



MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta

**Molekulární patogeneze B buněčných malignit a úloha
microRNA v jejich biologii**

habilitační práce

MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Brno, 2014

OBSAH

1. SOUHRN	5
2. ABSTRACT	6
3. ÚVOD.....	7
4. MOLEKULÁRNÍ PATOGENEZE CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE	8
4.1 Genové a chromozomální aberace.....	8
4.2 B-buněčný receptor a interakce v mikroprostředí	11
4.3 MicroRNA v patogenezi CLL	14
5. VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K VYBRANÝM PUBLIKACÍM	18
5.1 Optimalizace metod izolace a kvantifikace miRNA u CLL	18
5.2 Deregulace apoptické dráhy p53 a úloha miRNA u CLL.....	19
5.3 Struktura lokusu 22q11 a jeho vliv na expresi miR-650	22
5.4 Úloha interakcí v mikroprostředí v biologii CLL a vliv miRNA	23
5.5 Výskyt mutací v miRNA u CLL.....	26
5.6 Přehledové práce shrnující problematiku.....	27
6. ZÁVĚR.....	28
7. SEZNAM PŘÍLOH	29
8. LITERATURA.....	32

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji především Prof. RNDr. Šárce Pospíšilové, Ph.D. a Prof. MUDr. Jiřímu Mayerovi, CSc. za to, že mě přivedli k onkologickému výzkumu a za jejich neocenitelnou osobní a intelektuální podporu mé práce na Interní hematoonkologické klinice FN Brno a Lékařské fakultě MU. Jejich nadšení a vizionářský postoj k onkologii a přístup k aplikaci molekulární biologie v medicíně byl pro mě vždy inspirací a považuji za privilegium, že s nimi mohu pracovat. Děkuji také Prof. Thomasi Kippsovi, M.D., Ph.D. (University of California) a Prof. Gregu Nowakowski, M.D., Ph.D. (Mayo Clinic) za mnohé co mě o biologii B buněk a vědě naučili. Velký dík patří mojí rodině a přátelům za podporu, trpělivost a toleranci.

1. SOUHRN

Habilitační práce (předkládaná jako komentovaný soubor publikovaných prací) se věnuje molekulární patogenezi B buněčných malignit a úloze microRNA (miRNA) v jejich biologii. Jako modelová choroba je v této souvislosti studována chronická lymfocytární leukémie (CLL), která je nejčastější leukémií dospělé populace a byla jako vůbec první onemocnění spojena s deregulací miRNA. CLL je onemocnění s extrémně variabilní prognózou (desítky měsíců vs. desítky let) a její agresivní subtyp je spojen především s delecí/mutací nádorového supresoru TP53 (p53) či ATM. Zaměřili jsme se proto na detailní studium těchto pacientů a popsali asociaci specifických TP53 mutací s horší prognózou a vyvinuli nebo validovali metodiky na detekci aberací v apoptické dráze (TP53, ATM). Specificky jsme poté analyzovali expresi miRNA u tohoto subtypu onemocnění a popsali sníženou expresi miR-34a a dalších miRNA. Pro analýzy exprese miRNA byla dále validována metoda izolace miRNA z patientských vzorků.

Zabývali jsme se také významem miRNA v souvislosti se strukturou B-buněčného a signalizací receptoru (BCR), který je klíčový pro stimulaci a přežití normálních i maligních B-lymfocytů. Inhibice signalizace přes BCR představuje v současné době nejslibnější terapeutický přístup u B buněčných malignit, ale mechanismy její (de)regulace v maligních B lymfocytech jsou z velké části neznámé. V dvou recentních publikacích jsme demonstrovali poprvé význam miRNA (miR-150 a miR-155) v regulaci aktivity BCR signálační dráhy. Také jsme popsali mechanismus, jímž protein MYB reguluje expresi miR-155 u CLL a byl tak ilustrován zásadní význam těchto molekul pro biologii CLL. Zaměřili jsme se také na regulaci exprese a funkce miR-650, která se nachází v lokusu (22q11) pro lambda lehký řetězec imunoglobulinové komponenty BCR. Prokázali jsme, že u pacientů dochází při využití subgenů pro lehký řetězec obsahujícího miR-650 (rodina V2 subgenů) ke koordinované expresi miRNA společně s lehkým řetězcem imunoglobulinu. Tímto byl popsán zcela nový mechanismus regulace miRNA společně s genem pro imunoglobulin. Exprese miR-650, miR-34a, miR-150 a miR-155 je také spojena s prognózou CLL a lze je využít jako prognostické markery.

Výsledky publikované uchazečem a jejich zasazení do kontextu biologie CLL přispělo zásadním způsobem k objasnění úlohy miRNA v biologii CLL.

2. ABSTRACT

This habilitation-thesis (presented as a commented collection of publications) is focused on the molecular pathogenesis of B cell malignancies and the role of microRNAs (miRNA) in their biology. In this respect chronic lymphocytic leukemia (CLL), which is the most common leukemia in adults, was studied as a model disease since it has been the first disease associated with deregulation of miRNAs. CLL is a disease with an extremely variable prognosis (tens of months vs. tens of years), and its aggressive subtype is mainly connected to deletion/mutation of tumor-suppressor TP53 (p53) and ATM. We have studied in detail this CLL subtype and described association of specific TP53 mutations with worse prognosis and developed and/or validated methods to detect aberrations in apoptotic pathway (TP53, ATM). We have further analyzed the expression of miRNAs in this disease subtype and described down-regulation of miR-34a and other miRNAs in these cases. We have also validated a methodology for miRNA isolation from patient samples.

We have also studied the role of miRNA in connection to B cell receptor (BCR) structure and signaling, which is a pathway critical for stimulation and survival of normal and malignant B cells. Currently, inhibition of BCR signaling represents the most promising therapeutic approach in B cell malignancies; however, the mechanisms of its (de)regulation are largely unknown. Recently, we have demonstrated for the first time that miRNAs (miR-150 and miR-155) regulate activity of BCR signaling pathway. We have also described that protein MYB regulates expression of miR-155 in CLL, and this illustrated the importance of these molecules in CLL biology. We also focused on the regulation and function of miR-650, which is located in the immunoglobulin lambda light chain locus (22q11), which is a component of BCR. We demonstrated that expression of miR-650 is coupled with the expression of its host gene for the lambda light chain (V2 subgene family). This represents a novel mechanism for regulation of the miRNA gene together with an immunoglobulin gene. Moreover, the expression of miR-650, miR-34a, miR-150, and miR-155 is related to the CLL prognosis and can be used as prognostic markers

Altogether, the obtained results and their implementation to the context of CLL biology significantly contributed to the understanding of miRNAs role in CLL pathogenesis and progression.

3. ÚVOD

Tato habilitační práce využívá možnosti, která byla dána vědeckou radou Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, a je předkládána jako soubor prací opatřených komentářem. Aspirant je celkově autorem či spoluautorem 29 prací publikovaných v recenzovaných časopisech (celkový impakt faktor 123,1) a 5 kapitol v monografiích. Tato habilitační práce se zabývá molekulární patogenezí B buněčných malignit a úlohou microRNA v jejich biologii s důrazem na studium chronické lymfatické leukémie. Práce je uvedena obecným přehledem známé patologie chronické lymfatické leukémie (CLL) s přihlédnutím k interakcím v mikroprostředí a úloze microRNA. Získané výsledky a komentované práce se dotýkají hned několika aspektů biologie CLL a B-lymfomů včetně úlohy chromozomálních aberací, deregulace apoptózy, regulace imunoglobulinových genů a transkripčních faktorů v B-lymfocytech. Kvalita získaných výsledků je ilustrována jejich vysokou citovaností (242krát, bez auto-citací 216krát, H-index: 8) a publikací v časopisech s vysokým impakt faktorem.

4. MOLEKULÁRNÍ PATOGENEZE CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE

Chronická lymfocytární leukémie je charakterizována akumulací monoklonálních CD5+CD23+CD27+smlg^{slabě} B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni a lymfatických orgánech ¹. Přes relativní morfologickou a imunofenotypovou homogennost má CLL výrazně variabilní klinický průběh. V poslední době se ukázalo, že přítomnost/absence somatických hypermutací ve variabilní oblasti těžkého řetězce B-buněčného receptoru (IgHV) determinuje dva základní subtypy tohoto onemocnění. Somatické hypermutace v IgHV se fyziologicky odehrávají u B-lymfocytů v germinálních centrech (GC) a předpokládá se, že mutované IgHV charakterizuje subtyp CLL, u nějž prošly leukemické buňky GC (prognosticky příznivé). Struktura a signalizace B-buněčným receptorem je pravděpodobně klíčová v patogenezi obou subtypů CLL a přítomnost somatických hypermutací v jeho těžkém řetězci Ig je jedním z nejčastěji využívaných prognostických markerů. Klein a kol. provedli analýzu genové exprese (DNA expresní-čipy) u CLL a zjistili, že se buňky s mutovaným a nemutovaným IgHV odlišují v expresi pouze několika desítek genů ². V této studii také analýza genové exprese naznačila, že CLL je odvozena z paměťových B-lymfocytů.

4.1 Genové a chromozomální aberace

U CLL se vyskytují 4 časté, prognosticky významné chromozomální aberace (del13q14, del17p13, del11q23 a trisomie chr. 12) ³, z nichž s nepříznivou prognózou je spojena především delece 17p1 a 11q23. Jedná se o aberace zasahující nádorový supresor p53 (delece 17p13/mutace TP53; cca 10 % pacientů) a ATM kinázu (delece 11q23; cca 20 % pacientů) ³. Za fyziologických okolností je v odpovědi na apoptotické stimuly protein p53 fosforylován kinázou ATM a následně aktivuje transkripci dalších genů, např. BAX nebo PUMA. Pacienti s inaktivací p53 tvoří podskupinu s výrazně agresivnějším onemocněním, které špatně reaguje na cytotoxickou terapii ^{4,5}. Důsledky aberací ATM pro prognózu onemocnění a predikci odpovědi na terapii jsou široce diskutovány. Ve většině publikovaných studií je k dispozici pouze údaj o delecí ATM (pomocí FISH), neboť vyšetření mutací v tomto dlouhém genu je technicky náročné. Delece ATM může být přítomna jako samostatná abnormalita, v kombinaci s mutací druhé ATM alely nebo případně společně s mutací p53 alely ⁴.

Zásadní posun v chápání patogeneze CLL umožnila technologie „sekvenování nové generace“ (Next Generation Sequencing - NGS), která dovoluje získat informaci o sekvenci celého genomu jednotlivce nebo o sekvenci všech známých oblastí kódujících geny (tzv. exomové sekvenování - cca 5 % genomu). V nedávné době byly publikovány výsledky čtyř průlomových prací využívajících celogenomové a exomové sekvenování pro identifikaci genových aberací u CLL ⁶⁻⁹. Byly takto popsány mutace v 15 protein-kódujících genech vyskytující se s frekvencí větší než 2 %, jejichž úloha v patogenezi CLL předtím nebyla

prakticky vůbec předpokládána. V první práci provedli autoři sekvenování celého genomu u 4 jedinců s CLL ⁶. U těchto 4 pacientů autoři detekovali mutace v 45 protein-kódujících genech a následně se zaměřili na validaci 26 vybraných mutací, které byly nalezeny v genech exprimovaných v CLL buňkách. Tento přístup umožnil snížit množství sekvenování, které bylo provedeno na validačním souboru 169 pacientů. Byly identifikovány 4 mutace v genech NOTCH1, MYD88, XPO1 a KLHL6, které se vyskytly alespoň u dvou pacientů. Tyto čtyři geny byly dále studovány na větším souboru pacientů. Nejčastěji mutovaným genem (12 % pacientů) byl NOTCH1, kde se ve většině případů vyskytovala dvou-nukleotidová delece CT (p.P2515Rfs*4). Tato mutace, společně se dvěma dalšími méně častými záměnami v této oblasti, vede k vzniku předčasného stop kodonu a akumulaci aberantního proteinu. Z výsledků vyplývá, že tyto mutace způsobují stabilizaci proteinu, což vede ke zvýšené aktivitě celé NOTCH-signalizační dráhy (analýza genové exprese pomocí DNA čipů). Doposud publikované poznatky jsou v souladu se známou úlohou mutací v NOTCH1 u T-akutní lymfoblastické leukémie (T-ALL). Mutace v NOTCH1 jsou přítomny až u 60 % případů T-ALL a předpokládaným mechanismem je NOTCH1-dependentní aktivace protoonkogenu c-myc ¹⁰. NOTCH dráha je klíčová i v biologii kmenových buněk, což by mohlo být relevantní také pro CLL, kde byla postulována existence kmenové nádorové buňky.

Druhým nejčastěji mutovaným genem byl MYD88 (cca u 3 % pacientů), jehož mutace byly také popsány u lymfomů ¹¹. Tento protein se účastní signalizační kaskády interleukinu 1 a Toll-receptoru. Podobně jako u NOTCH1 se předpokládá, že se jedná o mutaci aktivující, neboť buňky pacientů s mutací v MYD88 produkovaly po stimulaci Toll-like receptoru nebo interleukin-1 receptoru větší množství interleukinu 6 a chemokinových ligandů (CCL2, CCL3, CCL4). Je známo, že vysoká produkce těchto cytokinů napomáhá vytváření mikroprostředí, které podporuje přežívání CLL buněk. Je zajímavé, že mutace MYD88 byla mnohem častější u pacientů s mutovaným IgHV (7 z 8 detekovaných mutací).

Zbývající dvě popsané mutace v genech XPO1 a KLHL6 byly přítomny u méně než 3 % pacientů. Stojí za povšimnutí, že všechny 4 detekované mutace v XPO1 genu (exportin receptor 1) byly lokalizovány v jednom kodonu a pravděpodobně ovlivňují funkce XPO1 v transportu mRNA z jádra. V případě KLHL6 vykazovaly mutace rysy charakteristické pro vznik mechanismem somatických hypermutací, což by u tohoto proteinu důležitého v tvorbě germinálního centra mohlo být logické.

Výsledky studie Puente a kolegů ⁶ byly následně rozšířeny dalšími publikacemi. Práce autorů Fabbri a kol. ⁸ potvrdila vysokou četnost mutací v genu NOTCH1 (zde u 15 % pacientů) a detailně analyzovala jejich vztah k transformaci do Richterova syndromu (RS). Frekvence mutací v NOTCH1 u RS byla dvojnásobná (31 %) ve srovnání s kohortou CLL pacientů (15 %). Tento rozdíl byl ještě markantnější při zohlednění CLL vzorků

analyzovaných pouze při diagnóze – 10 % pacientů s mutací v NOTCH1 – vs 31 % pacientů při transformaci do RS. Autoři dvou recentně publikovaných studií ^{7,9} zvolili přístup založený na exomovém sekvenování několika desítek CLL pacientů, což vedlo k objevu dalších mutací. Při sekvenaci exomů u 105 CLL pacientů byly identifikovány mutace celkově u 1100 různých protein-kódujících genů ⁸. Největším překvapením byla identifikace mutací v genu SF3B1, která je podobně častá jako mutace NOTCH1 (9,7 % CLL pacientů). Gen SF3B1 kóduje protein, který je součástí komplexu spliceosomu, nezbytného pro sestřih (splicing) RNA. Vysoká míra konzervovanosti sekvence SF3B1 genu naznačuje jeho důležitou úlohu v regulaci genové exprese. Je zajímavé, že mutace v SF3B1 byly prakticky souběžně popsány také u myelodysplastického syndromu ¹². U CLL bylo také detekováno několik dalších mutací v jiných genech zapojených do sestřihu RNA. Neočekávaným pozorováním je úplná absence mutací v SF3B1 u 156 sekvenovaných non-Hogkinských lymfomů⁹.

Zůstává zatím z velké části neobjasněno, jak je deregulace některých rekurentně mutovaných genů měla být podstatná v biologii CLL.

4.2 B-buněčný receptor a interakce v mikroprostředí

Část výsledků, které jsou níže diskutovány, se věnuje regulaci miRNA v souvislosti s B-buněčným receptorem (BCR) a imunoglobulinovými geny. Předkládám zde tedy stručný souhrn poznatků o úloze BCR u CLL.

B-buněčný receptor je vystaven na povrchu buňky, funkčně charakterizuje zralý B-lymfocyt a jeho fyziologická úloha souvisí s rozpoznáváním antigenu, selekcí B-lymfocytů a produkcí protilátek. Signalizace prostřednictvím BCR receptoru je nezbytná pro přežití a proliferaci normálních i nádorových B-lymfocytů¹³. Imunologická komponenta BCR vzniká přestavbou subgenů pro V, D a J oblasti těžkých a V, J oblasti lehkých řetězců imunoglobulinů. Jedná se o proces, který umožňuje B-lymfocytům vytvořit *de novo* protilátky proti mnoha různým antigenům. Je zajímavé, že u CLL neodpovídá frekvence použití jednotlivých V elementů rozložení u normálních B-lymfocytů¹⁴⁻¹⁶. Preference určitých V segmentů pro těžký řetězec (IgHV) a také asociace některých z nich (např. subgenu VH3-21) se špatnou prognózou vedly k názoru, že se na patogenezi CLL podílí stimulace a selekce antigenem¹⁷. Další přirozená variabilita a specifita vazby na antigen je zajištěna náhodným včleňováním nukleotidů při tvorbě HCDR3 oblasti (heavy chain complementarity determining region 3) na hranici jednotlivých vystřižených a znovu spojených V(D)J. Podobně jako v případě subgenů pro variabilní oblasti IgHV je také struktura-sekvence aminokyselin v HCDR3 u CLL nenáhodná¹⁸. Důležitou úlohu při vzniku IgHV hraje enzym AID (activation-induced cytidine deaminase), který do něj vnáší somatické hypermutace při vyžívání B-lymfocytu a tím dále zvyšuje specifitu produkovaných protilátek. Pacienty s CLL lze na základě přítomnosti anebo absence somatických hypermutací v IgHV rozdělit na dvě zhruba stejně velké skupiny s mediánem přežití 25 let (mutované IgHV) resp. 8 let (nemutované IgHV). Porušená regulace AID může v některých případech vnášet nežádoucí mutace i do jiných genů např. do BCL6 a C-MYC u lymfomů¹⁹. Mezi pacienty s CLL se vyskytují případy, kde došlo k vnesení hypermutací do p53 genu (TP53) a tím k jeho inaktivaci²⁰.

Molekuly zapojené do signalizace BCR receptorem jsou spojovány s prognózou CLL (např. ZAP-70, CD38), což vedlo ke studiu dalších souvisejících molekulárních drah^{14,15,21}. Pozoruhodnou vlastností CLL buněk je jejich heterogenita v reakci na stimulaci BCR u různých pacientů. Buňky pacientů s nemutovaným IgHV častěji reagují na aktivaci BCR fosforylací klíčové signální kinázy SYK, zatímco buňky pacientů s mutovaným IgHV setrvávají ve stavu anergie, který je považován za důsledek chronické stimulace autoantigenem²².

Expresí molekul ZAP-70 a CD38, které se účastní BCR signalizace na membráně je asociována s agresivnějším průběhem onemocnění. ZAP-70 je strukturálním homologem SYK kinázy (viz níže) a u CLL moduluje BCR signalizaci pravděpodobně nepřímo přes jiné asociované molekuly²³. Tento názor je podporován absencí fosforylované (aktivované) ZAP-

70 u CLL po stimulaci BCR přesto, že dojde k aktivaci dalších molekul této signální dráhy [ERK, AKT, SYK; ²⁴]. Větší potenciál k reakci na stimulaci BCR daný vysokou expresí ZAP-70 by mohl přispívat k agresivnějšímu klinickému průběhu a nutnosti časnější terapie u ZAP-70-pozitivních pacientů ^{20,25}. S horší prognózou a jinými negativními prognostickými faktory (nemutované IgHV, ZAP-70, solubilní CD23, β2m, delece p53) je asociována také exprese molekuly CD38. Povrchový antigen CD38 je zapojen do BCR signalizace a kooperuje se ZAP-70, což se odráží na horší prognóze pacientů CD38+/ZAP-70+ při srovnání se skupinou CD38+/ZAP-70 ²⁶⁻²⁸. CD38 byl definován jako membránový receptor pro CD31 na stromálních a „nurse like“ buňkách, který disponuje také ekto-enzymatickou funkcí (metabolismus NAD+).

Cytoplazmatickou signalizaci BCR zprostředkovávají u CLL především kinázy LYN & SYK a navazující dráhy MEK/ERK, PI3K, PKC, AKT/MCL1 [^{23,29,30}]. U CLL byla popsána abnormální konstitutivní aktivace kináz LYN a SYK, které přenáší anti-apoptotické signály bez ohledu na vazbu antigenu na receptor. Inhibice těchto kináz vedla k apoptóze CLL buněk ³¹. Obě kinázy mohou přes molekuly PI3K a PLC aktivovat kinázu AKT a zvyšovat expresi anti-apoptotického proteinu MCL1 (z rodiny BCL2). Nadměrná exprese MCL1 a BCL2 u CLL je vysvětlována signalizací BCR receptorem, interakcí s mikroprostředím a v nedávné době poruchou exprese microRNA ³²⁻³⁴. Kináza AKT může být také aktivována proto-onkogenem TCL1, jehož zvýšená exprese je pozorována u 90 % pacientů s CLL a způsobuje vznik lymfomů u myšího modelu ³⁵. Poznatky o úloze signalizace BCR receptorem vedly k úvahám o možné terapii založené na inhibici jednotlivých molekul této dráhy. Závěrem lze říci, že BCR signalizace pravděpodobně souvisí s patogenezi obou subtypů CLL (mutované a nemutované IgHV) a její ovlivnění je slibným terapeutickým cílem.

Na patogenезi CLL se kromě porušení vnitřních regulačních mechanismů B-lymfocyty podílí také porucha externí regulace. Oboustranná interakce CLL buněk a ne-maligních buněk společně s cirkulací CLL mezi periferními uzlinami a kostní dření vytváří aberantní mikroprostředí, které dovoluje nádorovým lymfocytům přežít a proliferovat. Mikroprostředí navíc poskytuje buňkám prostor pro rezistenci k chemoterapii a relaps onemocnění ³⁵. Přes zvýšenou expresi mnoha anti-apoptotických molekul v CLL buňkách vyšetřených z periferní krve pacientů a přítomnost závažných chromozomálních abnormalit (viz výše) nejsou tyto buňky schopny samostatně dlouhodoběji přežít *in vitro*. Je také zřejmé, že akumulaci B-lymfocytů v periferní krvi, kterou pozorujeme v klinické praxi, musí doprovázet jejich proliferace, ke kterému však v periférii nedochází (tyto buňky jsou v G₀/G₁ fázi). Tyto úvahy vedly k předpokladu, že dlouhodobé přežití CLL lymfocytů je umožněno signály z mikroprostředí lymfatických uzlin a především kostní dřeně, kde jsou lokalizovány oblasti s proliferační aktivitou B-lymfocytů ¹. Úloha antigenu v patogenезi CLL byla výše popsána v souvislosti se strukturou IgHV a velmi pravděpodobně CLL buňky využívají

k svému přežití fyziologické procesy související s prezentací antigenu a podpůrnými signály od T-lymfocytů a stromálních buněk. Proliferační kompartment CLL je tvořen agregáty polymfocytů a para-imunoblastů, které dávají vznik tzv. pseudofolikulům³⁵⁻³⁹. Oboustranná interakce mezi buňkami mikroprostředí a CLL buňkami je regulována množstvím cytokinů a adhezivních molekul, které podporují přežívání CLL buněk včetně upregulace BCL2. Bylo popsáno několik receptorů na povrch CLL buněk, které jsou důležité pro jejich migraci do kostní dřeně (především CXCR4 a jeho ligand SDF-1/stroma cell-derived factor-1) a adheze B-lymfocytů k stromálním buňkám je chrání před apoptózou spontánní i indukovanou cytostatiky a monoklonálními protilátkami³⁹. Adhezivní molekuly lymfocytů patří do skupiny integrinů tvořených podjednotkami $\alpha 1/2/3/4$ a $\beta 1/2$. Exprese integritu $\alpha 4\beta 1$ (CD49d) CLL buňkami v periferní krvi byla také asociována s agresivitou onemocnění⁴⁰. Za adhezi CLL buněk k stromálním buňkám a folikulárním dendritickým buňkám je zodpovědná také adhezivní molekula Plexinu-B1 a její ligand CD100 exprimovaný na většině CLL buněk⁴⁰. Folikulární dendritické buňky jsou další skupinou buněk přítomných v pseudofolikulech a jejich kontakt s CLL buňkami je zajištěn pomocí Plexinu-B1 a CD44^{20,25}. Je zajímavé, že také z periferní krve CLL pacientů je možné získat podpůrné buňky pro přežití lymfocytů tzv. „nurse-like cells“, které vylučují SDF-1 chemokin a také exprimují podobně jako stromální buňky ligand pro CD38 (molekula CD31)⁴¹⁻⁴³.

Mikroprostředí kostní dřeně, lymfatických uzlin a sleziny hraje důležitou roli v patogenezi a progresi CLL. Interakce CLL buněk se stromálními buňkami, nurse-like buňkami, T-lymfocyty a dalšími podpůrnými buňkami pomocí přímé adheze i cytokinů je zásadní pro přežívání, proliferaci a chemo-rezistenci leukemických buněk. Tyto interakce jsou také velmi slibným cílem nových léčiv umožňujících mobilizaci a senzitivizaci k chemo-immuno terapii.

4.3 MicroRNA v patogenezi CLL

Představy o komplexnosti regulace genové exprese byly nedávno rozšířeny o úlohu malých molekul microRNA, což jsou evolučně konzervované RNA tvořící 5 % všech genů v genomu (doposud popsáno cca 1400 miR genů v lidském genomu, www.miRBase.org). MicroRNA (miRNA) ovlivňují stabilitu a translaci mRNA cílových genů a mají zásadní funkce v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze⁴⁴. MicroRNA se fyziologicky podílí mimo jiné na řízení hematopoézy a diferenciaci buněk imunitního systému. MicroRNA se v genomu nacházejí z ~60 % v intronech (50 % v intronech protein-kódujících genů, 10% v protein-nekódujících genech), ~10 % v exonech protein-nekódujících genů (případně jsou homology miR genu jak v exonech tak intronech) a ~30 % miR genů leží mimo známé či předpokládané oblasti genů⁴¹⁻⁴³. Samotná miRNA vzniká transkripcí miR genů a následným sestřihem primárního transkriptu (pomocí enzymů Drosha a Dicer). Výsledně je jednořetězcová cca ~22 nukleotidů dlouhá molekula microRNA asociována s RNA-induced silencing komplexem (RISC). V buňce se komplex miRNA s RISC proteiny naváže pomocí částečné sekvenční komplementarity k cílové mRNA. Takto vázaná mRNA není translatována nebo je snížena její stabilita a je degradována⁴⁵. Jedna miRNA se díky neúplné komplementaritě váže k mnoha mRNA, což má významné důsledky pro regulaci proteomu a fyziologie buňky. Mnoho studií z posledních let dokumentuje přirozenou specifickou expresi miRNA v tkáních určitého histologického typu a zároveň je popisována aberantní exprese miRNA v tkáních prakticky všech doposud studovaných nádorů.

Práce prof. Croceho a kolegů v roce 2002 demonstrovala, že delece 13q14 u CLL ve většině případů zahrnuje dvě miRNA (miR-15a a miR-16-1)⁴⁶. Jednalo se tak o vůbec první popis přímé úlohy miRNA v patogenezi nádorů. Tento objev a častá lokalizace miRNA v oblastech chromozomálních aberací u nádorů [shrnutí v⁴⁷] odstartoval vlnu prací zabývajících se deregulací miRNA u hematologických malignit a solidních nádorů.

Následně byl popsán také jeden z cílů klastru miR-15a-16-1, kterým je anti-apoptotický protein BCL2, což je konzistentní s poznatkami o jeho vysoké expresi u CLL⁴⁸. Byly objeveny také zárodečné a somatické mutace genů pro miRNA (včetně miR-15a-16-1), které v několika případech vedly k jejich aberantní expresi^{48,49}. Celkově jsou mutace miRNA u cca 10 % CLL pacientů^{50,51} a mutace miR-16 se vyskytuje také u myší, které jsou náchylné ke vzniku CLL v dospělosti (tzv. myš New Zealand Black)^{52,53}. Na myším modelu bylo také přímo prokázáno, že delece oblasti zahrnující miR-15a a miR-16-1 vede ke vzniku CLL fenotypu a dalších B-buněčných malignit⁵⁴. Souhrnně je aberantní exprese těchto dvou miRNA částečně zodpovědná za deregulaci apoptózy u CLL B-lymfocytů, což představuje významný pokrok ve snaze charakterizovat aberaci podílející se na patogenezi CLL a potenciálně také dalších malignit, kde se delece 13q14 vyskytuje (lymfom z plášťových

buněk, mnohočetný myelom, karcinom prostaty)⁵². Zůstává nevyjasněno, jak k regulaci fyziologie B-lymfocytů přispívají miR-15b a miR-16-2, které jsou lokalizovány jako homologní klasty na chromozomu 3. Zároveň se také kumulují poznatky o patogenetickém významu genů DLEU v chromozomální oblasti, která přímo sousedí s miR-15a-16-1^{3,55}.

Další chromozomální aberace četné u CLL představuje delece 17p13 (~10 % pacientů), delece 11q (~20 % pacientů) a trisomie chromozomu 12 (~15 % pacientů)^{4,5,56,57}. Jako klíčový tumor supresor v oblasti 17p13 byl popsán gen pro p53 a tumor-supresorem poškozeným při deleci 11q23 je pravděpodobně ATM^{4,56,57}. V obou případech se také vyskytují mutace těchto genů (TP53, ATM) u CLL a jiných malignit, což dále podporuje jejich relevanci pro biologii maligních buněk⁵⁸. Přesto stojí za povšimnutí, že oblast 11q23 obsahuje dvě miRNA (miR-34b/c)⁵⁹. Práce Fabbriho a kolegů spojila deleci 11q23 s nižší expresí miR-34b/c a demonstrovala, že tyto miRNA regulují u CLL kinázu ZAP-70, která je důležitá v signalizaci skrz B-buněčný receptor (viz níže)⁶⁰.

S deregulací exprese miRNA byly přímo spojeny již dvě časté chromozomální abnormality u CLL (del13q14 a del11q23). V průběhu onemocnění však dochází k hromadění defektů v genomu CLL buněk a tím k progresi choroby (např. delece/mutace tumor-supresorů p53 a ATM)^{61,62}. Exprese miRNA byla zkoumána také u těchto agresivních subtypů onemocnění. U pacientů s deletovaným a/nebo mutovaným p53 jsme popsali nízkou expresi microRNA miR-34a, miR-29c, miR-17-5p⁶³. Nižší exprese miR-34a byla také popsána *in vitro* u CLL buněk rezistentnějších na gama-záření jako zdroje poškození DNA. MicroRNA miR-34a reguluje expresi BCL2 proteinu a je transkripčně aktivována přímo p53⁶⁴. MicroRNA miR-29c reguluje výše diskutované protoonkogeny TCL1 a MCL1. miR-17-5p (klasty miR-17-92) je regulována C-MYC a řídí expresi E2F1, p21, cyklinu D1 a mnoha dalších proteinů důležitých pro buněčný cyklus a apoptózu⁶⁵. Publikované údaje ukazují, že defekty v p53-dráze zahrnují následně i porušení exprese miRNA a jejich cílových proteinů.

Sampath a kolegové popsali, že microRNA jsou u CLL zapojeny také do regulace apoptózy prostřednictvím ovlivnění ubiquitinace p73⁶⁶. Exprese ubiquitin ligázy Itch (degradující p73) je inhibována miR-106b. Exprese miR-106b je možné aktivovat podáním inhibitorů histon deacetyláz, což vede zprostředkovaně k indukci p73-závislé apoptózy u CLL, a to také u buněk, které nemají funkční p53 (nejagresivnější subtyp CLL). Tyto údaje poddhalují mechanismus účinku inhibitorů histon deacetyláz, které jsou zvažovány pro použití v klinických studiích u CLL^{67,68}.

Několik publikací popsalo rozdíly v expresi miRNA u primárních CLL vzorků, které vykazovaly rezistenci na podanou terapii *in vitro* a/nebo *in vivo*⁶⁷. Ferracin a kol. zkoumali expresi miRNA u vzorků odebraných během podávání chemoterapie a vztah ke klinické odpovědi pacientů na léčbu⁶⁹. V této studii autoři popsali indukci desítek miRNA po podání chemoterapie *in vivo* a rozdíly v expresi 10 miRNA u pacientů s dobrou vs. špatnou odpovědí

na léčbu. Výsledky těchto studií nejsou však zatím dostatečně konkluzivní pro jejich využití v predikci léčebné odpovědi. Jedna studie také srovnávala expresi miRNA u sekvenčních vzorků odebraných od jednoho pacienta v průběhu choroby a popsala snížení exprese miR-181b při progresi CLL⁷⁰. Je zajímavé, že také členové rodiny miR-181 regulují TCL1 protoonkogen a Akt-dráhu, které jsou známy svou relevancí pro CLL biologii. Zároveň byla v myším modelu demonstrována úloha miR-181 v regulaci tvorby B-lymfocytů z kmenových hematopoetických buněk¹³.

Jak bylo uvedeno výše signalizace přes B-buněčný receptor (BCR) hraje klíčovou roli v přežití normálních i maligně transformovaných B-lymfocytů³⁵. Aktivní signalizace přes B-buněčný receptor byla spojena s agresivitou CLL a v současné době jsou testovány terapeutické přístupy založené na inhibici BCR-dráhy⁷¹. Publikace z posledních let ukazují, že miRNA potenciálně patří mezi faktory přispívající k regulaci BCR-signalizace a tím k ovlivnění prognózy CLL. Iniciálně byla definována exprese miRNA u CLL pacientů, kteří mají nemutovanou variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (IgHV) a exprimují zároveň tyrozin-kinázu ZAP-70⁷². Oba tyto markery jsou přítomny u CLL buněk s obecně aktivnější BCR-dráhou a tím agresivnějším onemocněním a horší prognózou [shrnutí v^{61,71,73-75}]. Identifikovaný soubor 13 miRNA s prognostickou funkcí zahrnoval některé miRNA, které jsou deregulovány také u jiných B-buněčných malignit (rodina miR-29, miR-155, miR-221). Stojí za povšimnutí, že expresní profily miRNA definované v následných studiích CLL se z velké části nepřekrývají, což se přičítá na vrub rozdílnému složení souborů a použitých metodik detekce⁷⁶. Opakovaně byla v jednotlivých studiích popsána především vyšší exprese členů rodiny miR-29 u pacientů s dobrou prognózou. Úloha miR-29 v biologii CLL byla také potvrzena v myším modelu, kde její zvýšená exprese vedla k CLL fenotypu^{77,78}. miR-29 se tak pravděpodobně podílí na poruše apoptických procesů, neboť je zodpovědná za regulaci TCL1 a MCL1 protoonkogenů, které jsou více exprimovány u agresivních subtypů CLL⁷⁹. U transgenních myší exprimujících TCL1 dochází ke vzniku CLL a také je známa souvislost TCL1 exprese s nemutovaným IgHV a aktivní BCR-signalizací. Dalším z možných mechanismů působení miR-29 je nesprávná regulace metylace genomu při změně exprese *de novo* DNA metyl transferáz, které jsou také cílem miR-29⁸⁰.

Úlohu miR-150 a miR-155 v signalizaci přes BCR u CLL jsme popsali v nedávné době a jedná se o první demonstraci přímé úlohy microRNA v regulaci této fundamentální molekulární dráhy⁸¹. Také jsme popsali, že exprese miR-155 je u CLL regulována transkripčním faktorem MYB⁸². Objasnili jsme, že exprese miR-155 přispívá k regulaci fosfatáz zodpovědných za řízení BCR-signalizace a přežití CLL buněk⁸³. Relevanci miRNA pro BCR-dráhu také podpořily studie popisující indukci (včetně miR-155) a represi miRNA po stimulaci B-buněčného receptoru¹³.

Typickou vlastností CLL je preferenční využívání některých subgenů pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinových genů, které pak dávají vznik BCR na povrchu buněk. Předpokládá se, že jsou častěji využívány subgeny, které ve výsledku tvoří imunoglobulin mající tendenci k vazbě na auto-antigeny, čímž podporuje přežití maligního klonu ⁸⁴. V této souvislosti jsme popsali vysokou expresi miR-650 u pacientů s CLL, kteří využívají tzv. V2 subgeny pro lambda lehké řetězce imunoglobulinových genů ⁸⁴. miR-650 přispívá k regulaci důležitých transkripčních faktorů, proliferace B-lymfocytů a její exprese je spojena s prognózou onemocnění ⁸⁵. Důležitá úloha miRNA ve fyziologické regulaci BCR-dráhy u normálních B-lymfocytů ⁶⁰ se také promítá do jejich deregulace u maligních buněk.

Chronická lymfocytární leukémie má extrémně variabilní prognózu od desítek měsíců po desítky let, což vede k hledání vhodných prognostických markerů ⁷⁴. První práce zabývající se miRNA u CLL studovaly jejich expresi u subtypů onemocnění, které se klinicky chovají nepříznivě. Byl takto definován expresní profil miRNA u pacientů s nemutovaným IgHV a expresí ZAP-70 (viz výše). Stamatopoulos a kol. analyzovali publikovaná data a testovali expresi dvou vybraných miRNA (miR-29c a miR-223) na velkém souboru dobře charakterizovaných CLL pacientů (n=110) ⁸⁶. Obě miRNA bylo možné samostatně nebo v kombinaci s dalšími markery použít k rozlišení pacientů dle délky času do první terapie a celkového přežití. Zajímavé údaje také přineslo studium exprese miRNA u pacientů s velmi nepříznivou prognózou nesoucích p53 abnormalitu (delece a/nebo mutace). Srovnání exprese 7 vybraných miRNA u 104 CLL pacientů (60 % mělo p53 delecii) identifikovalo vyšší expresi miR-21 jako dobrý marker delecce a celkového přežití ^{61,62,86-88}. U pacientů s p53 mutací byla také popsána cca 10krát nižší exprese miR-34a, která je přímým cílem p53 ⁸⁹. Především rozdíl v expresi miR-34a u pacientů s p53 mutací by mohl být reálně využitelný v klinické praxi, neboť identifikace těchto pacientů je technicky náročná a většinou zahrnuje krok pre-screeningu ⁹⁰. V současném okamžiku není vhodné doporučit kvantifikaci miRNA pro běžnou klinickou praxi a jejich prognostický význam je nyní validovaným v klinických studiích. Publikované studie postupně odhalují, jak jsou miRNA zapojeny do odpovědi nádorových buněk na poškození DNA, indukci apoptózy a navození rezistence na léčbu. Lze spekulovat, že lepší pochopení jejich biologie by mohlo mít důsledky pro cílenou léčbu a to jako prediktory odpovědi či dokonce terapeutické cíle.

5. VLASTNÍ PŘÍNOS A KOMENTÁŘ K VYBRANÝM PUBLIKACÍM

5.1 Optimalizace metod izolace a kvantifikace miRNA u CLL

- **Mraz M**, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(1):1-4.

PŘÍLOHA 1

Problematika analýzy exprese miRNA je relativně počátku a zatím nejsou přijaty a definovány standardy studia miRNA. V publikaci Mraz et al. BBRC (2009) jsme se pokusili alespoň částečně srovnat vliv různých postupů izolace mRNA na výsledná expresní data a také stabilitu miRNA v izolované totální RNA.

Veškeré analýzy byly prováděny na vzorcích B-lymfocytů od CLL pacientů s čistotou vyšší než 95 % CD5+CD19+ buněk. Pro analýzu exprese microRNA bylo nutné zavést vhodnou metodu izolace RNA. Některé metody využívající adsorpci RNA na silikovém povrchu kolonek nejsou pro izolaci microRNA vhodné. V literatuře se také objevila zmínka o nestabilitě microRNA v zamražených vzorcích ⁹¹. Tato skutečnost by omezovala naše možnosti studia, a proto jsme se rozhodli ověřit kvalitu RNA po dlouhodobém uchopání (-80°C). Na základě stanovení exprese panelu miRNA jsme potvrdili reprodukcibilitu expresních analýz při použití dlouhodobě skladovaných vzorků. Tato publikace je přes využití CLL vzorků jako modelu vysoce citována v literatuře, která se věnuje izolaci miRNA obecně.

5.2 Deregulace apoptické dráhy p53 a úloha miRNA u CLL

- **Mraz M**, Malinova K, Kotaskova J, Pavlova S, Tichy B, Malcikova J, Stano Kozubik K, Smardova J, Brychtova Y, Doubek M, Trbusek M, Mayer J, Pospisilova S. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*. 2009;23(6):1159-63. **PŘÍLOHA 2**
- **Mraz M**, Pospisilova S, Malinova K, Slapak I, Mayer J. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):506-9. **PŘÍLOHA 3**
- Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, Sebejova L, Dobes P, Svitakova M, Vranova V, **Mraz M**, Francova HS, Doubek M, Brychtova Y, Kuglik P, Pospisilova S, Mayer J. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 1;29(19):2703-8. **PŘÍLOHA 4**
- te Raa GD, Malcikova J, Pospisilova S, Trbusek M, **Mraz M**, Garff-Tavernier ML, Merle-Béral H, Lin K, Pettitt AR, Merkel O, Stankovic T, van Oers MH, Eldering E, Stilgenbauer S, Zenz T, Kater AP; European Research Initiative on CLL (ERIC). Overview of available p53 function tests in relation to TP53 and ATM gene alterations and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Aug;54(8):1849-53. **PŘÍLOHA 5**
- Navrkalova V, Sebejova L, Zemanova J, Kminkova J, Kubesova B, Malcikova J, **Mraz M**, Smardova J, Pavlova S, Doubek M, Brychtova Y, Potesil D, Nemethova V, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M. ATM mutations uniformly lead to ATM dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: application of functional test using doxorubicin. *Haematologica*. 2013 Jul;98(7):1124-31. **PŘÍLOHA 6**
- Doubek M, Trbušek M, Malčíková J, Brychtová Y, Smardová J, Lochmanová J, Panovská A, Skuhrová Francová H, **Mraz M**, Tichý B, Sebejová L, Navrkalová V, Plevová K, Kuglík P, Mayer J, Pospíšilová S. Specific p53 mutations do not impact results of alemtuzumab therapy among patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012 Sep;53(9):1817-9. **PŘÍLOHA 7**
- te Raa GD, Malcikova J, **Mraz M**, Trbusek M., Le Garff-Tavernier H, Merle-Béral H, Greil R, Merkel O, Pospisilova S, Lin K, Pettitt AR, Stankovic T, van Oers NH, Eldering E, Stilgenbauer S, Zenz T, Kater AP, on behalf of the European Research Initiative on CLL (ERIC). Assessment of p53 Functionality in Chronic Lymphocytic Leukemia by Different Assays; an ERIC-wide Approach. *British Journal of Hematology*, in press. **PŘÍLOHA 8**

Kromě statusu IgHV jsou delece a mutace p53 genu klíčovými faktory v agresivitě CLL buněk a rezistence na podávanou cytostatickou léčbu. Přítomnost těchto abnormalit samostatně (delece nebo mutace p53) či v kombinaci (delece a mutace druhé alely) má jednoznačně negativní prognostický vliv⁹²⁻⁹⁶. Také jsme prokázali, že specifické mutace p53 postihující proteinovou doménu zodpovědnou za vazbu k DNA, jsou spojeny s nejagresivnějším onemocněním^{5,97}. Pro detekci abnormalit v p53 a ATM u CLL jsme vyvinuli a validovali několik metodik⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Použití microarray technologie umožnilo v nedávné době definovat expresní profil miRNA u různých subtypů CLL a zdravých kontrolních B-lymfocytů⁴⁸. Při dalším studiu byl

popsán soubor 13 miRNA, jejichž expresi lze asociovat s prognostickými faktory a progresí onemocnění⁴⁸. Analýzu exprese těchto miRNA lze využít k rozlišení pacientů s nemutovanou variabilní částí těžkého řetězce imunoglobulinu (IgHV) a exprimujících tyrozin-kinázu ZAP-70 (pacienti s horší prognózou) od pacientů bez exprese ZAP-70 a s mutovaným IgHV (pacienti s lepší prognózou). V našich studiích jsme se zaměřili na studium exprese miRNA u CLL vzorků s mutovaným a nemutovaným IgHV. Pozorovali jsme sníženou expresi miRNA miR-23a, miR-23b a miR-15a u pacientů s mutovaným IgHV. Je zajímavé, že charakter exprese miR-16 nebyl podobný expresi miR-15 přesto, že obě tyto miRNA jsou lokalizovány v oblasti 13q14 (tzv. 13q14 cluster). Dvě z těchto miRNA (miR-23b, miR-15a) byli již v této souvislosti popsány v publikaci⁴⁸. Exprese miRNA u subtypu CLL s TP53 aberací nebyla v době zahájení studie známa a námi publikovaná data výrazně přispěla k pochopení úlohy miRNA u tohoto subtypu onemocnění. V naší studii byla pomocí RT-PCR zjištěna snížená exprese tří miRNA – miR-34a, miR-29c a miR-17-5p u pacientů s p53 abnormalitou (del/mut TP53 n=12, wt TP53 n=18). Zvláště výrazná byla změna exprese u miR-34a (p=0,000001). miR-34a patří mezi přímé transkripční cíle p53⁹⁴ a byla také popsána regulace exprese genu BCL2 pomocí miR-34²⁸ a úloha této miRNA při spouštění apoptózy a zástavě buněčného cyklu. V naší práci se vůbec poprvé podařilo prokázat změnu v expresi microRNA miR-34a v závislosti na funkčnosti genu p53 také *in vivo* přímo u pacientů. Vzhledem k prokázanému vlivu miR-34 na další důležité proteiny může tato miRNA hrát významnou roli v patogenezi/progresi CLL. Mezi další microRNA, které se liší svou expresí u pacientů s delecí a/nebo mutací p53 oproti pacientům s wild-type p53 patří miR-29c. miR-29c reguluje TCL1 proto-onkogen. TCL1 je ko-aktivátorem PI3K/AKT kinázy a reguluje mnohé pro- a anti-apoptotické signály⁷⁸. U transgenních myší exprimujících TCL1 dochází ke spontánnímu vzniku CLL a také je známa souvislost TCL1 exprese s nemutovaným IgHV. Dalším cílem miR-29 je anti-apoptotický gen MCL1 deregulovaný u CLL (z rodiny BCL2) a obdobně jako TCL1 je znám z myšího modelu chronické lymfocytární leukémie. Nabízí se zde tedy možnost účasti miR-29 při vzniku agresivní formy CLL s delecí/mutací p53. Třetí miRNA, která je abnormálně regulována ve vzorcích s aberantním p53 genem, je miR-17-5p. Tato často studovaná molekula je součástí klastru miRNA regulovaného proto-onkogenem c-MYC (miR-17-92). miR-17-5p reguluje např. p21, E2F1, Cyclin D a je také součástí c-myc regulované odpovědi na hypoxické prostředí. Navíc jsme zjistili změnu exprese dalších, hypoxií regulovaných, miRNA (miR-23a a miR-29b) u pacientů s různým mutačním statusem IgHV. Spojením literárních dat a našich poznatků umožnilo vytvoření prognostického panelu u CLL.

Součástí těchto studií byl také výzkum úlohy miRNA v odpovědi na poškození DNA u lidských embryonálních kmenových buněk, které na takovéto poškození reagují velmi senzitivně. Tento model nám umožnil testovat použité metody a také objasnit, do jaké míry

mohou být fyziologicky miRNA zapojeny do odpovědi na poškození DNA¹⁰¹. Stojí za povšimnutí, že tato studie odhalila fundamentální úlohu miRNA v regulaci buněčného cyklu přes protein p21. Lze spekulovat, že podobné regulace by mohly probíhat také v nediferencovaných buňkách některých akutních B buněčných leukémií, což bude dále testováno.

Získané výsledky ukazují biologickou úlohu miRNA a p53 dráze a roli microRNA v patogenezi/progresi hematologických malignit s poškozenou dráhou p53.

5.3 Struktura lokusu 22q11 a jeho vliv na expresi miR-650

- **Mraz M**, Dolezalova D, Plevova K, Stano Kozubik K, Mayerova V, Cerna K, Musilova K, Tichy B, Pavlova S, Borsky M, Verner J, Doubek M, Brychtova Y, Trbusek M, Hampl A, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012 119(9):2110-3. **PŘÍLOHA 9**
- **Mraz M**, Stano Kozubik K, Plevova K, Musilova K, Tichy B, Borsky M, Kuglik P, Doubek M, Brychtova Y, Mayer J, Pospisilova S. The origin of deletion 22q11 in chronic lymphocytic leukemia is related to the rearrangement of immunoglobulin lambda light chain locus. *Leuk Res*. 2013 Jul;37(7):802-8. **PŘÍLOHA 10**

Při studiu chromozomálních aberací u CLL byla popsána častá rekurentní aberace v lokusu 22q11¹⁰². Komplexně jsme charakterizovali původ chromozomálních přestaveb v této oblasti u CLL, které mohou mít potenciální vliv na hladiny miRNA a protein-kódujících genů. Prokázali jsme, že všechny přestavby detekované v této oblasti v naší skupině pacientů (n=7/40), které byly jinými autory považovány za pravé chromozomální aberace, jsou důsledkem fyziologické přestavby lehkých řetězců imunoglobulinů¹⁰³. Následně jsme prokázali, že neovlivňují expresi protein-kódujících genů, které jsou v této oblasti obsaženy, ale mohou ovlivnit expresi miRNA-650. Dále jsme se tedy věnovali studiu miR-650 lokalizovaného v lokusu 22q11. Homology miR-650 jsou přítomny v několika subgenech lehkých řetězce. Prokázali jsme, že u pacientů dochází při využití subgenů pro lehký řetězec obsahujícího miR-650 (rodina V2 subgenů) ke koordinované expresi microRNA společně s lehkým řetězcem imunoglobulinu. Tímto byl popsán zcela nový mechanismus regulace microRNA společně s genem pro imunoglobulin. Exprese miR-650 je také spojena s prognózou chronické lymfocytární leukémie tj. časem do první terapie a celkovým přežitím. Následné experimenty také prokázaly, že miR-650 reguluje proliferaci B-lymfocytů *in vitro*. Pro identifikaci cílových genů této microRNA jsme provedli transfekční experimenty se syntetickou miR-650 a western blot analýzu potenciálních cílů této microRNA (CDK1, ING4 atd). Cíle této microRNA byly také hledány na úrovni bioinformatické analýzy s využitím databáze TargetScan (protein EBF3) a následně ověřeny pomocí Western Blotu. Prokázali jsme, že miR-650 reguluje expresi několika proteinů (ING4, CDK1, EBF3) relevantních pro vývoj B-lymfocytů či jejich proliferaci⁸⁴.

5.4 Úloha interakcí v mikroprostředí v biologii CLL a vliv miRNA

- **Mraz M**, Chen L, Rassenti LZ, Ghia EM, Li H, Jepsen K, Smith EN, Messer K, Frazer KA, Kipps TJ. MicroRNA-150 contributes to the proficiency of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1 genes. *Blood*. 2014 May 1. [Epub ahead of print] **PŘÍLOHA 11**
- **Mraz M**, Kipps TJ. MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Aug;54(8):1836-9. **PŘÍLOHA 12**
- **Mraz M**, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, Ansell SM, Novak AJ, Kay NE, Witzig TE, Nowakowski GS. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(1):53-64. **PŘÍLOHA 13**
- Cui B, Chen L, Zhang S, **Mraz M**, Fecteau JF, Yu J, Ghia EM, Zhang L, Bao L, Rassenti LZ, Messer K, Calin GA, Croce CM, Kipps TJ. MicroRNA-155 Influences B-cell Receptor Signaling And Associates With Aggressive Disease In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. v tisku **PŘÍLOHA 14**
- Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, **Mraz M**, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3816-25. **PŘÍLOHA 15**

Základní subtypy CLL definované přítomností/absencí mutací v IgHV se výrazně liší nejenom v prognóze^{60,104}, ale především v některých funkčních aspektech BCR signalizace. Buňky s nemutovaným IgHV odpovídají na stimulaci BCR *in vitro* výraznější aktivací signalizačních molekul a fosforylací kináz zodpovědných za aktivaci genů anti-apoptické odpovědi^{60,104}. Na druhé straně, CLL buňky s mutovaným IgHV exprimují menší množství IgM na svém povrchu a jsou více anerní vůči BCR stimulaci¹³. Je třeba zdůraznit, že tyto poznatky vycházejí ze studia CLL buněk získaných z periferní krve a pravděpodobně neodrážejí charakteristiky klíčové populace dělicích se CLL buněk v lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Zároveň bylo nedávno překvapivě popsáno, že specifická struktura BCR receptoru derivovaného z CLL buněk způsobuje konstitutivní signalizaci bez přítomnosti antigenu¹⁰⁵. Tyto poznatky zatím nejsou zcela vysvětleny na molekulární úrovni, ale je pravděpodobné, že antigen-dependentní signalizace se u CLL buněk často kombinuje také s konstitutivní aktivací BCR dráhy. Signalizace přes BCR zprostředkovává u CLL buněk nezbytné signály pro přežití, proliferaci, migraci a rezistenci k terapii^{106,107}. BCR signalizace je propojena na mnoha úrovních s adhezí a migrací B buněk, neboť ta souvisí s jejich lokalizací v primárních a sekundárních lymfatických orgánech, kde jsou vystaveny antigenům a antigen-prezentujícím buňkám. Není překvapivé, že inhibice BCR dráhy má pro maligní lymfocyt fatální důsledky uvědomíme-li si její důležitou úlohu pro osud vyvíjejícího se normálního B-lymfocyty a klonální proliferaci maturovaného B-lymfocyty.

Imunoglobulinová komponenta BCR sama o sobě nemá kinázovou aktivitu a první kinázou odpovídající na jeho stimulaci je Lyn, která fosforyluje cytoplazmatické části BCR-asociovaných Ig α a Ig β (ITAM), které následně slouží jako místa organizace „signalosomu“ (shrnuto v ¹⁰⁸). BCR signalizace je dále propagována kinázou Lyn rekrutující PI3K, kinázou Syk pomocí asociace s adaptorovou molekulou BLNK a kinázou Btk aktivující fosfolipázu PLC γ 2 ¹⁰⁸. Funkcí výše zmíněných kináz je aktivovat proteiny PLC γ 2 a PI3K zodpovědné za integraci signálu a produkci tzv. druhých posílů. PLC γ 2 produkuje inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG), které vedou k vylití intracelulárních zásob kalcia a aktivaci proteinkinázy C, MAPK, ERK1/2, p38, transkripční aktivaci NF κ B a dalších. PI3K je na membráně vázána k intracelulární části CD19 a dává vznik fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátu a posiluje BCR signalizaci přes další aktivaci Btk a Akt dráhu ¹⁰⁸. V naší práci jsme popsali zásadní úlohu miR-150 v regulaci aktivace BCR signalizační dráhy a Akt dráhy u CLL buněk ⁸¹. Identifikovali a ověřili jsme na základě DNA mikročipů dva nové cíle této miRNA, které jsou relevantní pro CLL. Zároveň jsme postulovali některé další miRNA, které by se mohly BCR signalizace účastnit ¹⁰⁹.

U CLL byla kromě výše zmíněných proteinů popsána důležitá úloha tyrozin kinázy ZAP-70, která zde ale pravděpodobně funguje spíše jako adaptorová molekula některé z kináz ²². Rozdíly v expresi ZAP-70 jsou silně asociovány s odpovědí CLL buněk na stimulaci BCR *in vitro* a jsou dobře známým prognostickým faktorem spojeným s nemutovaným IgHV ²⁴. Podobně také CD38 a CD49d, obě asociované s prognózou CLL, napomáhají svými funkcemi v iniciaci BCR signalizace a možná tak integrují více signálů v mikroprostředí lymfatických orgánů, kde zprostředkovávají adhezi a migraci ^{20,25,39}. V naší práci jsme prokázali, že inhibice CD49d je vhodným mechanismem k překonání rezistence v mikroprostředí kostní dřeně a lymfatických orgánů ³⁹. Zároveň jsme tak zavedli vhodný model ke studiu miRNA regulovaných v rámci adheze B buněk.

Jednou z nejčastěji studovaných miRNA v biologii B buněčných malignit je miR-155, jejíž exprese je regulována adhezí a typicky je nadměrně exprimována u B buněčných malignit ¹¹⁰⁻¹¹³. Například u subtypů ABC a GCB DLBCL, které se podstatně liší délkou přežití má hladina exprese miR-155 prognostický význam. Nedávno byl také popsán vztah mezi expresí miR-155 a NF- κ B v buněčných liniích DLBCL ¹¹⁴. V buňkách s vysokým množstvím miR-155 je významně vyšší aktivita NF- κ B a exprese miR-155 v DLBCL může být řízena aktivitou dráhy NF- κ B, což bylo naznačeno rovněž u Burkittova lymfomu ^{115,116}. Širší role miR-155 ve vzniku lymfomů byla potvrzena prvním transgenním myším modelem pro miRNA (E μ -miR-155), v němž byla exprese miR-155 pod kontrolou zesilovače E μ z V $_H$ promotoru *IgH* ¹¹⁷. Docházelo tak ke zvýšené expresi miR-155 v B-lymfocytech, v důsledku čehož se u myši postupně vyvinul B-buněčný nádor, jehož buňky se fenotypově podobaly buňkám lidských B-buněčných malignit. MicroRNA miR-155 je velmi pravděpodobně zahrnuta do

iniciace a/nebo progresu lymfomů a poprvé bylo prokázáno, že deregulace byť jediné miRNA je dostačující pro vznik maligního nádoru ¹¹⁷. Costinean a kolegové také prokázali, že cílem miR-155 jsou proteiny SHIP a C/EBP β , které jsou známé svou rolí ve zrání B-lymfocytů ⁸². Transgenní myši vykazovaly nejvyšší expresi miR-155 na stupni pre-B-lymfocytů, čímž docházelo ke snížení tvorby SHIP i C/EBP β , zastavení diferenciaci pre-B-lymfocytů a vzniku leukémie. Význam miR-155 jsme objasnili u CLL, kde reguluje hematopoetický transkripční faktor PU.1 ¹¹⁸. Podstatným krokem v pochopení úlohy miR-155 v biologii B lymfocytů pak byla naše recentně publikované práce, která přímo demonstrovala její úlohu v BCR signalizaci u CLL přes regulaci klíčové fosfatázy SHIP-1⁸³.

5.5 Výskyt mutací v miRNA u CLL

- Kminkova J, **Mraz M**, Zaprazna K, Navrkalova V, Tichy B, Plevova K, Malcikova J, Cerna K, Rausch T, Benes V, Brychtova Y, Doubek M, Mayer J, Pospisilova S. Identification of novel sequence variations in microRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Carcinogenesis*. 2014 May;35(5):992-1002. doi: 10.1093/carcin/bgt396. Epub 2013 Dec 4. **PŘÍLOHA 16**

Význam miRNA v biologii CLL byl jasně demonstrován pro případ delece 13q14 obsahující miR-15-16. Lze tedy předpokládat, že by se mohly u maligních B buněk také vyskytovat mutace v miRNA. Provedeli jsme re-sekvenční analýzu pro 109 microRNA genů u celkem 105 vzorků u 98 CLL pacientů (u 7 pacientů byla analyzována DNA ze dvou různých dat odběrů periferní krve). Dále byla mutační analýza genů pro microRNA provedena u 15 zdravých kontrol. Resekvenční mikročip byl navržen tak, aby byla analyzována celá oblast pre-microRNA, včetně maturované microRNA, a přibližně 40 nukleotidů z pri-microRNA oblasti (cca 20 nukleotidů od 5' konce pre-microRNA a 20 nukleotidů od 3' konce pre-microRNA). Byla také analyzována miRNA-16-1 nacházející se v oblasti 13q, což je nejčastěji deletovaná oblast u CLL pacientů. Celkem bylo metodou Sangerova sekvenování analyzováno 193 pacientů, jež byli vybráni na základě (ne)přítomnosti delece oblasti 13q. Mimo jiné byly v projektu analyzovány primární oblasti miRNA-29b-2 a miRNA-29c, jejichž aberantní exprese, jejíž příčiny nejsou dosud známy, je vysoce asociována s patogenezi CLL. Tyto microRNA byly sekvenovány u 213 CLL pacientů. V genech pro microRNA bylo resekvenčními mikročipy detekováno a následně ověřeno přímým sekvenováním 5 nových heterozygotních záměn (mutací) u 5 různých CLL pacientů. Mutace nalezená v pre-miR-16-1 byla přímým sekvenováním detekována u dvou potomků (dcera, syn) daného pacienta. Mutace popsaná v primární oblasti této microRNA *a/* nebyla resekvenčními mikročipy detekována a nebyla nalezena ani v dalším souboru 193 pacientů, což svědčí o velmi nízké frekvenci záměn v této microRNA u CLL pacientů. Metodou qRT-PCR bylo zjištěno, že hladiny exprese maturované miR-16-1 jsou nižší v buňkách transfekovaných mut-plasmidem oproti buňkám s wt-plasmidem ($p < 0,01$). V případě expresní analýzy genu *BCL2* byly jeho hladiny vyšší u buněk s mut-plasmidem než u buněk s wt-plasmidem ($p < 0,05$). Obě zjištění tedy potvrzují, že nově identifikovaná mutace má funkční význam. Závěrem lze říci, že sekvenční varianty se vyskytují u CLL pacientů a mohou být asociovány s biologii a/nebo patogenezi CLL.

5.6 Přehledové práce shrnující problematiku

- Mraz M, Pospisilova S. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: from causality to associations and back. *Expert Rev Hematol.* 2012 Dec;5(6):579-81. **PŘÍLOHA 17**
- Dolezalova D, **Mraz M**, Hampl A. miRNA in Embryonic Stem Cells. v *MICRORNA IN REGENERATIVE MEDICINE* (Elsevier Inc.) 2014. V tisku (kapitola v zahraniční monografii). **PŘÍLOHA 18**
- **Mráz M**, Musilová K, Mayer J, Pospíšilová S. MicroRNA u B-buněčných lymfomů. *MikroRNA v onkologii.* Galén 2012. (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 19**
- **Mráz M**, Mayerová V, Černá K, Doležalová D, Musilová K, Mayer J, Pospíšilová Š. MicroRNA u chronické lymfocytární leukémie. *MikroRNA v onkologii.* Galén 2012. (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 20**
- **Mráz M**, Pospíšilová Š. Genová terapie u hematologických onemocnění: historie a budoucnost. *Molekulární hematologii.* Galén. 2013 (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 21**
- Trbušek M, **Mráz M**, Pospíšilová Š, Doubek M. Molekulární patogeneze B-buněčné chronické lymfocytární leukémie (B- CLL). *Molekulární hematologii.* Galén. 2013 (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 22**
- **Mráz M**, Doubek M, Mayer J. Inhibici signalizace B-buněčným receptorem: první cílená léčba u chronické lymfatické leukémie a dalších B-buněčných lymfomů. *Klinická onkologie.* 2013; 26(3): 179–185 179. **PŘÍLOHA 23**
- **Mráz M**, Trbusek M, Dolezalova D, Malcikova J, Supikova J, Stano-Kozubík K, Kantorova B, Mayer J, Pospisilova S. Identifikace patogeneticky významných mutací u chronické lymfatické leukémie pomocí „sekvenování nové generace“. *Transfuze a hematologie dnes.* 2012; 18: 72-75. **PŘÍLOHA 24**
- **Mráz M**, Pavlová Š, Malčíková J, Malinová K, Mayer J, Pospíšilová, Š. Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie. *Transfuze a hematologie dnes.* 2010; Suppl 1: 16-20. **PŘÍLOHA 25**
- **Mráz M**, Pospíšilová Š, Mayer J. MicroRNA v patogenezi chronické lymfocytární leukémie a jejich prognostický význam. *Transfuze a hematologie dnes.* 2010 Suppl 1: 33-35. **PŘÍLOHA 26**
- Pospíšilová Š, Malinová K, **Mráz M**, Mayer J. MicroRNA – malé molekuly s velkým významem (nejen) u hematologických malignit. *Transfuze a hematologie dnes.* 2008; 14: 180-187. **PŘÍLOHA 27**
- Létalová E, Doubek M, Folber F, Verner J, **Mráz M**, Pospíšilová Š, Mayer J. Mikroprostředí kostní dřeně a jeho role v patogenezi leukemií. *Transfuze Hematol. Dnes.* 2011;4: 171-176. **PŘÍLOHA 28**
- Kusenda B, **Mraz M**, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap.* 2006;150(2):205-15. **PŘÍLOHA 29**
- Seda V, **Mraz M**. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol.* 2014 Aug 1. doi: 10.1111/ejh.12427. **PŘÍLOHA 30**

6. ZÁVĚR

Od roku 2002 se hromadí poznatky o možném významu miRNA v patogenezi CLL a B buněčných malignit. Habilitační práce (předkládaná jako komentovaný soubor publikovaných prací) se věnuje molekulární patogeneze B buněčných malignit a úloze microRNA v jejich biologii. Jako modelová choroba je v této souvislosti studována chronická lymfocytární leukémie (CLL), která je nejčastější leukémií dospělé populace a byla jako vůbec první onemocnění spojena s deregulací miRNA. MicroRNA jsou důležitou součástí procesu hematopoézy, neboť regulují diferenciaci hematopoetických buněk a významně se podílí na řízení jejich apoptózy a proliferace. Abnormální exprese miRNA byla popsána u zatím všech doposud studovaných B-buněčných malignit. K nejčastěji deregulovaným miRNA patří miR-155, miR-34a, miR-21 či klastr miR-17-92. U všech těchto miRNA bylo na myším modelu *in vivo* prokázáno, že významně přispívají k vývoji lymfomů. Mezi miRNA se sníženou expresí v B-lymfomech spadá např. rodina miR-29 a let-7a. U těchto miRNA se předpokládá, že mají především tumor-supresorové funkce, které jsou jejich nižší expresí porušeny. Deregulace miRNA má významný vliv na biologické vlastnosti maligních buněk a analýza exprese miRNA přináší informace o prognóze onemocnění. Publikace komentované v této habilitační práci zásadním způsobem přispěly k pochopení úlohy miRNA v patogenezi, prognóze a progresi CLL. Popsali jsme jejich úlohu u buněk s poškozenou p53 dráhou, vztah ke struktuře a aktivaci BCR a jejich prognostický význam (celkový impakt faktor 123,1; citováno 242krát).

Výsledky publikované uchazečem a jejich zasazení do kontextu biologie B buněčných malignit přispělo zásadním způsobem k objasnění úlohy microRNA v jejich biologii. V budoucnosti bude třeba objasnit, do jaké míry jsou aberace miRNA relevantní pro iniciaci choroby a zda by bylo možné použít jejich kvantifikaci jako nástroj predikce odpovědi na léčbu či např. inhibitory/aktivátory miRNA v terapii.

7. SEZNAM PŘÍLOH

- **Mraz M**, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(1):1-4. **PŘÍLOHA 1**, IF=2,648
- **Mraz M**, Malinova K, Kotaskova J, Pavlova S, Tichy B, Malcikova J, Stano Kozubik K, Smardova J, Brychtova Y, Doubek M, Trbusek M, Mayer J, Pospisilova S. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia.* 2009;23(6):1159-63. **PŘÍLOHA 2**, IF=8,634
- **Mraz M**, Pospisilova S, Malinova K, Slapak I, Mayer J. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(3):506-9. **PŘÍLOHA 3**, IF=1,939
- Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, Sebejova L, Dobes P, Svitakova M, Vranova V, **Mraz M**, Francova HS, Doubek M, Brychtova Y, Kuglik P, Pospisilova S, Mayer J. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011 Jul 1;29(19):2703-8. **PŘÍLOHA 4**, IF=18,970
- te Raa GD, Malcikova J, Pospisilova S, Trbusek M, **Mraz M**, Garff-Tavernier ML, Merle-Béral H, Lin K, Pettitt AR, Merkel O, Stankovic T, van Oers MH, Eldering E, Stilgenbauer S, Zenz T, Kater AP; European Research Initiative on CLL (ERIC). Overview of available p53 function tests in relation to TP53 and ATM gene alterations and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013 Aug;54(8):1849-53. **PŘÍLOHA 5**, IF=2,301
- Navrkalova V, Sebejova L, Zemanova J, Kminkova J, Kubsova B, Malcikova J, **Mraz M**, Smardova J, Pavlova S, Doubek M, Brychtova Y, Potesil D, Nemethova V, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M. ATM mutations uniformly lead to ATM dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: application of functional test using doxorubicin. *Haematologica.* 2013 Jul;98(7):1124-31. **PŘÍLOHA 6** IF=5,935
- Doubek M, Trbušek M, Malčíková J, Brychtová Y, Smardová J, Lochmanová J, Panovská A, Skuhrová Francová H, **Mraz M**, Tichý B, Sebejová L, Navrkalová V, Plevová K, Kuglík P, Mayer J, Pospíšilová S. Specific p53 mutations do not impact results of alemtuzumab therapy among patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012 Sep;53(9):1817-9. **PŘÍLOHA 7** IF=2,301
- te Raa GD, Malcikova J, **Mraz M**, Trbusek M., Le Garff-Tavernier H, Merle-Béral H, Greil R, Merkel O, Pospisilova S, Lin K, Pettitt AR, Stankovic T, van Oers NH, Eldering E, Stilgenbauer S, Zenz T, Kater AP, on behalf of the European Research Initiative on CLL (ERIC). Assessment of p53 Functionality in Chronic Lymphocytic Leukemia by Different Assays; an ERIC-wide Approach. *British Journal of Hematology*, in press. **PŘÍLOHA 8**, IF=4.959
- **Mraz M**, Dolezalova D, Plevova K, Stano Kozubik K, Mayerova V, Cerna K, Musilova K, Tichy B, Pavlova S, Borsky M, Verner J, Doubek M, Brychtova Y, Trbusek M, Hampl A, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012 119(9):2110-3. **PŘÍLOHA 9**, IF=9,060
- **Mraz M**, Stano Kozubik K, Plevova K, Musilova K, Tichy B, Borsky M, Kuglik P, Doubek M, Brychtova Y, Mayer J, Pospisilova S. The origin of deletion 22q11 in chronic

lymphocytic leukemia is related to the rearrangement of immunoglobulin lambda light chain locus. *Leuk Res.* 2013 Jul;37(7):802-8. **PŘÍLOHA 10**, IF=2,923

- **Mraz M**, Chen L, Rassenti LZ, Ghia EM, Li H, Jepsen K, Smith EN, Messer K, Frazer KA, Kipps TJ. MicroRNA-150 contributes to the proficiency of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1 genes. *Blood.* 2014 May 1. [Epub ahead of print] **PŘÍLOHA 11**, IF=9,775
- **Mraz M**, Kipps TJ. MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013 Aug;54(8):1836-9. **PŘÍLOHA 12**, IF=2,301
- **Mraz M**, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, Ansell SM, Novak AJ, Kay NE, Witzig TE, Nowakowski GS. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol.* 2011 Oct;155(1):53-64. **PŘÍLOHA 13**, IF=4,942
- Cui B, Chen L, Zhang S, **Mraz M**, Fecteau JF, Yu J, Ghia EM, Zhang L, Bao L, Rassenti LZ, Messer K, Calin GA, Croce CM, Kipps TJ. MicroRNA-155 Influences B-cell Receptor Signaling And Associates With Aggressive Disease In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* v tisku **PŘÍLOHA 14**, IF=9,775
- Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, **Mraz M**, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011 Apr 7;117(14):3816-25. **PŘÍLOHA 15**, IF=10,558
- Kminkova J, **Mraz M**, Zaprazna K, Navrkalova V, Tichy B, Plevova K, Malcikova J, Cerna K, Rausch T, Benes V, Brychtova Y, Doubek M, Mayer J, Pospisilova S. Identification of novel sequence variations in microRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Carcinogenesis.* 2014 May;35(5):992-1002. doi: 10.1093/carcin/bgt396. Epub 2013 Dec 4. **PŘÍLOHA 16**, IF=5,266
- Mraz M, Pospisilova S. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: from causality to associations and back. *Expert Rev Hematol.* 2012 Dec;5(6):579-81. **PŘÍLOHA 17**, IF=2,382
- Dolezalova D, **Mraz M**, Hampl A. miRNA in Embryonic Stem Cells. v *MICRORNA IN REGENERATIVE MEDICINE* (Elsevier Inc.) 2014. V tisku (kapitola v zahraniční monografii). **PŘÍLOHA 18**
- **Mráz M**, Musilová K, Mayer J, Pospíšilová S. MicroRNA v patogenezi b-buněčných lymfomů. *MikroRNA v onkologii.* Galén 2012. (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 19**
- **Mráz M**, Mayerová V, Černá K, Doležalová D, Musilová K, Mayer J, Pospíšilová Š. MicroRNA u chronické lymfocytární leukémie. *MikroRNA v onkologii.* Galén 2012. (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 20**
- **Mráz M**, Pospíšilová Š. Genová terapie u hematologických onemocnění: historie a budoucnost. *Molekulární hematologii.* Galén. 2013 (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 21**
- Trbušek M, **Mráz M**, Pospíšilová Š, Doubek M. Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie (B- CLL). *Molekulární hematologii.* Galén. 2013 (kapitola v monografii). **PŘÍLOHA 22**

- **Mráz M**, Doubek M, Mayer J. Inhibici signalizace B-buněčným receptorem: první cílená léčba u chronické lymfatické leukémie a dalších B-buněčných lymfomů. *Klinická onkologie*. 2013; 26(3): 179–185 179. **PŘÍLOHA 23**
- **Mráz M**, Trbusek M, Dolezalova D, Malcikova J, Supikova J, Stano-Kozubík K, Kantorova B, Mayer J, Pospisilova S. Identifikace patogeneticky významných mutací u chronické lymfatické leukémie pomocí „sekvenování nové generace“. *Transfuze a hematologie dnes*. 2012; 18: 72-75. **PŘÍLOHA 24**
- **Mráz M**, Pavlová Š, Malčíková J, Malinová K, Mayer J, Pospíšilová, Š. Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie. *Transfuze a hematologie dnes*. 2010; Suppl 1: 16-20. **PŘÍLOHA 25**
- **Mráz M**, Pospíšilová Š, Mayer J. MicroRNA v patogenezi chronické lymfocytární leukémie a jejich prognostický význam. *Transfuze a hematologie dnes*. 2010 Suppl 1: 33-35. **PŘÍLOHA 26**
- Pospíšilová Š, Malinová K, **Mráz M**, Mayer J. MicroRNA – malé molekuly s velkým významem (nejen) u hematologických malignit. *Transfuze a hematologie dnes*. 2008; 14: 180-187. **PŘÍLOHA 27**
- Létalová E, Doubek M, Folber F, Verner J, **Mráz M**, Pospíšilová Š, Mayer J. Mikroprostředí kostní dřeně a jeho role v patogenezi leukemií. *Transfuze Hematol. Dnes*. 2011;4: 171-176. **PŘÍLOHA 28**
- Kusenda B, **Mráz M**, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap*. 2006;150(2):205-15. **PŘÍLOHA 29**
- Seda V, **Mráz M**. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol*. 2014 Aug 1. doi: 10.1111/ejh.12427. **PŘÍLOHA 30**, IF=2,414

8. LITERATURA

1. Zenz T, Mertens D, K  ppers R, D  hner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:37-50.
2. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625-1638.
3. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.
4. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114:5307-5314.
5. Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:2703-2708.
6. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101-105.
7. Wang L, Lawrence LS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2011:1-10.
8. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208:1389-1401.
9. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011.
10. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306:269-271.
11. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470:115-119.
12. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365:1384-1395.
13. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118:4313-4320.
14. Caligaris-Cappio F, Ghia P. The normal counterpart to the chronic lymphocytic leukemia B cell. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:385-397.
15. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol*. 2008;26:4497-4503.
16. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008;264:549-562.
17. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111:1524-1533.
18. Nilsen H, An Q, Lindahl T. Mutation frequencies and AID activation state in B-cell lymphomas from Ung-deficient mice. *Oncogene*. 2005;24:3063-3066.

19. Malcikova J, Smardova J, Pekova S, et al. Identification of somatic hypermutations in the TP53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Immunol*. 2008;45:1525-1529.
20. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007;110:4012-4021.
21. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:405-418.
22. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:4609-4614.
23. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 2007;109:2032-2039.
24. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:893-901.
25. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003;102:2146-2155.
26. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev*. 2007;7:102-108.
27. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007;21:110-120.
28. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2008;111:846-855.
29. Crosby ME, Almasan A. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biology & Therapy*. 2004;3:1208-1211.
30. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009;23:686-697.
31. Mraz M, Malinova K, Kotaskova J, et al. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*. 2009;23:1159-1163.
32. Herling M, Patel KA, Khalili J, et al. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia*. 2006;20:280-285.
33. Herling M, Patel KA, Weit N, et al. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114:4675-4686.
34. Johnson AJ, Lucas DM, Muthusamy N, et al. Characterization of the TCL-1 transgenic mouse as a preclinical drug development tool for human chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108:1334-1338.
35. Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:96-103.
36. Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol*. 2010;20:424-430.

37. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96:2655-2663.
38. Burger M, Hartmann T, Krome M, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005;106:1824-1830.
39. Mraz M, Zent CS, Church AK, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*. 2011;155:53-64.
40. Granziero L, Circosta P, Scielzo C, et al. CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood*. 2003;101:1962-1969.
41. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006;150:205-215.
42. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-297.
43. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215-233.
44. Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007;26:775-783.
45. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:15524-15529.
46. Calin GA, Croce CM. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest*. 2007;117:2059-2066.
47. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944-13949.
48. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2005;353:1793-1801.
49. Wojcik SE, Rossi S, Shimizu M, et al. Non-codingRNA sequence variations in human chronic lymphocytic leukemia and colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31:208-215.
50. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. 2007;109:5079-5086.
51. Salerno E, Scaglione BJ, Coffman FD, et al. Correcting miR-15a/16 genetic defect in New Zealand Black mouse model of CLL enhances drug sensitivity. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:2684-2692.
52. Lia M, Carette A, Tang H, et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood*. 2011.
53. Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17:28-40.
54. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:5166-5171.

55. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:1410-1416.
56. Pettitt AR, Sherrington PD, Cawley JC. The effect of p53 dysfunction on purine analogue cytotoxicity in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;106:1049-1051.
57. Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood*. 2001;98:814-822.
58. Cardinaud B, Moreilhon C, Marcet B, et al. miR-34b/miR-34c: a regulator of TCL1 expression in 11q- chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia*. 2009;23:2174-2177.
59. Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*. 2011;305:59-67.
60. Mráz M, Pavlová Š, Malčíková J, Plevová K, Mayer J, Pospíšilová Š. Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie. *Transfuzie a hematologie dnes*. 2010;16:16-20.
61. Mraz M, Malinova K, Kotaskova J, et al. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*. 2009;23:1159-1163.
62. Zenz T, Mohr J, Eldering E, et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113:3801-3808.
63. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-833.
64. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435:839-843.
65. Sampath D, Calin GA, Pudevalli VK, et al. Specific activation of microRNA106b enables the p73 apoptotic response in chronic lymphocytic leukemia by targeting the ubiquitin ligase Itch for degradation. *Blood*. 2009;113:3744-3753.
66. Blum KA, Advani A, Fernandez L, et al. Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;147:507-514.
67. Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, et al. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2010;9:123.
68. Moussay E, Palissot V, Vallar L, et al. Determination of genes and microRNAs involved in the resistance to fludarabine in vivo in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2010;9:115.
69. Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, et al. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114:3872-3879.
70. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303:83-86.
71. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2005;353:1793-1801.
72. Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, Slapak I, Mayer J. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:506-509.
73. Marton S, Garcia MR, Robello C, et al. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia*. 2008;22:330-338.

74. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*. 2009;113:5237-5245.
75. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109:4944-4951.
76. Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? *Oncotarget*. 2010;1:224-227.
77. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006;66:11590-11593.
78. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26:6133-6140.
79. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:15805-15810.
80. Vargova K, Curik N, Burda P, et al. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117:3816-3825.
81. Mraz M, Chen L, Rassenti LZ, et al. MicroRNA-150 contributes to the proficiency of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1 genes. *Blood*. 2014.
82. Costinean S, Sandhu SK, Pedersen IM, et al. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood*. 2009;114:1374-1382.
83. Cui B, Chen L, Zhang S, et al. MicroRNA-155 Influences B-cell Receptor Signaling And Associates With Aggressive Disease In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2014;in press.
84. Mraz M, Dolezalova D, Plevova K, et al. MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119:2110-2113.
85. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 2009;136:26-36.
86. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010;116:945-952.
87. Asslaber D, Pichler JD, Seyfried I, et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115:4191-4197.
88. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*. 2010;24:2072-2079.
89. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012.
90. Bravo V, Rosero S, Ricordi C, Pastori RL. Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353:1052-1055.
91. Calin G, Liu C, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11755-11760.

92. Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, et al. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*. 2007;109:4599-4606.
93. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26:731-743.
94. Bommer G, Gerin I, Feng Y, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*. 2007;17:1298-1307.
95. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 2007;6:1586-1593.
96. Chang T, Wentzel E, Kent O, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26:745-752.
97. Doubek M, Trbuľek M, Maláková J, et al. Specific p53 mutations do not impact results of alemtuzumab therapy among patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:1817-1819.
98. Navrkalova V, Sebejova L, Zemanova J, et al. ATM mutations uniformly lead to ATM dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: application of functional test using doxorubicin. *Haematologica*. 2013;98:1124-1131.
99. te Raa GD, Malcikova J, Pospisilova S, et al. Overview of available p53 function tests in relation to TP53 and ATM gene alterations and chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54:1849-1853.
100. Te Raa GD, Malcikova J, Mraz M, et al. Assessment of p53 Functionality in Chronic Lymphocytic Leukemia by Different Assays; an ERIC-wide Approach. *British Journal of Hematology*. 2014;in press.
101. Dolezalova D, Mraz M, Barta T, et al. MicroRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2012;30:1362-1372.
102. Gunn SR, Bolla AR, Barron LL, et al. Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene. *Leuk Res*. 2009;33:1276-1281.
103. Mraz M, Stano Kozubik K, Plevova K, et al. The origin of deletion 22q11 in chronic lymphocytic leukemia is related to the rearrangement of immunoglobulin lambda light chain locus. *Leuk Res*. 2013;37:802-808.
104. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood*. 2008;112:782-792.
105. Minden MD, Ubelhart R, Schneider D, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012.
106. Burger JA. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012;7:26-33.
107. Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol*. 2012;24:643-649.
108. Dal Porto JM, Gauld SB, Merreal KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular Immunology*. 2004;41:599-613.
109. Mraz M, Kipps TJ. MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013;54:1836-1839.
110. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:3627-3632.
111. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007;121:1156-1161.

112. Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, et al. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol.* 2008;142:732-744.
113. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *Journal of Pathology.* 2005;207:243-249.
114. Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PL, Aguiar RC. Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;181:8-15.
115. van den Berg A, Kroesen BJ, Kooistra K, et al. High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes & Cancer.* 2003;37:20-28.
116. Kluiver J, van den Berg A, de Jong D, et al. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene.* 2007;26:3769-3776.
117. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7024-7029.
118. Vargova K, Curik N, Burda P, et al. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;117:3816-3825.