliedbiosystems.com>].

Sekvenciranje *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

Izbor prajmera i postupak sekvenciranja *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana je zavisio od načina na koji su oni amplifikovani.

Ukoliko je rearanžman umnožen multipleks RT-PCR reakcijom, sekvenciranje se odvijalo u tri runde. Naime, u zavisnosti od *IGHV-IGHD-IGHJ* sastava klonalnog rearanžmana, on je umnožen pomoću odgovarajuće kombinacije VHL i JH prajmera. Međutim, pošto multipleks RT-PCR smeša sadrži miks VHL i JH prajmera, ne može se znati koja kombinacija prajmera je dovela do amplifikacije. Samim tim, otežan je izbor prajmera koji će se koristiti u reakciji sekvenciranja. Zbog toga je u prvoj rundi sekvenciranja korišćen VLJH prajmer koji je komplementaran konzervisanom regionu na 3' kraju *IGHJ* gena, i dobijena sekvenca je analizirana u IMGT V-QUEST softveru (<http://www.imgt.org>). S obzirom na poziciju VLJH prajmera, najčešće se ne može dobiti sekvenca celog rearanžmana, ali se dobija sekvenca njegovog 5' kraja, tako da IMGT V-QUEST može da identifikuje prisutan *IGHV* gen. Kada je poznato kojoj *IGHV* familiji pripada *IGHV* gen u datom rearanžmanu, pristupa se drugoj rundi sekvenciranja, gde se kao prajmer za sekvenciranje koristi odgovarajući VHL prajmer. U slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3* familije, sekvenciranje u drugoj rundi vršeno je sa oba VHL prajmera (aL i bL) u dve odvojene PCR reakcije, dok je u slučaju *IGHV4*, *IGHV5* i *IGHV6* korišćen samo jedan VHL prajmer. Na ovaj način je dobijena sekvenca kompletnog rearanžmana koja je analizirana u IMGT V-QUEST softveru, čime se otkriva tačan *IGHV-IGHD-IGHJ* sastav klonalnog rearanžmana. U cilju provere dobijenih rezultata, u trećoj rundi je sekvenciran i suprotan lanac rearanžmana, korišćenjem odgovarajućeg JH prajmera, a dobijena sekvenca analizirana u IMGT V-QUEST softveru.

U slučajevima kada je amplifikacija rearanžmana vršena u šest pojedinačnih "family-specific" RT-PCR reakcija, sekvenciranje se odvijalo u dve runde. Pošto se u ovako postavljenom eksperimentu zna kojoj *IGHV* familiji pripada *IGHV* gen prisutan u klonalnom rearanžmanu, u prvoj rundi sekvenciranja korišćen je odgovarajući VHL prajmer. U slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3* familije, sekvenciranje je vršeno sa oba VHL prajmera (aL i bL) u dve odvojene PCR reakcije, dok je u slučaju *IGHV4*, *IGHV5* i *IGHV6* korišćen samo jedan VHL prajmer. Dobijena sekvenca je analizirana u IMGT V-QUEST softveru, čime se otkriva tačan *IGHV-IGHD-IGHJ* sastav klonalnog rearanžmana. U cilju provere dobijenih rezultata, u drugoj rundi je sekvenciran i

suprotan lanac rearanžmana, korišćenjem odgovarajućeg JH prajmera, a dobijena sekvenca analizirana u IMGT V-QUEST softveru.

Sekvenciranje plazmidnih konstrukata

Plazmidni CAT konstrukti su sekvencirani pomoću prajmera koji su korišćeni prilikom kloniranja DNK inserta u pCAT basic reporterski vektor. Radi provere tačnosti rezultata, sekvencirana su oba lanca plazmidne DNK

ANALIZA SEKVENCI *IGHV-IGHD-IGHJ* REARANŽMANA

Kompozicija *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana i *IGHV* mutacioni status

Sekvence klonalnih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana dobijene sekvenciranjem RT-PCR produkata su analizirane u IMGT/V-QUEST softveru (<http://www.imgt.org>). IMGT® ("The International ImMunoGeneTics information system") obuhvata 6 baza podataka koje sadrže informacije vezane za imunoglobuline (IG), T-ćelijske receptore (TR), MHC ("major histocompatibility complex") i RPI ("related proteins of the immune system"), kao i 15 interaktivnih programa koji omogućavaju njihovu analizu [Lefranc 2003; Lefranc *et al.* 2005]. IMGT/V-QUEST ("V-QUERy and Standardization") vrši detaljnu karakterizaciju unetih sekvenci i identifikuje *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gene i alele u rearanžmanu poravnavanjem sa referentnim sekvencama nerearanžiranih ("germline") gena i alela. Pored toga, definišu se FR ("framework") i VH CDR ("heavy complementarity determining") regioni, mutacioni status *IGHV* gena kao i to da li je rearanžman produktivan ili neproduktivan [Giudicelli *et al.* 2004; Brochet *et al.* 2008].

Analiza stereotipnih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

VH CDR3 amino-kiselinske sekvence dobijene IMGT/V-QUEST analizom klonalnih rearanžmana su analizirane pomoću ClustlW softvera (<http://www.ebi.ac.uk>), koji vrši

poravnavanje većeg broja sekvenci sa referentnom sekvencom ("multiple sequence alignment"). Kako bi se utvrdilo da li analizirani rearanžman pripada nekom od prijavljenih VH CDR3 klastera, njegova VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca je poravnavana sa VH CDR3 sekvencama u okviru klastera definisanih od strane Murray *et al.* [Murray *et al.* 2008].

Da bi rearanžman bio svrstan u određeni klaster, morali su da budu ispunjeni kriterijumi definisani od strane Messmer i saradnika [Messmer *et al.* 2004]:

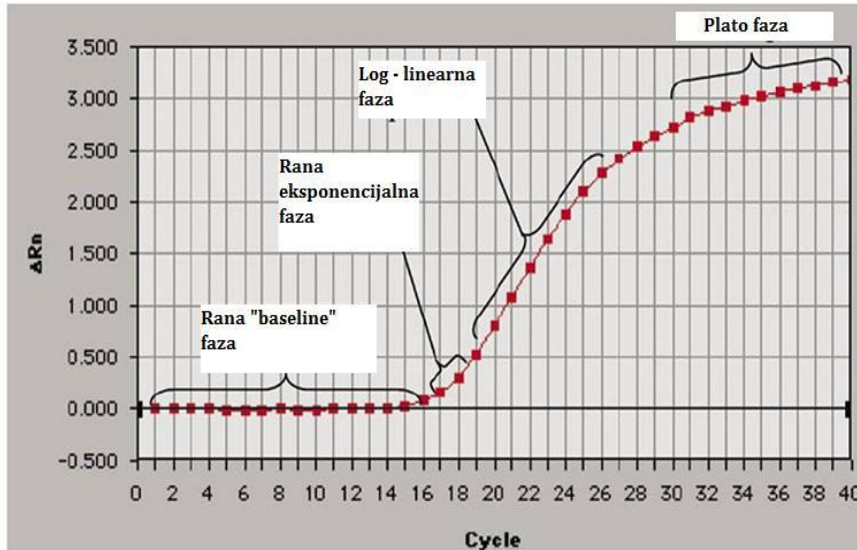
- prisustvo istih *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena kao kod ostalih članova klastera
- isti okvir čitanja *IGHD* gena kao kod ostalih članova klastera
- MAS ("mean alignment score"; srednja vrednost poravnanja svih parova sekvenci koje pripadaju datom klasteru) ≥ 60

ANALIZA EKSPRESIJE GENA POMOĆU "REAL-TIME" PCR (qPCR) METODE

"Real-time" PCR ili kvantitativni PCR ("quantitative PCR"; qPCR) je metoda koja omogućava kvantifikaciju PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu ("real-time"). qRT-PCR ("quantitative RT-PCR") je varijanta qPCR metode u kojoj se, kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence, koristi cDNK.

U qPCR se meri fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije i čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. Za razliku od "klasičnog" PCR, gde se količina produkta može meriti samo na kraju PCR reakcije, ovde se kvantifikacija odvija u toku eksponencijalne faze reakcije, u toku koje dolazi do udvostručavanja PCR produkta prilikom svakog ciklusa (Slika 10).

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo ("baseline"). Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se "threshold cycle" – Ct. Vrednost Ct je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence, Ct je niži i obratno, Ct je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence.

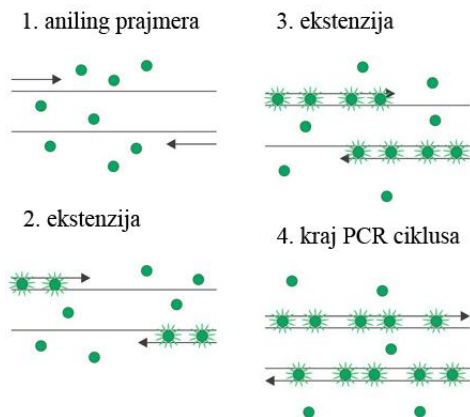


Slika 10. Faze PCR amplifikacije. R_n predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a ΔR_n predstavlja razliku R_n vrednosti između uzorka i blanka ("no template control") [<http://www.appliedbiosystems.com>]

Trenutno se koriste 2 osnovne qPCR tehnike:

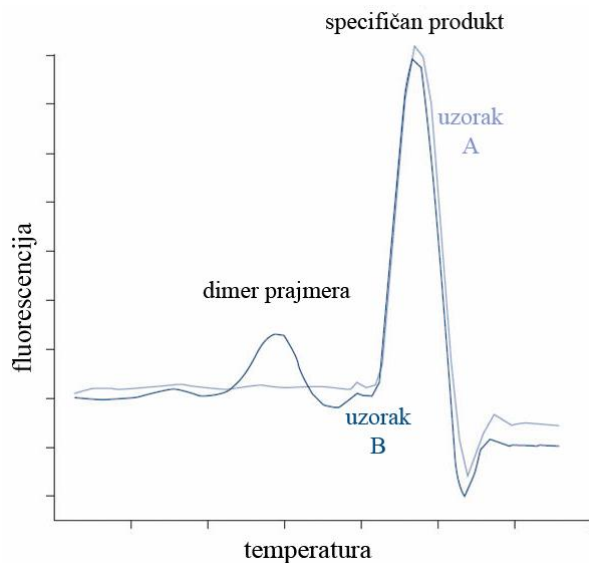
1. SYBR Green
2. TaqMan

SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primeni interkalirajuće SYBR Green I boje koja se vezuje za manji žljeb dvolančane DNK. Sa povećanjem broja ciklusa PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim i do povećanja intenziteta fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja (Slika 11).



Slika 11. Princip rada SYBR Green I tehnike [van der Velden *et al.* 2003]

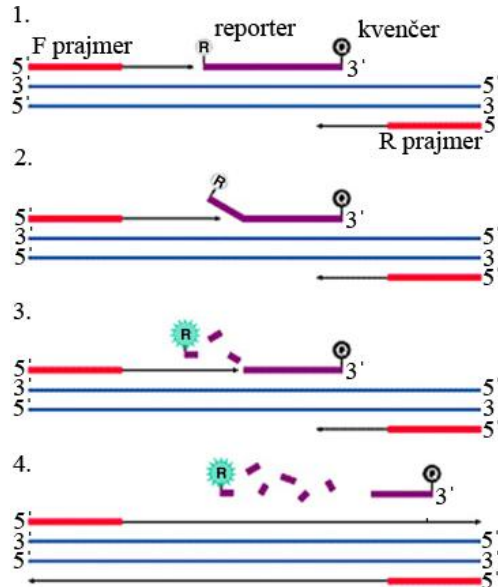
SYBR Green tehnika za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Zbog toga se za procenu specifičnosti reakcije primenjuje analiza krive topljenja ("melting curve analysis"). U ovoj analizi, tokom qPCR reakcije temperatura postepeno raste od 65°C do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. U prisustvu dvolančane DNK, intenzitet fluorescentnog signala će biti visok pri niskim temperaturama, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja, pa će davati različite pik-ove fluorescencije. U prisustvu samo jednog, specifičnog PCR produkta detektovaće se samo jedan pik (Slika 12).



Slika 12. Analiza krive topljenja
[<http://www.appliedbiosystems.com>]

TaqMan tehnika koristi 5'→3' egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze za detekciju PCR produkta. Za razliku od SYBR Green tehnike, u TaqMan tehnici se, pored specifičnih prajmera, koristi i TaqMan proba. TaqMan proba je oligo-nukleotidna proba komplementarna sekvenci u okviru target sekvence; na 5' kraju je obeležena fluorescentnom, reporterskom bojom (najčešće FAM, VIC ili JOE), a na 3' kraju "kvenčerom" (najčešće TAMRA). Sve dok se reporter i kvenčer nalaze blizu jedan drugom, tj. dok je TaqMan proba intaktna, nema emitovanja fluorescencije jer fluorescencija koju emituje reporter biva apsorbovana od strane kvenčera. Međutim, u toku PCR amplifikacije 5'→3' egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze izmešta probu i uklanja je sa DNK lanca, što rezultira emitovanjem detektabilne fluorescencije od strane reporterske boje (Slika 13).

U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije slobodnih reportera.



Slika 13. Princip rada TaqMan tehnike. 1) TaqMan proba i prajmeri se vezuju za target sekvencu i započinja ekstenzija; 2) kada Taq polimeraza stigne do probe, njena 5'→3' egzonukleazna aktivnost uklanja probu; 3) započinje "seckanje" probe i emitovanje fluorescencije; 4) završetak polimerizacije [Wang *et al.* 2010].

U toku eksponencijalne faze PCR reakcije, kvantitativni odnos između početne količine target sekvence i količine PCR produkta u bilo kom ciklusu je:

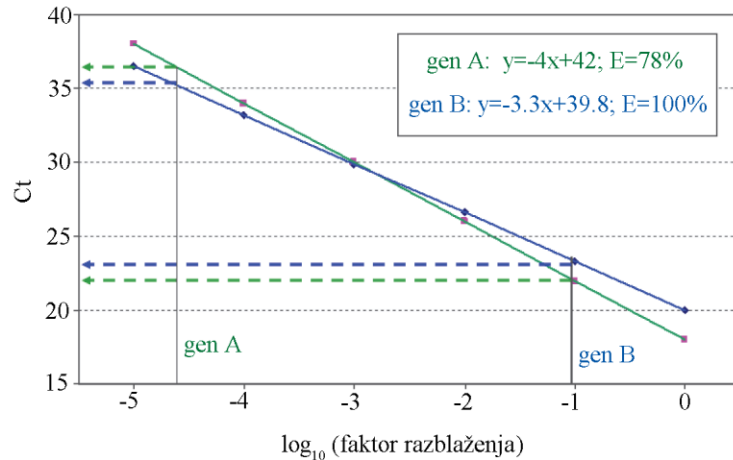
$$X_n = X_0 (1+E)^n$$

gde je X_n količina target sekvence u ciklusu n , X_0 početna količina target sekvence, dok je E efikasnost amplifikacije i može imati vrednosti od 0 (nema amplifikacije) do 1 (u svakom ciklusu dolazi do dupliranja količine target sekvence).

Efikasnost reakcije je veoma važna za odabir metode kvantifikacije qPCR podataka i ona se izračunava iz nagiba (S) standardne krive:

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

Standardna kriva se pravi analiziranjem amplifikacije desetostrukih razblaženja početne količine DNK ili cDNK (Slika 14).



Slika 14. Određivanje efikasnosti qPCR reakcije metodom standardne krive
 [http://www.appliedbiosystems.com]

Kvantifikacija qPCR produkata može biti:

- 1) apsolutna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao apsolutni broj kopija target sekvence; kvantifikacija target sekvence se dobija poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije
- 2) relativna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao relativni odnos količine referentnog uzorka (kalibrator) i merenog uzorka; u ovom radu kvantifikacija ekspresije gena od interesa vršena je metodom relativne kvantifikacije.

U oba pristupa kvantifikaciji, veoma je važno izvršiti normalizaciju dobijenih podataka. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od početne količine matrice, da bi se izbegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, uporedo sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje tzv. endogene kontrole. Endogena kontrola je obično "housekeeping" gen čija je ekspresija stabilna u svim uzorcima, odnosno čija se ekspresija ne menja prilikom eksperimentalnih tretmana.

U slučaju relativne kvantifikacije, kvantifikacija ekspresije target gena može se izvršiti metodom relativne standardne krive ili komparativnom ddCt metodom, koja je korišćena u ovom radu.

Komparativna ddCt metoda

Komparativna ddCt metoda je najčešće korišćena metoda kvantifikacije ekspresije target gena primenom qRT-PCR tehnologije [Livak *et al.* 2001].

Količina target gena, normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu i relativno u odnosu na kalibrator je:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$$ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{KALIBRATOR}} =$$

$$(Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{endogena kont.}}) - (Ct_{\text{target, KALIBRATOR}} - Ct_{\text{endogena kont., KALIBRATOR}})$$

Da bi kalkulacija primenom ove metode bila tačna, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno jednaka i $> 96\%$.

Merenje ekspresije apoptotskih gena qRT-PCR metodom

Ekspresija apoptotskih gena *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* je praćena qRT-PCR metodom na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom SYBR Green tehnike. Kao endogena kontrola je korišćen *Abl* gen. Nazivi i sekvence prajmera navedeni su u Tabeli 4.

Reakciona smeša finalnog volumena 10 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 50 ng cDNK
- 1 x *Power* SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 2 pmol (*Abl*) / 0.5 pmol (*Bcl2*, *Bax*, *Bcl2L12*) "forward" prajmera
- 2 pmol (*Abl*) / 0.5 pmol (*Bcl2*, *Bax*, *Bcl2L12*) "reverse" prajmera

Temperaturni profil reakcije:

1. 2 min/50°C
2. 10 min/95°C

3. 40 ciklusa:

- 15 sek/95°C
- 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena HL60 ćelijska linija.

Merenje ekspresije *LPL* gena qRT-PCR metodom

Ekspresija *LPL* je praćena qRT-PCR metodom na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan tehnike. Kao endogena kontrola je korišćen *Abl* gen. Nazivi i sekvence prajmera i proba navedeni su u Tabeli 5.

Reakciona smeša finalnog volumena 10 µl je sadržala sledeće komponente:

- 50 ng cDNK
- 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 3 pmol (*Abl*) / 6 pmol (*LPL*) "forward" prajmera
- 3 pmol (*Abl*) / 6 pmol (*LPL*) "reverse" prajmera
- 2 pmol (*Abl*) / 1.5 pmol (*LPL*) TaqMan probe

Temperaturni profil reakcije:

1. 2 min/50°C
2. 10 min/95°C
3. 50 ciklusa:
 - 30 sek/95°C
 - 1 min/60°C

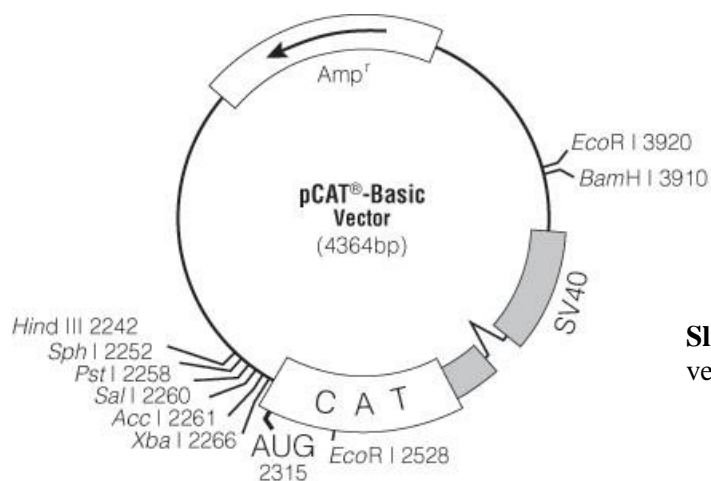
Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena HL60 ćelijska linija.

KLONIRANJE POTENCIJALNIH PROMOTORSKIH FRAGMENTATA *Bcl2L12* GENA U REPORTERSKI VEKTOR

U cilju funkcionalne analize potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena, odabrani regioni su klonirani u pCAT basic reporterski vector (Promega) (Slika 15).

pCATbasic je plazmidni vektor koji, kao reporterski gen, sadrži bakterijski gen za enzim hloramfenikol acetiltransferazu (CAT). Uzvodno od *CAT* gena se nalazi polilinkerski region u koji se uklonira željeni fragment; posle tranzijentne transfekcije u odabranu sisarsku ćelijsku liniju, CAT ELIZA esejom se meri aktivnost CAT enzima. S obzirom da CAT protein nije endogeno eksprimiran u sisarskim ćelijama, izmerena CAT aktivnost je direktno proporcionalna aktivnosti kloniranog promotorskog regiona.

Prvo su PCR reakcijom umnoženi potencijalni promotorski regioni *Bcl2L12* gena na prethodno opisan način (Tabela 10). Dobijeni PCR produkti su prečišćeni na koloni, a koncentracija i čistoća izmerene na spektrofotometru. Nakon toga su digestijom odgovarajućim restrikcionim enzimima (Tabela 11), kreirani jednolančani "lepljivi krajevi".



Slika 15. Mapa pCAT basic reporterskog vektora [<http://www.promega.com>]

Tabela 11. Sastavi reakcionih smeša za digestiju fragmenata za kloniranje.

fragment	PCR produkt	reakcioni pufer	BSA	restrikcioni enzim	restrikcioni enzim	finalni volumen
Bcl2L12 -667/+105	600 ng	1 x M	0.01%	<i>HindIII</i> (3U)	<i>XbaI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 -247/+105	600 ng	1 x M	0.01%	<i>HindIII</i> (3U)	<i>XbaI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 -247/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 -130/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +68/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +123/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +196/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +266/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +345/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +485/+752	450 ng	1 x B	/	<i>HindIII</i> (3U)	<i>SphI</i> (3U)	30 μ l
Bcl2L12 +345/+830	600 ng	1 x M	0.01%	<i>HindIII</i> (3U)	<i>PstI</i> (3U)	30 μ l

Napomena: korišćeni su *HindIII*, *XbaI*, *PstI* i 10 x pufer M od proizvođača Amersham Pharmacia Biotech, a *SphI* i 10 x pufer B od proizvođača Fermentas

Plazmid (600 ng u reakciji finalnog volumena 30 μ l) je digeriran istom kombinacijom restrikcioni enzima kao i PCR produkt, čime se formiraju jednolančani "lepljivi krajevi" komplementarni "lepljivim krajevima" dobijenim digestijom PCR produkta. Time je omogućena insercija željenog fragmenta u polilinkerski region vektora u odgovarajućoj orijentaciji.

Istovremeno su pripremane i kontrolne digestije u kojima je plazmid (200 ng u reakciji finalnog volumena 10 μ l) digeriran samo jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obe jednostruke digestije je potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Smeše za digestiju inkubirane su preko noći na 37⁰C. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu u slučaju digestije plazmida, odnosno 2% agaroznom gelu u slučaju digestije PCR produkta.

Formiranje rekombinantnog DNK molekula spajanjem plazmida i PCR fragmenta sa komplementarnim "lepljivim krajevima" vrši se u ligacionoj reakciji.

Ukupna količina DNK u ligacionoj smeši ne bi trebalo da pređe 200 ng. Molarni odnos vektora i fragmenta je varijabilan. Za fragmente veličine slične vektoru, preporučuje se odnos 1 : 1, dok u slučaju fragmenata manjih od vektora odnos raste 1:2, 1:3, 1:5 i tako dalje.

Ligaciona smeša finalne zapremine 10 - 20 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 100 ng digeriranog pCATbasic vektora
- odgovarajuću količinu (ng) digeriranog PCR fragmenta tako da molarni odnos plazmida i fragmenta bude 1:5
- 1 x reakcioni pufer
- 1.5 U T4 DNK Ligaze (Fermentas)

Ligaciona smeša je inkubirana preko noći na 16⁰C.

Napravljeni plazmidni konstrukti koji sadrže potencijalni promotorski region *Bcl2L12* gena su nazvani prema insertu koji sadrže (npr. pCAT *Bcl2L12* -667/+105, itd).

KULTIVISANJE BAKTERIJA

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, sve manipulacije odvijaju se u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude (petri šolje, menzure, itd.) i alatke (eža, nastavak, čačkalica, itd.) moraju biti sterilni.

E. coli bakterije soja *DH5 α* kultivisane su u tečnom, LB (Luria-Bertani) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj, LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt kvasca, 1.5% bakto-agar) [Sambrook *et al.* 1989]. Svi medijumi za kultivisanje se sterilišu autoklaviranjem.

Bakterije se kultivišu na temperaturi od 37⁰C. Kako bi se obezbedio selektivni rast transformanata, u tečni i čvrsti medijum dodaje se odgovarajući antibiotik. S obzirom da pCATbasic nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u medijum u finalnoj koncentraciji 80 μ g/ml.

PRIPREMANJE *E. Coli DH5α* KOMPETENTNIH ĆELIJA

Ovom metodom se bakterije pripremaju za transformaciju stranom DNK. Ćelijska membrana bakterija treba da se učini propustljivijom, a da se pritom ne umanjuje vijabilnost samih ćelija i njihova sposobnost razmnožavanja [Sambrook *et al.* 1989].

Protokol:

- sa čvrste, LA podloge pojedinačnu bakterijsku koloniju preneti u 5 ml tečnog, LB medijuma bez antibiotika (*DH5α* soj ne poseduje rezistenciju na antibiotike)
- kultivisati preko noći, uz aeraciju, na 37°C
- narednog dana, inokulisati 1 ml prekonocne kulture u svež LB medijum (20 ml)
- bakterije kultivisati na 37°C do postizanja gustine od 0.3 - 0.5 OD, što se određuje merenjem spektrofotometrom na talasnoj dužini od 600 nm
- bakterije iz ove kulture razblažiti inokuliranjem (2 ml) u svež tečni, LB medijum (20 ml)
- rast bakterijske kulture nastaviti na 37°C do gustine od 0.5 OD_{600nm} (na ovaj način se dobija veliki broj bakterijskih ćelija koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta)
- kulturu centrifugirati na 6000 rpm/10 min/+4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34)
- dobijeni talog bakterija resuspendovati u 10 ml hladnog 0.1 M CaCl₂, inkubirati na ledu 10 min i ponovo centrifugirati pri istim uslovima
- bakterijski talog resuspendovati u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 85% 0.1 M CaCl₂ i 15% glicerola
- kompetentne bakterijske ćelije čuvati u alikvotima od 200 µl na -80°C

Poželjno je izvršiti proveru vijabilnosti kompetentnih ćelija njihovim zasejavanjem na neselektivnu LA podlogu. Takođe, poželjno je isprobati kompetentnost dobijenih bakterija njihovom transformacijom plazmidom koji nosi rezistenciju na antibiotik i zasejavanjem na odgovarajuću selektivnu podlogu.

TRANSFORMACIJA *E. Coli DH5a* KOMPETENTNIH ĆELIJA

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija plazmidom u koji je ukloniran željeni fragment DNK je ključna metoda genetičkog inženjerstva kojom se obezbeđuju velike količine plazmidne DNK potrebne za naredne eksperimente. Bakterije se u ovom postupku, zbog svoje velike reproduktivne sposobnosti, koriste kao recipijenti strane DNK koju replikuju jednako efikasno kao i svoju sopstvenu [Cohen *et al.* 1972].

Protokol:

- kompetentne ćelije (200 μ l) otopiti na ledu i dodati im ligacionu smešu plazmida i DNK fragmenta uz veoma pažljivo, blago mešanje; inkubirati 30 min na ledu
- smešu prebaciti u ugrejanu tubu i inkubirati na 42⁰C/2 min, a zatim na ledu/10 min (izlaganjem smeše temperaturnom šoku propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum, što omogućava efikasnu transformaciju)
- transformisanim bakterijama dodati 800 μ l tečnog, LB medijuma bez antibiotika i omogućiti im rast u aerisanim uslovima na 37⁰C/30-60 min
- oporavak nastaviti dodavanjem 1 ml svežeg LB medijuma sa antibiotikom i rastom u aerisanim uslovima na 37⁰C/1-2 sata
- alikvot bakterijske kulture (20-100 μ l) razmazati po čvrstoj, LA podlozi koja sadrži antibiotik
- rast bakterija odvija se preko noći na 37⁰C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama; s obzirom na selektivnost podloge, samo transformanti (bakterije koje su primile plazmidnu DNK) mogu da izrastu

DETEKCIJA PLAZMIDNOG KONSTRUKTA

Sekvenciranje konstrukata je konačna potvrda da plazmid sadrži željeni DNK insert, kao i da u čitavoj sekvenci ne postoji promena nastala usled eventualne greške u DNK replikaciji. U ovom

radu, sekvenciranje konstrukata je vršeno pomoću prajmera korišćenih za umnožavanje željenog fragmenta za kloniranje.

Nakon postupka transformacije bakterija ligacionom smešom plazmida i DNK fragmenta, na selektivnoj podlozi sa ampicilinom će izrasti samo kolonije transformanta, s obzirom da pCATbasic plazmid nosi gen za rezistenciju na ampicilin. Međutim, u ovako postavljenom eksperimentu, ne može se znati da li plazmid koji je ušao u bakterijsku ćeliju sadrži u sebi fragment koji smo želeli da uklonimo ili je "prazan". Da bi se smanjio broj transformanta koji će se proveravati digestijom restrikcionim enzimima i sekvenciranjem na prisustvo plazmida sa insertom, rađena je preliminarna analiza velikog broja transformanta metodom brze lize.

Brza liza ("lysis gel electrophoresis")

Ovom metodom se u nekoliko koraka, brzo i efikasno, može uočiti postojanje plazmidnih molekula u velikom broju bakterija koje se analiziraju [Barnes 1977].

Protokol:

- dobijene transformante zasaditi na nove petri šolje sa selektivnom podlogom i ostaviti ih da izrastu preko noći na 37⁰C
- u epruvetu sa 25 µl 10 mM EDTA pH=8 sterilnom čačalicom preneti bakterijsku koloniju i vorteksovati
- dodati 25 µl sveže napravljenog 2 x "cracking" pufera (0.2 M NaOH, 0.5% SDS, 0.5 M saharoza)
- smešu inkubirati na 70⁰C/10 min, a zatim postepeno ohladiti na sobnoj temperaturi
- dodati 1.5 µl 4 M KCl i inkubirati 5 min na ledu
- centrifugirati na 13000 rpm/5 min/+4⁰C; u talogu ostaje hromozomska DNK, a u supernatantu plazmidna DNK koja se analizira elektroforezom na 1% agaroznom gelu

Pored transformanata koji se obrađuju ovim postupkom, potrebno je uraditi i brzu lizu kontrolne bakterijske kolonije transformisane "praznim" plazmidom. Poređenjem elektroforetske pokretljivosti plazmida izolovanih iz kontrolnih kolonija i plazmida iz ispitivanih transformanata, identifikovaće se oni koji se kreću sporije od "praznih" plazmida, što znači da sadrže fragment koji smo želeli da ukloniramo. Međutim, plazmidi izolovani brzom lizom nisu dovoljno čisti da bi se digestijom restrikcionim enzimima i sekvenciranjem moglo potvrditi prisustvo inserta. Za dobijanje relativno male količine plazmida koji je dovoljno prečišćen da se na njemu mogu raditi dalje analize koristi se "mini prep" metoda.

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali ("mini prep")

Za dobijanje relativno male količine plazmida zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, korišćena je "mini prep" metoda [Zhou *et al.* 1990].

Protokol:

- sa čvrste selektivne podloge pojedinačnu bakterijsku koloniju inokulisati u 2 ml tečnog, LB medijuma sa antibiotikom i inkubirati preko noći na 37⁰C uz aeraciju
- prekonocnu kulturu prebaciti u epruvetu i centrifugirati na 13000 rpm /5 min
- bakterijski talog resuspendovati vorteksovanjem i suspenziji dodati 300 µl svežeg TENS pufera (1 x TE, 0.1 N NaOH, 0.5% SDS) koji lizira bakterije
- nakon kratkog vorteksovanja dodati 150 µl 3M Na-acetata pH=5.2
- nakon snažnog vorteksovanja centrifugirati na 13000 rpm/2 min
- supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK prebaciti u čistu tubu
- dodati 1 ml hladnog 95% etanola, promešati i centrifugirati pri istim uslovima
- talog isprati hladnim 70% etanolom i nakon centrifugiranja pri istim uslovima osušiti u vakuum centrifugi

- DNK resuspendovati u 30 µl pufera 1 x TE (10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA pH=8) koji sadrži RNK-azu u finalnoj koncentraciji 10 µg/ml
- plazmidnu DNK proveriti elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Ova metoda daje plazmidnu DNK koja je dovoljno čista da bi se konstrukt proverio digestijom restrikcionim enzimima pomoću kojih je PCR fragment i kloniran. Na ovaj način se insert "izbacuje" iz plazmida, što se detektuje elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Ovako izolovana plazmidna DNK nije dovoljno čista da bi željeni konstrukt mogao da se proveriti i sekvenciranjem. Iz transformanata kod kojih smo digestijom restrikcionim enzimima potvrdili prisustvo plazmida sa željenim insertom, plazmidna DNK je ponovo izolovana na maloj skali pomoću QIAprep Spin Miniprep Kit-a (Qiagen).

Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

Za dobijanje male količine plazmidne DNK koja može uspešno da se sekvencira, korišćen je QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Protokol:

- sa čvrste selektivne podloge pojedinačnu bakterijsku koloniju inokulisati u 5 ml tečnog, LB medijuma sa antibiotikom i inkubirati preko noći na 37⁰C uz aeraciju
- prekonocnu kulturu prebaciti u tubu i centrifugirati na 13000 rpm/5 min
- bakterijski talog resuspendovati vorteksovanjem u 250 µl pufera P1
- dodati 250 µl pufera P2 (pufer za lizu) i sadržaj promešati invertovanjem tube 4 do 6 puta
- dodavati 350 µl pufera N3 (pufer za neutralizaciju) i momentalno promešati invertovanjem tube 4 do 6 puta
- smešu centrifugirati na 13000 rpm/10 min

- supernatant presuti u QIAprep kolonu i centrifugirati na 13000 rpm/1 min (adsorpcija plazmidne DNK na kolonu)
- odbaciti filtrat, dodati 0.5 ml pufera PB i centrifugirati na 13000 rpm/1 min (uklanjanje endonukleaza)
- odbaciti filtrat, a DNK isprati dodavanjem 0.75 ml pufera PE i centrifugiranjem na 13000 rpm/1 min
- da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolonu prebaciti u čistu tubu i ponovo centrifugirati na 13000 rpm/1 min
- kolonu prebaciti u čistu tubu i dodati 100 µl pufera EB; inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi 1 min kako bi se povećao prinos DNK
- centrifugiranjem na 13000 rpm/1 min dobija se eluat u kome je rastvorena plazmidna DNK
- koncentraciju i čistoću plazmidne DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

Izolovanje plazmidne DNK na velikoj skali

Za dobijanje velike količine plazmidne DNK dobrog kvaliteta, potrebne za eksperimente transfekcije, korišćen je EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

Protokol:

- sa čvrste selektivne podloge pojedinačnu bakterijsku koloniju inokulisati u 5 ml tečnog, LB medijuma sa antibiotikom i inkubirati preko noći na 37⁰C uz aeraciju (ukoliko bakterijski soj nije dostupan na petri šolji, može se koristiti i mala količina glicerolskog stoka)
- 1 ml prekonocne kulture diluirati u 500 ml selektivnog LB medijuma i inkubirati preko noći na 37⁰C uz aeraciju
- prekonocnu kulturu podeliti na dva dela i prebaciti u sterilne plastične tube od 250 ml

- centrifugirati na 5000 rpm/20 min/+4⁰C (Sorvall centrifuga, rotor GS-3)
- odbaciti supernatant, a bakterijski talog resuspendovati 10 ml pufera P1 (liza bakterijskih ćelija); od ovog koraka pa na dalje, sve se radi na ledu
- dodati 10 ml pufera P2 i promešati invertovanjem tube 4 do 6 puta
- inkubirati na sobnoj temperaturi maksimalno 5 min, a za to vreme pripremiti QIAfilter Cartridge (zatvoriti poklopac na izlazu iz kertridža i kertridž smestiti u odgovarajuću tubu od 50 ml)
- dodati 10 ml pufera P3 ohlađenog na +4⁰C; momentalno i temeljno promešati invertovanjem tube 4 do 6 puta
- lizat sipati u otvor na kertridžu i inkubirati, bez pomeranja, na sobnoj temperaturi 10 min (tokom ovog vremena, nastali precipitati koji sadrže proteine, genomsku DNK i deterdžent će isplivati i na površini rastvora formirati sloj)
- skinuti poklopac sa donjeg dela kertridža i profiltrirati lizat
- u filtrat dodati 2.5 ml ER pufera, izmešati invertovanjem tube 10 puta i inkubirati na ledu 30 minuta (uklanjanje endotoksina)
- za to vreme, pripremiti Qiagen-tip 500 kolonu nanošenjem 10 ml pufera QBT; pustiti da se kolona isprazni pod dejstvom sile gravitacije
- naneti filtrat koji se inkubirao na ledu na kolonu i pustiti da se isprazni pod dejstvom sile gravitacije (vezivanje plazmidne DNK za kolonu)
- DNK isprati od nečistoća dva puta, dodavanjem 30 ml pufera QC; od sledećeg koraka se koristi samo "endotoxin-free" i "pyrogen-free" posuđe (u ovom radu korišćeno je stakleno posuđe pečeno na 180⁰C tokom 12 sati)
- kolonu prebaciti u novu tubu i DNK pomoću gravitacije eluirati sa kolone sa 15 ml pufera QN

- dodati 10.5 ml (0.7 volumena) izopropanola na sobnoj temperaturi, promešati invertovanjem tube i centrifugirati na 9000 rpm/45 min/+4⁰C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34)
- supernatant pažljivo odliti, a DNK talog isprati sa 5 ml 70% etanola i centrifugirati na 9000 rpm/20 min/+4⁰C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34)
- ukloniti supernatant i osušiti talog na sobnoj temperaturi
- DNK talog rastvoriti u 500 µl 1 x TE pufera (10 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA pH=8) ili vode
- koncentraciju i čistoću plazmidne DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

ČUVANJE TRANSFORMANATA

Transformanti su nekoliko nedelja vijabilni na čvrstim, selektivnim LA podlogama, ukoliko su petri šolje zatvorene parafilmom i čuvaju se na +4⁰C okrenute poklopcem na dole.

Za duže čuvanje transformanata, pripremaju se glicerolski stokovi koji sadrže 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture.

Glicerolski stokovi su vijabilni nekoliko godina na -20⁰C i duži niz godina na -80⁰C [Sambrook *et al.* 1989].

USLOVI GAJENJA ĆELIJA U KULTURI

U ovom radu korišćene su 2 permanentne humane ćelijske linije, K562 i HL-60.

K562 (DSMZ br. ACC-10) je permanentna ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije. K562 ćelije su krupne, okruglog oblika i rastu u suspenziji (razmnožavaju se u tečnom medijumu bez lepljenja za podlogu), a po deobi ostaju zajedno formirajući "grozdove". K562 ćelije su gajene u petri šoljama u termostatu sa automatskim protokom 5% CO₂ u vazduhu i na temperaturi od 37⁰C. Korišćen je medijum koji sadrži sve komponente neophodne za neprekidno razmnožavanje

ćelija. Jedan litar ovog medijuma je sadržao: 100 ml 10 x Eagle MEM-a (Torlak), 100 ml fetalnog telećeg seruma (PAA), 28 ml 7.5% NaHCO₃, 10 ml 1 M HEPES-a pH= 7-7.2, 10 ml 3% L-glutamina, 10 ml 100 x neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich), 10 ml antibiotika (penicilin – streptomycin; 5000 U/ml; Sigma-Aldrich).

HL-60 (DSMZ br. ACC-3)) je permanentna ćelijska linija akutne mijeloidne leukemije. HL-60 ćelije su sitne, okruglog oblika i rastu pojedinačno u suspenziji. HL-60 ćelije su gajene u petri šoljama u termostatu sa automatskim protokom 5% CO₂ u vazduhu i na temperaturi od 37⁰C. Medijum za gajenje ćelija je sadržao 90% RPMI 1640 medijuma sa natrijum bikarbonatom i L-glutaminom (PAA) i 10% fetalnog telećeg seruma (PAA).

Zamrzavanje ćelija

Ćelije se zamrzavaju kad su u fazi logaritamskog rasta, ni pre (*lag* faza – neposredno posle pasažiranja, dok se ćelije oporavljaju i neznatno umnožavaju), ni posle (*stacionarna* faza koja se karakteriše sve većim umiranjem ćelija zbog prevelike gustine ćelija u medijumu za rast) [Shannon *et al.* 1973].

Protokol:

- ćelijsku suspenziju prebaciti u sterilnu epruvetu i centrifugirati na 1800 rpm/7 min u kliničkoj centrifugi
- pažljivo ukloniti medijum, a talog ćelija resuspendovati u 1 x PBS puferu pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i centrifugirati pod istim uslovima (ispiranje)
- talog od 2 x 10⁶ K562, odnosno 5 x 10⁶ HL-60 ćelija resuspendovati u 0.5-1 ml medijuma za zamrzavanje i sipati u ohlađene epruvete za zamrzavanje; medijum za zamrzavanje sadrži krioprotektivni agens DMSO (dimetilsulfoksid) i odgovarajući medijum (sa 10% fetalnog telećeg seruma) u odnosu 1:9 (krioprotektivni agens vezuje vodu i tako smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda u ćelijama)

Ćelijska suspenzija se mora zamrznuti polako (temperatura treba da opada $1-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jer se tada preferencijalno stvaraju ekstra-, a ne intracelularni kristali leda, pa ćelije ostaju neoštećene. To se postiže držanjem ćelija prvo na $+4^{\circ}\text{C}$ (1 sat), zatim na -20°C (1 do 16 sati) i konačno na -80°C (16 do 72 sata). Tek tada se ćelije smeštaju u tečni azot (-196°C), gde su hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji na zanemarljivom nivou, i one ostaju vijabilne godinama. Alternativno, ćelije se pre smeštanja u tečni azot mogu smestiti u specijalne kutije direktno na -80°C . Naime, ležista ovih kutija uronjena su u izopropil alkohol koji omogućava postepeno spuštanje temperature unutar kutije.

Odmrzavanje ćelija

Ćelije treba odmrznuti brzo, prenoseći ih iz tečnog azota (-196°C) u topli medijum (37°C). Brzim otapanjem kristalne strukture brzo nestaju i smanjuje se opasnost da probiju ćelijske membrane.

DMSO prisutan u medijumu za zamrzavanje je inertan u medijumu za gajenje ćelija, ali ipak postoji mogućnost da svojim prisustvom dovede do promene njihovih prvobitnih karakteristika. Zbog toga se ćelije ispiraju od medijuma za zamrzavanje centrifugiranjem na 1800 rpm/7 min, a zatim resuspenduju u odgovarajućem medijumu i zasejavaju u petri-šolje.

Potrebno je da prođe izvesno vreme da bi se ćelije oporavile posle odmrzavanja i uspostavile normalni tempo rasta.

Subkultivacija ćelija

Pasažiranje ćelije koje rastu u suspenziji obavlja se na sledeći način:

- medijum sa ćelijama prebaciti u tubu od 10 ml i centrifugirati u kliničkoj centrifugi na 1800 rpm/7 min (u slučaju K562 ćelija, grozdovi nastali pri deobi ćelija su prethodno "razbijani" blagim pipetiranjem, kako bi se oslobodile pojedinačne ćelije)
- ukloniti supernatant, a talog ćelija resuspendovati u 1 ml 1 x PBS pufera pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4)

- izbrojati ćelije i zasejati u odgovarajućem medijumu

K562 ćelije su zasejavane u koncentraciji od 0.2×10^6 ćelija/ml i pasažirane jednom u 2 dana u odnosu 1:2 ili 1:3.

HL-60 ćelije su zasejavane u koncentraciji od 1×10^6 ćelija/ml i pasažirane jednom u 2-3 dana u odnosu 1:2 ili 1:3.

Brojanje ćelija

Ćelije se broje uz pomoć mikroskopa i pločice za brojanje [Meryman 1963; Ristić 1979]. U izradi ovog rada korišćena je Bürker-Türk-ova pločica i sledeća formula za izračunavanje broja ćelija:

br. ćelija na pločici/64 (br. polja u kojima su ćelije brojane) $\times 0.5 =$ br. ćelija u suspenziji $\times 10^6$ /ml.

Da bi brojanje bilo verodostojno, neophodno je dobro resuspendovati ćelije. Mešanjem 100 μ l ćelija iz suspenzije sa istim volumenom 0.1% tripan-plavo boje omogućava se razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svetle, sa zlatnim oreolom.

TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA

Tranzijentna transfekcija K562 ćelija vršena je pomoću Lipofektamina 2000 (Invitrogen).

U ovom radu, ćelije su transfekovane pCAT Bcl2L12 konstruktima, kao i kontrolnim pBLCAT5 vektorom.

pBLCAT5 je reporterski vektor kod koga je ekspresija *CAT* gena pod kontrolom timidin-kinaznog promotora Herpes Simplex virusa. Aktivnost *CAT* enzima u ekstraktima ćelija transfekovanih pBLCAT5 plazmidom je služila za izračunavanje relativnih *CAT* aktivnosti u ekstraktima ćelijama transfekovanih pCAT Bcl2L12 konstruktima.

U svim eksperimentima istovremeno je vršena i kotransfekcija pCH110 plazmidom, koji je služio kao kontrolni vektor za normalizaciju efikasnosti transfekcije.

Protokol za transfekciju preporučen od strane proizvođača je delimično modifikovan kako bi se postigla maksimalna efikasnost transfekcije u datim eksperimentalnim uslovima.

Protokol:

- K562 ćelije dan pre transfekcije zasejati u petri šolje pod normalnim uslovima u Eagle MEM medijumu sa 10% fetalnog telećeg seruma
- sutradan ćelije oprati 1 x PBS puferom pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) i prebrojati ih
- zasejati 2 x 10⁶ ćelija u petri šolje prečnika 3.56 cm (površine 10 cm²) u 2 ml Eagle MEM medijuma bez antibiotika.
- rastvoriti 8 µg plazmidne DNK (6 µg pCAT konstrukta, odnosno kontrolnog pBLCAT5 vektora, i 2 µg pCH110 plazmida) u 250 µl Opti-MEM (GibcoBRL) i blago promešati
- 20 µl Lipofektamina 2000 (Invitrogen) rastvoriti u 250 µl Opti-MEM, blago promešati i inkubirati 5 min na sobnoj temperaturi
- pomešati rastvorenu DNK sa rastvorenim Lipofektaminom
- inkubirati 20 min na sobnoj temperaturi, čime se omogućava formiranje kompleksa između lipofektamina i DNK
- komplekse dodati direktno u šolju sa ćelijama i nežno promešati
- inkubirati ćelije 24 sata/37⁰ u inkubatoru pre testiranja na ekspresiju transgena

PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKATA

Protokol:

- 24 sata nakon transfekcije ćelije dva puta isprati 1 x PBS puferom pH=7.4 od medijuma, i talog ćelija resuspendovati u 1 ml TEN pufera (40 mM Tris-HCl pH=7.4, 1 mM EDTA pH=8, 150 mM NaCl)
- centrifugirati na 13000 rpm/2 min
- ćelijski talog vorteksovanjem resuspendovati u 100 μ l 0.25 M Tris-HCl pH=8
- liziranje ćelija se postiže tokom tri ciklusa naizmeničnog stavljanja ćelija u tečni azot (-196⁰C) i vodeno kupatilo (+37⁰C) uz vorteksovanje nakon svakog koraka
- nakon centrifugiranja na 13000 rpm/5 min/+4⁰C, supernatant alikvotirati u nove tube

Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za CAT esej i β -galaktozidazni esej, ili ih zalediti i čuvati na -80⁰C. Da bi se izbegla degradacija CAT enzima i β -galaktozidaze, uzorak bi trebalo brzo zalediti kratkotrajnom inkubacijom u tečnom azotu, a tek tada skladištiti na -80⁰C.

 β -GALAKTOZIDAZNI ESEJ

β -galaktozidazni esej služi za normalizaciju rezultata CAT eseja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga se prilikom transfekcije ćelija CAT reporterskim vektorom istovremeno vrši i kotransfekcija β -galaktozidaznim reporterskim vektorom (pCH110). Aktivnost enzima β -galaktozidaze sintetisanog u ćeliji je direktno proporcionalna količini pCH110 unetog transfekcijom i meri se pomoću eseja β -galaktozidazne aktivnosti (" β -galactosidase Enzyme Assay System"; Promega).

Protokol:

- uzorku razblaženom u Tris-HCl pH=7.8 dodati isti volumen 2 x Assay pufera koji sadrži 200 mM natrijum fosfatni pufer pH=7.3, 2 mM MgCl₂, 100 mM β -merkaptioetanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid)

- inkubirati na 37⁰C najmanje 30 minuta (tokom ovog vremena β-galaktozidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju)
- izmeriti absorbancu na talasnoj dužini od 420 nm (Microplate reader Multiscan RC, Labsystems)

Određivanje koncentracije β-galaktozidaze (mU) u ispitivanim ćelijskim lizatima vršeno je na osnovu standardne krive koja je dobijena istim postupkom, korišćenjem poznatih razblaženja ovog enzima: 1.5625 mU, 3.125 mU, 6.25 mU, 12.5 mU, 25 mU, 50 mU, i 100 mU.

CAT ELIZA ESEJ

Aktivnost CAT enzima (hloramfenikol acetil-transferaza) je određivana "CAT ELIZA esejom" ("CAT Enzyme Linked Immunosorbent Assay", Roche). CAT ELIZA esej je enzimski imunoesej koji služi za kvantifikaciju hloramfenikol acetil-transferaze (CAT) iz *E. coli* u eukariotskim ćelijama transfekovanim plazmidima koji sadrže *CAT* reporterski gen.

CAT ELIZA esej se bazira na "sendvič" ELIZA principu. Anti-CAT antitelo vezano je za površinu bunarića mikrotitar ploče (Roche kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetil-transferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Primarno antitelo je obeleženo digoksigeninom (anti-CAT-DIG) i specifično se vezuje za hloramfenikol acetil-transferazu. Za njega se vezuje sekundarno antitelo koje je konjugovano sa peroksidazom (anti-DIG-POD). Kvantifikacija hloramfenikol acetil-transferaze obezbeđuje se dodavanjem supstrata peroksidaze (ABTS). Peroksidaza razlaže supstrat dajući obojeni produkt. Apsorbanca uzorka je direktno proporcionalna količini hloramfenikol acetil-transferaze prisutne u uzorku.

Protokol:

- ćelijske ekstrakte pomešati sa "puferom za uzorak" do finalne zapremine od 200 μl, naneti u bunariće na mikrotitar ploči i pokrivene inkubirati na 37⁰C/1 sat
- nakon vezivanja hloramfenikol acetil-transferaze iz uzorka, bunariće pet puta isprati sa po 250 μl pufera za ispiranje

- u bunariće dodati po 200 μ l anti-CAT-DIG antitela i pokriveno inkubirati na 37⁰C/1 sat
- nakon vezivanja primarnog antitela, bunariće pet puta isprati sa po 250 μ l pufera za ispiranje
- u bunariće dodati po 200 μ l anti-DIG-POD antitela i pokriveno inkubirati na 37⁰C/1 sat
- nakon vezivanja sekundarnog antitela, bunariće pet puta isprati sa po 250 μ l pufera za ispiranje
- na kraju u bunariće dodati po 200 μ l supstrata i inkubirati pokriveno do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi
- izmeriti absorbancu na talasnoj dužini 405/492 nm (Microplate reader Multiskan RC, Labsystems)

Koncentracija CAT enzima u ispitivanim ćelijskim lizatima određena je na osnovu standardne krive koja je dobijena istim postupkom, korišćenjem poznatih razblaženja CAT enzima *E coli*: 1.5625 pg, 3.125 pg, 6.25 pg, 12.5 pg, 25 pg, 50 pg, i 100 pg.

Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost β -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti plazmidnih konstrukata su izražene relativno u odnosu na normalizovanu vrednost CAT aktivnosti pBLCAT5 plazmida, i predstavljene su kao srednja vrednost \pm SEM dobijena iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

IZOLACIJA NUKLEARNIH PROTEINA

Za izolaciju nuklearnih proteina iz K562 ćelija u kulturi korišćena je metoda definisana od strane Schreiber *et al.* [Schreiber *et al.* 1989]

Protokol:

- 0.5-1 x 10⁶ ćelija ćelije resuspendovati 1 ml 1 x TBS (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150 mM NaCl) i prebaciti u epruvetu

- nakon kratkog centrifugiranja na 13000 rpm, talog resuspendovati u 400 μ l hladnog pufera A (10 mM HEPES pH=7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) laganim provlačenjem kroz nastavak
- ćelije inkubirati 15 minuta na ledu, a zatim dodati 25 μ l 10% rastvora Nonidet NP-40
- nakon intenzivnog vorteksovanja, homogenat centrifugirati na 13000 rpm/30 sekundi
- talog resuspendovati u 50 μ l hladnog pufera C (20mM HEPES pH7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) i epruvetu snažno protresati 15 min/+4⁰C
- jedarni ekstrakt centrifugirati na 13000 rpm/ 5 min/+4⁰C
- odvaditi supernatant sa proteinima i čuvati ga u alikvotima na -80⁰C.

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NUKLEARNIH PROTEINA

Koncentracija nuklearnih proteina izolovanih iz K562 ćelija određena je Bradford metodom [Bradford 1976].

U smešu finalne zapremine 1 ml stavlja se 10 μ l proteinskog uzorka i 200 μ l Bradford reagensa (Protein Assay Dye Reagent, BioRad). Nakon mešanja, meri se apsorpcije smeše na talasnoj dužini od 595 nm na spektrofotometru.

Koncentracije proteina u uzorku određuje se očitavanjem sa standardne krive, koja se pravi tako što se poznata razblaženja BSA proteina, uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

ANALIZA INTERAKCIJE DNK I NUKLEARNIH PROTEINA

***In silico* analiza potencijalnog promotorskog regiona *Bcl2L12* gena**

Za *in silico* analizu potencijalnog promotorskog regiona *Bcl2L12* gena je korišćen kompjuterski algoritam TFSEARCH, v.1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Program

omogućava identifikaciju sekvenci koje pokazuju visoku korelaciju u odnosu na TFMATRIX bazu podataka (v.3.3) u kojoj su sakupljena okarakterisana mesta vezivanja transkripcionih faktora. Pretraga je bila ograničena na mesta vezivanja transkripcionih faktora prisutnih kod vertebrata i na nivo značajnosti preko 80%.

Analiza direktne interakcije DNK i nuklearnih proteina

U ovom radu analizirana je interakcija nuklearnih proteina izolovanih iz K562 ćelija i dvolančane probe Bcl2L12 +485/+830, sintetisane PCR reakcijom kombinacijom odgovarajućih prajmera (Tabela 10). Kao matrica za PCR amplifikaciju odabranog fragmenata služila je DNK izolovana iz krvi zdrave kontrole. Sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije su bili isti kao u slučaju umnožavanja potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena.

Za proučavanje interakcija promotorskih DNK sekvenci i transkripcionih faktora korišćena je metoda usporene elektroforetske pokretljivosti ("electrophoretic mobility shift assay"; EMSA).

U "supershift" esejima korišćena su anti-Sp1 i anti-GATA-1 antitela, čije su karakterisitke prikazane u Tabeli 9.

Obeležavanje dvolančane probe

Reakcija obeležavanja 5' kraja dvolančane probe vršena je pomoću T4 Polinukleotidne kinaze (Fermentas).

Reakciona smeša finalne zapremine 20 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 10 pmol dvolančane probe
- 1.6 pmol γ -³²P ATP
- 1 x pufer A (Fermentas)
- 10 U T4 Polinukleotidne kinaze (Fermentas)

Reakciona smeša je inkubirana na 37⁰C /30 min, nakon čega je proba prečišćena od neugrađenog aktiviteta propuštanjem kroz G-50 kolonu (GE Healthcare).

Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određen je merenjem na scintilacionom brojaču.

Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti ("EMSA")

Interakcija nuklearnih proteina sa odabranom probom analizirana je modifikovanom standardnom metodom usporene elektroforetske pokretljivosti [Fried and Crothers 1981; Wall *et al.* 1988]. Pri određenim uslovima nuklearni proteini se, ukoliko imaju afinitet za određene sekvence DNK, vezuju za iste, formirajući komplekse koji se u električnom polju kreću sporije nego slobodan DNK fragment. Nakon razdvajanja na 4% poliakrilamidnom gelu, formirani kompleksi se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u poređenju sa onom koju ima slobodan fragment.

Reakciona smeša finalne zapremine 25 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 1-5 ng ³²P obeležene dvolančane probe (specifičnog aktiviteta oko 10000 cpm)
- 10 μ g jedarnih proteina
- 1 x reakcioni pufer (5 mM Tris pH=8.0; 25 mM NaCl; 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA; 50 % glicerol)

Po potrebi, smeši su dodavane i sledeće komponente:

- nespecifični dvolančani kompetitor (20 ng/ μ l Poly(dI-dC):Poly(dI-dC) Pharmacia)
- specifični kompetitor (ista, ali neobeležena dvolančana proba; dodaje se u 50 do 100 x molarnom višku u odnosu na obeleženu probu)
- odgovarajuća antitela (3 μ g po reakciji)

Smeša se priprema na ledu, dok se reakcija vezivanja transkripcionih faktora za DNK probu odvija na 37⁰C/30 min. Nakon isteka tog vremena, reakciona smeša se meša sa 6 μ l boje (0.25%, bromfenol-plavo, 0.25% ksilen-cijanolo, 30% glicerol) i nanosi na 4% poliakrilamidni gel

(akrilamid : N,N-metilenbisakrilamid = 29 : 1, 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8, 0.1% amonijumpersulfat, 0.1% TEMED). Elektroforeza se odvija u 0.5 x TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH=8), pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 55 mA. Poliakrilamidni gel se suši (45 min/75°C) i analizira na fosfoimidžeru (Cyclone, Perkin Elmer) ili autoradiografski.

ODREĐIVANJE STARTA TRANSKRIPCije *Bcl2L12* GENA METODOM ELONGACIJE REVERZNOG PRAJMERA ("PRIMER EXTENSION")

Radioaktivni "primer extension" esej

U radioaktivnom "primer extension" eseju je korišćena totalna RNK izolovana iz K562 ćelija i reverzni prajmer *Bcl2L12* +752 R (Tabela 8).

Protokol:

- 20 µg RNK upariti u vakuum-uparivaču i rastvoriti u 2 µl vode
- dodati 4 µl pufera A (10 mM HEPES pH=7.0; 50 mM KCl) u kome je rastvoreno 2 pmol prajmera
- smešu denaturisati 2 min/90°C, a zatim je lagano ohladiti do 50°C
- dodati 40 U "Ribo-Lock" RNaznog inhibitora (Fermentas) i kratko ohladiti na ledu
- dodati 3 µl pufera M (10 mM HEPES, 50 mM KCl, 30 mM MgCl₂) i inkubirati 20 min na sobnoj temperaturi
- dodati 9 µl RT smeše koja sadrži 50 mM Tris-HCl pH=8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 0.05 mM dTTP, 0.05 mM dGTP, 0.05 mM dATP, 1 µCi [α -³²P] dCTP i 20 U MMLV reverzne transkriptaze (Amersham Pharmacia Biotech) i inkubirati 20 min/37°C

- dodati 2 μ l "Chase" miksa koji sadrži 50 mM Tris-HCl pH=8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) i inkubirati još 20 min/37°C
- dodati 3V hladnog 96% etanola i precipitirati preko noći na -20°C
- sutradan centrifugirati na 13000 rpm/45 min/+4°C, odvaditi supernatant i talog resuspendovati u 5 μ l vode i 5 μ l boje (0.3% bromfenol-plavo, 0.3% ksilen-cijanolo, 10 mM EDTA, 97.5% formamid)
- pre nanošenja na gel, produkt reakcije i radioaktivno obeležen DNK marker denaturisati 5 min/95°C i naglo ohladiti na ledu

Produkt "primer extension" reakcije i 10 bp DNK marker (Invitrogen), prethodno radioaktivno obeležen, se nanose na 6% poliakrilamidni denaturišući gel (akrilamid : N,N-metilenbisakrilamid = 19 : 1, 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8, 0.1% amonijumpersulfat, 0.1% TEMED, 7 M urea). Elektroforeza se odvija u 1 x TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8), pri konstantnom naponu od 1500 V, struji od 30 mA i snazi od 40 W. Nakon završetka elektroforeze, poliakrilamidni gel se suši (45 min/75°C) i analizira na fosfoimidžeru (Cyclone, Perkin Elmer) ili autoradiografski. Dužina "primer extension" produkta se određuje poređenjem sa DNK markerom, kao i sa produktima reakcije sekvenciranja koja je urađena istim reverznim prajmerom kao i "primer extension" reakcija.

Neradioaktivni "primer extension" esej

U neradioaktivnom "primer extension" esejju je korišćena totalna RNK izolovana iz K562 ćelija koje su transfekovane pCAT Bcl2L12 +345/+830 konstruktom, i reverzni prajmeri VIC-CAT R i CAT R (Tabela 7).

Protokol:

- smešu finalnog volumena 11 μ l koja sadrži 2 μ g RNK i 20 pmol fluorescentno obeleženog prajmera inkubirati 5 min/70°C, a zatim ohladiti na ledu

- dodati smešu finalnog volumena 9 μ l koja sadrži 4 μ l 5 x RT pufera (Fermentas) , 20 U "Ribo-Lock" RNaznog inhibitora (Fermentas), 2 μ l dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 60 min/42°C, a zatim 10 min/70°C
- produkt RT reakcije prečistiti na kolonici (QIAquick PCR Purification kit; Qiagen) i, po potrebi, koncentrovati
- u 10 μ l prečišćenog RT produkta dodati 20 μ l Hi-Di formamida i 0.25 μ l Gene Scan-500 LIZ Size Standarda
- celokupnu količinu naneti u bunarić na mikrotitarskoj ploči

Produkt "primer extension" reakcije se analizira kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Dužina "primer extension" produkta se određuje poređenjem sa markerom, uz pomoć programa Gene Mapper v.4.0 [<http://www.appliedbiosystems.com>].

Dužina "primer extension" produkta se može odrediti i na drugi način, nanošenjem RT reakcione smeše u isti bunarić na mikrotitarskoj ploči sa produktima reakcije sekvenciranja koja je urađena sa istim, ali neobeležnim reverznim prajmerom. Ova smeša je analizirana kapilarnom elektroforezom, a dobijeni podaci obrađeni programom Sequencing Analysis v.5.2 [<http://www.appliedbiosystems.com>].

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobijeni rezultati su obrađeni statističkim testovima i prikazani u tabelama i graficima, uz propratnu diskusiju.

Od deskriptivnih statističkih parametara korišćeni su: srednja vrednost i standardna greška ("standard error mean"; SEM), raspon vrednosti promenljivih (minimum, maksimum) i medijana vrednosti.

Za istraživanje jačine veze između dve neprekidne promenljive korišćen je metod Spirmanove korelacije rangova.

Za ispitivanje veze između kategorijskih promenljivih korišćeni su neparametarski testovi: Hi-kvadrat test nezavisnosti (χ^2 - test) i Fišerov egzaktni test.

Od statističkih testova za poređenje grupa korišćeni su neparametarski testovi: t-test i Man-Vitnijev test (Test sume rangova).

Za ocenu sposobnosti testa da pravilno klasifikuje ispitanike korišćena je ROC ("receiver operating characteristic") analiza.

Za analizu dužine preživljavanja korišćena je Kaplan-Majerova metoda, kao i Log Rank test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama.

Svi statistički testovi su posmatrani na nivou značajnosti nulte hipoteze od $p < 0.05$. Statistička analiza je urađena na PC računaru primenom SigmaStat 3.5 i SigmaPlot 11.0 statističkih paketa.

REZULTATI

ANALIZA *IGHV-IGHD-IGHJ* REARANŽMANA

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je klinički heterogeno oboljenje kod koga su tok bolesti, potrebe za terapijom i dužina preživljavanja izuzetno varijabilni među pacijentima. Do danas je otkriveno nekoliko molekularnih markera asociranih sa tokom i prognozom HLL. Status somatskih hipermutacija rearanžiranih gena za varijabilni region teških lanaca imunoglobulina (*IGHV*) se pokazao kao najinformativniji prognostički marker, koji je stabilan tokom vremena i može se odrediti u bilo kom trenutku bolesti. Na osnovu *IGHV* mutacionog statusa, HLL pacijenti se mogu podeliti u 2 grupe; pacijenti bez ili sa malim procentom *IGHV* mutacija (N-HLL) obično imaju mnogo agresivniji oblik bolesti i lošiju prognozu od pacijenata sa mutiranim *IGHV* (M-HLL). Referentna ("cut-off") vrednost za razlikovanje mutiranih od nemutiranih rearanžmana je 98% identičnosti sekvence rearanžiranog i nerearanžiranog ("germline") *IGHV* gena.

Ekspresija skoro identičnih, "stereotipnih" B-ćelijskih receptora (BcR) kod nekih pacijenata ukazuje na ulogu specifičnih antigena u patogenezi HLL. Pored toga, primećene su populacione razlike u *IGHV-IGHD-IGHJ* konfiguraciji *IGH* rearanžmana koje verovatno reflektuju uticaj genetičkih i /ili sredinskih faktora na *IGHV-IGHD-IGHJ* genski repertoar leukemičnih B ćelija.

U ovom radu analiziran je mutacioni status i genski repertoar varijabilnog regiona teških lanaca imunoglobulina kod 85 pacijenata obolelih od HLL, kao i njihova asocijacija sa odabranim kliničkim karakteristikama (Tabela 12) i molekularnim prognostičkim markerima. Klonalni *IGH* rearanžmani su umnoženi RT-PCR metodom, sekvencirani i dobijene sekvence analizirane u IMGT/V-QUEST softveru (<http://www.imgt.org>).

Tabela 12. Kliničke karakteristike HLL pacijenata

ukupan broj pacijenata	85
pol (muški/ženski), br.	62/23
starost (god.), medijana (opseg)	65 (40-86)
dužina praćenja pacijenata (mes.), medijana (opseg)	36.5 (19-84)
Bine stadijum (n=68), br.(%)	
A	39 (57.4%)
B	9 (13.2%)
C	20 (29.4%)
tok bolesti (n=68), br.(%)	
progresivan	39 (57.4%)
indolentan	29 (42.6%)
primena terapije (n=68), br.(%)	
da	41 (60.3%)
ne	27 (39.7%)
TTT (mes.), medijana (opseg)	17 (0.5-48)
CD38 status (n=38), br.(%)	
pozitivan (≥ 30 %)	14 (36.8%)
negativan (< 30 %)	24 (63.2%)

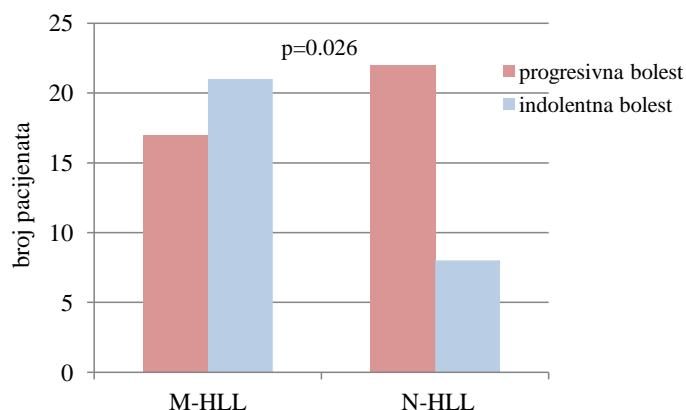
Napomena:

- n = broj pacijenata kod kojih je evidentiran dati klinički parametar
- TTT = vreme od postavljanja dijagnoze do prve terapije ("time to treatment")

***IGHV* mutacioni status; asocijacija sa kliničkim parametrima**

Analiza mutacionog statusa rearanžiranih *IGHV* gena je pokazala da 47 pacijenata (55.3%) pripada M-HLL podtipu, a 38 pacijenata (44.7%) N-HLL podtipu hronične limfocitne leukemije. U mutiranim rearanžmanima, procenat *IGHV* mutacija je varirao u opsegu od 2.08% do 13.89% (medijana=5.9%).

IGHV mutacioni status je pokazao jaku asocijaciju sa tokom bolesti. Među M-HLL pacijentima, kod 44.7% je bolest pokazivala progresivni tok, dok je u N-HLL podtipu progresivni tok bolesti imalo čak 73.3% pacijenata (Fišerov egzaktni test; $p=0.026$) (Slika 16).

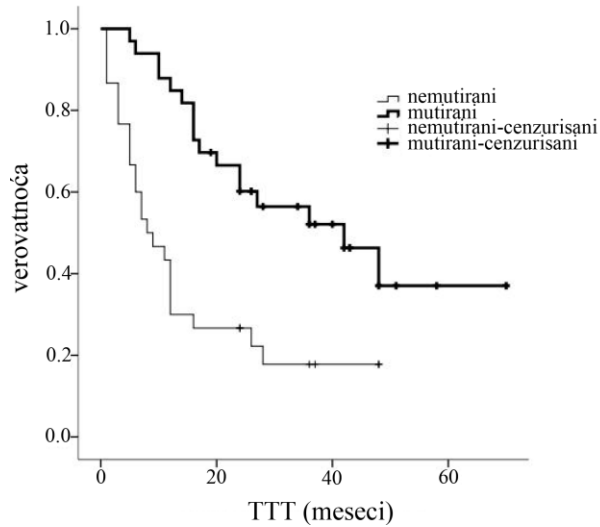


Slika 16. Grafički prikaz raspodele pacijenata sa različitim tokom bolesti u odnosu na *IGHV* mutacioni status

Starost pacijenata pri postavljanju dijagnoze i pol nisu pokazali značajnu asocijaciju kako sa *IGHV* mutacionim statusom, tako ni sa tokom bolesti.

Distribucija kliničkih Bine stadijuma je bila statistički značajno različita u M-HLL (55.3% stadijum A; 25.5% stadijumi B i C) i N-HLL (34.2% stadijum A; 44.7% stadijumi B i C) grupi pacijenata (Fišerov egzaktni test; $p=0.05$).

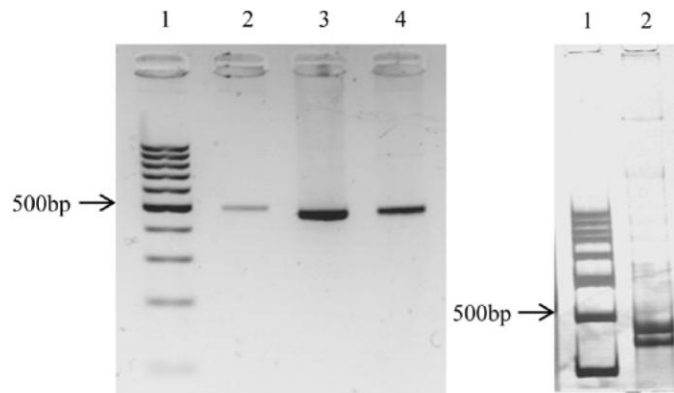
Od parametara koji pokazuju progresiju bolesti, u ovom radu je analizirano vreme od postavljanja dijagnoze do prve terapije ("time to treatment"; TTT). Poređenje medijane TTT kod M-HLL (42 meseca) i N-HLL (8 meseci) pacijenata je pokazalo da je TTT značajno duže kod nosilaca mutiranih *IGH* rearanžmana (log-rank test; $p<0.001$) (Slika 17). Značajno duže TTT kod mutiranih u odnosu na nemutirane slučajeve pokazano je i kod pacijenata u Bine A stadijumu (48 i 12 meseci; $p=0.01$) i Bine B stadijumu (27 i 3 meseca; $p=0.02$), dok kod pacijenata u Bine C stadijumu ova razlika nije bila statistički značajna.



Slika 17. Kaplan-Majer analiza vremena od postavljanja dijagnoze do prve terapije (TTT) kod M-HLL (n=33) i N-HLL (n=30) pacijenata (log-rank test; $p < 0.001$)

Mutacioni status i *IGHV-IGHD-IGHJ* genski repertoar

RT-PCR metodom je umnoženo ukupno 88 alela, s obzirom da su 3 pacijenta (3.5%) ekspimirala bialelske *IGH* rearanžmane (Slika 18). U sva tri bialelska slučaja, oba alela su bila istog mutacionog statusa (mutirani). Kod dva pacijenta oba rearanžmana su bila produktivna, dok je treći pacijent ekspimirao jedan produktivni i jedan neproduktivni rearanžman. To je ujedno bio i jedini neproduktivni rearanžman detektovan u celoj grupi pacijenata. Konfiguracije svih analiziranih *IGH* rearanžmana su navedene u Tabeli 13.



Slika 18. Produkti amplifikacije *IGH* rearanžmana multipleks RT-PCR metodom
Levo: 1 – 100bp DNK marker; 2-4 – klonalni *IGH* rearanžmani tri HLL pacijenta (elektroforeza na 4% agaroznom gelu)
Desno: 1 – 100bp DNK marker; 2 – bialelski rearanžman (elektroforeza na 8% poliakrilamidnom gelu)

Tabela 13. Rezultati IMGT/V-QUEST analize *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana HLL pacijenata

pacijent	<i>IGHV</i> gen	% identi- čnosti	mutacioni status	<i>IGHD</i> gen	okvir čitanja <i>IGHD</i> gena	<i>IGHJ</i> gen	funkcio- nalnost	dužina VH CDR3	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca
1	<i>IGHV1-3*01</i>	92.7	M	<i>IGHD3-3*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	10	CARDFQWGIDFW
2	<i>IGHV3-23*01</i>	94.39	M	<i>IGHD1-1*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	14	CARLEDQERPTGTTFW
3	<i>IGHV3-48*01</i>	95.49	M	<i>IGHD6-13*01</i>	1	<i>IGHJ5*01</i>	IF	9	CAMGEYRTSFW
4	<i>IGHV3-30*03</i>	95.49	M	<i>IGHD1-20*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	18	CAKAVSDIPRDYQYFGMDVW
5	<i>IGHV3-48*01</i>	98.26	N	<i>IGHD2-2*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	14	CATDIVVVPVAVTTDYW
6	<i>IGHV1-2*04</i>	95.49	M	<i>IGHD1-7*01</i>	1	<i>IGHJ3*01</i>	IF	13	CARGLPGAPGAFDVW
7	<i>IGHV3-48*03</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	21	CARDYDFWSGYYSYYYYYGMDVW
8	<i>IGHV1-2*02</i>	95.14	M	<i>IGHD3-22*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	12	CARDGGSKGPITWW
	<i>IGHV3-30*03</i>	97.57	M	<i>IGHD6-13*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	16	CANGVYSSNWDAAAGFDYW
9	<i>IGHV4-39*01</i>	97.9	M	<i>IGHD4-23*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	11	CAEATSGDYVGLW
	<i>IGHV3-48*03</i>	97.6	M	<i>IGHD2-2*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	OF	/	CAR*TSGIVVVPAMG*##DYW
10	<i>IGHV1-3*01</i>	93.06	M	<i>IGHD6-19*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	16	CARGIAVAGTSLHYFDYW
11	<i>IGHV1-46*01</i>	99.65	N	<i>IGHD2-2*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	21	CARRYCSSTSCYYWSYYYGMDVW
12	<i>IGHV4-34*01</i>	97.89	M	<i>IGHD5-5*01</i>	1	<i>IGHJ6*02</i>	IF	20	CARDYPDTADIRRYYYYGMDVW
13	<i>IGHV3-72*01</i>	91.5	M	<i>IGHD4-23*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	16	CVRVDYGGDSAGHYSYDW
14	<i>IGHV3-15*01</i>	100	N	<i>IGHD2-2*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	24	CTTDPTNEIVVPAAMYYYYYGMDVW
15	<i>IGHV3-33*01</i>	93.06	M	<i>IGHD2-21*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	18	CARDRALCGDCPNRYFDYW
16	<i>IGHV1-69*01</i>	91.32	M	<i>IGHD5-24*01</i>	1	<i>IGHJ3*02</i>	IF	17	CVRAGEVAAMGGNNAFDIW

pacijent	<i>IGHV</i> gen	% identičnosti	mutacioni status	<i>IGHD</i> gen	okvir čitanja <i>IGHD</i> gena	<i>IGHJ</i> gen	funkcionalnost	dužina VH CDR3	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca
17	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD2-15*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	25	CARAKGDIVVVVAATRSEYYYYGMDVW
18	<i>IGHV3-33*01</i>	89.24	M	<i>IGHD2-15*01</i>	2	<i>IGHJ5*02</i>	IF	12	CATNSLPGSGPSDW
19	<i>IGHV3-30*03</i>	89.82	M	<i>IGHD5-5*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	17	CVKGDGHIYGSTWWYFDYW
20	<i>IGHV3-23*01</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ6*03</i>	IF	25	CAKETDYDFWSGYYEGPIYYYYYMDVW
22	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD2-2*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	22	CARDPDIVVVPAAMYYYYYGMDVW
23	<i>IGHV5-51*03</i>	97.19	M	<i>IGHD1-1*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	18	CAKHASYNDNWYSAKYPENW
24	<i>IGHV3-23*01</i>	86.11	M	<i>IGHD1-1*01</i>	1	<i>IGHJ3*02</i>	IF	14	CARPTLSQGGDAFDIW
25	<i>IGHV4-b*02</i>	90.64	M	<i>IGHD3-16*02</i>	3	<i>IGHJ5*02</i>	IF	21	CARANSGRAVPVTLNGLNWFDPW
27	<i>IGHV1-18*01</i>	100	N	<i>IGHD3-10*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	13	CARLGWYGEYYFDYW
28	<i>IGHV4-4*02</i>	100	N	<i>IGHD4-17*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	16	CASKGVVDYGDYAALFDYW
29	<i>IGHV3-11*01</i>	100	N	<i>IGHD3-10*01</i>	1	<i>IGHJ6*03</i>	IF	24	CARDSLWFGEWLWLGSGPYYYMDVW
30	<i>IGHV1-2*02</i>	100	N	<i>IGHD6-19*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	13	CARGQWLVLQFDYW
31	<i>IGHV3-21*01</i>	98.61	N	<i>IGHD3-10*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	9	CASDRDGMDVW
32	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	23	CARGCPSIFGVVIRGFDYYGMDVW
34	<i>IGHV3-64*02</i>	99	N	<i>IGHD3-9*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	21	CARSRENYDILTGYFTYYGMDVW
35	<i>IGHV1-2*02</i>	100	N	<i>IGHD6-19*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	14	CARGQWLHLVYYFDYW
36	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD3-16*02</i>	2	<i>IGHJ3*02</i>	IF	21	CARGGDYDYVWGSYRPNDAFDIW
38	<i>IGHV3-9*01</i>	100	N	<i>IGHD3-16*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	27	CAKDKGYDYVWGSYLEKRWYYYYYGMDVW
39	<i>IGHV3-9*01</i>	95.8	M	<i>IGHD7-27*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	12	CVKASSTGGHYDYW

pacijent	<i>IGHV</i> gen	% identičnosti	mutacioni status	<i>IGHD</i> gen	okvir čitanja <i>IGHD</i> gena	<i>IGHJ</i> gen	funkcionalnost	dužina VH CDR3	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca
40	<i>IGHV1-18*01</i>	99.7	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ3*02</i>	IF	25	CARDTQDGYDFWSGYYSHPDAFDIW
41	<i>IGHV3-23*01</i>	100	N	<i>IGHD4-23*01</i>	1	<i>IGHJ6*02</i>	IF	20	CAKGEERLRWDYYYYYGMVDVW
42	<i>IGHV4-34*01</i>	94.04	M	<i>IGHD1-14*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	20	CARSYPESPTLRRYYYYGMDLW
43	<i>IGHV1-2*02</i>	100	N	<i>IGHD6-19*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	21	CARSGGSSSQWLVPDGGYFDYW
44	<i>IGHV3-33*03</i>	94.44	M	<i>IGHD1-7*01</i>	3	<i>IGHJ5*01</i>	IF	14	CARDTWNGWYYCYYYC
45	<i>IGHV3-23*04</i>	95.49	M	<i>IGHD2-21*01</i>	2	<i>IGHJ4*01</i>	IF	15	CAKDAEDGGDCDYYYC
46	<i>IGHV3-20*01</i>	99.65	N	<i>IGHD3-22*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	23	CARNAYYYDSSGYWRSYYGMDVW
47	<i>IGHV3-48*03</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	21	CARDYDFWSGYYSYYYYGMDVW
49	<i>IGHV3-49*05</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	26	CTRIIDELYDFWSGYFKPPYYGMDVW
50	<i>IGHV3-33*01(*04)</i>	90.28	M	<i>IGHD3-16*01</i>	3	<i>IGHJ5*02</i>	IF	16	CVRWALYATDEGDWFDPW
52	<i>IGHV2-5*10</i>	96.91	M	<i>IGHD3-22*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	20	CAHARRNGRHCNGFCYTFDYW
53	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD2-2*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	22	CAREQPDIVVPAAVGYYYGMDVW
54	<i>IGHV4-39*01</i>	100	N	<i>IGHD3-22*01</i>	2	<i>IGHJ3*02</i>	IF	28	CARHGRHNTVYYYYDSSGYWGNNAFDIW
55	<i>IGHV6-1*01(*02)</i>	87.21	M	<i>IGHD3-10*02</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	13	CARDDLGVGYPLDYW
56	<i>IGHV4-4*02</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ3*02</i>	IF	23	CARVGPPSDFWSGYRGLDAFDIW
58	<i>IGHV3-30*03(*18)</i>	94.79	M	<i>IGHD4-23*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	19	CAKVGLSGNFEDYKYYGMDVW
59	<i>IGHV4-39*07</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ5*02</i>	IF	18	CARDRPPYDFWSGMWFDPW
60	<i>IGHV3-23*04</i>	97.92	M	<i>IGHD1-26*01</i>	1	<i>IGHJ4*03</i>	IF	15	CAKDAGAAPTSGFGDYW
61	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD3-16*02</i>	2	<i>IGHJ3*02</i>	IF	21	CARGGFYDYVWGSYRPNAFDIW

pacijent	<i>IGHV</i> gen	% identičnosti	mutacioni status	<i>IGHD</i> gen	okvir čitanja <i>IGHD</i> gena	<i>IGHJ</i> gen	funkcionalnost	dužina VH CDR3	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca
62	<i>IGHV3-30-3*01</i>	99.65	N	<i>IGHD6-6*01</i>	1	<i>IGHJ6*02</i>	IF	18	CARDWVYSSSGTSSYYGMDVW
63	<i>IGHV3-21*01</i>	94.1	M	<i>IGHD2-15*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i> (*03)	IF	16	CARDPGDCSDGSCYAPLW
65	<i>IGHV1-18*01</i>	99.31	N	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	15	CAREDQYYDFWSGYFYW
66	<i>IGHV3-23*04</i>	96.53	M	<i>IGHD2-15*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	18	CAKGQAYCSGGSCYPSFDYW
67	<i>IGHV4-61*08</i>	92.78	M	<i>IGHD4-23*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	12	CARYSGGNDDMGYW
	<i>IGHV3-23*04</i>	93.75	M	<i>IGHD5-24*01</i>	2	<i>IGHJ3*02</i>	IF	15	CAKERERWELSDAFDIW
79	<i>IGHV3-49*05</i>	91.5	M	<i>IGHD4-23*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	11	CTRDFGGNSPDYW
89	<i>IGHV3-23*01</i>	94.1	M	<i>IGHD3-16*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	16	CAKCMMSVGYYYYGMDVW
102	<i>IGHV3-7*01</i>	87.5	M	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	19	CARAVHDFWSGYSSHFYFDYW
103	<i>IGHV3-23*01</i>	97.22	M	<i>IGHD2-21*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	18	CAKKGAGPPSGFDYWDHG
104	<i>IGHV3-30-3*01</i>	91.67	M	<i>IGHD6-19*01</i>	1	<i>IGHJ3*02</i>	IF	15	CAKRRSSGRSPDAFDIW
105	<i>IGHV1-18*01</i>	99.65	N	<i>IGHD3-16*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	25	CAREDNQFGIMITFGGVIEGLGGMDVW
106	<i>IGHV3-23*04</i>	94.1	M	<i>IGHD5-12*01</i>	3	<i>IGHJ5*01</i>	IF	15	CAKDEKHNDGGYGSYYC
107	<i>IGHV3-33*01</i>	91.32	M	<i>IGHD2-8*02</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	14	CAREPGGAHDHLFDYW
108	<i>IGHV3-23*04</i>	94.79	M	<i>IGHD5-24*01</i>	3	<i>IGHJ4*01</i> (*02)	IF	14	CAKDPYNNDGYYYYYC
109	<i>IGHV4-30-4*04</i>	100	N	<i>IGHD3-16*01</i>	3	<i>IGHJ6*02</i>	IF	19	CARSIQRIPLVDYYYYGMDVW
112	<i>IGHV3-33*01</i>	94.79	M	<i>IGHD2-2*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	17	CARDFCSTTCFAPNYFDYW
113	<i>IGHV3-33*01</i>	94.1	M	<i>IGHD6-19*01</i>	1	<i>IGHJ5*02</i>	IF	15	CVRNGGSEWSHNWFDPW
114	<i>IGHV3-30*03(*18)</i>	90.28	M	<i>IGHD3-22*01</i>	1	<i>IGHJ4*01</i> (*02)	IF	14	CAKDYAWSLRDAPDYW

pacijent	<i>IGHV</i> gen	% identičnosti	mutacioni status	<i>IGHD</i> gen	okvir čitanja <i>IGHD</i> gena	<i>IGHJ</i> gen	funkcionalnost	dužina VH CDR3	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca
115	<i>IGHV1-2*04</i>	95.83	M	<i>IGHD1-26*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	13	CAREETGVLPNFDYW
116	<i>IGHV3-23*01</i>	88.19	M	<i>IGHD3-16*01</i>	2	<i>IGHJ5*02</i>	IF	16	CATSRENHALAKGWFDPW
117	<i>IGHV5-51*03</i>	98.61	N	<i>IGHD3-22*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	18	CARQYFLDTSSYFSPHYDSW
118	<i>IGHV3-74*01</i>	99.65	N	<i>IGHD3-16*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	12	CAHKSLWAGYFDYW
119	<i>IGHV3-74*01</i>	97.57	M	<i>IGHD3-3*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	17	CVRGQWTASSRGYSYGDYW
120	<i>IGHV3-7*01</i>	92.71	M	<i>IGHD6-19*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	11	CVRGGWGRPIDHW
121	<i>IGHV4-34*02</i>	92.28	M	<i>IGHD2-2*01</i>	2	<i>IGHJ5*02</i>	IF	12	CAGIRIPRNWLDPW
123	<i>IGHV3-30-3*01</i>	96.18	M	<i>IGHD2-15*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	15	CAKDPEAGGGSDYYDYC
124	<i>IGHV1-18*01</i>	94.79	M	/	/	<i>IGHJ4*03</i>	IF	14	CARDPPGDGTSDYCYH
127	<i>IGHV1-69*06</i>	100	N	<i>IGHD2-2*01</i>	2	<i>IGHJ4*02</i>	IF	22	CARAICSSTSCYVWDNWNYYFFDYW
128	<i>IGHV3-30-3*01</i>	100	N	<i>IGHD3-3*01</i>	1	<i>IGHJ4*02</i>	IF	19	CAREVLRFLWLLSGGYFDYW
130	<i>IGHV1-69*01</i>	100	N	<i>IGHD2-2*01</i>	2	<i>IGHJ6*02</i>	IF	21	CASPPLCSSTSCYYYYYYGMDVW
131	<i>IGHV1-3*01</i>	100	N	<i>IGHD6-19*01</i>	3	<i>IGHJ4*02</i>	IF	13	CARVQWLVLAHFDYW

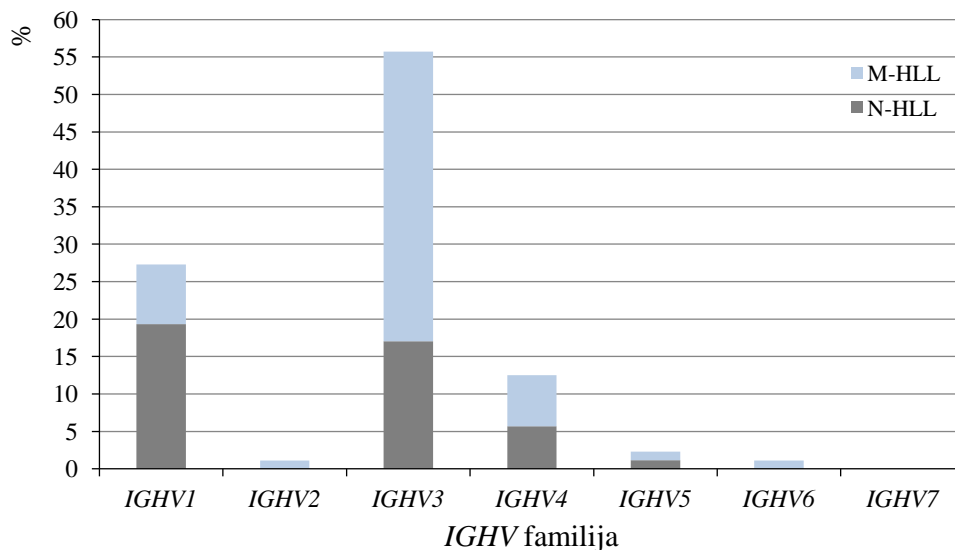
Napomena:

- M = mutiran; N = nemutiran
- broj posle * u nazivu gena označava alel datog gena
- IF = produktivan rearanžman ("in frame"); OF = neproduktivan rearanžman ("out of frame")
- kolona "dužina VH CDR3" se odnosi na broj amino-kiselina u okviru VH CDR3
- * = stop kodon; # = "frameshift" (amino-kiselinska sekvenca)

IGHV geni

U analiziranim rearanžmanima su sa najvećom frekvencom bili zastupljeni geni *IGHV3* familije (55.7%), a zatim *IGHV1* (27.3%), *IGHV4* (12.5%), *IGHV5* (2.3%), *IGHV2* (1.1%) i *IGHV6* (1.1%) geni. Geni *IGHV7* familije nisu detektovani ni u jednom rearanžmanu.

Analiza mutacionog statusa je pokazala da su geni *IGHV3* familije eksprimirani predominantno u mutiranim rearanžmanima (69.4%) (Fišerov egzaktni test; $p=0.01$), nasuprot *IGHV1* genima koji su bili predominantno nemutirani (70.8%) (Fišerov egzaktni test; $p=0.002$). Geni *IGHV4* familije su detektovani u mutiranim i nemutiranim rearanžmanima sa sličnom učestalošću (54.5% i 45.5%) (Slika 19).

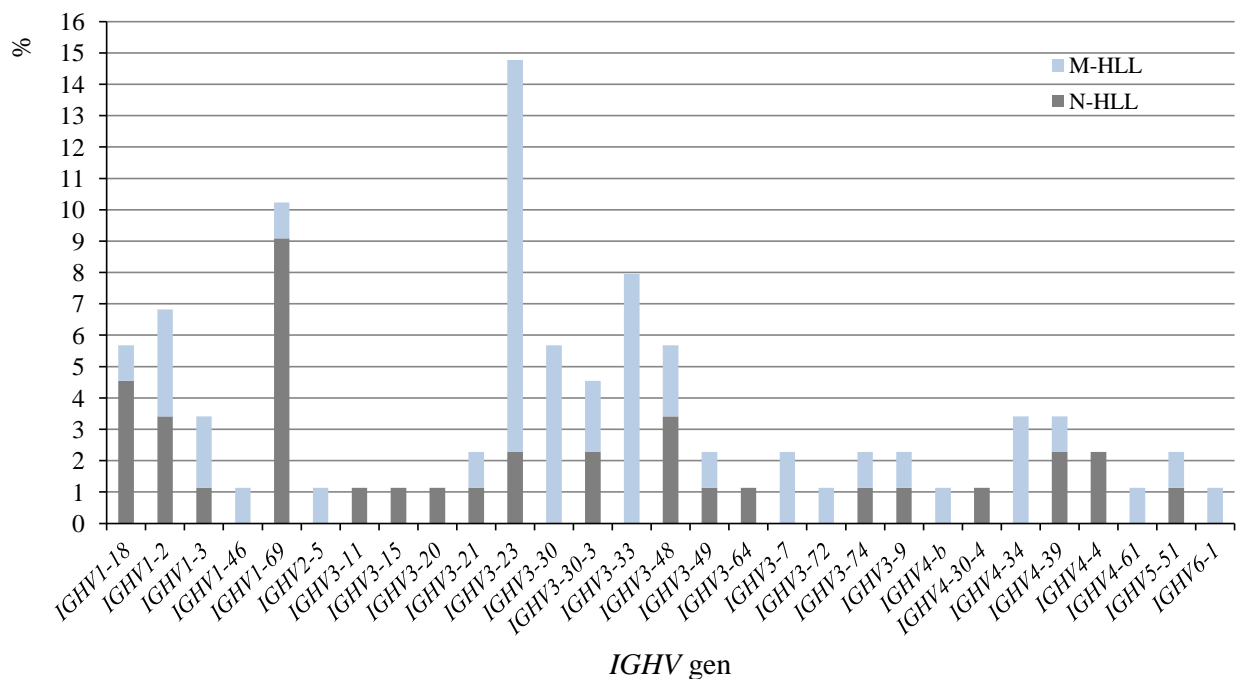


Slika 19. Relativne frekvence *IGHV* familija u mutiranim i nemutiranim rearanžmanima

Frekvence pojedinačnih *IGHV* familija nisu bile statistički značajno različite kod pacijenata sa različitim tokom bolesti.

Mutirani *IGHV3* rearanžmani su bili predominantno eksprimirani u grupi pacijenata sa indolentnom bolešću, dok su nemutirani *IGHV3* rearanžmani pokazali veću frekvencu među pacijentima sa progresivnom bolešću (Fišerov egzaktni test; $p=0.016$). U slučaju *IGHV1* i *IGHV4* familije nije primećena asocijacija između mutacionog statusa i toka bolesti.

U 88 analiziranih *IGH* alela identifikovano je ukupno 29 različitih *IGHV* gena, od kojih je 7 bilo prisutno u 56.9% rearanžmana. Najčešće eksprimirani *IGHV* geni su bili: *IGHV3-23* (14.8%), *IGHV1-69* (10.2%), *IGHV3-33* (8%), *IGHV1-2* (6.8%), *IGHV1-18* (5.7%), *IGHV3-30* (5.7%) i *IGHV3-48* (5.7%) (Slika 20).



Slika 20. Relativne frekvence *IGHV* gena u mutiranim i nemutiranim rearanžmanima

IGHV3-23 je bio najčešće eksprimiran od svih gena i detektovan je u 14.8% svih rearanžmana, kao i u 26.5% *IGHV3* rearanžmana. Njegova distribucija između mutirane (84.6%) i nemutirane forme (15.4%) je bila statistički značajno različita od distribucije drugih *IGHV* gena (Fišerov egzaktni test; $p=0.035$), ali ne i od distribucije ostalih *IGHV3* gena. Pored toga, *IGHV3-23* je bio preferencijalno eksprimiran kod pacijenata sa indolentnom u odnosu na pacijente sa progresivnom bolešću, i to značajno češće od svih drugih *IGHV* gena (Fišerov egzaktni test; $p=0.018$), kao i ostalih *IGHV3* gena (Fišerov egzaktni test; $p=0.017$).

IGHV3-33 je detektovan u 14.3% *IGHV3* rearanžmana, isključivo u mutiranoj formi. Takva njegova distribucija između mutirane i nemutirane forme je bila statistički značajno različita od distribucije svih drugih *IGHV* gena (Fišerov egzaktni test; $p=0.018$), ali ne i ostalih *IGHV3* gena.

Od članova *IGHVI* familije, *IGHVI-69* je bio najčešće eksprimiran i prisutan u 37.5% *IGHVI* rearanžmana. Samo 1 od 9 detektovanih rearanžmana sa *IGHVI-69* genom je bio mutiran, dok je u preostalih 8 rearanžmana *IGHVI-69* pokazao 100% identičnosti sa "germline" sekvencom. Njegova ekspresija u nemutiranoj formi (88.9%) je bila statistički značajno češća od ekspresije svih drugih *IGHV* gena (Fišerov egzaktni test; $p=0.005$), ali ne i od ostalih *IGHVI* gena koji se preferencijalno eksprimiraju u nemutiranim rearanžmanima. Iako je *IGHVI-69* bio češće eksprimiran kod pacijenata sa progresivnom bolešću, asocijacija sa tokom bolesti nije dostigla statističku značajnost.

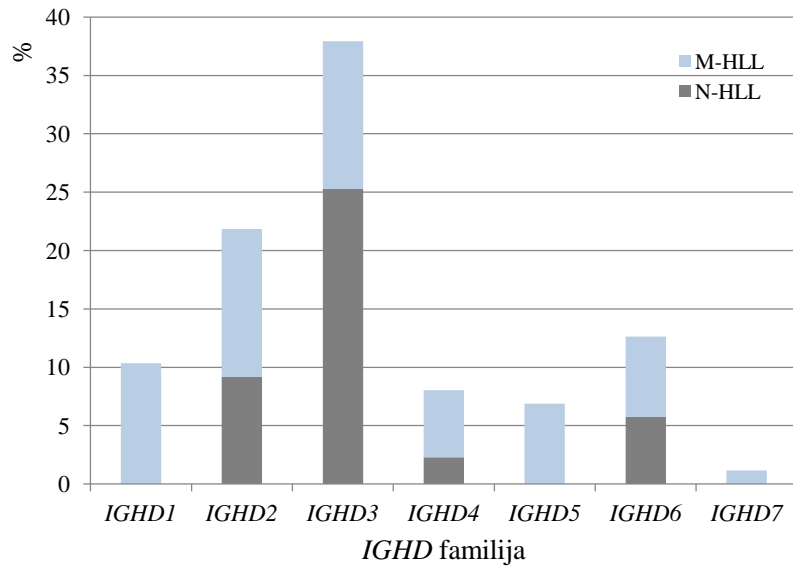
IGHVI-18 je takođe bio češće eksprimiran u nemutiranoj nego u mutiranoj formi (80% i 20%), ali ovakva njegova distribucija nije bila značajno različita od distribucije ostalih *IGHVI* gena.

Ostali najčešće eksprimirani *IGHV* geni nisu pokazali preferencijalnu ekspresiju u mutiranim odnosno nemutiranim rearanžmanima, kao ni u progresivnoj odnosno indolentnoj bolesti.

Najčešće eksprimirani geni *IGHV4* familije su bili *IGHV4-34*, *IGHV4-39* i *IGHV4-4*, detektovani u 27.3%, 27.3% i 18.2% *IGHV4* rearanžmana. *IGHV4-4* je bio eksprimiran isključivo u nemutiranoj formi, za razliku od *IGHV4-34* koji je bio isključivo mutiran. U svim nemutiranim rearanžmanima, *IGHV4* geni su pokazali 100% identičnosti sa "germline" sekvencama.

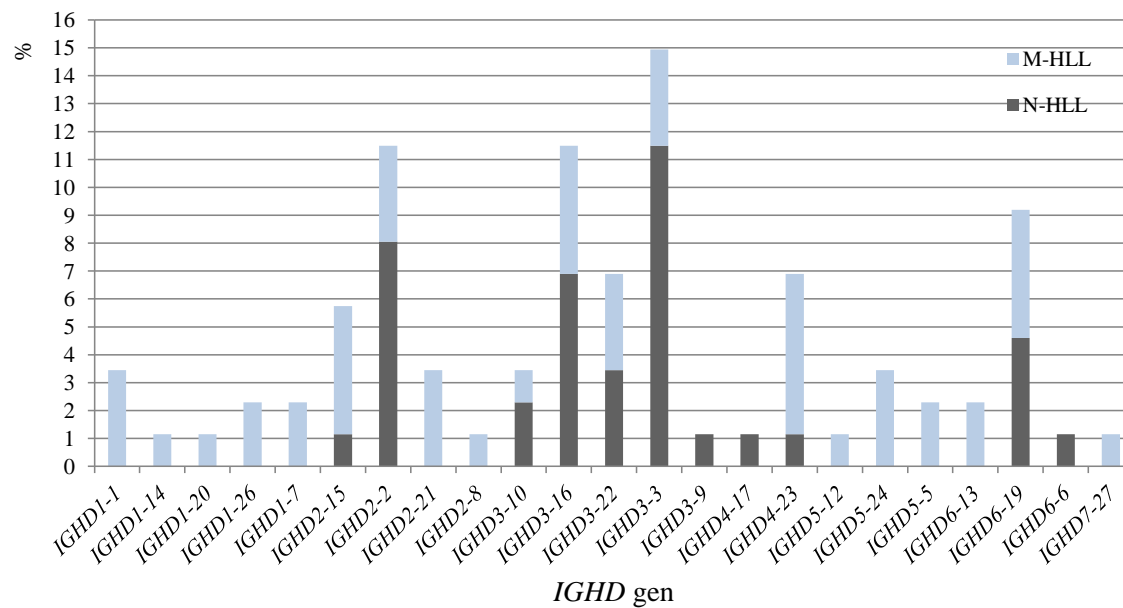
IGHD i IGHJ geni

IGHD geni su detektovani u 87 od 88 rearanžmana (98.9%). Frekvence *IGHD* familija su bile sledeće: *IGHD3* – 39.1%, *IGHD2* – 21.8%, *IGHD6* – 12.6%, *IGHD1* – 10.3%, *IGHD4* – 8%, *IGHD5* – 6.9% i *IGHD7* – 1.1%. Geni *IGHD1* i *IGHD5* familije su bili preferencijalno eksprimirani u mutiranim rearanžmanima (Fišerov egzaktni test; $p=0.004$ i $p=0.033$), za razliku od *IGHD3* gena koji su bili preferencijalno eksprimirani u nemutiranim rearanžmanima (Fišerov egzaktni test; $p<0.001$) (Slika 21).



Slika 21. Relativne frekvence *IGHD* familija u mutiranim i nemutiranim rearanžmanima

U 87 *IGH* alela koji su sadržali *IGHD* gen identifikovano je ukupno 23 različita *IGHD* gena i najčešći su bili: *IGHD3-3* (14.9%), *IGH2-2* (11.5%), *IGHD3-16* (11.5%) i *IGHD6-19* (9.2%). (Slika 22).

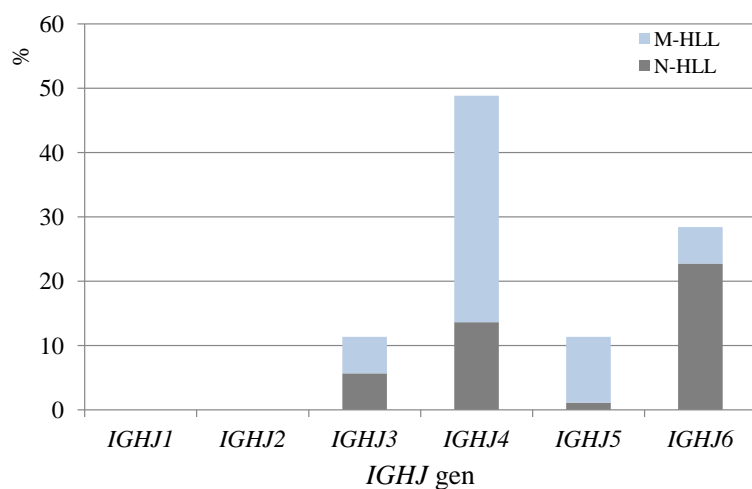


Slika 22. Relativne frekvence *IGHD* gena u mutiranim i nemutiranim rearanžmanima

Okvir čitanja ("reading frame") br. 2 *IGHD* gena bio je upotrebljen u 49.4% rearanžmana, a okviri čitanja br. 1 i br. 3 u 24.1% odnosno 26.4% rearanžmana.

Od *IGHJ* gena, najčešće je bio ekspimiran *IGHJ4* (48.9%), a za njim *IGHJ6* (28.4%), *IGHJ3* (11.4%) i *IGHJ5* (11.4%). *IGHJ1* i *IGHJ2* geni nisu detektovani ni u jednom rearanžmanu.

IGHJ4 je bio preferencijalno ekspimiran u mutiranim (72.1%) u odnosu na nemutirane rearanžmane (27.9%) (Fišerov egzaktni test; $p=0.006$), za razliku od *IGHJ6* koji je češće bio prisutan u nemutiranim (80%) nego u mutiranim rearanžmanima (20%) (Fišerov egzaktni test; $p<0.001$) (Slika23).



Slika 23. Relativne frekvence *IGHJ* gena u mutiranim i nemutiranim rearanžmanima

Karakteristike VH CDR3

Dužina VH CDR3 regiona, odnosno broj amino-kiselinskih ostataka u okviru VH CDR3, u analiziranim rearanžmanima je varirao u opsegu od 9 do 28, gde je medijana iznosila 17 amino-kiselina.

Pokazano je da je dužina VH CDR3 statistički značajno veća u nemutiranim (medijana=21 amino-kiselina) nego u mutiranim rearanžmanima (medijana=15 amino-kiselina) (Man-Vitnjev test; $p<0.001$). Statistički značajna razlika je primećena i kada je poređena dužina VH CDR3

kod pacijenata sa progresivnom (medijana=19 amino-kiselina) i indolentnom bolešću (medijana=15 amino-kiselina) (t-test; p=0.009).

Analiza amino-kiselinskih sekvenci VH CDR3 regiona u ClustalW softveru (<http://www.ebi.ac.uk>) je pokazala da 13 rearanžmana (15.3%) pripada nekom od definisanih VH CDR3 klastera (Tabela 14). Samo dva rearanžmana sa stereotipnim VH CDR3 (15.4%) su pripadala mutiranom HLL podtipu, dok je preostalih 11 (84.6%) bilo nemutirano (Fišerov egzaktni test; p=0.002). Stereotipni VH CDR3 su bili zastupljeni sa različitim frekvencama u *IGHV1*, *IGHV3* i *IGHV4* rearanžmanima (29.2%, 8.3% i 18.2%), ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost.

Tabela 14. Rearanžmani sa stereotipnim VH CDR3 sekvencama

klaster	pacijent	<i>IGHV</i> gen	<i>IGHD</i> gen (RF)	<i>IGHJ</i> gen	mutacioni status	VH CDR3 amino-kiselinska sekvencija	MAS
#1	30	<i>IGHV1-2</i>	<i>IGHD6-19</i> (3)	<i>IGHJ4</i>	N	ARGQWLVLQFDY	63
#1	131	<i>IGHV1-3</i>	<i>IGHD6-19</i> (3)	<i>IGHJ4</i>	N	ARVQWLVLAHFDY	66
#2	31	<i>IGHV3-21</i>	<i>IGHD3-10</i> (3)	<i>IGHJ6</i>	N	ASDRDGMDV	66
#3	22	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD2-2</i> (3)	<i>IGHJ6</i>	N	ARDPDIVVPPAAMYYYYYGMDV	58
#3	53	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD2-2</i> (3)	<i>IGHJ6</i>	N	AREQPDIVVPPAAVGYYYGMDV	64
#4	12	<i>IGHV4-34</i>	<i>IGHD5-5</i> (1)	<i>IGHJ6</i>	M	ARDYPDTADIRYYYYGMDV	70
#4	42	<i>IGHV4-34</i>	<i>IGHD1-14</i> (2)	<i>IGHJ6</i>	M	ARSYPESPTLRRYYYYGMDL	61
#6	36	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD3-16</i> (2)	<i>IGHJ3</i>	N	ARGGDYDYVWGSYRPNDAFDI	91
#6	61	<i>IGHV1-69</i>	<i>IGHD3-16</i> (2)	<i>IGHJ3</i>	N	ARGGFYDYVWGSYRPNDAFDI	90
#31	7	<i>IGHV3-48</i>	<i>IGHD3-3</i> (2)	<i>IGHJ6</i>	N	ARDYDFWSGYSSYYYYYGMDV	85
#31	47	<i>IGHV3-48</i>	<i>IGHD3-3</i> (2)	<i>IGHJ6</i>	N	ARDYDFWSGYSSYYYYYGMDV	85
#51	65	<i>IGHV1-18</i>	<i>IGHD3-3</i> (2)	<i>IGHJ4</i>	N	AREDQYYDFWSGYFY	82
#79	14	<i>IGHV3-15</i>	<i>IGHD2-2</i> (3)	<i>IGHJ6</i>	N	TTDPTNEIVVPPAAMYYYYYGMDV	74

Napomena:

- korišćena je nomenklatura klastera predložena od strane Stamatopoulos *et al.* [Stamatopoulos *et al.* 2007] i Murray *et al.* [Murray *et al.* 2008]
- M = mutiran; N = nemutiran
- RF = okvir čitanja ("reading frame")
- MAS ("mean alignment score") = srednja vrednost poravnanja svih parova sekvenci ("pairwise alignment scores") koje pripadaju datom klasteru

Populacione karakteristike analiziranih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

Imajući u vidu geografske i etničke razlike u *IGHV-IGHD-IGHJ* genskom repertoaru B ćelijskih receptora u HLL, dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima objavljene studije [Stamatopoulos *et al.* 2007] koja je obuhvatila 916 HLL pacijenata iz 4 mediteranske zemlje (Francuska, Grčka, Italija i Španija), i ukupno 927 produktivnih rearanžmana.

Ovim poređenjem je pokazano da se mutacioni status i frekvence pojedinačnih *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena i genskih familija kod HLL pacijenata iz Srbije nisu statistički značajno razlikovale od istih kod pacijenata iz navedenih mediteranskih zemalja.

Izuzetak su geni *IGHV4* familije, koji su u *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanima bili zastupljeni sa manjom učestalošću kod srpskih u odnosu na mediteranske pacijente (χ^2 - test; $p=0.027$). Pored toga, *IGHJ5* gen je bio eksprimiran u mutiranoj formi češće nego što je to bio slučaj kod pacijenata iz mediteranskih zemalja (χ^2 - test; $p=0.049$).

Učestalost rearanžmana sa stereotipnim VH CDR3 među srpskim pacijentima (15.3%) je bila nešto manja nego kod mediteranskih pacijenata (21.7%), ali ta razlika nije ispoljila statističku značajnost. VH CDR3 klasteri #1, #2, #3, #4 i #6 su u srpskoj HLL populaciji detektovani sa sličnim frekvencama kao kod mediteranskih pacijenata, dok je klaster #31 bio zastupljen sa značajno većom učestalošću (χ^2 - test; $p<0.001$). Detektovan je i jedan rearanžman koji pripada retkom klasteru #51, kao i jedan rearanžman svrstan u potencijalni klaster #79.

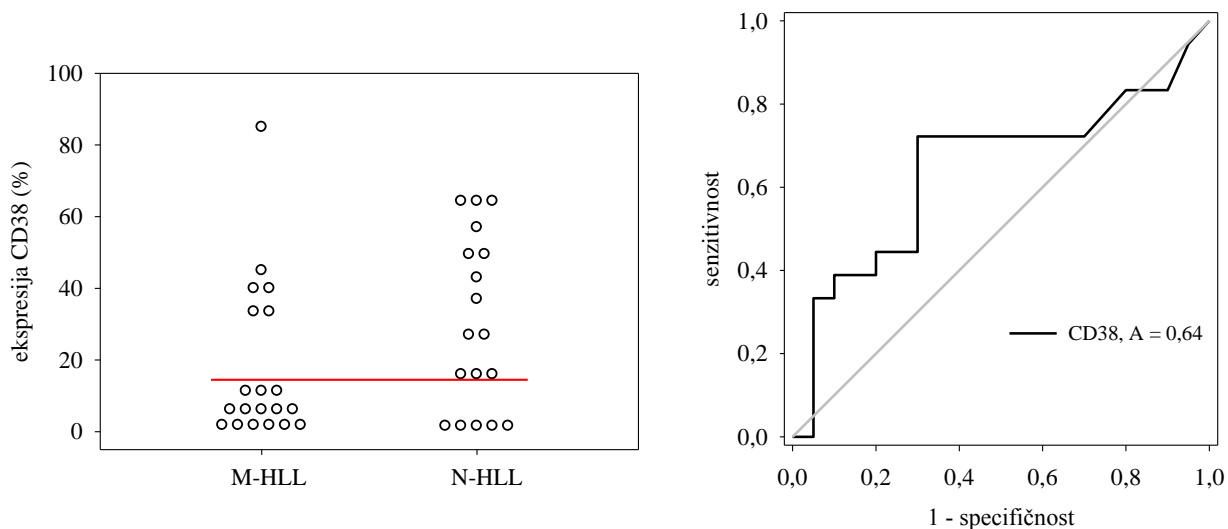
Asocijacija *IGHV* mutacionog statusa sa drugim molekularnim prognostičkim markerima

Ekspresija CD38

Ekspresija CD38 na površini B limfocita je merena tehnikom protočne citofluorimetrije na Klinici za hematologiju, Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, kod HLL pacijenata na prezentaciji bolesti. Kao "cut-off" nivo za razlikovanje CD38-pozitivnih i CD38-negativnih slučajeva korišćena je vrednost od 30% CD38-pozitivnih HLL ćelija.

Iako je CD38-pozitivnost bila češća kod pacijenata nosilaca nemutiranih *IGH* rearanžmana, ova asocijacija nije ispoljila statističku značajnost (Fišerov egzaktni test; $p=0.503$).

ROC analiza je pokazala da "cut-off" vrednost od 14.5% CD38-pozitivnih ćelija najbolje diskriminiše M-HLL od N-HLL pacijenata (Slika 24).

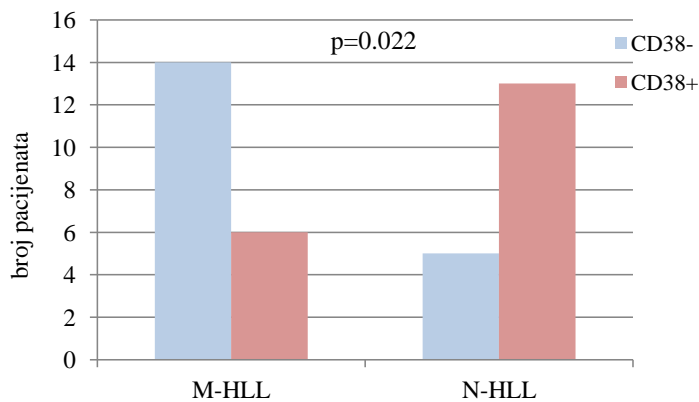


Slika 24. ROC analiza ekspresije CD38 u odnosu na *IGHV* mutacioni status

"cut-off"=14.5% CD38-pozitivnih ćelija (crvena linija); senzitivnost=0.72; specifičnost=0.70; A=0.6431 (površina ispod ROC krive); 95%CI=0.4570-0.8291; $p=0.1322$

Ekspresija CD38 je pokazala slabu prediktivnu moć *IGHV* mutacionog statusa ($A=0.6431$), s obzirom da je primenom ovako određenog "cut-off" nivoa kod 11 pacijenata (28.9%) postojalo neslaganje CD38 statusa i *IGHV* mutacionog statusa (pozitivna prediktivna vrednost=0.68; negativna prediktivna vrednost=0.74).

Uprkos tome, pacijenti su na osnovu "cut-off" nivoa od 14.5% CD38-pozitivnih ćelija podeljeni u dve grupe, CD38-pozitivnu i CD38 negativnu. Kod ovako formiranih grupa, pokazana je statistički značajna asocijacija CD38-pozitivnog statusa i nemutiranog *IGHV* statusa (Fišerov egzaktni test; $p=0.022$) (Slika 25).



Slika 25. Grafički prikaz raspodele pacijenata sa različitim CD38 statusom u odnosu na *IGHV* mutacioni status

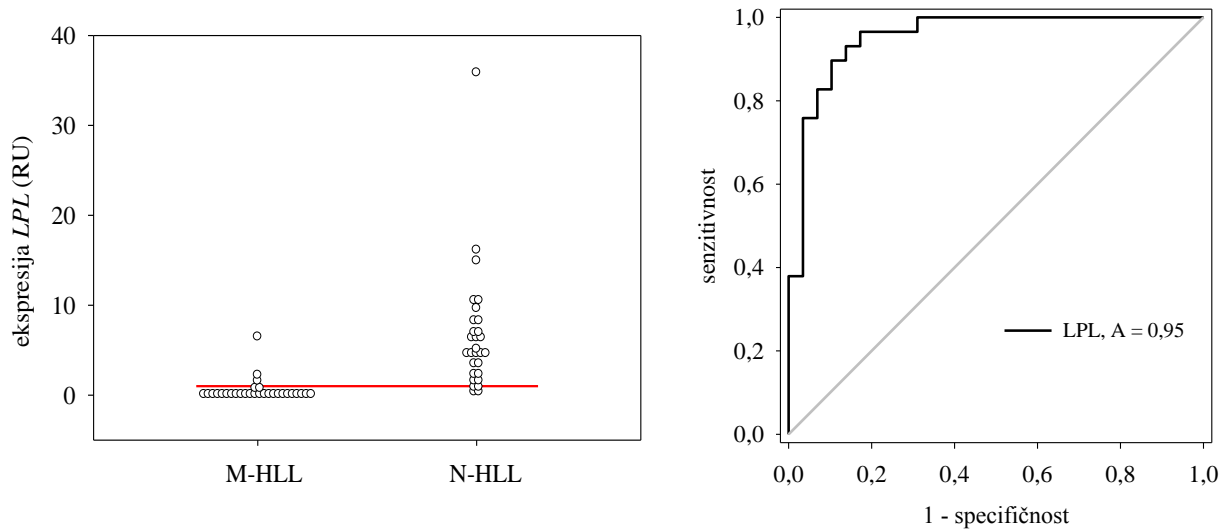
Ekspresija lipoprotein-lipaze (LPL)

Ekspresija gena za lipoprotein lipazu (*LPL*) je merena qRT-PCR metodom, korišćenjem TaqMan tehnike. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde je kao kalibrator korišćena HL-60 ćelijska linija. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama ("relative units"; RU).

ROC analiza je pokazala da "cut-off" vrednost od 1 RU najbolje diskriminiše M-HLL od N-HLL pacijenata (Slika 26).

Ekspresija *LPL* je pokazala veliku prediktivnu moć *IGHV* mutacionog statusa, s obzirom da je primenom ovako određenog "cut-off" nivoa samo kod 6 pacijenata (7.06%) postojalo neslaganje

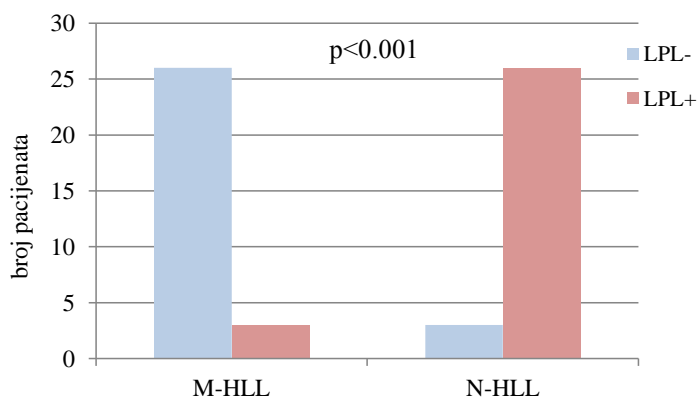
LPL statusa i *IGHV* mutacionog statusa (pozitivna prediktivna vrednost=0.90; negativna prediktivna vredost=0.90).



Slika 26. ROC analiza ekspresije *LPL* u odnosu na *IGHV* mutacioni status

"cut-off"=1 RU (crvena linija); senzitivnost=0.90; specifičnost=0.90; A=0.9536 (površina ispod ROC krive); 95%CI=0.9020-1.005; $p < 0.0001$

Na osnovu "cut-off" vrednosti ekspresije *LPL* od 1 RU pacijenti su podeljeni u dve grupe, LPL-pozitivnu i LPL-negativnu. Kod ovako formiranih grupa, pokazana je statistički značajna asocijacija LPL-pozitivnog statusa i nemutiranog *IGHV* statusa (Fišerov egzaktni test; $p < 0.001$) (Slika 27).



Slika 27. Grafički prikaz raspodele pacijenata sa različitim LPL statusom u odnosu na *IGHV* mutacioni status

ANALIZA EKSPRESIJE APOPTOTSKIH GENA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI

Jedno od osnovnih obeležja hronične limfocitne leukemije je poremećaj procesa apoptoze. Brojne studije su ukazale na aberantnu ekspresiju i genetičke promene (promotorske mutacije i mutacije u kodirajućem regionu) gena koji kodiraju proteine Bcl2 familije u HLL. Međutim, ni jedna od tih promena nije pokazala konzistentnu asocijaciju sa stadijumom bolesti, kliničkom progresijom i odgovorom na terapiju.

U ovom radu je analizirana ekspresija tri člana *Bcl2* familije apoptotskih regulatora, *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12*, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi HLL pacijenata. Studija je obuhvatila 58 pacijenata, čije su kliničke i biološke karakteristike prikazane u Tabeli 15.

Ekspresija *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* gena je merena qRT-PCR metodom, korišćenjem SYBR Green tehnike. Relativni nivo ekspresije je određen primenom ddCt metode, gde je kao kalibrator korišćena HL-60 ćelijska linija. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama ("relative units"; RU).

Analizirana je razlika u ekspresiji navedenih gena između HLL pacijenata i zdravih kontrola, kao i asocijacija nivoa ekspresije sa odabranim kliničkim karakteristikama, serumskim i molekularnim prognostičkim markerima.

Tabela 15. Kliničke i biološke karakteristike HLL pacijenata

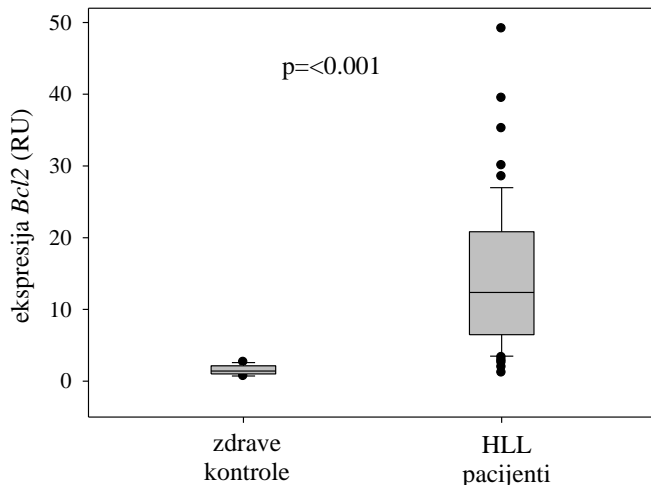
ukupan broj pacijenata	58
pol (muški/ženski), br.	45/13
starost (god.), medijana (opseg)	63.5 (39-86)
broj leukocita [$\times 10^9/l$], medijana (opseg)	55 (13.5-413)
broj limfocita [$\times 10^9/l$], medijana (opseg)	42 (4.1-371)
LDT (n=43), medijana (opseg)	12 (1-84)
$\beta 2$-mikroglobulin [mg/l] (n=32), medijana (opseg)	3.86 (0.21-13.5)
LDH status (n=37), br.(%)	
normalan	25 (67.6%)
povišen	12 (32.4%)
Bine stadijum (n=52), br.(%)	
A	22 (42.3%)
B	7 (13.5%)
C	23 (44.2%)
tok bolesti (n=52), br.(%)	
progresivan	40 (76.9%)
indolentan	12 (23.1%)
CD38 status (n=38), br.(%)	
pozitivan (≥ 30 %)	14 (36.8%)
negativan (< 30 %)	24 (63.2%)
IGHV mutacioni status (n=58), br.(%)	
mutiran	29 (50%)
nemutiran	29 (50%)

Napomena:

- n = broj pacijenata kod kojih je evidentiran dati klinički parametar
- LDT ("lymphocyte doubling time") = vreme udvostručavanja broja limfocita (meseći)
- LDH = serumska laktat dehidrogenaza; opseg normalnih vrednosti LDH je 150 – 450 U/l; kao "cut-off" za definisanje LDH statusa je uzeta vrednost 1.3 puta veća od gornje granice normalnog opsega (585 U/l)

Ekspresija *Bcl2* gena

qRT-PCR analiza je pokazala značajno viši nivo ekspresije *Bcl2* iRNK kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole (Man-Vitnijev test; $p < 0.001$) (Slika 28).

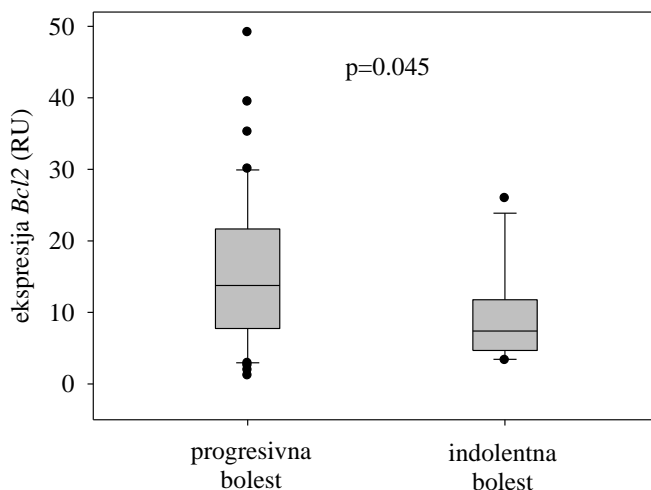


Slika 28. Grafički prikaz ekspresije *Bcl2* gena kod HLL pacijenata i zdravih kontrola (horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane)

Srednja vrednost ekspresije *Bcl2* među pacijentima je 14.132 ± 1.317 (SEM), a medijana iznosi 12.374 (1.168-49.146).

Srednja vrednost ekspresije *Bcl2* među zdravim kontrolama je 1.572 ± 0.202 (SEM), a medijana iznosi 1.411 (0.685-2.629).

Ekspresija *Bcl2* nije pokazala asocijaciju sa polom i Bine stadijumom bolesti, ali je ispoljila značajnu negativnu korelaciju sa starošću pacijenata na prezentaciji bolesti (Spirmanova korelacija; $r = -0.4$; $p = 0.004$), kao i sa LDT (Spirmanova korelacija; $r = -0.369$; $p = 0.015$). Pored toga, ekspresija *Bcl2* je bila statistički značajno viša kod pacijenata sa progresivnom bolešću u odnosu na pacijente sa indolentnom bolešću (Man-Vitnijev test; $p = 0.045$) (Slika 29).



Slika 29. Grafički prikaz ekspresije *Bcl2* gena kod HLL pacijenata sa progresivnom i indolentnom bolešću (horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane)

Srednja vrednost ekspresije *Bcl2* među pacijentima sa progresivnom bolešću je 15.773 ± 1.704 (SEM), a medijana iznosi 13.767 (1.168-49.146).

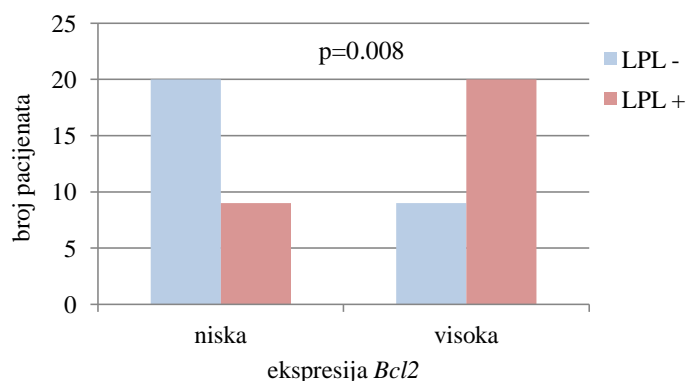
Srednja vrednost ekspresije *Bcl2* među pacijentima sa indolentnom bolešću je 9.314 ± 1.979 (SEM), a medijana iznosi 7.397 (3.305-25.946).

Kada je reč o serumskim markerima, ekspresija *Bcl2* je ispoljila pozitivnu korelaciju sa nivoom β 2-mikroglobulina (Spirmanova korelacija; $r=0.353$; $p=0.047$), dok asocijacija sa LDH statusom nije bila statistički značajna, iako je nivo ekspresije *Bcl2* bio viši kod pacijenata sa povišenim serumskim LDH.

U ovom radu je analizirana i asocijacija ekspresije *Bcl2* sa molekularnim prognostičkim markerima. qRT-PCR metodom je detektovan viši nivo ekspresije *Bcl2* iRNK u grupi N-HLL pacijenata u odnosu na M-HLL pacijente, mada je ova razlika bila na granici statističke značajnosti (Man-Vitnijev test; $p=0.054$).

Asocijacija sa CD38 statusom nije pokazana, bez obzira na "cut-off" vrednost odabranu za razlikovanje CD38-pozitivnih i CD38-negativnih pacijenata (30%, 20% i 14.5% CD38-pozitivnih ćelija).

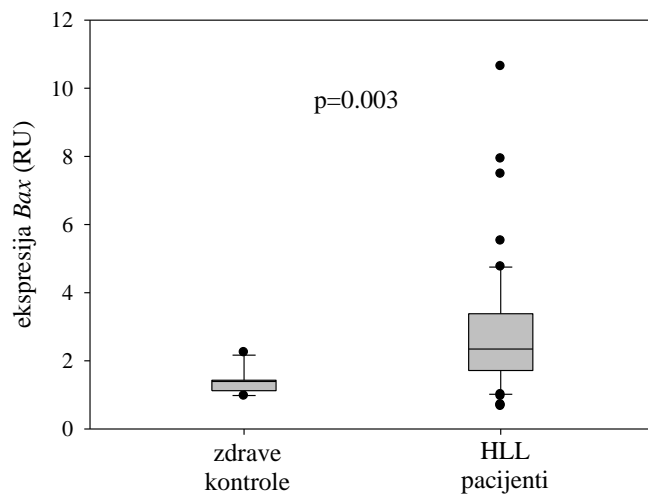
Za razliku od CD38 statusa i *IGHV* mutacionog statusa, ekspresija *Bcl2* je pokazala jaku pozitivnu korelaciju sa ekspresijom *LPL* gena (Spirmanova korelacija; $r=0.418$; $p=0.001$). Asocijacija sa *LPL* statusom je potvrđena i Fišerovim egzaktnim testom: pacijenti su podeljeni na one sa niskim i visokim nivoom ekspresije *Bcl2*, gde je kao "cut-off" vrednost poslužila medijana vrednosti ekspresije ukupnog uzorka HLL pacijenata (12.374 RU), dok je za definisanje *LPL* statusa upotrebljen "cut-off" od 1 RU, za koji je pokazano da najbolje diskriminiše N-HLL od M-HLL pacijenata (ova vrednost je, inače, veoma blizu medijane vrednosti *LPL* ekspresije ukupnog uzorka pacijenata, koja iznosi 0.999 RU). Kod ovako formiranih grupa pacijenata, pokazana je statistički značajna asocijacija *LPL*-pozitivnog statusa sa visokim nivoom ekspresije *Bcl2* iRNK (Fišerov egzaktni test; $p=0.008$) (Slika 30).



Slika 30. Grafički prikaz raspodele pacijenata sa različitim *LPL* statusom u odnosu na ekspresiju *Bcl2* gena

Ekspresija *Bax* gena

Kao što je to bio slučaj sa ekspresijom *Bcl2* gena, qRT-PCR analizom je detektovan značajno viši nivo ekspresije *Bax* iRNK kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole (Man-Vitnijev test; $p=0.003$) (Slika 31).



Slika 31. Grafički prikaz ekspresije *Bax* gena kod HLL pacijenata i zdravih kontrola (horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane)

Srednja vrednost ekspresije *Bax* među pacijentima je 2.799 ± 0.242 (SEM), a medijana iznosi 2.346 (0.670-10.642).

Srednja vrednost ekspresije *Bax* među zdravim kontrolama je 1.385 ± 0.110 (SEM), a medijana iznosi 1.393 (0.972-2.243).

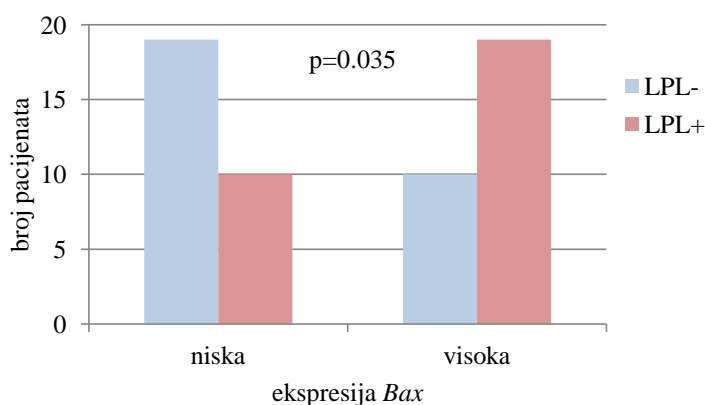
Nivo ekspresije *Bax* gena nije pokazao asocijaciju sa polom i Bine stadijumom na prezentaciji bolesti. Primećena je negativna korelacija sa starošću pacijenata, ali ona nije dostigla statističku značajnost (Spirmanova korelacija; $r=-0.26$; $p=0.0683$). Za razliku od *Bcl2* ekspresije, ekspresija *Bax* nije pokazala asocijaciju ni sa tokom bolesti, kao ni sa LDT. Pored toga, izostala je i korelacija sa nivoom serumskih markera, $\beta 2$ -mikroglobulina i LDH.

Poređenjem pacijenata sa različitim *IGHV* mutacionim statusom primećen je viši nivo ekspresije *Bax* iRNK u grupi N-HLL pacijenata, ali ova razlika je bila na granici statističke značajnosti (Man-Vitnijev test; $p=0.056$).

Asocijacija sa CD38 statusom nije pokazana, bez obzira na "cut-off" vrednost odabranu za razlikovanje CD38-pozitivnih i CD38-negativnih pacijenata (30%, 20% i 14.5% CD38-pozitivnih ćelija).

Kao i u slučaju *Bcl2* gena, i ekspresija *Bax* gena je pokazala pozitivnu korelaciju sa ekspresijom *LPL* gena (Spirmanova korelacija; $r=0.395$; $p=0.0023$). Asocijacija sa LPL statusom je potvrđena i Fišerovim egzaktnim testom: pacijenti su podeljeni na one sa niskim i visokim nivoom ekspresije *Bax*, gde je kao "cut-off" vrednost poslužila medijana vrednosti ekspresije ukupnog uzorka HLL pacijenata (2.376 RU), dok je za definisanje LPL statusa ponovo upotrebljen "cut-off" od 1 RU.

Kod ovako formiranih grupa pacijenata, pokazana je statistički značajna asocijacija LPL-pozitivnog statusa sa visokim nivoom ekspresije *Bax* iRNK (Fišerov egzaktni test; $p=0.035$) (Slika 32).

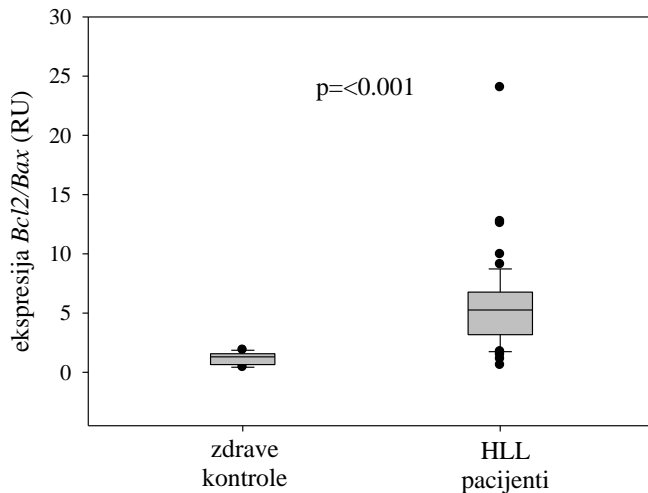


Slika 32. Grafički prikaz raspodele pacijenata sa različitim LPL statusom u odnosu na ekspresiju *Bax* gena

Analiza odnosa ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena

Uprkos antagonističkoj ulozi *Bcl2* i *Bax* proteina u procesu apoptoze, navedeni rezultati su pokazali povišenu ekspresiju oba gena kod pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom, kao i asocijaciju visoke ekspresije *Bcl2* i *Bax* sa pojedinim negativnim prognostičkim markerima. Međutim, smatra se da je njihov odnos, a ne nivo ekspresije pojedinačnih proteina, glavna determinanta apoptotskog potencijala HLL B limfocita. Zbog toga je u ovom radu analiziran odnos ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena kod HLL pacijenata, i njegova asocijacija sa kliničkim parametrima i molekularnim prognostičkim markerima.

Kao što se i očekivalo na osnovu izmerenih nivoa ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena, odnos *Bcl2/Bax* ekspresije je bio statistički značajno viši kod HLL pacijenata nego kod zdravih kontrola (Mann-Vitnijev test; $p < 0.001$) (Slika 33).



Slika 33. Grafički prikaz odnosa ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena kod HLL pacijenata i zdravih kontrola (horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane)

Srednja vrednost *Bcl2/Bax* odnosa među pacijentima je 5.494 ± 0.470 (SEM), a medijana iznosi 5.261 (0.608-24.046).

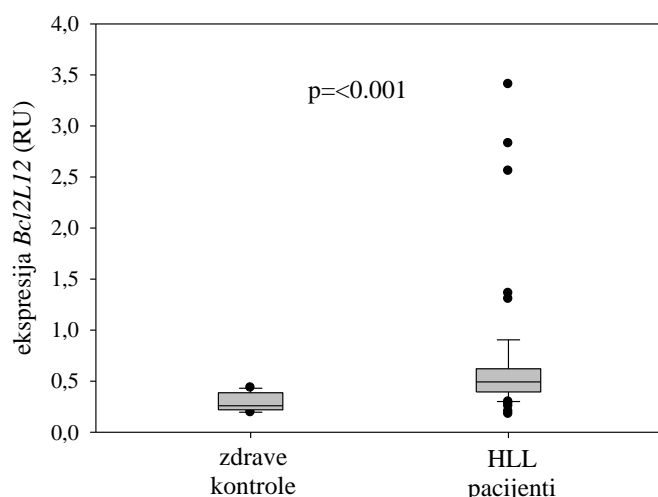
Srednja vrednost *Bcl2/Bax* odnosa među zdravim kontrolama je 1.195 ± 0.160 (SEM), a medijana iznosi 1.305 (0.428-1.885).

Odnos ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena nije pokazao asocijaciju sa polom pacijenata, Bine stadijumom ni tokom bolesti. Kao i u slučaju ekspresije *Bax* gena, negativna korelacija sa starošću pacijenata je bila slabija nego korelacija *Bcl2* ekspresije i nije dostigla statističku značajnost (Spirmanova korelacija; $r = -0.265$; $p = 0.0627$). S druge strane, primećena je statistički značajna negativna korelacija sa LDT (Spirmanova korelacija; $r = -0.307$; $p = 0.0451$). Korelacija sa nivoom serumskih markera, $\beta 2$ -mikroglobulina i LDH, nije detektovana.

Uprkos tome što je ekspresija *Bcl2* i *Bax* gena bila nešto viša u grupi N-HLL pacijenata (mada na granici statističke značajnosti), *Bcl2/Bax* odnos, iako viši kod N-HLL pacijenata, nije pokazao statistički značajnu asocijaciju sa *IGHV* mutacionim statusom. Nije detektovana ni asocijacija sa CD38 statusom, bez obzira na "cut-off" vrednost odabranu za razlikovanje CD38-pozitivnih i CD38-negativnih pacijenata (30%, 20% i 14.5% CD38-pozitivnih ćelija). Kao i u slučaju *IGHV* mutacionog statusa, *Bcl2/Bax* odnos je bio veći u grupi LPL-pozitivnih nego u grupi LPL-negativnih pacijenata, ali ova razlika nije bila statistički značajna.

Ekspresija *Bcl2L12* gena

qRT-PCR metodom su izmerene relativno niske vrednosti ekspresije *Bcl2L12* iRNK u mononuklearnim ćelijama kako HLL pacijenata tako i zdravih kontrola, ali je nivo ekspresije ipak bio statistički značajno viši u grupi HLL pacijenata (Man-Vitnjev test; $p < 0.001$) (Slika 34).



Slika 34. Grafički prikaz ekspresije *Bcl2L12* gena kod HLL pacijenata i zdravih kontrola (horizontalne linije predstavljaju vrednosti medijane)

Srednja vrednost ekspresije *Bcl2L12* među pacijentima je 0.646 ± 0.077 (SEM), a medijana iznosi 0.492 (0.178-3.408).

Srednja vrednost ekspresije *Bcl2L12* među zdravim kontrolama je 0.296 ± 0.0283 (SEM), a medijana iznosi 0.259 (0.194-0.435).

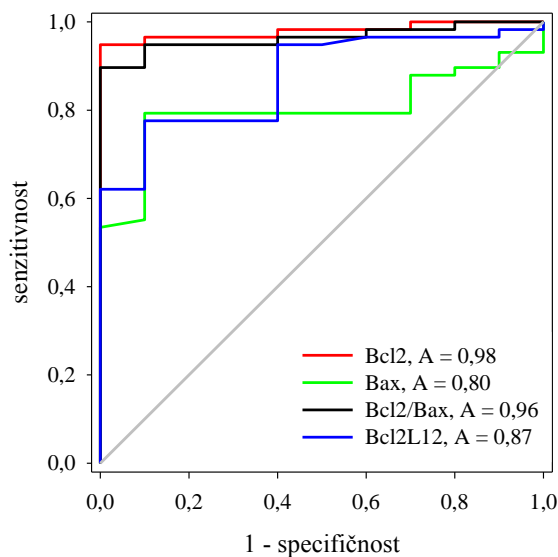
Ekspresija *Bcl2L12* gena nije pokazala asocijaciju sa polom pacijenata, starošću i Bine stadijumom na prezentaciji, kao ni sa tokom bolesti. Nije detektovana ni statistički značajna asocijacija sa LDT i nivoom $\beta 2$ -mikroglobulina dok je, za razliku od *Bcl2* i *Bax* gena, ekspresija *Bcl2L12* bila viša u grupi pacijenata sa povišenim LDH (Man-Vitnjev test; $p = 0.038$).

Ekspresija *Bcl2L12* nije pokazala asocijaciju ni sa jednim molekularnim prognostičkim markerom. Nivo *Bcl2L12* iRNK je bio nešto viši kod pacijenata sa nemutiranim *IGHV* rearanžmanima, CD38-pozitivnim statusom i LPL-pozitivnim statusom u odnosu na pacijente sa mutiranim *IGHV* rearanžmanima, CD38-negativnim statusom i LPL-negativnim statusom, ali ni jedna od navedenih razlika nije dostigla statističku značajnost.

Uporedna analiza ekspresije *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* gena

Sva tri analizirana apoptotska gena, *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12*, kao i *Bcl2/Bax* odnos, pokazali su značajno viši nivo ekspresije kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole, pri čemu je povećanje ekspresije bilo najizraženije u slučaju *Bcl2* gena.

ROC analiza (Slika 35) je pokazala da najveću moć diskriminacije između HLL uzoraka i normalnih uzoraka ima ekspresija *Bcl2* ($A=0.98$; pozitivna prediktivna vrednost=1; negativna prediktivna vrednost=0.77), a zatim i *Bcl2/Bax* odnos ($A=0.96$; pozitivna prediktivna vrednost=0.93; negativna prediktivna vrednost=0.75). Ekspresija *Bax* i *Bcl2L12* su pokazale slabiju moć diskriminacije između HLL i normalnih uzoraka; ispoljile su visoku pozitivnu prediktivnu vrednost (0.97 i 0.97), ali i prilično nisku negativnu prediktivnu vrednost (0.42 i 0.41).



Slika 35. ROC analiza ekspresije *Bcl2*, *Bax*, *Bcl2L12* gena i *Bcl2/Bax* odnosa kod HLL pacijenata i zdravih kontrola (A =površina ispod ROC krive)

Bcl2: "cut-off"=2.76; senzitivnost=0.95; specifičnost=1.00; 95%CI=0.95-1.009; $p<0.0001$

Bax: "cut-off"=1.47; senzitivnost=0.79; specifičnost=0.90; 95%CI=0.6920-0.9097; $p=0.002514$

Bcl2/Bax: "cut-off"=1.91; senzitivnost=0.90; specifičnost=1.00; 95%CI=0.9230-1.005; $p<0.0001$

Bcl2L12: "cut-off"=0.391; senzitivnost=0.78; specifičnost=0.90; 95%CI=0.7762-0.9703; $p=0.0001776$

Nivo ekspresije *Bcl2* gena je ujedno pokazao i najveću varijabilnost među HLL pacijentima (1.168-49.146 RU). Ekspresija *Bax* je pokazala nešto manju varijabilnost (0.670-10.642 RU), dok je ekspresija *Bcl2L12* bila izrazito homogena u grupi HLL pacijenata (0.178-3.408 RU). i, kao takva, nije ispoljila asocijaciju sa većinom prognostičkih markera.

Pored toga, detektovana je pozitivna korelacija između ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena (Spirmanova korelacija; $r=0.6$; $p=0.00$). Ekspresija *Bcl2L12* je takođe pokazala pozitivnu korelaciju sa ekspresijom *Bax* gena (Spirmanova korelacija; $r=0.417$; $p=0.00122$), kao i sa ekspresijom *Bcl2* gena (Spirmanova korelacija; $r=0.285$; $p=0.0304$).

ANALIZA PROMOTORA I STARTA TRANSKRIPCije *Bcl2L12* GENA

Jedan od ciljeva ovog rada je bilo definisanje promotorskog regiona i starta transkripcije *Bcl2L12* gena. Kao polazna tačka u ovim eksperimentima poslužilo je istraživanje Scorilas i saradnika u kome je prvi put izvršeno molekularno kloniranje, fizičko mapiranje i ekspresiona analiza novog apoptotskog gena *Bcl2L12* [Scorilas *et al.* 2001]. U dobijenoj sekvenci *Bcl2L12* gena (GenBank AF289220) je, između ostalog, označen položaj pretpostavljenog TATA bloka (prvi TATA blok uzvodno od kodirajućeg dela egzona 1) i na osnovu njega pretpostavljenog mesta starta transkripcije ("transcription start site"; TSS). Sekvenca 5' kraja *Bcl2L12* gena i uzvodnog regiona je prikazana na Slici 36.

Treba naglasiti da navedeno mesto starta transkripcije, odnosno položaj +1 nukleotida, nije eksperimentalno potvrđeno. Pored toga, u literaturi ne postoje podaci o promotoru *Bcl2L12* gena.

Zato je prvi korak u ovim eksperimentima bila *in silico* analiza 5' kraja *Bcl2L12* gena i uzvodne sekvence, koja je obuhvatila region od -250 do početka kodirajućeg dela egzona 1 (translacioni start kodon; ATG). Rezultati *in silico* analize su bili krajnje neočekivani, s obzirom da ni jedan od korišćenih softvera nije predvideo prisustvo promotora i TSS u navedenom regionu.


```

acccccagga tgcatttctt ttgcgtacta accggetttc ccggttttat tcccgtaac
-667          -651
ctgcagctcc aacctgctt gcgccccacc atcagtcagc ggatccggct agccccgcc
ctcccgttct agccccacc accagcgttg gcacgagccc gccctcgcg cgccacctcc
gccttctcag cggggccac taggagtctt ttccgcccag cgcgcagctc cgggtttcca
ggtcccagg tcgtcgcaag cacctggaag attccgaaat cctcctgctg tgcctcctgc
cgtaggccgt gcttccaagg gatgcggaag -402 cgcgtgcggc tcttgttcac ccaggccacg
ccctccagtt gccccagctc cagctgcgac accagccagg gcaggatccg tggctttggg
gttcccattg tccggcctgc gcgtataggg catttctctg gcgcgaccgg cctccccgg
-247
accacactgg cctggagttt cgcacccag acctccttct cacgggccac ggcacaggtc
cttaccocat attttcgggg gtacaaacag gaaacctcct cttcccatcc tcccatcctc
-130
ccgagaggct ctctaatacag ctagggttcc ttcccatatc catggacat ccttcccag
cgtcttcagt gcagaccctc cactccctca attccgcccag tatagacctc ctccctcccc
cacatcatcg aaagtaagta tccccacttt cagggtagca tcctctttcc ctagtatttt
cagtgcagaa tcgattcacg tgtaagcctc tacctcctgc acttacccca atgtagacc
+68          +105
ccttccacag tccccttaca gaagatctcc caaaaattt ccaacacaga acttccattc
+123
aattcccctc cgactgcccg cctcccctcct ccaggacaga gcacgcccc a ggtttcgaga
+196
ctgaactacc cccatctacg gaggccacc ctcctctctc agaaccctc cagtgtagac
+266
gcctcctctt ttctctttc ctccctactt tttctagttt ttctgcagcc gacctccagc
+345
gtcggccaact gtagctcctt ccttgcctca ctttcccag agtacacagc ctgcctttcc
actctcogtg cagaccctc ctctttcccg ctccctcgtc tcggacgcca ccaacgctct
cccgggctct tccgcgttac ctacgatgga aggtcggggc gtgcgggcag ctggaacca
+485
ccctgtctt ggagctccg gtagctctca aactcgaggc tgcgcacccc ctttcccgtc
agctgagctc tagagcgtg gggctttctt tttgatcgac ttcttgaaat aaaaccaact
ttatcattct ttgggtaaca gaccaaaag ccgATGGGAC GGCCCGCTGG GCTGTTCCCG
+752
CCCCTATGCC CTTTTTGGG TTTCCGGCCA GAGGCATGCT GGGAGCGTCA CATGCAAATT
+815
GAGCGTGCAC CCAGCGTTCC GCCCTTTCTA CGCTGGGCCG GTTATCGACC CGGCCAGTG
+830
CGCAGGCGCG GAAAGTTGA ACTAATAAAG TTTGTACGAG TTCAGTGGAG GAGACCGCAA
GTTGAGTGGG GGAGGCGGCG GTGGGGCCCC GGACCAGgtc agcgggggtgt tgacgagggg
tggggtgagg agggaagagg agggggccgg gatccagtgg tgggcacccc agtcccgtt

```

Slika 36. Sekvenca 5' kraja *Bcl2L12* gena i uzvodnog regiona. Strelice označavaju pozicije "forward" i "reverse" prajmera korišćenih u eksperimentima kloniranja; brojevi označavaju pozicije nukleotida koje se pominju u ovom radu; velikim slovima je označena kodirajuća sekvenca egzona 1. Pozicije nukleotida kao i TATA bloka su numerisane su na osnovu pretpostavke Scorilas i saradnika [Scorilas *et al.* 2001].

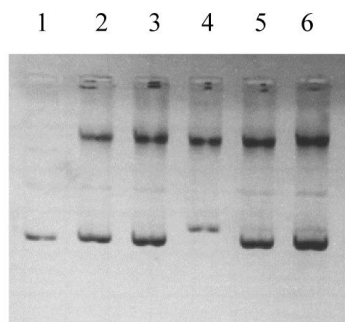
Funkcionalna analiza potencijalnog promotorskog regiona -247/+105 *Bcl2L12* gena

Kako bismo proverili pretpostavku Scorilas i saradnika o mestu starta transkripcije, izvršena je funkcionalna analiza regiona na poziciji od -247 do +105 u sekvenci *Bcl2L12* s obzirom da on obuhvata TATA blok i +1 nukleotid, pa bi mogao da sadrži i deo promotora *Bcl2L12* gena. Navedeni region je ukloniran je u pCATbasic reporterski vektor i, nakon tranzijentne transfekcije K562 ćelija dobijenim plazmidnim konstruktom, njegova aktivnost je merena CAT ELIZA esejom.

Priprema CAT konstrukta

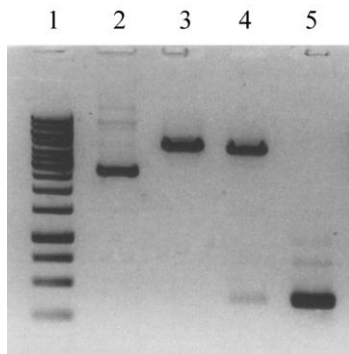
Fragment -247/+105 je umnožen PCR metodom na način opisan u poglavlju Materijal i metode (Tabela 10), i ukloniran u pCATbasic reporterski vektor. Kao matrica za PCR amplifikaciju odabranog fragmenta služila je DNK izolovana iz krvi zdrave kontrole.

Detekcija pCAT konstrukata sa insertovanim fragmentom izvršena je elektroforetskom analizom plazmida izolovanih iz transformanata metodom brze lize (Slika 37).



Slika 37. Detekcija pCAT konstrukata sa insertovanim -247/+105 fragmentom izolovanih iz transformanata metodom brze lize. 1 – pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta); 2-6 – potencijalni klonovi (elektroforeza na 1% agaroznom gelu)

Detekcija insertovanog fragmenta u plazmidnoj DNK izolovanoj iz odabranog transformanta "mini prep" metodom izvršena je digestijom odgovarajućim restrikcionim enzimima (Slika 38).



Slika 38. Detekcija insertovanog fragmenta digestijom plazmidne DNK izolovane iz transformanta "mini prep" metodom. 1 – 1 kb DNK marker; 2 – nedigerirana plazmidna DNK potencijalnog klona; 3 – plazmidna DNK potencijalnog klona linearizovana digestijom *HindIII* restrikcijom; 4 – plazmidna DNK potencijalnog klona digerirana restrikcijom enzimima *HindIII* i *XbaI*; 5 – fragment -247/+105 umnožen PCR reakcijom (elektroforeza na 1% agaroznom gelu)

Krajnja potvrda uspešnosti kloniranja je dobijena sekvenciranjem CAT konstrukta.

Merenje promotorske aktivnosti -247/+105 regiona

Dobijeni CAT konstrukt je kotransfekovan sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju K562, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Promotorska aktivnost kloniranog fragmenta je merena CAT ELIZA esejom.

CAT ELIZA esej je pokazao da fragment -247/+105 ne poseduje promotorsku aktivnost.

Funkcionalna analiza drugih potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena

S obzirom da fragment -247/+105 nije pokazao promotorsku aktivnost, region u okviru koga je tražen promotor je proširen, i obuhvatio je deo od -247 do +747 sekvence *Bcl2L12* gena, čime je zahvaćen ATG kodon i deo kodirajuće sekvence egzona 1. Izvršena je funkcionalna analiza 8 fragmenata koji su obuhvatali sledeće regione: -247/+747, -130/+747, +68/+747, +123/+747, +196/+747, +266/+747, +345/+747 i +485/+752.

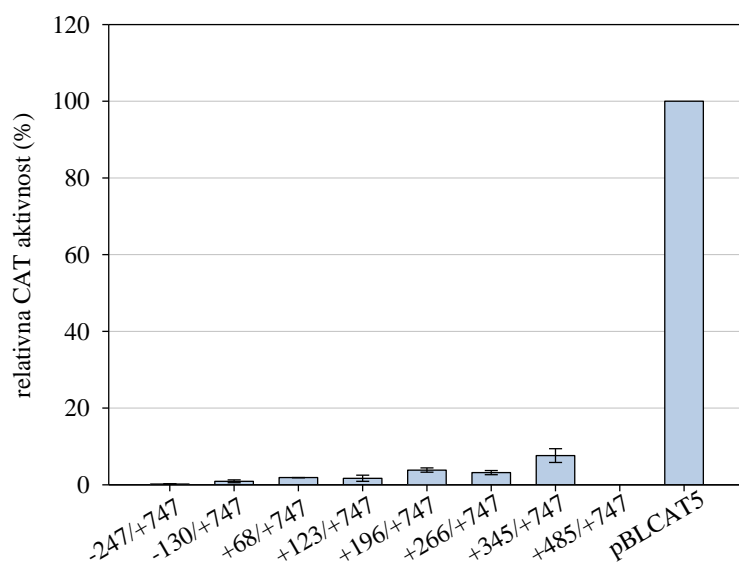
Potencijalni promotorski regioni su uklonirani u pCATbasic reporterski vektor. Nakon tranzijentne transfekcije K562 ćelija dobijenim plazmidnim konstruktima, njihova aktivnost je merena CAT ELIZA esejom.

Priprema CAT konstrukata

Potencijalni promotorski fragmenti su umnoženi PCR metodom kombinacijom odgovarajućih prajmera (Tabela 10) na način opisan u poglavlju Materijal i metode, i uklonirani u pCATbasic reporterski vektor. Detekcija pCAT konstrukata sa insertovanim fragmentom izvršena je kao što je prikazano na primeru kloniranja fragmenta -247/+105. Krajnja potvrda uspešnosti kloniranja dobijena je sekvenciranjem CAT konstrukata.

Merenje promotorske aktivnosti potencijalnih promotorskih regiona

CAT konstrukti su kotransfekovani sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju K562, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Promotorska aktivnost kloniranih fragmenata je merena CAT ELIZA esejom i upoređivana sa aktivnošću promotora kontrolnog pBLCAT5 plazmida. Rezultati merenja promotorske aktivnosti kloniranih fragmenata su prikazani na Slici 39.



Slika 39. Aktivnosti potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena. K562 ćelije su tranzijentno transfekovane odgovarajućim CAT konstruktom i pCH110 plazmidom. Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima merene CAT ELIZA esejom normalizovane su u odnosu na aktivnost β -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti pojedinačnih konstrukata izražene su relativno u odnosu na normalizovanu CAT aktivnost kontrolnog pBLCAT5 plazmida, čija je aktivnost označena sa 100%. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SEM dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

Funkcionalna analiza odabranih fragmenata 5' kraja *Bcl2L12* gena je pokazala da najveću promotorsku aktivnost ispoljava region +345/+747. Međutim, relativna aktivnost ovog regiona je i dalje izuzetno niska (7.6062 ± 1.8019) u odnosu na aktivnost promotora kontrolnog plazmida pBLCAT5.

***In silico* analiza 5' kraja *Bcl2L12* gena i uzvodnog regiona**

Već je rečeno da *in silico* analiza sekvence od -250 do početka kodirajućeg dela egzona 1 *Bcl2L12* gena nije pokazala prisustvo promotora u datom regionu. Imajući u vidu navedene rezultate funkcionalne analize potencijalnih promotorskih fragmenata, *in silico* analiza je urađena ponovo, ali je ovog puta analizirani region produžen uzvodno, do pozicije -800 i nizvodno, do kraja egzona 1 (pozicija 926).

U ovako definisanom regionu, *in silico* analiza (Proscan v.1.7; <http://www-bimas.cit.nih.gov>) je predvidela prisustvo dva promotora na + lancu DNK (kodirajućem lancu *Bcl2L12* gena), jednog u regionu od -651 do -402, i drugog u regionu +565 do +815.

Funkcionalna analiza potencijalnih promotorskih regiona -667/+105 i +345/+830 *Bcl2L12* gena

Na osnovu pozicija promotora predviđenih *in silico* analizom, odabrana su još dva regiona za ispitivanje promotorske aktivnosti, region od -667 do +105 i region od +345 do +830.

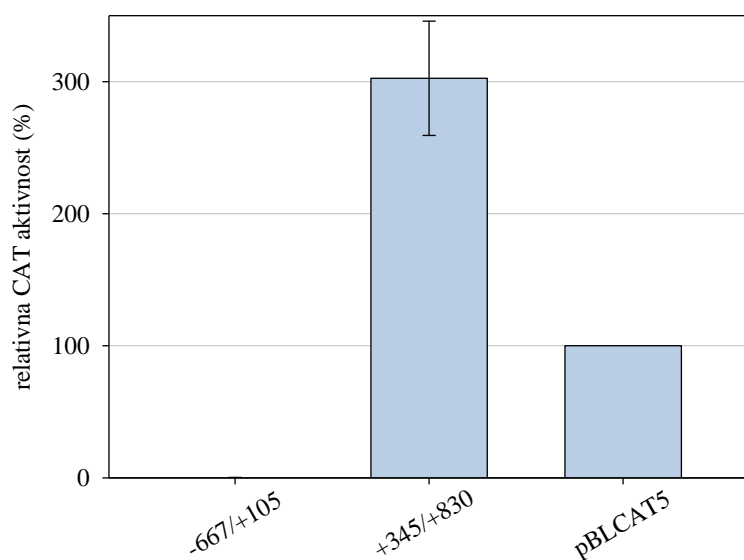
Potencijalni promotorski regioni su uklonirani u pCATbasic reporterski vektor. Nakon tranzijentne transfekcije K562 ćelija dobijenim plazmidnim konstruktima, njihova aktivnost je merena CAT ELIZA esejom.

Priprema CAT konstrukata

Fragmenti -667/+105 i +345/+830, koji obuhvataju potencijalne promotore predviđene *in silico* analizom, su umnoženi PCR metodom na način opisan u poglavlju Materijal i metode (Tabela 10), i uklonirani u pCATbasic reporterski vektor. Detekcija pCAT konstrukata sa insertovanim fragmentom izvršena je kao što je prikazano na primeru kloniranja fragmenta -247/+105. Krajnja potvrda uspešnosti kloniranja dobijena je sekvenciranjem CAT konstrukata.

Merenje promotorske aktivnosti -667/+105 i +345/+830 regiona

CAT konstrukti su kotransfekovani sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju K562, kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Promotorska aktivnost kloniranih fragmenata je merena CAT ELIZA esejom i upoređivana sa aktivnošću promotora kontrolnog pBLCAT5 plazmida. Rezultati merenja promotorske aktivnosti kloniranih fragmenata su prikazani na Slici 40.



Slika 40. Aktivnosti potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena. K562 ćelije su tranzijentno transfekovane odgovarajućim CAT konstruktom i pCH110 plazmidom. Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima merene CAT ELIZA esejom normalizovane su u odnosu na aktivnost β -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti pojedinačnih konstrukata izražene su relativno u odnosu na normalizovanu CAT aktivnost kontrolnog pBLCAT5 plazmida, čija je aktivnost označena sa 100%. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SEM dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

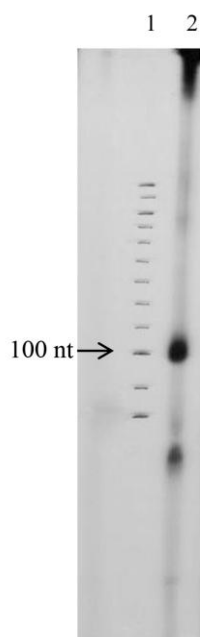
Fragment -667/+105 nije pokazao promotorsku aktivnost, dok je aktivnost fragmenta +345/+830 bila izuzetno visoka (302.54 ± 43.24), oko 3 puta veća od aktivnosti promotora kontrolnog pBLCAT plazmida.

Analiza starta transkripcije *Bcl2L12* gena

Radioaktivni "primer extension" esej

Imajući u vidu rezultate funkcionalne analize potencijalnih promotorskih regiona *Bcl2L12* gena, pretpostavljeno je da bi TSS trebalo da se nalazi u regionu između pozicije +345 i ATG kodona. Zbog toga je urađen radioaktivni "primer extension" esej, elongacijom Bcl2L12 +752 R reverznog prajmera (Tabela 8), na način opisan u poglavlju Materijal i metode.

Rezultati radioaktivnog "primer extension" eseja su prikazani na Slici 41.



Slika 41. Radioaktivni "primer extension" esej. 1 – 10 nt DNK marker; produkti reakcije elongacije Bcl2L12 +752 R prajmera (elektroforeza na denaturišućem 6% poliakrilamidnom gelu)

Elongacijom Bcl2L12 +752 R prajmera dobijeno je nekoliko produkata, pri čemu je glavni bio fragment dužine oko 100 nukleotida. S obzirom na poziciju Bcl2L12 +752 R prajmera, ovaj fragment ukazuje na položaj TSS u regionu oko 30 bp uzvodno od ATG kodona.

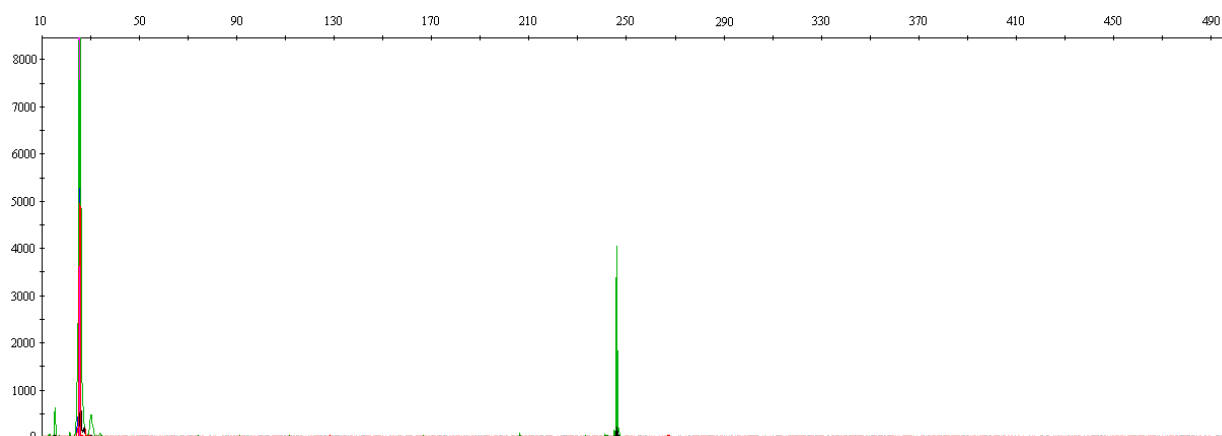
Neradioaktivni "primer extension" esej

Preliminarni rezultat dobijen radioaktivnim "primer extension" esejom je proveren neradioaktivnim "primer extension" esejom.

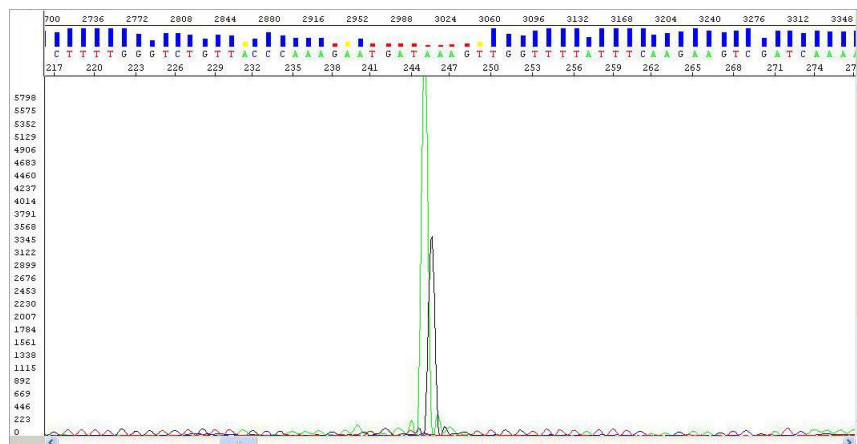
Naime, kako je funkcionalna analiza fragmenta +345/+830 pokazala da on ispoljava jaku promotorsku aktivnost, a pri tome sadrži i deo kodirajućeg regiona egzona 1, himerni plazmid dobijen kloniranjem navedenog fragmenta u pCAT basic reporterski vektor (pCAT Bcl2L12 +345/+830) je upotrebljen za određivanje mesta starta transkripcije.

K562 ćelije su tranzijentno transfekovane pCAT Bcl2L12 +345/+830 plazmidnim konstruktom i, 24 časa nakon transfekcije, iz njih je izolovana totalna RNK. Dobijena RNK, koja sadrži i iRNK *CAT* gena transkribovanu sa pCAT Bcl2L12 +345/+830 konstrukta, je reverzno transkribovana pomoću VIC-CAT R reverznog prajmera (Tabela 7), nakon čega je sintetisana cDNK analizirana kapilarnom elektroforezom na način opisan u poglavlju Materijal i metode.

Rezultati neradioaktivnog "primer extension" eseja su prikazani na Slici 42.



Slika 42a. Neradioaktivni "primer extension" esej. Hromatogram dobijen kapilarnom elektroforezom produkta reakcije elongacije VIC-CAT R reverznog prajmera; dužina dobijenog fragmenta je određena poređenjem sa Gene Scan-500 LIZ Size Standard-om, pomoću programa Gene Mapper v.4.0. Detektovan je fragment dužine 246 nukleotida.



Slika 42b. Neradioaktivni "primer extension" esej. Hromatogram dobijen kapilarnom elektroforezom smeše koja je sadržala produkt reakcije sekvenciranja pCAT Bcl2L12 +345/+830 konstrukta neobeležnim CAT R reverznim prajmerom i produkt reakcije elongacije VIC-CAT R reverznog prajmera; analiza je izvršena programom Sequencing Analysis v.5.2.

Neradioaktivnim "primer extension" esejom je detektovan fragment dužine 246 nukleotida. S obzirom na poziciju VIC-CAT R "reverse" prajmera i dužinu VIC-obeležnog fragmenta, zaključeno je da 5' kraj analiziranog transkripta odgovara T nukleotidu koji se nalazi 33 nukleotida uzvodno od ATG kodona na početku kodirajućeg regiona egzona 1 *Bcl2L12* gena.

Analiza vezivanja transkripcionih faktora za +345/+830 promotorski region *Bcl2L12* gena

In silico analiza +345/+830 promotorskog regiona

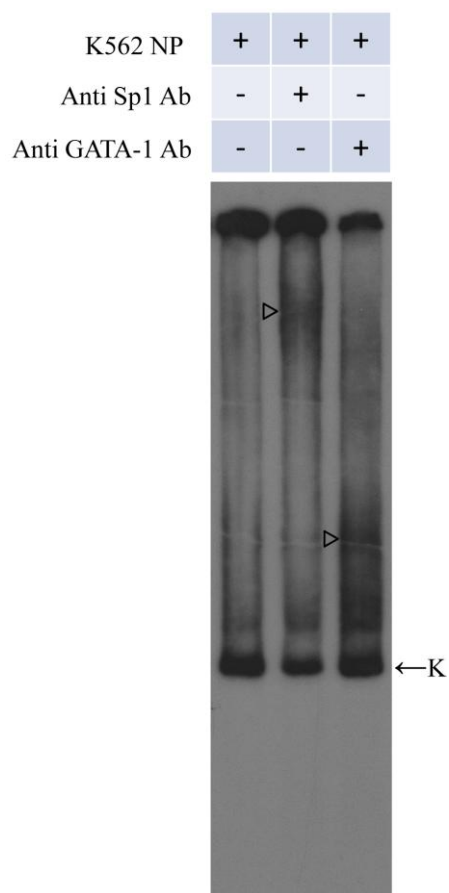
U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za promotorski region *Bcl2L12* gena, fragment +345/+830 je analiziran na prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora programom TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Ova analiza je pokazala da se za +345/+830 region vezuje veći broj transkripcionih faktora, među kojima su Sp1 i članovi GATA familije. Poređenjem vezivnih mesta za transkripcione faktore prisutnih u fragmentu +345/+747 i +345/+830 primećeno je da su u dužem fragmentu prisutna dodatna mesta za vezivanje 4 transkripciona faktora: USF, Brn-2, GATA-1 i Sp1. Za razliku od GATA vezivnih

mesta, sva detektovana Sp1 mesta su bila prisutna nizvodno od pozicije +683, odnosno od ATG kodona.

Analiza interakcije promotorskog regiona Bcl2L12 gena i transkripcionih faktora

Interakcije nuklearnih proteina izolovanih iz K562 ćelija sa promotorskim regionom *Bcl2L12* gena su analizirane eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) na način opisan u poglavlju Materijal i metode. U ovim eksperimentima je korišćena dvolančana proba sintetisana PCR reakcijom pomoću +485 Fc i +830 Rc prajmera (Tabela 10). U "supershift" esejima su korišćena antitela specifična za Sp1 i GATA-1 transkripcione faktore.

Rezultati "supershift" eseja su prikazani na Slici 43.



Slika 43. Analiza interakcije radioaktivno obeležene dvolančane probe +485/+830 sa nuklearnim proteinima (NP) iz K562 ćelija, metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). Formirani kompleks je označen sa K. "Supershift" esej je raden dodavanjem antitela za Sp1 i GATA-1 transkripcione faktore; dobijeni kompleksi su označeni trouglovima (▷).

Na osnovu rezultata "supershift" eseja je zaključeno da kompleks koji se formira interakcijom nuklearnih proteina izolovanih iz K562 ćelija i +485/+830 probe najverovatnije sadrži Sp1 i GATA-1 transkripcione faktore, što je *in silico* analizom i predviđeno.

DISKUSIJA

ANALIZA *IGHV-IGHD-IGHJ* REARANŽMANA

Hronična limfocitna leukemija je najčešći tip leukemije adultnog doba u Evropi i Severnoj Americi. Iako su leukemije relativno česte među hematološkim malignitetima u Srbiji, podaci o epidemiološkim karakteristikama HLL nisu dostupni [<http://batut.org.rs/>].

Imajući u vidu geografske i populacione razlike u strukturi B ćelijskog receptora HLL klonova, kao i prognostički značaj *IGHV* mutacionog statusa, jedan od ciljeva ovog rada je bila analiza *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana kod pacijenata obolelih od hronične limfocitne leukemije u Srbiji.

Studija je obuhvatila 85 pacijenata; medijana starosti pacijenata pri postavljanju dijagnoze je bila 65 godina, a odnos broja muškaraca i žena 2.7. Kao i u drugim studijama, starost pacijenata pri postavljanju dijagnoze i pol nisu pokazali asocijaciju sa *IGHV* mutacionim statusom i kliničkim tokom bolesti.

Frekvence M-HLL i N-HLL podtipa bolesti u analiziranoj grupi pacijenata (55.3% i 44.7%) su bile slične frekvencama prijavljenim u drugim studijama [Fais *et al.* 1998; Maurer *et al.* 2005]. U M-HLL grupi, većina pacijenata je bila u Bine A stadijumu i imala indolentan tok bolesti (55.3%). S druge strane, u N-HLL grupi su preovlađivali pacijenti sa progresivnom bolešću (73.3%) i pripadali su Bine B i C stadijumima. Pored toga, kod M-HLL pacijenata je detektovano značajno duže vreme od postavljanja dijagnoze do prve terapije (TTT), što je jedan od parametara koji pokazuje manju agresivnost bolesti, nego kod N-HLL pacijenata. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih studija u kojima je pokazano da postoji jaka asocijacija *IGHV* mutacionog statusa sa tokom bolesti, kao i da su nemutirani *IGHV* geni nepovoljan prognostički faktor u HLL [Hamblin *et al.* 1999; Maloum *et al.* 2000].

Analizirano je ukupno 88 *IGH* alela, s obzirom da su 3 pacijenta (3.5%) ekspimirala bialelske rearanžmane. Izostanak "alelskog isključivanja" je inače detektovan kod oko 5% HLL pacijenata; pretpostavlja se da u slučaju kada mutacije uvedene u ekspimirani *IGHV* gen dovode do smanjene funkcionalnosti BcR HLL klon, selektivnu prednost imaju ćelije koje su u stanju da rearanžiraju i drugi *IGH* alel [Rassenti and Kipps 1997].

Analiza relativnih frekvenci *IGHV* familija u *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanima je pokazala da je *IGHV3* familija bila najzastupljenija (55.7%), a za njom *IGHV1* (27.3%) i *IGHV4* (12.5%). Dobijene frekvence se nisu značajno razlikovale od frekvenci *IGHV* familija kod pacijenata iz mediteranskih zemalja [Stamatopoulos *et al.* 2007], sa izuzetkom *IGHV4* familije koja je pokazala manju zastupljenost. Ovaj rezultat je možda uzrokovan relativno malim brojem pacijenata u našoj studiji, a moguće je i da je odraz uticaja populaciono-specifičnih genetičkih karakteristika i/ili sredinskih faktora u selekciji HLL klonova.

Asimetrija u prisustvu somatskih hipermutacija, kao i hijerarhija u stepenu mutiranosti između *IGHV* familija [Fais *et al.* 1998; Duke *et al.* 2003; Mauerer *et al.* 2005] je detektovana i u našoj studiji. Geni *IGHV3* familije su bili ekspimirani pretežno u mutiranoj formi, nasuprot genima *IGHV1* familije koji su bili pretežno nemutirani. Pored toga, *IGHV1* geni su sadržali mali broj somatskih hipermutacija, dok su *IGHV3* i *IGHV4* geni bili visoko mutirani.

Od ukupno 29 identifikovanih različitih *IGHV* gena, njih 7 je bilo prisutno u 56.9% rearanžmana, što pokazuje izrazitu asimetriju u ekspresiji pojedinih *IGHV* gena u HLL. Neki od najčešće ekspimiranih gena (*IGHV3-23*, *IGHV1-2*, *IGHV1-18*) su bili zastupljeni u frekvencama sličnim kao u rearanžmanima normalnih B ćelija [Brezinschek *et al.* 1997] dok je, na primer, *IGHV1-69* pokazao povećanu zastupljenost tipičnu za HLL.

IGHV3-23 je bio najzastupljeniji od svih *IGHV* gena; iako je njegova frekvencija bila viša nego u drugim populacijama [Hamblin *et al.* 1999; Stamatopoulos *et al.* 2007], ova razlika nije dostigla statističku značajnost. *IGHV3-23* je bio preferencijalno ekspimiran u mutiranim rearanžmanima i, uprkos tome što je mutirani *IGHV3-23* u nekim studijama identifikovan kao nezavisan negativni prognostički marker [Bomben *et al.* 2010], u našoj grupi pacijenata je on bio asociran sa indolentnim tokom bolesti.

Sledeći po učestalosti je bio *IGHV1-69* gen. Kao i u drugim studijama [Tobin *et al.* 2004; Widhopf *et al.* 2004], pokazana je njegova velika učestalost u HLL, preferencijalna ekspresija u N-HLL podtipu, kao i nizak stepen mutiranosti. Četiri od ukupno 9 detektovanih *IGHV1-69* gena je bilo u sastavu stereotipnih rearanžmana (klasteri #3 i #6). *IGHV1-69* je pokazao preferencijalno rekombinovanje sa *IGHD2* i *IGHD3* genima (88.9%), kao i sa *IGHJ6* (55.5%), što je rezultiralo nastankom relativno dugačkih VH CDR3 regiona u rearanžmanima sa *IGHV1-69* genom; medijana dužine VH CDR3 ovih rearanžmana je bila 22 amino-kiseline, dok je u ostalim rearanžmanima iznosila 16 amino-kiselina. Ovaj visoko-specifičan genski repertoar HLL klonova koji ekspimiraju *IGHV1-69* gen je opisan i u drugim studijama [Forconi *et al.* 2010; Potter *et al.* 2003] i ide u prilog pretpostavci o učešću antigena u selekciji klonova određene antigenske specifičnosti u HLL.

IGHV3-30 je bio ekspimiran isključivo u mutiranim rearanžmanima. Nedavno objavljena studija [Del Giudice *et al.* 2009] je pokazala da je ovaj gen marker indolentnog kliničkog toka bolesti koja je sklona spontanoj regresiji. Međutim, u našoj grupi pacijenata on je češće bio asociiran sa progresivnom formom HLL. Moguće je, ipak, da je ova razlika rezultat malog broja pacijenata u našoj studiji koji su ekspimirali *IGHV3-30*.

IGHV4-34 i *IGHV3-07* su u drugim studijama bili među najzastupljenijim genima u HLL rearanžmanima [Fais *et al.* 1998], ali u našoj grupi pacijenata to nije bio slučaj. Ipak, njihove relativno niske frekvence (3.4% i 2.3%) nisu bile statistički značajno različite od frekvenci detektovanih kod pacijenata iz mediteranskih zemalja [Stamatopoulos *et al.* 2007]. U skladu sa njihovom preferencijalnom ekspresijom u M-HLL [Ghia *et al.* 2005; Sutton *et al.* 2009], oba gena su detektovana isključivo u mutiranoj formi.

Rezultati ove studije su još jednom potvrdili postojanje geografskih razlika u zastupljenosti *IGHV3-21* gena u HLL rearanžmanima. Naime, u našoj grupi pacijenata *IGHV3-21* je detektovan u samo 2.3% rearanžmana, što je slično frekvenci dobijenoj u mediteranskim zemljama [Stamatopoulos *et al.* 2007; Ghia *et al.* 2005; Bomben *et al.* 2007], nasuprot mnogo većim frekvencama detektovanim u skandinavskim zemljama i drugim zemljama severne Evrope [Tobin *et al.* 2002; Tobin *et al.* 2004]. *IGHV3-21* je bio ekspimiran kod samo 2 pacijenta, i to kod jednog u mutiranoj, a kod drugog u nemutiranoj formi. Nemutirani *IGHV3-21* je bio u sklopu stereotipnog rearanžmana (klaster #2), kombinovan sa *IGHD3* i *IGHJ6*. Rearanžmani koji

pripadaju ovom klasteru se odlikuju izuzetno kratkim VH CDR3 (9 amino-kiselina), uprkos činjenici da sadrže *IGHJ6*, najduži od svih *IGHJ* gena. Mnoge studije su pokazale da HLL u kojoj je eksprimiran *IGHV3-21* predstavlja poseban podtip bolesti, za koji je karakteristična loša prognoza bez obzira na *IGHV* mutacioni status [Tobin *et al.* 2002; Bomben *et al.* 2007]. Na žalost, zbog malog broja ovih pacijenata u našoj studiji, nije bilo moguće analizirati asocijaciju *IGHV* mutacionog statusa rearanžmana sa *IGHV3-21* genom sa tokom bolesti.

Ekspresija stereotipnih B ćelijskih receptora je detektovana kod 15.3% pacijenata uključenih u našu studiju. Ova frekvenca je nešto niža od frekvence stereotipnih rearanžmana u drugim studijama [Stamatopoulos *et al.* 2007; Murray *et al.* 2008; Bomben *et al.* 2009; Messmer *et al.* 2004] i verovatno je rezultat relativno malog broja analiziranih pacijenata. Rearanžmani sa stereotipnim VH CDR3 su predominantno detektovani u N-HLL podtipu. Pored toga, česta zastupljenost pojedinih *IGHV* gena u stereotipnim rearanžmanima, pokazana u mnogim studijama [Stamatopoulos *et al.* 2007; Bomben *et al.* 2009], primećena je i u našoj grupi pacijenata, s obzirom da su najčešći VH CDR3 klasteri bili mešoviti *IGHV1/5* klaster (#1) i *IGHV1-69* klasteri (#3 and #6), koji su svi sadržali isključivo nemutirane rearanžmane. Klaster #4 je sadržao 2 od ukupno 3 rearanžmana sa *IGHV4-34* genom, i oba su bila u nemutiranoj formi. U skladu sa niskom zastupljenošću *IGHV3-21* gena u našoj grupi pacijenata, detektovan je samo 1 rearanžman koji pripada klasteru #2. Generalno, najčešći VH CDR3 klasteri detektovani u našoj studiji (#1, #2, #3, #4 i #6) bili su detektovani sa sličnim frekvencama kao kod mediteranskih pacijenata, dok je klaster #31 bio zastupljen sa značajno većom učestalošću. Zanimljivo je da je, uprkos malom broju pacijenata, u našoj studiji detektovan i 1 rearanžman koji pripada retkom klasteru #51, kao i 1 rearanžman koji pripada potencijalnom klasteru #79 definisanom od strane Murray i saradnika [Murray *et al.* 2008].

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da je *IGHV-IGHD-IGHJ* genski repertoar kod M-HLL i N-HLL pacijenata iz Srbije sličan repertoaru opisanom kod pacijenata iz mediteranskih zemalja. Dalja istraživanja će pokazati da li su primećene razlike rezultat populaciono-specifičnih genetičkih karakteristika i/ili sredinskih faktora prisutnih u ovom geografskom području.

IGHV mutacioni status se pokazao kao najpouzdaniji molekularni marker u HLL, s obzirom da ispoljava jaku i konzistentnu asocijaciju sa kliničkim tokom bolesti. Pored toga, mutacioni status *IGH* koje eksprimiraju ćelije leukemičnog klona se ne menja tokom vremena, pa se može odrediti u bilo kom trenutku bolesti. Ipak, zbog metodologije koja se koristi za određivanje *IGHV* mutacionog statusa, primena ovog molekularnog markera u svakodnevnoj kliničkoj praksi je još uvek relativno ograničena. Zbog toga su mnoga istraživanja usmerena ka pronalaženju prognostičkog markera koji bi pokazivao jaku asocijaciju sa *IGHV* mutacionim statusom i tako bio upotrebljen kao njegov surogat-marker.

Jedan od ispitivanih markera je CD38 status, s obzirom na njegov prognostički značaj i asocijaciju sa kliničkim parametrima HLL [Damle *et al.* 1999; Ghia *et al.* 2003; Dürig *et al.* 2002]. U nekim studijama je pokazana snažna korelacija pozitivnog CD38 statusa sa nemutiranim *IGHV* statusom [Damle *et al.* 1999; Kröber *et al.* 2002]. Međutim, u drugim studijama je pokazano da ekspresija CD38 nije pouzdan prediktor *IGHV* mutacionog statusa, bez obzira na "cut-off" nivo odabran za definisanje CD38 statusa (30%, 20%, 7% CD38-pozitivnih ćelija) [Jelinek *et al.* 2001]. U ovom radu je pokazano da "cut-off" nivo od 14.5% CD38-pozitivnih ćelija najbolje diskriminiše M-HLL od N-HLL pacijenata. Međutim, iako je primenom ovog "cut-off" nivoa dobijena značajna asocijacija CD38-pozitivnosti i nemutiranog *IGHV* statusa, na osnovu broja pogrešno klasifikovanih slučajeva (28.9%) je zaključeno da je CD38 status slab prediktor mutacionog statusa, te nije pogodan surogat-marker.

Lipoprotein lipaza (LPL) je relativno nov molekularni marker u HLL. Iako uloga LPL u patogenezi HLL nije razjašnjena, povišena ekspresija LPL je pokazala značajnu asocijaciju sa nepovoljnim kliničkim karakteristikama bolesti, kao i sa drugim negativnim prognostičkim markerima, uključujući i *IGHV* mutacioni status [Nüchel *et al.* 2006; Van Bockstaele *et al.* 2007]. I u našoj studiji je ekspresija *LPL* gena ispoljila jaku asocijaciju sa *IGHV* mutacionim statusom. Naime, pokazano je da "cut-off" nivo od 1RU najbolje diskriminiše M-HLL od N-HLL pacijenata, kao i da korišćenjem ove vrednosti kod samo 7.06% slučajeva postoji neslaganje *LPL* statusa i *IGHV* mutacionog statusa. Na osnovu toga je zaključeno da je nivo ekspresije *LPL* odličan prediktor *IGHV* mutacionog statusa. Međutim, da bi *LPL* mogao da uđe u upotrebu kao surogat-marker, neophodna je standardizacija qRT-PCR metode za merenje njegove ekspresije, i određivanje univerzalne "cut-off" vrednosti na osnovu koje bi se definisao *LPL* status.

EKSPRESIJA APOPTOTSKIH GENA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI

Hronična limfocitna leukemija se često navodi kao paradigma maligniteta izazvanog poremećajem apoptoze. Međutim, mehanizmi koji dovode do rezistencije HLL B limfocita na apoptozu, kao i značaj ove rezistencije za tok bolesti, su u velikoj meri nerazjašnjeni. U HLL su opisani defekti u okviru različitih puteva koji učestvuju u regulaciji apoptoze, kao što su ATM-p53 put [Pettit *et al.* 2001], Fas/FasL sistem [Panayiotidis *et al.* 1995; Osorio *et al.* 2001], signalni putevi fosfatidil-inozitol-3 kinaze [Cuni *et al.* 2004; Ringshausen *et al.* 2002; Barragan *et al.* 2002] i drugi. Naročito su česti poremećaji unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze, u kome ključno mesto zauzimaju članovi Bcl2 familije proteina. Pored toga, pokazano je da mnogi citokini, uključujući BAFF ("B-cell activation factor"), APRIL ("a proliferation inducing ligand"), CD40 ligand i interleukin 4 utiču na apoptotsku rezistenciju HLL B limfocita [Kern *et al.* 2004; Schattner 2000; Pu and Bezwoda 1997]. Pretpostavlja se da antigenska stimulacija preko BcR takođe utiče na apoptotske puteve [Bernal *et al.* 2001], iako i dalje postoje brojne kontroverze po pitanju signalizacije sa aktiviranih površinskih IgM i IgD u HLL ćelijama. S obzirom da ni jedan od do sada opisanih poremećaja apoptoze nije univerzalno prisutan kod HLL pacijenata, smatra se da ne postoji jedinstveni mehanizam koji leži u osnovi apoptotske rezistencije HLL B limfocita, što je možda jedan od uzroka izrazite heterogenosti kliničkog toka HLL.

U ovom radu je analizirana uloga unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze u HLL preko praćenja ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena, kao tipičnih predstavnika Bcl2 familije apoptotskih regulatora. Analizirana je i ekspresija *Bcl2L12* gena, novog člana Bcl2 familije, čija funkcija u apoptozu još uvek nije u potpunosti objašnjena.

U našoj studiji je detektovan značajno viši nivo ekspresije *Bcl2* gena kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole što je i očekivano, kada se ima u vidu njegova anti-apoptotska funkcija s jedne, i dugovečnost HLL B limfocita s druge strane. Iako je ekspresija *Bcl2* bila izrazito heterogena među pacijentima, opseg izmerenih vrednosti *Bcl2* iRNK se u maloj meri preklapao sa opsegom vrednosti zdravih kontrola, tako da je ekspresija *Bcl2* pokazala odličnu moć diskriminacije HLL od normalnih uzoraka; na osnovu dobijene "cut-off" vrednosti je izračunato

da je povišena ekspresija *Bcl2* detektovana kod čak 94.8% pacijenata. Druge studije su takođe pokazale povećanu ekspresiju *Bcl2* kod većine HLL pacijenata, kao i velike razlike u nivou ekspresije među pacijentima [Mariano *et al.* 1992], dok je stepen preklapanja sa zdravim kontrolama varijabilan i u nekim studijama je bio uzuzetno visok [Saxena *et al.* 2004].

Ekspresija *Bcl2* nije pokazala značajnu asocijaciju sa Bine stadijumom bolesti. Rezultati različitih studija po pitanju asocijacije *Bcl2* ekspresije sa stadijumom bolesti su prilično kontroverzni; u nekim studijama je detektovan porast ekspresije u kasnijim stadijumima [Faderl *et al.* 2002; Aviram *et al.* 2000], dok je u drugim asocijacija potpuno izostala [Robertson *et al.* 1996; Saxena *et al.* 2004]. Treba imati u vidu da su u ovim studijama korišćena oba sistema za podelu bolesti na stadijume (Rai i Bine), što je možda uzrok oprečnih rezultata. Time bi se mogao objasniti i rezultat naše studije koji pokazuje da je, uprkos nepostojanju asocijacije sa kliničkim stadijumom HLL, ekspresija *Bcl2* značajno viša u progresivnom tipu bolesti. U skladu sa tim, ekspresija *Bcl2* je ispoljila i značajnu negativnu korelaciju sa LDT, koji odražava agresivnost bolesti.

U ovom radu je analizirana i asocijacija ekspresije *Bcl2* sa molekularnim prognostičkim markerima. U grupi N-HLL pacijenata su detektovani viši nivoi *Bcl2* iRNK u odnosu na M-HLL pacijente ali, iako na samoj granici, ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Međutim, ekspresija *Bcl2* je ispoljila snažnu pozitivnu korelaciju sa ekspresijom *LPL*, za koju je prethodno pokazano da ima odličnu prediktivnu moć *IGHV* mutacionog statusa. Treba naglasiti da je do sada objavljeno samo nekoliko studija u kojima je analizirana diferencijalna ekspresija gena u N-HLL i M-HLL [Kienle *et al.* 2005; Kienle *et al.* 2006] i u njima nije detektovana asocijacija ekspresije *Bcl2* i *IGHV* mutacionog statusa. Ipak, naši rezultati pokazuju visok nivo *Bcl2* ekspresije u grupi pacijenata definisanoj na osnovu pozitivnog *LPL* statusa (i nemutiranog *IGHV* statusa). S obzirom da je *LPL* pozitivnost negativan prognostički marker u HLL, asociiran sa agresivnijim tipom bolesti i kraćim preživljavanjem, moguće je da ovim nepovoljnim kliničkim karakteristikama, makar delimično, doprinosi i visoka ekspresija anti-apoptotskog *Bcl2* proteina, koja dovodi do smanjenja apoptotskog potencijala leukemičnih ćelija i njihove povećane akumulacije.

Asocijacija sa CD38 statusom nije pokazana, bez obzira na "cut-off" vrednost odabranu za razlikovanje CD38-pozitivnih i CD38-negativnih pacijenata.

Analiza ekspresije *Bax* gena je pokazala da je i on jače eksprimiran kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole, ali je ovo povećanje bilo manje nego u slučaju *Bcl2* gena. Pored toga, ekspresija *Bax* je bila manje heterogena među pacijentima, ali se opseg izmerenih vrednosti *Bax* iRNK u značajnoj meri preklapao sa opsegom vrednosti izmerenih kod zdravih kontrola. Iako je u nekim studijama pokazana asocijacija između visoke ekspresije *Bax* i indolentnog toka bolesti [Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Molica *et al.* 1998], u našoj grupi pacijenata asocijacija sa tokom bolesti, Bine stadijumom i LDT nije detektovana.

Što se tiče asocijacije sa molekularnim prognostičkim markerima, rezultati su bili slični rezultatima dobijenim za *Bcl2* gen. Ekspresija *Bax* je bila viša u N-HLL grupi pacijenata, ali na granici statističke značajnosti. S druge strane, pokazana je pozitivna korelacija sa *LPL* ekspresijom, i asocijacija visokog nivoa *Bax* sa pozitivnim *LPL* statusom. Asocijacija sa *CD38* statusom nije detektovana.

S obzirom na pro-apoptotsku funkciju *Bax* proteina, povišena ekspresija *Bax* u apoptotski-rezistentnim HLL ćelijama na prvi pogled deluje paradoksalno. Međutim, neka istraživanja su pokazala da u HLL dolazi do povećanja ekspresija kako pro- tako i anti-apoptotskih proteina [Kitada *et al.* 1998], kao i da su one pozitivno korelisane [Faderl *et al.* 2002; Aviram *et al.* 2000]. U našoj studiji je takođe detektovana pozitivna korelacija između ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena. Smatra se da je u pitanju mehanizam kojim ćelija višak anti-apoptotskih proteina pokušava da kompenzuje povećanjem ekspresije pro-apoptotskih, i na taj način povрати balans neophodan za normalnu regulaciju apoptoze.

Analiza odnosa ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena je pokazala da je on značajno viši kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole i da, usled malog preklapanja sa opsegom *Bcl2/Bax* odnosa kod zdravih kontrola, on odlično diskriminiše HLL od normalnih uzoraka. Međutim, *Bcl2/Bax* odnos nije pokazao značajnu asocijaciju kako sa kliničkim karakteristikama bolesti (izuzev LDT), tako ni sa molekularnim prognostičkim markerima, iako je ovaj odnos bio nešto viši u *LPL*-pozitivnoj i N-HLL grupi pacijenata. Generalno se smatra da povišen *Bcl2/Bax* odnos pokazuje jaču asocijaciju sa nepovoljnim prognostičkim karakteristikama bolesti i da je značajniji za preživljavanje HLL ćelija od ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena pojedinačno [Aguilar-Santelises *et al.*

1996; Molica *et al.* 1998], ali treba istaći da je u nekim studijama, kao u našoj, ova korelacija potpuno izostala [Kitada *et al.* 1998].

Objašnjenje za ovaj rezultat treba potražiti u činjenici da u kontroli unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze u HLL učestvuju i drugi proteini Bcl2 familije, koji takođe mogu da formiraju heterodimere kako međusobno, tako i sa Bcl2 i Bax, modulišući na taj način njihovu funkciju. To znači da, iako je relativni odnos pro- i anti-apoptotskih članova Bcl2 familije od presudnog značaja za sposobnost ćelije da uđe u proces apoptoze, to ne mora obavezno biti odnos Bcl2 i Bax. Primer koji najbolje ilustruje ovu tvrdnju je protein Mcl1, anti-apoptotski član Bcl2 familije koji je visoko eksprimiran u HLL. Povećana ekspresija Mcl1 je asocirana sa brzom progresijom bolesti, slabim odgovorom na hemoterapiju i kraćim preživljavanjem pacijenata [Veronese *et al.* 2008; Saxena *et al.* 2004]. Kao Bcl2, i Mcl1 formira heterodimere sa Bax, tako da povećana ekspresija Bcl2 i Mcl1 imaju aditivni ili sinergistički negativni efekat na pro-apoptotsku funkciju Bax. Smatra se da, usled relativno kratkog poluživota [Michels *et al.* 2005], Mcl1 ne može u potpunosti da zameni Bcl2. Ipak, istraživanje Saxena i saradnika [Saxena *et al.* 2004] je pokazalo da je u slučaju odgovora na hemoterapeutske agense koji indukuju apoptozu, kod nekih pacijenata negativan efekat visokog Bcl2/Bax odnosa u potpunosti prevaziđen smanjenom ekspresijom Mcl1, te da je Mcl1 bolji prediktor hemosenzitivnosti HLL ćelija.

U ovom radu je analizirana i ekspresija *Bcl2L12* gena u HLL. *Bcl2L12* je pokazao relativno nisku ekspresiju kod HLL pacijenata, ali ipak značajno višu u odnosu na zdrave kontrole. Za razliku od *Bcl2* i *Bax*, ekspresija *Bcl2L12* nije mnogo varirala među pacijentima; s druge strane, nalik ekspresiji *Bax*, opseg izmerenih vrednosti *Bcl2L12* iRNK se u većoj meri preklapao sa opsegom izmerenim kod zdravih kontrola nego što je to bio slučaj sa *Bcl2* i *Bcl2/Bax* odnosom. Imajući u vidu izrazitu homogenost ekspresije *Bcl2L12* gena među HLL pacijentima, nije iznenađujuće što ona nije ispoljila značajnu asocijaciju sa kliničkim i molekularnim prognostičkim faktorima. Izuzetak je samo detektovana asocijacija visoke ekspresije *Bcl2L12* sa povišenim nivoom serumske laktat dehidrogenaze, koja je marker kinetike leukemijskih ćelija i predstavlja negativni prognostički faktor u HLL [Lee *et al.* 1987] (asocijacija sa LDH statusom nije pokazana u slučaju ekspresije *Bcl2* i *Bax* gena). Pokazana je i korelacija ekspresije *Bcl2L12* sa ekspresijom *Bax* gena, kao i nešto slabija korelacija sa ekspresijom *Bcl2* gena. Rezultati jedine objavljene studije koja se

bavila ekspresijom *Bcl2L12* u HLL [Papageorgiou *et al.* 2011] nisu pokazali asocijaciju sa LDH statusom kao i ostalim serumskim i molekularnim markerima, ali je povećana ekspresija *Bcl2L12* pokazala značajnu korelaciju sa kasnijim stadijumima bolesti i kraćim preživljavanjem pacijenata. Imajući u vidu razlike u dobijenim rezultatima, kao i činjenicu da funkcija *Bcl2L12* još uvek nije u potpunosti razjašnjena, jasno je da su neophodna dalja istraživanja na većim grupama pacijenata kako bi se utvrdilo da li, i u kojoj meri, ekspresija *Bcl2L12* utiče na apoptozu HLL B limfocita, kao i na kliničke karakteristike bolesti.

Iz svega do sada navedenog, očigledno je da je regulacija unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze u HLL izuzetno kompleksan proces sa mnogo učesnika koji pojedinačno, ili u kombinaciji, u različitoj meri doprinose dugovečnosti HLL B limfocita. Velike razlike u ekspresiji gena *Bcl2* familije među pacijentima verovatno doprinose izrazitoj heterogenosti kliničkog toka bolesti, ali treba imati u vidu da na aktivnost proteina *Bcl2* familije utiču i drugi mehanizmi koji uključuju protein-protein interakcije, lokalizaciju u ćeliji i različite post-translacione modifikacije. Zbog toga se može pretpostaviti da su kontradiktorni rezultati po pitanju korelacije između ekspresije članova *Bcl2* familije i kliničkih karakteristika, makar delimično, uslovljeni različitom metodologijom korišćenom za merenje njihove ekspresije (na nivou iRNK i proteina).

Nepostojanje konzistentne veze između poremećaja različitih puteva regulacije apoptoze i varijabilnosti kliničkog toka HLL otvara pitanje u kolikoj meri apoptotska rezistencija HLL B limfocita utiče na fenotip bolesti. S druge strane, struktura i mutacioni status BcR pokazuju nedvosmisleno korelaciju sa kliničkim karakteristikama HLL. Po jednom modelu, određeni stepen rezistencije na apoptozu postoji u oba podtipa HLL i doprinosi akumulaciji leukemičnih ćelija, dok interakcija antigena sa BcR moduliše tok bolesti [Packham and Stevenson 2005].

ANALIZA PROMOTORA I STARTA TRANSKRIPCije *Bcl2L12* GENA

Bcl2L12 gen je novi član Bcl2 familije regulatora apoptoze, otkriven od strane Scorilas i saradnika [Scorilas *et al.* 2001]. Gen je mapiran na hromozomu 19q13.3-q13.4 i određena je njegova egzon-intron struktura. U dobijenoj sekvenci *Bcl2L12* gena je označen položaj TATA bloka, kao i položaj pretpostavljenog mesta starta transkripcije (TSS), čime je predviđeno postojanje relativno dugačkog 5' netranslirajućeg regiona (5'-UTR) od 682 bp. Međutim, položaj TSS (+1 nukleotida) nije eksperimentalno potvrđen, niti je identifikovan promotorski region *Bcl2L12* gena.

U cilju lociranja promotora *Bcl2L12* gena, u ovom radu smo pošli od pretpostavke Scorilas i saradnika o položaju starta transkripcije. Klonirana su i funkcionalno analizirana dva fragmenta koja su obuhvatala region u okolini pretpostavljenog +1 nukleotida: fragment -667/+105 i fragment -247/+105. Međutim, funkcionalni CAT eseji su pokazali da ni jedan od ova dva fragmenta ne poseduje promotorsku aktivnost.

S obzirom na dobijene rezultate, analizirani region je produžen nizvodno, do pozicije +747, čime je zahvaćen i deo kodirajuće sekvence egzona 1 (prvih 65 bp). Urađena je funkcionalna analiza 8 delecionijskih reporterskih konstrukata (koji su sadržali fragmente -247/+752, -130/+747, +68/+747, +123/+747, +196/+747, +266/+747, +345/+747 i +485/+752), kako bi se utvrdilo da li neki od njih obuhvata promotorski region. Funkcionalnim CAT esejom je pokazano da, od navedenih fragmenata, najveću promotorsku aktivnost ispoljava fragment +345/+747, ali je ona i dalje izuzetno niska u poređenju sa aktivnošću promotora kontrolnog plazmida pBLCAT5. Zbog toga je navedeni fragment produžen na 3' kraju, do pozicije +830. Funkcionalnim CAT esejom pCAT *Bcl2L12* +345/+830 konstrukta je detektovana visoka aktivnost CAT enzima u transfekovanim K562 ćelijama, na osnovu čega je pretpostavljeno da fragment +345/+830 sadrži promotor *Bcl2L12* gena.

Ovaj rezultat je bio krajnje neočekivan, s obzirom da je za punu promotorsku aktivnost fragmenta +345/+830 očigledno bio neophodan region od +747 do +830 (region koji nedostaje u fragmentu

+345/+747), koji se u potpunosti nalazi u okviru kodirajućeg dela egzona 1 *Bcl2L12* gena. Ipak, u literaturi su opisani promotori za čiju su aktivnost neophodni elementi prisutni u kodirajućem delu prvog egzona. Jedan od primera je promotor gena za elastin (*ELN*); funkcionalna analiza promotorskih fragmenata ovog gena je pokazala da se aktivnost reporterskih konstrukata višestruko povećava kada oni obuhvataju i region od 84 nukleotida nizvodno od translacionog start kodona. Štaviše, promena pozicije ovog regiona u reporterskim konstruktima je dovela do gubitka promotorske aktivnosti, čime je pokazano da on nije klasični "enhancer", već integralni deo promotora [Pierce *et al.* 2006].

Na osnovu dobijenih rezultata je pretpostavljeno da bi TSS trebalo da se nalazi u regionu između pozicije +345 i početka kodirajuće sekvence egzona 1 (ATG kodona), što je i potvrđeno "primer extension" eksperimentima. Naime, neradioaktivnim "primer extension" esejom je detektovan fragment čija dužina ukazuje na to da je T nukleotid, koji se nalazi 33 nukleotida uzvodno od ATG kodona, mesto starta transkripcije *Bcl2L12* gena. Iako je uobičajeno da se minimalni promotor nalazi na poziciji od -40 do +40 u odnosu na +1 nukleotid [Sandelin *et al.* 2007], postoje brojni izuzeci od ovog pravila. Upečatljiv je primer humanog *ETF1* gena ("eucaryotic translation termination factor 1"), kod koga je za bazalnu transkripcionu aktivaciju esencijalan region na poziciji od +14 do +117 [Dubourg *et al.* 2003]. U slučaju *Bcl2L12* gena, determinisano mesto starta transkripcije se nalazi oko 100 nukleotida uzvodno od 5' kraja regiona koji se pokazao kao neophodan za visoku aktivnost pCAT *Bcl2L12* +345/+830 reporterskog konstrukta. Ipak, treba naglasiti da će tek funkcionalna analiza delecionih konstrukata fragmenta +345/+830 pokazati koji njegov deo je esencijalan za bazalni nivo transkripcije.

Analiza sekvence uzvodno od određenog TSS je pokazala da ovaj region ne sadrži TATA blok i sa njim asocirani BRE element ("B recognition element"; konsenzus sekvenca SSRCGCC), koji su najčešće locirani na pozicijama od -26 do -31 (TATA), odnosno od -32 do -37 (BRE) [Carninci *et al.* 2006]. Pored toga, u uzvodnom regionu nije identifikovan ni CCAAT blok, kao ni GC-bogati element (konsenzus sekvence GGGCGG) za koji se vezuje Sp1 transkripcioni faktor. Ovi elementi su karakteristični za promotore koji ne sadrže TATA blok ("TATA-less" promotori), ali njihovo prisustvo nije obavezno, što je pokazano na primeru mnogih gena (*E2A*, $\alpha_{1a}AR$, *SRGN*, i drugi) [Hata and Mizuguchi 2004; Razik *et al.* 1997; Nicodemus *et al.* 1990]. *In silico* analizom regiona uzvodno od TSS su identifikovana potencijalna mesta za vezivanje brojnih

transkripcionih faktora (MZFI, GATA-1, GATA-2, E2F, CREB, NRF-2, STATx, SRY, c-Rel), čija uloga u regulaciji transkripcije *Bcl2L12* gena tek treba eksperimentalno da se potvrdi.

Promotori većine humanih gena (oko 76%) ne sadrže TATA blok; u oko 30% ovih "TATA-less" promotora inicijacija transkripcije se odvija na InR ("initiator") konsenzus sekvenci $YYA_{+1}NWYY$. InR u većini slučajeva obuhvata mesto starta transkripcije, mada se može naći i uzvodno od njega; +1 nukleotid je najčešće, ali ne i obavezno, A [Yang *et al.* 2007]. Za razliku od TATA promotora, "TATA-less" minimalni promotori često sadrže i DPE element ("downstream promoter element") konsenzus sekvence RGWYV. DPE je najčešće lociran na poziciji od +28 do +32, ali se može naći i još nizvodnije [Kadonaga *et al.* 2002].

S obzirom da u regionu uzvodno od određenog TSS *Bcl2L12* gena nije pronađen TATA blok, potražili smo elemente karakteristične za "TATA-less" promotore. Ova analiza je pokazala da se TSS određen "primer extension" esejom nalazi u okviru klasične InR sekvence (CTT₊₁TATC), s tim što je +1 nukleotid T umesto A. Pored toga, detektovan je i DPE element (GGACG), 36 nukleotida nizvodno od TSS (odmah nakon ATG kodona).

Za "TATA-less" promotore, naročito one koji ne sadrže InR, je karakteristično prisustvo vezujućih mesta za Sp1 transkripcioni faktor koji, u odsustvu TATA bloka, vezuje TBP ("TATA-binding protein") i na taj način učestvuje u pozicioniranju transkripcionog preinicijacionog kompleksa [Butler and Kadonaga 2002]. Međutim, kao što je već rečeno, u regionu uzvodno od TSS *Bcl2L12* gena nisu detektovana Sp1 vezujuća mesta. Ipak, nizvodno od ATG kodona, na poziciji +707, detektovano je jedno, a na poziciji +820 još jedno Sp1 mesto. Rezultati "supershift" eseja su potvrdili vezivanje Sp1 transkripcionog faktora za region +485/+830.

Sp1 vezujuće mesto na poziciji +820 se nalazi u okviru regiona koji se u funkcionalnim esejima pokazao kao neophodan za visoku aktivnost pCAT *Bcl2L12* +345/+830 reporterskog konstrukta. S obzirom da položaj TSS koji smo odredili "primer extension" esejom implicira postojanje relativno kratkog 5'-UTR, može se pretpostaviti da vezivanje Sp1 na +820 mestu može da dovede do stabilizovanja transkripcionog kompleksa koji se formira na InR, i na taj način pojača transkripciju *Bcl2L12* gena. Vezivanje Sp1 transkripcionog faktora za regione nizvodno od TSS, pa čak i u okviru kodirajućeg regiona egzona 1, je pokazano i kod drugih gena (*Col1A1*, *ELN*)

[Hernandez *et al.* 2000; Pierce *et al.* 2006], i smatra se da je ono neophodno za transkripcionu aktivnost njihovih promotora.

“Supershift” esejom je potvrđeno i vezivanje GATA-1 transkripcionog faktora za fragment +485/+830. GATA-1 pripada GATA familiji transkripcionih faktora koji prepoznaju WGATAR konsenzus sekvencu i učestvuju u aktivaciji transkripcije velikog broja, prvenstveno eritroidno-specifičnih gena [Ferreira *et al.* 2005]. Pored toga, pokazano je i da GATA-1 utiče na ekspresiju nekih anti-apoptotskih gena *Bcl2* familije (*Bcl2*, *Bcl-X_L*) [Gregory *et al.* 1999; Tanaka *et al.* 2000] i na taj način sprečava apoptozu diferencirajućih ćelija tokom eritropoeze, ali direktna interakcija sa promotorima ovih gena tek treba da se dokaže. Rezultati naše studije ukazuju na moguću ulogu GATA-1 transkripcionog faktora u regulaciji ekspresije *Bcl2L12* gena u ćelijama mijeloidne loze.

Treba naglasiti da je do sada otkriveno čak 13 alternativnih transkripata *Bcl2L12* gena, čija je ekspresiona analiza pokazala da su oni diferencijalno eksprimirani u različitim tipovima ćelija [Kontos and Scorilas 2012]. Svi eksperimenti opisani u ovom radu su rađeni na humanoj K562 ćelijskoj liniji hronične mijeloidne leukemije, koja eksprimira sve osim jednog od opisanih transkripata (*Bcl2L12* v.9). Moguće je da su promotorski region i TSS koji su određeni u ovom radu odgovorni za ekspresiju makar nekih transkripcionih varijanti *Bcl2L12* gena, što će biti predmet daljih istraživanja.

ZAKLJUČCI

ANALIZA IGHV-IGHD-IGHJ REARANŽMANA

- Određivanjem mutacionog statusa rearanžiranih *IGHV* gena je pokazano da 55.3% analiziranih pacijenata pripada M-HLL podtipu, a 44.7% N-HLL podtipu hronične limfocitne leukemije.
- Pokazano je da je nemutirani *IGHV* status asociran sa nepovoljnim prognostičkim parametrima HLL. U M-HLL grupi, većina pacijenata je bila u stadijumu niskog rizika (Bine A) i imala indolentan tok bolesti, dok su u N-HLL grupi preovlađivali pacijenti sa progresivnom bolešću, u stadijumima srednjeg i visokog rizika (Bine B i C); kod M-HLL pacijenata je detektovano značajno duže vreme od postavljanja dijagnoze do prve terapije nego kod N-HLL pacijenata.
- Određene su frekvence *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena i genskih familija u *IGH* rearanžmanima HLL pacijenata. *IGHV-IGHD-IGHJ* genski repertoar leukemičnih klonova kod pacijenata iz Srbije je veoma sličan repertoaru detektovanom kod pacijenata iz zemalja mediteranskog područja, sa izuzetkom gena *IGHV4* familije koji su zastupljeni sa manjom učestalošću.
- Analizom VH CDR3 regiona je pokazano prisustvo stereotipnih rearanžmana kod 15.3% pacijenata, predominantno u N-HLL podtipu. Najčešće eksprimirani stereotipni klasteri (#1, #2, #3, #4 i #6) su detektovani sa sličnim frekvencama kao kod pacijenata iz mediteranskih zemalja, dok je klaster #31 pokazao nešto veću zastupljenost.
- Nemutiran *IGHV* status je asociran sa povišenom ekspresijom CD38 i *LPL*.
- Ekspresija *LPL* je odličan prediktor prisustva *IGH* mutacija u rearanžmanima HLL B limfocita i dobar kandidat za surogat- marker *IGHV* mutacionog statusa.

EKSPRESIJA GENA *Bcl2* FAMILIJE U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI

- Merenjem ekspresije *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* su detektovani znatno viši nivoi ekspresije sva tri gena, kao i *Bcl2/Bax* odnosa, kod HLL pacijenata u odnosu na zdrave kontrole; povećanje ekspresije je bilo najizraženije u slučaju *Bcl2* gena.
- Povišena ekspresija *Bcl2* gena je asocirana sa negativnim prognostičkim parametrima: progresivnim tipom bolesti, visokim nivoom serumskog β 2-mikroglobulina i LPL-pozitivnim statusom.
- Povišena ekspresija *Bax* gena je pokazala asocijaciju sa LPL-pozitivnim statusom.
- *Bcl2/Bax* odnos je, kao i ekspresija *Bcl2*, pokazao odličnu moć diskriminacije između normalnih i HLL uzoraka, ali nije ispoljio asocijaciju sa kliničkim i molekularnim prognostičkim markerima.
- Za razliku od *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2/Bax* odnosa, ekspresija *Bcl2L12* gena je bila izrazito homogena među HLL pacijentima i, kao takva, nije ispoljila značajnu asocijaciju sa kliničkim i molekularnim prognostičkim faktorima.
- Ekspresija *Bcl2*, *Bax* i *Bcl2L12* je bila viša u grupi N-HLL pacijenata u odnosu na M-HLL pacijente, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost.

ANALIZA PROMOTORA I STARTA TRANSKRIPCije *Bcl2L12* GENA

- Identifikovan je region *Bcl2L12* gena koji ispoljava jaku promotorsku aktivnost i prostire se od 338 nukleotida uzvodno, do 148 nukleotida nizvodno od translacionog start kodona.
- Određen je položaj starta transkripcije *Bcl2L12* gena, 33 nukleotida uzvodno od početka kodirajućeg dela egzona 1.

- Pokazano je vezivanje Sp1 i GATA-1 transkripcionih faktora za regulatorne elemente u identifikovanom promotorskom regionu.

LITERATURA

1. Aguilar-Santelises, M., Rottenberg, M. E., Lewin, N., Mellstedt, H., and Jondal, M. (1996) Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression, *Int J Cancer* 69, 114-119.
2. Apte, S. S., Mattei, M. G., and Olsen, B. R. (1995) Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta, *Genomics* 26, 592-594.
3. Austen, B., Skowronska, A., Baker, C., Powell, J. E., Gardiner, A., Oscier, D., Majid, A., Dyer, M., Siebert, R., Taylor, A. M., Moss, P. A., and Stankovic, T. (2007) Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 5448-5457.
4. Aviram, A., Rabizadeh, E., Zimra, Y., Yeshoron, M., Marmelstein, M., Shaklai, M., and Bairey, O. (2000) Expression of bcl-2 and bax in cells isolated from B-chronic lymphocytic leukemia patients at different stages of the disease, *European journal of haematology* 64, 80-84.
5. Barnes, W. M. (1977) Plasmid detection and sizing in single colony lysates, *Science* 195, 393-394.
6. Barragan, M., Bellosillo, B., Campas, C., Colomer, D., Pons, G., and Gil, J. (2002) Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells, *Blood* 99, 2969-2976.
7. Bernal, A., Pastore, R. D., Asgary, Z., Keller, S. A., Cesarman, E., Liou, H. C., and Schattner, E. J. (2001) Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor, *Blood* 98, 3050-3057.
8. Besmer, E., Gourzi, P., and Papavasiliou, F. N. (2004) The regulation of somatic hypermutation, *Current opinion in immunology* 16, 241-245.
9. Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguat, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S., and Gremy, F. (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer* 48, 198-206.
10. Bomben, R., Dal Bo, M., Capello, D., Benedetti, D., Marconi, D., Zucchetto, A., Forconi, F., Maffei, R., Ghia, E. M., Laurenti, L., Bulian, P., Del Principe, M. I., Palermo, G., Thorselius, M., Degan, M., Campanini, R., Guarini, A., Del Poeta, G., Rosenquist, R., Efremov, D. G., Marasca, R., Foa, R., Gaidano, G., and Gattei, V. (2007) Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study, *Blood* 109, 2989-2998.
11. Bomben, R., Dal Bo, M., Capello, D., Forconi, F., Maffei, R., Laurenti, L., Rossi, D., Del Principe, M. I., Zucchetto, A., Bertoni, F., Rossi, F. M., Bulian, P., Cattarossi, I., Ilariucci, F., Sozzi, E., Spina, V., Zucca, E., Degan, M., Lauria, F., Del Poeta, G., Efremov, D. G., Marasca, R., Gaidano,

- G., and Gattei, V. (2009) Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study, *British journal of haematology* 144, 492-506.
12. Bomben, R., Dal-Bo, M., Benedetti, D., Capello, D., Forconi, F., Marconi, D., Bertoni, F., Maffei, R., Laurenti, L., Rossi, D., Del Principe, M. I., Luciano, F., Sozzi, E., Cattarossi, I., Zucchetto, A., Rossi, F. M., Bulian, P., Zucca, E., Nicoloso, M. S., Degan, M., Marasca, R., Efremov, D. G., Del Poeta, G., Gaidano, G., and Gattei, V. (2010) Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 620-628.
 13. Boshart, M., Kluppel, M., Schmidt, A., Schutz, G., and Luckow, B. (1992) Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene, *Gene* 110, 129-130.
 14. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
 15. Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati-Saad, R., and Lipsky, P. E. (1997) Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells, *The Journal of clinical investigation* 99, 2488-2501.
 16. Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Dorner, T., Brezinschek, R. I., and Lipsky, P. E. (1998) Pairing of variable heavy and variable kappa chains in individual naive and memory B cells, *J Immunol* 160, 4762-4767.
 17. Brochet, X., Lefranc, M. P., and Giudicelli, V. (2008) IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis, *Nucleic acids research* 36, W503-508.
 18. Butler, J. E., and Kadonaga, J. T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes & development* 16, 2583-2592.
 19. Byrd, J. C., Stilgenbauer, S., and Flinn, I. W. (2004) Chronic lymphocytic leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 163-183.
 20. Caligaris-Cappio, F. (2003) Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 123, 380-388.
 21. Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engstrom, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grimmond, S. M., Wells, C. A., Orlando, V., Wahlestedt, C., Liu, E. T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V. B., Hume, D. A., and Hayashizaki, Y. (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution, *Nature genetics* 38, 626-635.
 22. Cartron, P. F., Oliver, L., Martin, S., Moreau, C., LeCabellec, M. T., Jezequel, P., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2002) The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients, *Human molecular genetics* 11, 675-687.

23. Catherwood, M. A., Matthews, C., Niblock, R., Dobbin, E., Morris, T. C., and Alexander, H. D. (2006) ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia, *European journal of haematology* 76, 294-298.
24. Chen, L., Zhang, Y., Zheng, W., Wu, Y., Qiao, C., Fan, L., Xu, W., and Li, J. (2008) Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia research* 32, 1491-1498.
25. Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule, *Science* 263, 1759-1762.
26. Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J. M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases, *Science* 278, 1966-1968.
27. Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2003) B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor, *Annual review of immunology* 21, 841-894.
28. Chiorazzi, N., Rai, K. R., and Ferrarini, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia, *The New England journal of medicine* 352, 804-815.
29. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
30. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., and Croce, C. M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13944-13949.
31. Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veliuona, M. A., and Hardwick, J. M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 554-559.
32. Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 2110-2114.
33. Collins, R. J., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H., and Kerr, J. F. (1989) Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro, *British journal of haematology* 71, 343-350.
34. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003) ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia, *The New England journal of medicine* 348, 1764-1775.
35. Crespo, M., Villamor, N., Gine, E., Muntanola, A., Colomer, D., Marafioti, T., Jones, M., Camos, M., Campo, E., Montserrat, E., and Bosch, F. (2006) ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 726-734.

36. Crowther-Swanepoel, D., and Houlston, R. S. (2009) The molecular basis of familial chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica* 94, 606-609.
37. Dürig, J., Naschar, M., Schmücker, U., Renzing-Köhler, K., Hölter, T., Hüttmann, A., and Dührsen, U. (2002) CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 16, 30-35.
38. Cuni, S., Perez-Aciego, P., Perez-Chacon, G., Vargas, J. A., Sanchez, A., Martin-Saavedra, F. M., Ballester, S., Garcia-Marco, J., Jorda, J., and Durantez, A. (2004) A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 18, 1391-1400.
39. Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 94, 1840-1847.
40. Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Murray, F., Hatzi, K., Josefsson, P., Laoutaris, N., Moreno, C., Anagnostopoulos, A., Jurlander, J., Tsaftaris, A., Chiorazzi, N., Belessi, C., Ghia, P., Rosenquist, R., Davi, F., and Stamatopoulos, K. (2010) A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 24, 125-132.
41. Deaglio, S., Aydin, S., Grand, M. M., Vaisitti, T., Bergui, L., D'Arena, G., Chiorino, G., and Malavasi, F. (2010) CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells, *Mol Med* 16, 87-91.
42. Deaglio, S., Vaisitti, T., Aydin, S., Ferrero, E., and Malavasi, F. (2006) In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 108, 1135-1144.
43. Defoiche, J., Debacq, C., Asquith, B., Zhang, Y., Burny, A., Bron, D., Lagneaux, L., Macallan, D., and Willems, L. (2008) Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 143, 240-247.
44. Del Giudice, I., Chiaretti, S., Tavolaro, S., De Propriis, M. S., Maggio, R., Mancini, F., Peragine, N., Santangelo, S., Marinelli, M., Mauro, F. R., Guarini, A., and Foa, R. (2009) Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic features of 9 cases, *Blood* 114, 638-646.
45. Di Noia, J. M., and Neuberger, M. S. (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation, *Annual review of biochemistry* 76, 1-22.
46. Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *The New England journal of medicine* 343, 1910-1916.
47. Dorner, T., Foster, S. J., Brezinschek, H. P., and Lipsky, P. E. (1998) Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of subsequent selection on the distribution of nucleotide changes in human VHDJH rearrangements, *Immunological reviews* 162, 161-171.

48. Dubourg, C., Toutain, B., Le Gall, J. Y., Le Treut, A., and Guenet, L. (2003) Promoter analysis of the human translation termination factor 1 gene, *Gene* 316, 91-101.
49. Duke, V. M., Gandini, D., Sherrington, P. D., Lin, K., Heelan, B., Amlot, P., Mehta, A. B., Hoffbrand, A. V., and Foroni, L. (2003) V(H) gene usage differs in germline and mutated B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica* 88, 1259-1271.
50. Durig, J., Nuckel, H., Cremer, M., Fuhrer, A., Halfmeyer, K., Fandrey, J., Moroy, T., Klein-Hitpass, L., and Duhrsen, U. (2003) ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 17, 2426-2434.
51. Faderl, S., Keating, M. J., Do, K. A., Liang, S. Y., Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Manshour, T., and Albitar, M. (2002) Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 16, 1045-1052.
52. Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Dighiero, G., Schroeder, H. W., Jr., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors, *The Journal of clinical investigation* 102, 1515-1525.
53. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis, *Molecular and cellular biology* 25, 1215-1227.
54. Floro, D., Papadopoulos, I. N., and Scorilas, A. (2010) Molecular analysis and prognostic impact of the novel apoptotic gene Bcl2L12 in gastric cancer, *Biochem Biophys Res Commun* 391, 214-218.
55. Forconi, F., Potter, K. N., Wheatley, I., Darzentas, N., Sozzi, E., Stamatopoulos, K., Mockridge, C. I., Packham, G., and Stevenson, F. K. (2010) The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL, *Blood* 115, 71-77.
56. Fried, M., and Crothers, D. M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis, *Nucleic acids research* 9, 6505-6525.
57. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood* 54, 713-733.
58. Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2000) The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms, *Advances in cancer research* 79, 157-173.
59. Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C., and Caligaris-Cappio, F. (2003) The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression, *Blood* 101, 1262-1269.
60. Ghia, P., Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Stella, S., Guida, G., Michel, A., Crespo, M., Laoutaris, N., Montserrat, E., Anagnostopoulos, A., Dighiero, G., Fassas, A., Caligaris-Cappio, F., and Davi, F. (2005) Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene, *Blood* 105, 1678-1685.
61. Ghiotto, F., Fais, F., Valetto, A., Albesiano, E., Hashimoto, S., Dono, M., Ikematsu, H., Allen, S. L., Kolitz, J., Rai, K. R., Nardini, M., Tramontano, A., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2004)

- Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia, *The Journal of clinical investigation* 113, 1008-1016.
62. Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M. P. (2004) IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis, *Nucleic acids research* 32, W435-440.
 63. Grant, S. G., Jesse, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4645-4649.
 64. Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (1999) GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression, *Blood* 94, 87-96.
 65. Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes & development* 13, 1899-1911.
 66. Guo, B., Godzik, A., and Reed, J. C. (2001) Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, *The Journal of biological chemistry* 276, 2780-2785.
 67. Guse, A. H. (2002) Cyclic ADP-ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP): novel regulators of Ca²⁺-signaling and cell function, *Current molecular medicine* 2, 273-282.
 68. Farsangi, M. H., Jeddi-Tehrani, M., Sharifian, R. A., Razavi, S. M., Khoshnoodi, J., Rabbani, H., and Shokri, F. (2007) Analysis of the immunoglobulin heavy chain variable region gene expression in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia & lymphoma* 48, 109-116.
 69. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., and Stevenson, F. K. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 94, 1848-1854.
 70. Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., and Oscier, D. G. (2002) CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease, *Blood* 99, 1023-1029.
 71. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. C. (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 82, 1820-1828.
 72. Hata, K., and Mizuguchi, J. (2004) Genomic organization and characterization of the promoter for the E2A gene, *Gene* 325, 53-61.
 73. Heintel, D., Kienle, D., Shehata, M., Krober, A., Kroemer, E., Schwarzinger, I., Mitteregger, D., Le, T., Gleiss, A., Mannhalter, C., Chott, A., Schwarzmeier, J., Fonatsch, C., Gaiger, A., Dohner, H., Stilgenbauer, S., and Jager, U. (2005) High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 19, 1216-1223.
 74. Hernandez, I., de la Torre, P., Rey-Campos, J., Garcia, I., Sanchez, J. A., Munoz, R., Rippe, R. A., Munoz-Yague, T., and Solis-Herruzo, J. A. (2000) Collagen alpha1(I) gene contains an element

- responsive to tumor necrosis factor-alpha located in the 5' untranslated region of its first exon, *DNA and cell biology* 19, 341-352.
75. Hojjat-Farsangi, M., Jeddi-Tehrani, M., Razavi, S. M., Sharifian, R. A., Mellstedt, H., Shokri, F., and Rabbani, H. (2009) Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Sci* 100, 2346-2353.
 76. Hong, Y., Yang, J., Chi, Y., Wang, W., Wu, W., Yun, X., Kong, X., and Gu, J. (2010) BCL2L12A localizes to the cell nucleus and induces growth inhibition through G2/M arrest in CHO cells, *Molecular and cellular biochemistry* 333, 323-330.
 77. Hozumi, N., and Tonegawa, S. (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3628-3632.
 78. Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W. S. (1997) Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function, *The Journal of biological chemistry* 272, 11671-11673.
 79. Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Geyer, S. M., Bone, N. D., Dewald, G. W., Hanson, C. A., Stenson, M. J., Witzig, T. E., Tefferi, A., and Kay, N. E. (2001) Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 115, 854-861.
 80. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F. W. (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus, *Annual review of immunology* 24, 541-570.
 81. Kadonaga, J. T. (2002) The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II, *Experimental & molecular medicine* 34, 259-264.
 82. Kern, C., Cornuel, J. F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P. Y., Feldblum, S., and Kolb, J. P. (2004) Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway, *Blood* 103, 679-688.
 83. Kienle, D., Benner, A., Krober, A., Winkler, D., Mertens, D., Buhler, A., Seiler, T., Jager, U., Lichter, P., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2006) Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes, *Blood* 107, 2090-2093.
 84. Kienle, D. L., Korz, C., Hosch, B., Benner, A., Mertens, D., Habermann, A., Krober, A., Jager, U., Lichter, P., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2005) Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 3780-3792.
 85. Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H. G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C. M., Rai, K., Hines, J., and Reed, J. C. (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses, *Blood* 91, 3379-3389.
 86. Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1998) Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells, *Immunological reviews* 162, 261-280.

87. Koiso, H., Yamane, A., Mitsui, T., Matsushima, T., Tsukamoto, N., Murakami, H., Miyawaki, S., Nojima, Y., and Karasawa, M. (2006) Distinctive immunoglobulin VH gene usage in Japanese patients with chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia research* 30, 272-276.
88. Kontos, C. K., Papadopoulos, I. N., and Scorilas, A. (2008) Quantitative expression analysis and prognostic significance of the novel apoptosis-related gene BCL2L12 in colon cancer, *Biological chemistry* 389, 1467-1475.
89. Kontos, C. K., and Scorilas, A. (2012) Molecular cloning of novel alternatively spliced variants of BCL2L12, a new member of the BCL2 gene family, and their expression analysis in cancer cells, *Gene* 505, 153-166.
90. Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c, *Cell death and differentiation* 7, 1166-1173.
91. Krober, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2002) V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 100, 1410-1416.
92. Lanham, S., Hamblin, T., Oscier, D., Ibbotson, R., Stevenson, F., and Packham, G. (2003) Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 101, 1087-1093.
93. Lee, J. S., Dixon, D. O., Kantarjian, H. M., Keating, M. J., and Talpaz, M. (1987) Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients, *Blood* 69, 929-936.
94. Lefranc, M. P. (2003) IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 17, 260-266.
95. Lefranc, M. P., Giudicelli, V., Kaas, Q., Duprat, E., Jabado-Michaloud, J., Scaviner, D., Ginestoux, C., Clement, O., Chaume, D., and Lefranc, G. (2005) IMGT, the international ImMunoGeneTics information system, *Nucleic acids research* 33, D593-597.
96. Lefranc, M. P., and Lefranc, G. (2001) *The immunoglobulin FactsBook*, London, UK: Academic Press.
97. Lin, K., Sherrington, P. D., Dennis, M., Matrai, Z., Cawley, J. C., and Pettitt, A. R. (2002) Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 100, 1404-1409.
98. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25, 402-408.
99. Lozzio, C. B., and Lozzio, B. B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 45, 321-334.
100. Messmer, B. T., Albesiano, E., Efremov, D. G., Ghiotto, F., Allen, S. L., Kolitz, J., Foa, R., Damle, R. N., Fais, F., Messmer, D., Rai, K. R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (2004) Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia, *The Journal of experimental medicine* 200, 519-525.

101. Malcikova, J., Smardova, J., Rocnova, L., Tichy, B., Kuglik, P., Vranova, V., Cejkova, S., Svitakova, M., Skuhrova Francova, H., Brychtova, Y., Doubek, M., Brejcha, M., Klabusay, M., Mayer, J., Pospisilova, S., and Trbusek, M. (2009) Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage, *Blood* 114, 5307-5314.
102. Maloum, K., Davi, F., Merle-Beral, H., Pritsch, O., Magnac, C., Vuillier, F., Dighiero, G., Troussard, X., Mauro, F. F., and Benichou, J. (2000) Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 96, 377-379.
103. Mariano, M. T., Moretti, L., Donelli, A., Grantini, M., Montagnani, G., Di Prisco, A. U., Torelli, G., Torelli, U., and Narni, F. (1992) bcl-2 gene expression in hematopoietic cell differentiation, *Blood* 80, 768-775.
104. Mauerer, K., Zahrieh, D., Gorgun, G., Li, A., Zhou, J., Ansen, S., Rassenti, L. Z., and Gribben, J. G. (2005) Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 129, 499-510.
105. McHeyzer-Williams, L. J., and McHeyzer-Williams, M. G. (2005) Antigen-specific memory B cell development, *Annual review of immunology* 23, 487-513.
106. Mead, J. R., Irvine, S. A., and Ramji, D. P. (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease, *J Mol Med (Berl)* 80, 753-769.
107. Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M. C. (2000) Antibody regulation of B cell development, *Nature immunology* 1, 379-385.
108. Meryman, H. T. (1963) Preservation of living cells, *Federation proceedings* 22, 81-89.
109. Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., and Chiorazzi, N. (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, *The Journal of clinical investigation* 115, 755-764.
110. Michels, J., Johnson, P. W., and Packham, G. (2005) Mcl-1, *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 267-271.
111. Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell* 80, 293-299.
112. Molica, S., Dattilo, A., Giulino, C., Levato, D., and Levato, L. (1998) Increased bcl-2/bax ratio in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with a progressive pattern of disease, *Haematologica* 83, 1122-1124.
113. Murray, F., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Tobin, G., Boudjogra, M., Scielzo, C., Laoutaris, N., Karlsson, K., Baran-Marzsak, F., Tsaftaris, A., Moreno, C., Anagnostopoulos, A., Caligaris-Cappio, F., Vaur, D., Ouzounis, C., Belessi, C., Ghia, P., Davi, F., Rosenquist, R., and Stamatopoulos, K. (2008) Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis, *Blood* 111, 1524-1533.
114. Nicodemus, C. F., Avraham, S., Austen, K. F., Purdy, S., Jablonski, J., and Stevens, R. L. (1990) Characterization of the human gene that encodes the peptide core of secretory granule proteoglycans

- in promyelocytic leukemia HL-60 cells and analysis of the translated product, *The Journal of biological chemistry* 265, 5889-5896.
115. Nikitin, E. A., Malakho, S. G., Biderman, B. V., Baranova, A. V., Lorie, Y. Y., Shevelev, A. Y., Peklo, M. M., Vlasik, T. N., Moskalev, E. A., Zingerman, B. V., Vorob'ev, I. A., Poltaraus, A. B., Sudarikov, A. B., and Vorobjev, A. I. (2007) Expression level of lipoprotein lipase and dystrophin genes predict survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia & lymphoma* 48, 912-922.
 116. Nuckel, H., Frey, U. H., Bau, M., Sellmann, L., Stanelle, J., Durig, J., Jockel, K. H., Duhrsen, U., and Siffert, W. (2007) Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 109, 290-297.
 117. Nuckel, H., Frey, U. H., Sellmann, L., Bau, M., Durig, J., Duhrsen, U., and Siffert, W. (2006) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: lack of association with incidence, disease stage and progression-free survival, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 20, 724.
 118. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell* 74, 609-619.
 119. Orchard, J., Ibbotson, R., Best, G., Parker, A., and Oscier, D. (2005) ZAP-70 in B cell malignancies, *Leukemia & lymphoma* 46, 1689-1698.
 120. Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P. W., Hamblin, T. J., Staudt, L. M., and Oscier, D. G. (2004) ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia, *Lancet* 363, 105-111.
 121. Oscier, D. G., Gardiner, A. C., Mould, S. J., Glide, S., Davis, Z. A., Ibbotson, R. E., Corcoran, M. M., Chapman, R. M., Thomas, P. W., Copplestone, J. A., Orchard, J. A., and Hamblin, T. J. (2002) 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* 100, 1177-1184.
 122. Osorio, L. M., Aguilar-Santelises, M., De Santiago, A., Hachiya, T., Mellstedt, H., and Jondal, M. (2001) Increased serum levels of soluble Fas in progressive B-CLL, *European journal of haematology* 66, 342-346.
 123. Packham, G., and Stevenson, F. K. (2005) Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia, *Immunology* 114, 441-449.
 124. Pallasch, C. P., Schwamb, J., Konigs, S., Schulz, A., Debey, S., Kofler, D., Schultze, J. L., Hallek, M., Ultsch, A., and Wendtner, C. M. (2008) Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 22, 585-592.
 125. Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Foroni, L., and Hoffbrand, A. V. (1995) Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 9, 1227-1232.
 126. Papageorgiou, S. G., Kontos, C. K., Pappa, V., Thomadaki, H., Kontsioti, F., Dervenoulas, J., Papageorgiou, E., Economopoulos, T., and Scorilas, A. (2011) The novel member of the BCL2 gene family, BCL2L12, is substantially elevated in chronic lymphocytic leukemia patients, supporting its value as a significant biomarker, *Oncologist* 16, 1280-1291.

127. Peled, J. U., Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F., and Scharff, M. D. (2008) The biochemistry of somatic hypermutation, *Annual review of immunology* 26, 481-511.
128. Pepper, C., Bentley, P., and Hoy, T. (1996) Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 95, 513-517.
129. Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, D. P. (1997) Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance, *Br J Cancer* 76, 935-938.
130. Pettitt, A. R., Sherrington, P. D., Stewart, G., Cawley, J. C., Taylor, A. M., and Stankovic, T. (2001) p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation, *Blood* 98, 814-822.
131. Pierce, R. A., Moore, C. H., and Arikan, M. C. (2006) Positive transcriptional regulatory element located within exon 1 of elastin gene, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 291, L391-399.
132. Potter, K. N., Orchard, J., Critchley, E., Mockridge, C. I., Jose, A., and Stevenson, F. K. (2003) Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire, *Blood* 101, 3082-3084.
133. Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hammerle, G., and Zechner, R. (2002) Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism, *Curr Opin Lipidol* 13, 471-481.
134. Pu, Q. Q., and Bezwoda, W. R. (1997) Interleukin-4 prevents spontaneous in-vitro apoptosis in chronic lymphatic leukaemia but sensitizes B-CLL cells to melphalan cytotoxicity, *British journal of haematology* 98, 413-417.
135. Radojkovic, D., and Kusic, J. (2000) Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels, *Clinical chemistry* 46, 883-884.
136. Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., and Pasternack, B. S. (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 46, 219-234.
137. Rassenti, L. Z., and Kipps, T. J. (1997) Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia, *The Journal of experimental medicine* 185, 1435-1445.
138. Razik, M. A., Lee, K., Price, R. R., Williams, M. R., Ongjoco, R. R., Dole, M. K., Rudner, X. L., Kwatra, M. M., and Schwinn, D. A. (1997) Transcriptional regulation of the human alpha1a-adrenergic receptor gene. Characterization Of the 5'-regulatory and promoter region, *The Journal of biological chemistry* 272, 28237-28246.
139. Ringshausen, I., Schneller, F., Bogner, C., Hipp, S., Duyster, J., Peschel, C., and Decker, T. (2002) Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta, *Blood* 100, 3741-3748.
140. Ristić, M. (1979) *Hematologija za III i IV razred medicinske škole*, Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
141. Robertson, L. E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M. J., and McDonnell, T. J. (1996) Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and

- clinical outcome, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 10, 456-459.
142. Rosenwald, A., Alizadeh, A. A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R. E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O. K., Rassenti, L. Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J. C., Grever, M. R., Cheson, B. D., Chiorazzi, N., Wilson, W. H., Kipps, T. J., Brown, P. O., and Staudt, L. M. (2001) Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia, *The Journal of experimental medicine* 194, 1639-1647.
 143. Rozman, C., and Montserrat, E. (1995) Chronic lymphocytic leukemia, *The New England journal of medicine* 333, 1052-1057.
 144. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Cloning, A Laboratory Manual*, Second edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 145. Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., and Hume, D. A. (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies, *Nature reviews. Genetics* 8, 424-436.
 146. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
 147. Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L. H., Thompson, C. B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H. G., and et al. (1994) Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9238-9242.
 148. Saxena, A., Viswanathan, S., Moshynska, O., Tandon, P., Sankaran, K., and Sheridan, D. P. (2004) Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Am J Hematol* 75, 22-33.
 149. Schattner, E. J. (2000) CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy, *Leukemia & lymphoma* 37, 461-472.
 150. Schatz, D. G., and Spanopoulou, E. (2005) Biochemistry of V(D)J recombination, *Current topics in microbiology and immunology* 290, 49-85.
 151. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2004) Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation, *Oncogene* 23, 3915-3931.
 152. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells, *Nucleic acids research* 17, 6419.
 153. Schroeder, H. W., Jr., and Dighiero, G. (1994) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire, *Immunol Today* 15, 288-294.
 154. Scorilas, A., Kyriakopoulou, L., Yousef, G. M., Ashworth, L. K., Kwamie, A., and Diamandis, E. P. (2001) Molecular cloning, physical mapping, and expression analysis of a novel gene, BCL2L12, encoding a proline-rich protein with a highly conserved BH2 domain of the Bcl-2 family, *Genomics* 72, 217-221.

155. Shannon, J. R. (1973) *Tissue Culture Methods and Application.*, pp 112-718, New York: Academic Press Inc.
156. Shi, B., Triebe, D., Kajiji, S., Iwata, K. K., Bruskin, A., and Mahajna, J. (1999) Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains, *Biochem Biophys Res Commun* 254, 779-785.
157. Skogsberg, S., Tobin, G., Krober, A., Kienle, D., Thunberg, U., Aleskog, A., Karlsson, K., Laurell, A., Merup, M., Vilpo, J., Sundstrom, C., Roos, G., Jernberg-Wiklund, H., Dohner, H., Nilsson, K., Stilgenbauer, S., and Rosenquist, R. (2006) The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the Bax gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 20, 77-81.
158. Stamatopoulos, B., Meuleman, N., Haibe-Kains, B., Duvillier, H., Massy, M., Martiat, P., Bron, D., and Lagneaux, L. (2007) Quantification of ZAP70 mRNA in B cells by real-time PCR is a powerful prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia, *Clinical chemistry* 53, 1757-1766.
159. Starczynski, J., Pepper, C., Pratt, G., Hooper, L., Thomas, A., Milligan, D., Bentley, P., and Fegan, C. (2005) Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 1514-1521.
160. Stegh, A. H., Brennan, C., Mahoney, J. A., Forloney, K. L., Jenq, H. T., Luciano, J. P., Protopopov, A., Chin, L., and Depinho, R. A. (2010) Glioma oncoprotein Bcl2L12 inhibits the p53 tumor suppressor, *Genes & development* 24, 2194-2204.
161. Stegh, A. H., Chin, L., Louis, D. N., and DePinho, R. A. (2008) What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator, *Cell Cycle* 7, 2833-2839.
162. Stegh, A. H., Kim, H., Bachoo, R. M., Forloney, K. L., Zhang, J., Schulze, H., Park, K., Hannon, G. J., Yuan, J., Louis, D. N., DePinho, R. A., and Chin, L. (2007) Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma, *Genes & development* 21, 98-111.
163. Steinberg, M., Adjali, O., Swainson, L., Merida, P., Di Bartolo, V., Pelletier, L., Taylor, N., and Noraz, N. (2004) T-cell receptor-induced phosphorylation of the zeta chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk, *Blood* 104, 760-767.
164. Stevenson, F. K., and Caligaris-Cappio, F. (2004) Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor, *Blood* 103, 4389-4395.
165. Stilgenbauer, S., Sander, S., Bullinger, L., Benner, A., Leupolt, E., Winkler, D., Krober, A., Kienle, D., Lichter, P., and Dohner, H. (2007) Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival, *Haematologica* 92, 1242-1245.
166. Sutton, L. A., Kostareli, E., Hadzidimitriou, A., Darzentas, N., Tsaftaris, A., Anagnostopoulos, A., Rosenquist, R., and Stamatopoulos, K. (2009) Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen, *Blood* 114, 4460-4468.

167. Tobin, G., Soderberg, O., Thunberg, U., and Rosenquist, R. (2004) V(H)3-21 gene usage in chronic lymphocytic leukemia--characterization of a new subgroup with distinct molecular features and poor survival, *Leukemia & lymphoma* 45, 221-228.
168. Tobin, G., Thunberg, U., Karlsson, K., Murray, F., Laurell, A., Willander, K., Enblad, G., Merup, M., Vilpo, J., Juliusson, G., Sundstrom, C., Soderberg, O., Roos, G., and Rosenquist, R. (2004) Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 104, 2879-2885.
169. Thomadaki, H., Floros, K. V., Pavlovic, S., Tosic, N., Gourgiotis, D., Colovic, M., and Scorilas, A. (2012) Overexpression of the novel member of the BCL2 gene family, BCL2L12, is associated with the disease outcome in patients with acute myeloid leukemia, *Clinical biochemistry*.
170. Toumelin, G. L. (2006) Bcl2L12, a new BH2 BH3 containing protein, substrate for GSK3beta, mediates UV induced apoptosis. , *Proceedings of the 97th AACR Annual Meeting, American Association for Cancer Research, Washington DC*, 959.
171. Tamura, K., Sawada, H., Izumi, Y., Fukuda, T., Utsunomiya, A., Ikeda, S., Uike, N., Tsukada, J., Kawano, F., Shibuya, T., Gondo, H., Okamura, S., and Suzumiya, J. (2001) Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan, *European journal of haematology* 67, 152-157.
172. Tanaka, H., Matsumura, I., Nakajima, K., Daino, H., Sonoyama, J., Yoshida, H., Oritani, K., Machii, T., Yamamoto, M., Hirano, T., and Kanakura, Y. (2000) GATA-1 blocks IL-6-induced macrophage differentiation and apoptosis through the sustained expression of cyclin D1 and bcl-2 in a murine myeloid cell line M1, *Blood* 95, 1264-1273.
173. Tanaka, S., Saito, K., and Reed, J. C. (1993) Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival, *The Journal of biological chemistry* 268, 10920-10926.
174. Thomadaki, H., and Scorilas, A. (2006) BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer, *Crit Rev Clin Lab Sci* 43, 1-67.
175. Thomadaki, H., Talieri, M., and Scorilas, A. (2007) Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer, *Cancer Lett* 247, 48-55.
176. Thorselius, M., Krober, A., Murray, F., Thunberg, U., Tobin, G., Buhler, A., Kienle, D., Albesiano, E., Maffei, R., Dao-Ung, L. P., Wiley, J., Vilpo, J., Laurell, A., Merup, M., Roos, G., Karlsson, K., Chiorazzi, N., Marasca, R., Dohner, H., Stilgenbauer, S., and Rosenquist, R. (2006) Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status, *Blood* 107, 2889-2894.
177. Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Thorn, I., Soderberg, O., Hultdin, M., Botling, J., Enblad, G., Sallstrom, J., Sundstrom, C., Roos, G., and Rosenquist, R. (2002) Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 99, 2262-2264.
178. Tsujimoto, Y., and Croce, C. M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5214-5218.

179. Van Bockstaele, F., Pede, V., Janssens, A., Callewaert, F., Offner, F., Verhasselt, B., and Philippe, J. (2007) Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia, *Clinical chemistry* 53, 204-212.
180. van Dongen, J. J., Langerak, A. W., Bruggemann, M., Evans, P. A., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J. H., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J. L., Morgan, G. J., Kneba, M., and Macintyre, E. A. (2003) 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 : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 17, 2257-2317.
181. van't Veer, M. B., Brooijmans, A. M., Langerak, A. W., Verhaaf, B., Goudswaard, C. S., Graveland, W. J., van Lom, K., and Valk, P. J. (2006) The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica* 91, 56-63.
182. Vaseva, A. V., and Moll, U. M. (2009) The mitochondrial p53 pathway, *Biochimica et biophysica acta* 1787, 414-420.
183. Veronese, L., Tournilhac, O., Verrelle, P., Davi, F., Dighiero, G., Chautard, E., Veyrat-Masson, R., Kwiatkowski, F., Goumy, C., Vago, P., Travade, P., and Tchirkov, A. (2008) Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 22, 1291-1293.
184. Wall, L., deBoer, E., and Grosveld, F. (1988) The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein, *Genes & development* 2, 1089-1100.
185. Wang, D., Freeman, G. J., Levine, H., Ritz, J., and Robertson, M. J. (1997) Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies, *British journal of haematology* 97, 409-417.
186. Widhopf, G. F., 2nd, Rassenti, L. Z., Toy, T. L., Gribben, J. G., Wierda, W. G., and Kipps, T. J. (2004) Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins, *Blood* 104, 2499-2504.
187. Wilson, P. C., de Bouteiller, O., Liu, Y. J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J. D., and Pascual, V. (1998) Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes, *The Journal of experimental medicine* 187, 59-70.
188. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, *The Journal of cell biology* 139, 1281-1292.
189. Xu, J. L., and Davis, M. M. (2000) Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities, *Immunity* 13, 37-45.
190. Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., and Martinez, E. (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters, *Gene* 389, 52-65.
191. Yuille, M. R., Matutes, E., Marossy, A., Hilditch, B., Catovsky, D., and Houlston, R. S. (2000) Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies, *British journal of haematology* 109, 794-799.

192. Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity, *The Journal of biological chemistry* 272, 24101-24104.
193. Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A. Y. (1990) Mini-prep in ten minutes, *BioTechniques* 8, 172-173.
194. Zhou, M., Demo, S. D., McClure, T. N., Crea, R., and Bitler, C. M. (1998) A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX, *The Journal of biological chemistry* 273, 11930-11936.
195. Zupo, S., Cutrona, G., Mangiola, M., and Ferrarini, M. (2002) Role of surface IgM and IgD on survival of the cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 99, 2277-2278.