

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická**

**Kvantifikace genové exprese onkologických biomarkerů chronické
lymfocytární leukémie metodou real-time PCR**

Zuzana Jurčíčková

**Diplomová práce
2012**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Mgr. Zuzana Jurčíčková**
Osobní číslo: **C10917**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Kvantifikace genové exprese onkologických biomarkerů chronické lymfocytární leukemie metodou real-time PCR**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1) Teoretická část:

Obecná charakteristika leukémií se zaměřením na chronickou lymfocytární leukémii - CLL, charakteristika onkologických markerů, které se využívají při diagnostice CLL, cílové a referenční geny, geny pro T-lymfocyty, metoda real-time PCR.

2) Praktická část:

Reverzní transkripce, analýza genové exprese s použitím metody real-time PCR, vyhodnocení dat, srovnání výsledků s dalšími studii.

Rozsah grafických prací: **schémata, grafy, obrázky dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Martin Bunček, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce RNDr. Martinu Bunčekovi, Ph.D. za ochotnou pomoc při vedení této diplomové práce a vstřícný přístup.

Mé poděkování patří také PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D. za profesionální vedení, výrazné přispění svými odbornými znalostmi, za čas, který mi věnoval a také za jeho názory, ochotu a přátelský přístup.

Práci jsem vypracovávala ve firmě GENERI BIOTECH, s.r.o v Hradci Králové a mé poděkování patří rovněž celému kolektivu firmy za vytvoření příjemného pracovního zázemí.

Práce byla částečně podpořena projektem FR-TI2/254, který byl realizován za finanční podpory z prostředků státního rozpočtu prostřednictvím Ministerstva průmyslu a obchodu.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Nesouhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. května 2012

Zuzana Jurčíčková

Kvantifikace genové exprese onkologických biomarkerů chronické lymfocytární leukémie metodou real-time PCR

Anotace

Jedním z nejčastějších typů leukémie v západní Evropě, která postihuje především starší pacienty, je chronická lymfocytární leukémie. Průběh nemoci může být velmi různý v závislosti na typu prognózy, proto je včasné určení předpokládaného klinického průběhu nemoci v této oblasti velmi důležité. V dnešní době je v diagnostice CLL největší důraz kladen na identifikaci molekulárně biologických markerů – genů, jejichž hladina exprese může napomoci klinikovi rozhodnout se, do které prognostické skupiny pacient patří a jaký typ léčby je pro něj vhodný. S rozvojem nových diagnostických metod jsou diagnostikováni stále mladší pacienti, u nichž se často ještě ani neobjevily klinické příznaky. Metodou volby v oblasti diagnostiky molekulárních biomarkerů je real-time PCR, která je „zlatým standardem“ v kvantifikaci genové exprese a to především pro svou vysokou citlivost a přesnost. Metoda real-time PCR dnes zaujímá pozici v onkodiagnostice vedle tradičních imunohistochemických metod, fluorescenční *in situ* hybridizace či průtokové cytometrie. Za posledních dvacet let velmi pokročily možnosti zařazení pacienta do odpovídající prognostické kategorie, avšak další výzkum a identifikace nových biomarkerů v oblasti molekulárně biologického profilování pacientů jsou nezbytné.

Klíčová slova: chronická lymfocytární leukémie, reverzní transkripce, genová exprese, kvantitativní real-time PCR, onkologické biomarkery

Gene expression quantification of biomarkers for CLL on patient samples by real-time PCR method

Annotation

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) occurs mostly in elderly people and is the most common leukemia in the Western world. Advances in the identification and understanding of genomic and molecular markers are helping better predict disease progression and patient survival. The effort is to determine biomarkers that would be able to definitively determine the likelihood of rapid disease progression before the pathophysiologic development of CLL occurs. Gene profiling opens new possibilities to classify the disease into subtypes and guide the design of specialized treatment. Real-time PCR is characterized by high sensitivity and excellent precision, and has become the method of choice for quantitative gene expression measurements. Real-time PCR is rapidly becoming a powerful complement to traditional methods such as immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry for cancer detection and classification. The ability to stratify patients with CLL into high-risk and low-risk categories has advanced dramatically over the past two decades, however additional research in the area of identification different molecular profiles is necessary.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, reverse transcription, quantitative real-time PCR, gene expression, oncology, biomarkers

OBSAH

Anotace	5
Annotation	6
OBSAH	7
Seznam použitých zkratk a symbolů	9
ÚVOD	11
1. TEORETICKÝ ÚVOD A PROBLEMATIKA	12
1.1. Chronická lymfocytární leukémie	12
1.1.1. Úvodní a obecné informace	12
1.1.2. Epidemiologická data	13
1.1.3. Buněčná podstata vzniku CLL	14
1.1.4. Diagnostika CLL	16
1.1.5. Určení klinického stadia nemoci	18
1.1.6. Léčba	19
Chemoterapeutika	20
Monoklonální protilátky	20
1.2. Prognostické markery	20
1.2.1. Variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu	21
1.2.2. Chromozomové aberace	22
Výskyt chromozomových abnormalit	22
Charakteristika nejčastějších chromozomových aberací	23
Predikce vývoje nemoci	24
1.2.3. Molekula CD38	24
1.2.4. Geny se změněnou expresí - prognostické markery CLL	24
LAG3	24
LPL	25
ZAP70	25
1.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase v kombinaci s reverzní transkripcí	26
1.3.1. Reverzní transkripce	27
1.3.2. Ribonukleová kyselina	27
1.3.3. Způsoby generování fluorescenčního signálu	28
Nespecifické sondy	29
Sekvenčně specifické sondy	29
1.3.4. Metody kvantifikace genové exprese	31
Absolutní kvantifikace	32
Relativní kvantifikace	32
1.4. Referenční geny	34
1.4.1. Referenční geny v kitu pro diagnostiku CLL	34
B2M	34
GUSB	35
HPRT1	35
1.5. Hodnocení kvality diagnostických testů	35
2. CÍLE PRÁCE	37
3. MATERIÁL A METODY	38
3.1. Klinický materiál	38
3.2. Reakční komponenty	38

3.2.1. Reverzní transkripce	38
3.2.2. qPCR	39
3.3. Přístroje	39
3.4. Pomůcky	40
3.5. Metody	40
3.5.1. Reverzní transkripce	40
3.5.2. Real-time PCR	40
3.5.3. Analýza dat	41
3.5.3.1. Srovnávání hodnot genové exprese u skupiny vzorků MUT a UNMUT	41
3.5.3.2. Ověření prediktivní hodnoty vybraných genů	43
3.6. Další geny vybrané do kitu k diagnostice CLL - markery T-lymfocytů	44
CD3D	44
GZMA	44
4. VÝSLEDKY	45
4.1. Stanovení efektivity	45
4.2. Srovnání hodnot genové exprese u skupiny vzorků MUT a UNMUT	46
4.3. Ověření prediktivní hodnoty vybraných genů	47
5. DISKUZE	48
5.1. Vývoj v oblasti stanovení diagnózy u pacientů s CLL	48
5.2. Geny používané v diagnostice CLL	48
5.2.1. Prognostické markery	48
5.2.2. Referenční geny	49
5.3. Význam a využití metody real-time PCR v onkodiagnostice	49
5.3.1. Rozdílnost aplikace real-time PCR ve výzkumu a diagnostice	50
5.4. Vyjádření prediktivní hodnoty cílových genů	50
5.4.1. Změna genové exprese u skupiny vzorků MUT a UNMUT	50
5.4.2. Určení optimální prahové hodnoty	51
5.4.3. Posouzení prediktivní hodnoty genů <i>LAG3</i> , <i>LPL</i> a <i>ZAP70</i>	52
ZÁVĚR	53
LITERATURA	54
PŘÍLOHY	58

Seznam použitých zkratk a symbolů

18S, 28S	vyjádření hmotnosti ribozomálních podjednotek, Svedbergova sedimentační konstanta charakterizuje rychlost sedimentace v gravitačním poli a je nepřímo úměrná hmotnosti částice, 1 S = přibližně 10^{-13} sekund
ΔCt	hodnota delta Ct
$\Delta\Delta Ct$	hodnota delta delta Ct
ΔCt Ref	průměrná hodnota delta Ct pro referenční geny <i>B2M</i> , <i>HPRT1</i> a <i>GUSB</i>
Å	Ångström, jednotka délky. Hodnota jednoho angströmu je rovna 0,1 nanometrů neboli 10^{-10} metrů. Nejedná se o jednotku SI
ATM	ataxia telangiectasia mutated
B2M	beta-2 mikroglobulin, beta-2-microglobulin
BCR	receptor B-lymfocytů, B-cell receptor
CD	cluster differentiation
CD3D	molekula CD3D, CD3D molecule
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina, complementary deoxyribonucleic acid
CLL	chronická lymfocytární leukémie, chronic lymphocytic leukemia
Ct	prahový cyklus, treshold cycle
DNA	deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid
dsDNA	dvouřetězcová DNA, double-stranded DNA
E	efektivita, efectivity
EP ALL	průměr evaluačních parametrů všech genů
ExN	normalizovaná exprese (exprese vztažená k referenčním genům), standardized expression
ExR	relativní exprese (exprese vztažená ke kalibrátoru), relative expression
ExR Ref	geometrický průměr expresí referenčních genů <i>B2M</i> , <i>HPRT1</i> a <i>GUSB</i>
FCL	folikulární lymfom, follicular cell lymphoma
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace, fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FN	falešně negativní vzorek, false negative
FP	falešně pozitivní vzorek, false positive
FRET	Förster resonance energy transfer = mechanismus přenosu energie mezi dvěma molekulami
GUSB	glukuronidáza beta, beta glucuronidase
GZMA	granzym A, granzyme A
HCL	leukémie z vlasatých buněk, hairy cell leukemia
HPRT1	hypoxantin fosforibozyl transferáza 1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

iFISH	interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace, interphase fluorescence <i>in situ</i> hybridization
Ig	imunoglobulin/y, immunoglobulin
IGVH	variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu, immunoglobulin heavy chain – variable
kDa	kilo Dalton – jednotka hmotnosti proteinů. Jednotka relativní molekulové hmotnosti používaná v biochemii a biologii. Jeden Dalton se rovná 1 atomové hmotnostní jednotce, která se rovná hmotnosti 1/12 hmotnosti atomu uhlíku ¹² C (uhlíku s nukleonovým číslem 12). 1 Da = přibližně 1,66 · 10 ⁻²⁷ kg
LAG3	aktivační gen lymfocytů 3, lymphocyte-activation gene 3
LPL	lymfoplazmatický lymfom, lymphoplasmacytic lymphoma
LPL	gen pro lipoprotein lipázu, lipoprotein lipase
MCL	lymfom z plášťových buněk, mantle cell lymphoma
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, messenger ribonucleic acid
MUT	skupina patientských vzorků s mutovanou oblastí genu pro IGVH
nALL	normalizovaná průměrná hodnota delta delta Ct všech prediktivních genů
NK buňky	buňky imunitního systému, patří zde perforiny a granzymy, natural killer
Ref	referenční geny <i>B2M</i> , <i>HPRT1</i> a <i>GUSB</i> , reference genes
RIN	RNA integrity number = číslo udávající stupeň integrity RNA
ROC	graf prahové operační charakteristiky, Receiver Operating Characteristic Curve
RT	enzym reverzní transkriptáza, reverse transcriptase
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase v kombinaci s reverzní transkripcí, reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina, ribosomal ribonucleic acid
SCID	závažný kombinovaný imunodeficit, severe combined immunodeficiency
SEM	střední chyba průměru, standard error of the mean
sIg	povrchový imunoglobulin, surface immunoglobulin
SLL	malobuněčný lymfom, small lymphocytic lymphoma
SML	splenický lymfom marginální zóny, splenic marginal zone lymphoma
ssDNA	jednořetězcová DNA, single-stranded DNA
<i>Taq</i>	mikroorganismus <i>Thermus aquaticus</i>
TCR	receptor T lymfocytů, T-cell receptor
TG	cílový (prediktivní) gen <i>LAG3</i> , <i>LPL</i> nebo <i>ZAP70</i> , target gene
TN	pravdivě negativní vzorek, true negative
TNR	specifita nebo též pravdivě negativní poměr, true negative rate
TP	pravdivě pozitivní vzorek, true positive
TRP	senzitivita nebo též pravdivě pozitivní poměr, true positive rate
UNMUT	skupina patientských vzorků s nemutovanou oblastí genu pro IGVH
ZAP70	protein kináza asociovaná s řetězcem zeta, 70 kDa zeta chain (TCR) associated protein kinase

ÚVOD

S rozluštěním genetického kódu, odhalením tajemství lidského genomu a rozvojem molekulárně biologických metod se člověku otevřely nové obzory v oblasti poznání a léčby nejrůznějších onemocnění. I když některé z nich stále neumíme vyléčit, můžeme alespoň zpomalit průběh či potlačit klinické příznaky nemoci, odhalíme-li onemocnění včas. A právě v tomto má diagnostika svou nezastupitelnou roli.

Diplomová práce vznikla jako součást vývoje komerčního kitu k diagnostice chronické lymfocytární leukémie (CLL). Toto onemocnění se projevuje až v pozdějším věku a patří mezi nejčastější typ leukémie v Evropě. Diagnóza bývá u velké části pacientů stanovena v době, kdy ještě netrpí žádnými klinickými příznaky. Základem diagnostiky a léčby je stanovení klinického stádia nemoci a určení prognózy pacienta. Stanovení molekulárního profilu se dnes v diagnostice využívá stále častěji a to hlavně z toho důvodu, že poskytne informaci o předpokládané délce přežití pacienta a také nutnosti léčby. Daný profil se skládá z několika molekulárně biologických prognostických markerů, jako jsou cytogenetická analýza, určení mutačního statusu genu pro IGVH či exprese genů.

Cíle této diplomové práce vychází z poznatků Kotaškové *et al.* (2010), kteří srovnávali hladinu exprese vybraných prognostických genů u pacientů s CLL vzhledem k mutačnímu statusu genu pro IGVH s využitím technologie mikročipů. Následně byla pomocí analýzy vzorků metodou RT-qPCR určena nejvhodnější kombinace prognostických markerů CLL (geny *LAG3*, *LPL* a *ZAP70*). Ukázalo se, že zvýšená hladina exprese u těchto genů poukazuje na horší prognózu, tedy na nemutovaný gen pro IGVH. Výsledky potvrdily, že využitím expresní analýzy genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* mohou být získány obdobné informace o předpokládaném vývoji nemoci jako z určení mutačního statusu genu pro IGVH. Pacienti s mutovaným IGVH vykazují nižší expresi genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* a progredují pomalu. Naopak u pacientů s nemutovaným genem pro IGVH je exprese těchto tří genů zvýšená a tito pacienti trpí agresivnější formou CLL.

Tato práce navazuje také na výsledky diplomové práce Mgr. Hany Mádrové, jejíž cílem bylo potvrzení prognostického významu genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* s použitím sond GENERI BIOTECH, s.r.o., dále pak soustavný sběr klinického materiálu pro iniciační testování kitu pro diagnostiku CLL a také výběr stabilních referenčních genů. Pomocí algoritmu geNorm určila ty referenční geny, jejichž exprese nejméně kolísala a zároveň, která se nejméně lišila od exprese cílových genů. Na základě její práce byly vybrány referenční geny *B2M*, *HPRT1* a *GUSB*.

1. TEORETICKÝ ÚVOD A PROBLEMATIKA

1.1. Chronická lymfocytární leukémie

1.1.1. Úvodní a obecné informace

Leukémie je rakovina kostní dřeně a krve (Palásek *et al.*, 2003). Mezi čtyři hlavní typy leukémie patří chronická lymfocytární leukémie (CLL), akutní lymfoblastická leukémie (ALL), chronická myeloidní leukémie (CML) a akutní myeloidní leukémie (AML).

Hlavními typy krevních buněk jsou červené krvinky (erytrocyty), krevní destičky (trombocyty) a bílé krvinky (leukocyty). Bílé krvinky se dále dělí na lymfocyty (T, B a buňky NK), granulocyty (neutrofil, bazofil, eosinofil) a monocyt.

Leukémie je nazývána lymfocytární (či lymfoblastická), jestliže k přeměně na buňky nádorové dojde v buňkách kostní dřeně, ze kterých se běžně vyvíjejí bílé krvinky (lymfocyty). Jestliže změna postihne buňky, které jsou prekurzory granulocytů a monocytů, hovoříme o tzv. myeloidní leukémii.

Akutní či chronická leukémie se rozlišuje podle toho, jestli nemoc postihuje zralé či nezralé buňky a také podle rychlosti průběhu. U akutní leukémie jsou výrazně zmnoženy jedny z nejmladších buněk vývojové řady – blasty, zatímco u chronické leukémie dochází ke zmnožení zralějších buněk, které ale nemají normální funkci. Akutní forma leukémie má rychlý průběh a neléčená vede rychle ke smrti nemocného. Chronická forma se vyznačuje pomalým a postupným průběhem a nemocný může žít i několik let bez léčby, dokud není choroba rozpoznána.

Chronická lymfocytární leukémie je poměrně rozšířenou formou lymfocytárních malignit, přičemž pokrývá až čtvrtinu výskytu leukemií v západní Evropě (Crowther-Swanepoel *et Houlston*, 2010). CLL je považována za onemocnění s těžko předvídatelnou odezvou pacienta na léčbu, kdy někteří pacienti nepotřebují žádnou léčbu po mnoho let, zatímco jiní nemoci podlehnou i přes léčbu agresivními léky (Kharfan-Dabaja *et al.*, 2008). Patří mezi onemocnění s heterogenním průběhem, přičemž doba přežití po stanovení diagnózy se pohybuje od měsíců do desetiletí (Hallek, 2010). Až u poloviny pacientů je diagnóza stanovena na základě rozboru krve, i když nemoc v té době probíhá ještě asymptomaticky (Parker *et Strout*, 2011). U části pacientů je průběh nemoci klidný po mnoho let následovaný progresivní a často i fatální konečnou fází, která trvá jeden až dva roky. Naproti tomu část pacientů trpí dlouhá léta

klinickými příznaky jako jsou anémie (snížený počet červených krvinek), trombocytopenie (snížený počet krevních destiček) či různé infekce. CLL je charakterizována jako klonální proliferace zralých B-lymfocytů ($CD5^+$, $CD19^+$, $CD23^+$) s nízkou hladinou exprese imunoglobulinového receptoru B-lymfocytů. Buňky CLL se kumulují v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině.

Z nových poznatků vyplývá, že v případě výskytu CLL hraje roli zděděná genetická náchylnost k tomuto onemocnění (Crowther-Swanepoel *et Houlston*, 2010). Genetické analýzy poskytly možnost odhalit lokusy zodpovědné za predispozici k leukémii, přičemž tato skutečnost byla dána do souvislosti s CLL až poměrně nedávno.

Tento typ leukémie je charakteristický velmi proměnlivým průběhem (Kaderi *et al.*, 2011). Před třemi desetiletími byly zavedeny systémy (Rai and Binet staging) k rozdělení pacientů s CLL na dvě skupiny podle množství jejich potíží a stupně cytopenie (nízkého počtu krevních buněk). Tyto systémy však byly postupně nahrazeny mimo jiné z důvodu neschopnosti předpovědět následný průběh nemoci již v raném stádiu. Určení klinického stadia podle Raie a Bineta sloužilo dlouhou dobu k predikci přibližné délky přežití pacientů s CLL (Kharfan-Dabaja *et al.*, 2008). Patogeneze této nemoci však není ještě zcela objasněna, proto je třeba hledat jednotlivé predikční markery, které by pomohly jednoznačně odlišit prognostické skupiny a vyvinout postupy, jak s vysokou pravděpodobností předpovědět průběh nemoci (Hallek, 2010).

1.1.2. Epidemiologická data

Chronická lymfocytární leukémie je považována za onemocnění projevující se spíše v pozdějším věku (Crowther-Swanepoel *et Houlston*, 2010). Výskyt CLL je nejvyšší právě v populaci západní Evropy. Nižší výskyt je hlášen z jižní a východní Asie a subsaharské Afriky. Nejnížší počty nemocných byly zaznamenány v japonské populaci. Narozdíl od onemocnění, která nemají genetický základ, není výskyt CLL spojován s místem narození, ale s původem. Např. u původně asijských obyvatel zůstává nižší výskyt CLL a to i v případě, že se jedná o generaci potomků, kteří se již narodili a žijí v USA.

CLL je onemocnění starších lidí a v Evropě patří mezi nejčastější typ leukémie (Panovská *et al.*, 2010). Tvoří v průměru 30 % ze všech leukemických onemocnění. Zatímco např. v Dánsku je toto procento vyšší (35 – 40 %), Japonsko a Čína zaznamenávají výskyt CLL jen ve 3 – 5 %. Tento typ leukémie je u starších lidí v Evropě jedním z nejčastějších, medián věku v době diagnózy se však liší podle oblasti výskytu. Zatímco ve Spojených státech je medián 72 let (Furman *et al.*, 2010, Gribben *et al.*, 2010, Stephens *et al.*, 2012 a další), Panovská *et al.*

udávají pro oblast jižní Moravy věk pacienta 65 let. Nedávný průzkum z Itálie uvádí medián 66,2 (Frezzato *et al.*, 2010). Onemocnění je přibližně dvakrát častější u mužů než u žen, více se objevuje u Indoevropanů než Afroameričanů, velmi vzácně jsou postiženi lidé asijské národnosti (Gribben, 2010).

Tabulka 1. Incidence CLL v jednotlivých částech světa v roce 1999
(převzato od: Panovská *et al.*, 2010)

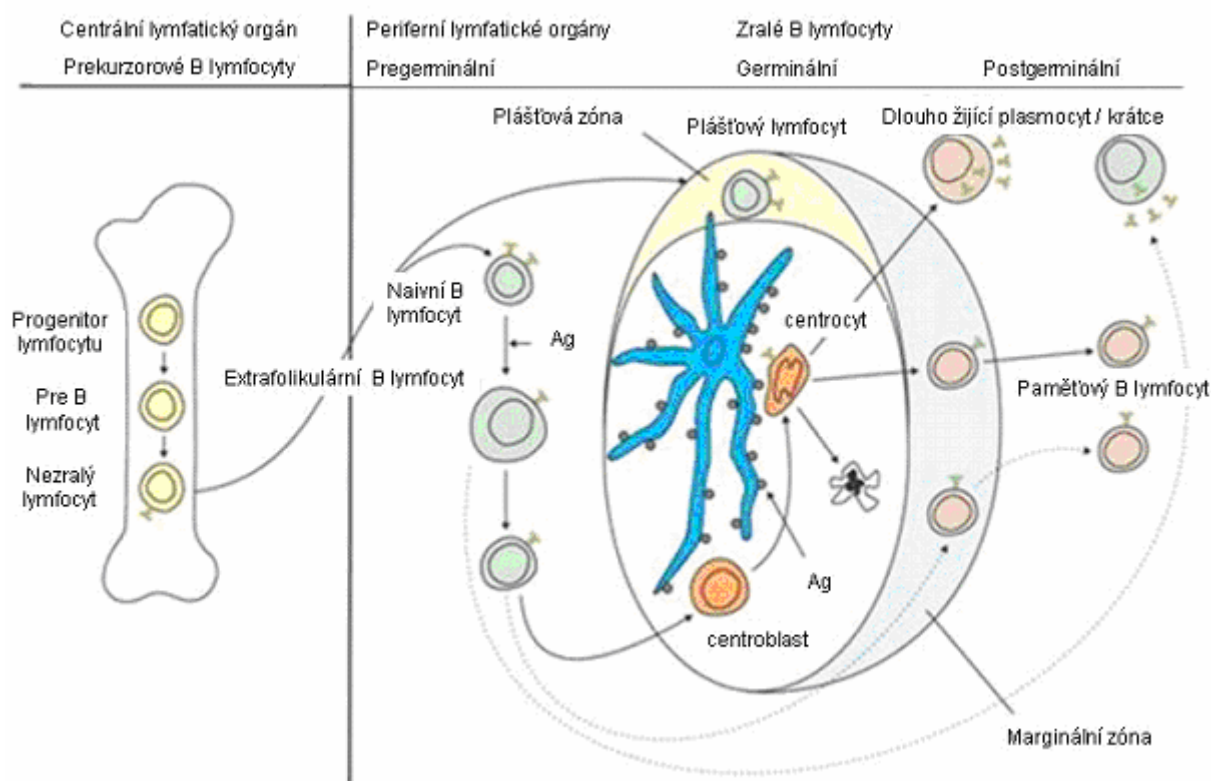
Oblast	Muži (incidence na 100000 obyvatel)	Ženy (incidence na 100000 obyvatel)
USA	3,35 - 3,69	1,61 - 1,92
Evropa	2,2 - 3,36	0,9 - 1,52
Oceánie	2,81 - 2,96	1,41 - 1,53

Panovská *et al.* (2010) prováděli průzkum za účelem zjištění incidence (počet nově vzniklých případů dané nemoci ve vybrané populaci za určité časové období) a prevalence (poměr počtu všech existujících případů daného onemocnění k počtu obyvatel v dané lokalitě ve sledovaném časovém období) chronické lymfocytární leukémie konkrétně v regionu jižní Morava. Z 540 pacientů s diagnózou CLL bylo 306 mužů a 234 žen. Medián věku pacienta v době diagnózy byl 65 let (33 – 92). Zjištěná incidence se pohybovala v rozmezí od 5,8 případů nemoci na sto tisíc zdravých obyvatel v roce 2006 (66 nově diagnostikovaných) po 6,2 nemocných na sto tisíc obyvatel v roce 2007 (70 nově diagnostikovaných). Za posledních deset let incidence CLL vzrostla. Důvodem je zřejmě zlepšení metod diagnostiky onemocnění. Také medián věku pacienta v době diagnózy se změnil. Dříve byl tento medián 72 let, zatímco Panovská *et al.* (2010) udávají 65 let. Rozdíl je dán pravděpodobně tím, že před více než deseti lety byli pacienti diagnostikováni již v pokročilejších stádiích nemoci, dnes bývá nemoc zachycena už ve stadiu dřívějším.

1.1.3. Buněčná podstata vzniku CLL

Nádory mohou vznikat v různých lymfatických orgánech (Češka, 2010). Buďto v centrálních, které jsou místem vzniku, diferenciací a zrání lymfocytů (kostní dřeň a brzlík) nebo v periferních (mízní uzliny, slezina, MALT – mucosa associated lymphoid tissue). Periferní lymfatické orgány jsou místem, kde probíhá hlavní fáze specifické imunitní odpovědi.

Obrázek 1. Schéma vývoje B-lymfocyty (převzato a upraveno podle: Češka, 2010)



Ag – antigen

V průběhu normálního vývoje se B-lymfocyty vyvíjejí z hematopoetických zárodečných buněk v kostní dřeni (Crowther-Swanepoel *et* Houlston, 2010). Receptory těchto vznikajících B-lymfocytů jsou utvářeny přeskupováním jednotlivých segmentů těžkých řetězců imunoglobulinů (Ig) – genových segmentů V (variable), D (diversity) a J (joining). Vzniklé receptory B-lymfocytů (BCR) jsou zodpovědné za buněčnou signalizaci, reagují také se specifickými antigeny. Z kostní dřene nezralé lymfocyty putují do sleziny, kde dokončují svůj vývoj. Také se zde diferencují do folikulárních B-lymfocytů a B-buněk marginální zóny. Oba typy buněk se mohou přeměnit v plazmatické buňky schopné produkce imunoglobulinů, avšak pouze folikulární B-lymfocyty mohou tvořit terminální centrum a také mohou podlehnout bodové mutaci v genu pro IGVH (variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu, immunoglobulin heavy chain – variable).

V primárních (nebo též centrálních) lymfatických orgánech jsou prekurzorové buňky (T- a B-lymfocytů), u nichž později dochází k přestavbě VDJ oblastí genu pro imunoglobuliny (Češka, 2010). Lymfocyty se pak jako naivní dostávají do krevního oběhu. Setkání lymfocytu s antigenem probíhá v zárodečném centru sekundárního folikulu za účasti APC (antigen prezentující buňka, antigen presenting cell). Zde dochází k somatické mutaci v oblasti genu pro těžké řetězce imunoglobulinů. Tato mutace umožní vazbu receptoru s antigenem, B-lymfocyt

se pak přemění v paměťovou nebo plazmatickou buňku. Pokud mutace neproběhne, následuje apoptóza B-lymfocyty.

CLL vzniká patologickým množением zralých B-lymfocytů (Mertens *et al.*, 2011). Za normálních podmínek vše probíhá ve tkáni, kde jsou geny pro imunoglobuliny geneticky modifikovány k produkci funkčních receptorů B-lymfocytů. Zatímco zdravé B-lymfocyty využívají celé škály segmentů imunoglobulinových genů k tvorbě co největšího počtu různých BCR, v případě maligních B-lymfocytů dojde k výraznému omezení počtu variabilních úseků těžkého řetězce imunoglobulinového genu, které by mohly vzniknout.

V případě zdravých B-lymfocytů vede proces somatické hypermutace variabilní oblasti Ig ke změně vazebné afinity. U pacientů s CLL je však tento proces narušen a pacienty lze následně podle tohoto kritéria dělit do dvou biologických a prognostických skupin na základě toho, zda je jejich IGVH oblast mutovaná či nikoliv.

Dříve byla CLL považována za nemoc, při níž jsou lymfocyty inaktivovány a dále se nemnoží (Damle *et al.*, 2010). Nicméně v posledních letech na základě zkoumání buněčného povrchu lymfocytů bylo zjištěno, že je většina buněk v průběhu nemoci aktivována, i když jen malé procento z nich se dostane přes G1 fázi růstového cyklu.

1.1.4. Diagnostika CLL

Podle klasifikace světové zdravotnické organizace je CLL definována jako onemocnění B-lymfocytů (Hallek *et al.*, 2008). Onemocnění T-lymfocytů dříve nazývané jako T-CLL je dnes již známé jako prolymfocytická leukémie T-lymfocytů a z toho důvodu je označení CLL používáno vždy pouze ve spojitosti s B-lymfocyty.

Jedním z kritérií v diagnostice CLL je zvýšený počet B-lymfocytů v periferní krvi, kdy je za hraniční koncentraci považována hodnota 5×10^9 B-ly/litr (nebo též 5000 B-ly/ μ l). Klonalita cirkulujících B-lymfocytů musí být ověřena metodou průtokové cytometrie. Normální situace v organismu odpovídá polyklonalitě čili přítomnosti vysokého počtu klonů s odlišnými přestavbami, což tělu umožňuje reagovat na velké množství antigenů. Diagnóza CLL zahrnuje nejčastěji hodnoty lymfocytózy (množství lymfocytů v krvi) nad 5000 ly/ μ l, méně než 55 % prolymfocytů, méně než 30 % obsahu lymfocytů v kostní dřeni a také průkaz monotypických (produkce pouze lehkého anebo těžkého řetězce Ig) CD5⁺ B-lymfocytů (Hsi *et al.*, 2000). CLL je již poměrně dobře charakterizována jak klinicky tak i imunologicky. Z pohledu imunologie je diagnóza zřejmá při průkazu buněk s povrchovými molekulami CD19⁺, CD5⁺ a CD23⁺.

V roce 1983 vyšel článek, který poprvé rozvíjel možnosti využití monoklonálních protilátek, díky nimž by se dala charakterizovat CLL (Dillman *et al.*, 1983). Byl také jedním z prvních článků, který se zabýval souvislostmi mezi klinickými příznaky nemoci a specifickými povrchovými molekulami exprimovanými na povrchu buněk. Dnes se využívá nejen různých kombinací monoklonálních protilátek k určení imunofenotypu, ale i vyšetření cytogenetických abnormalit či mutací v oblasti genu pro IGVH. Později se přešlo od používání povrchového Ig (sIg, surface immunoglobulin) jako ukazatele možného onemocnění k systému CD (cluster differentiation), tedy vlastně k využití protilátek, které reagují s povrchovými molekulami CD19 a CD20. CLL se vyznačuje typickou kombinací CD19⁺, CD5⁺, CD23⁺, také CD22⁻, CD79b⁻ a slabou expresí sIg. Touto kombinací se odlišuje od podobných lymfoproliferativních onemocnění.

Velmi podobným onemocněním je SLL (malobuněčný lymfom, small lymphocytic lymphoma), který se taktéž jako CLL projevuje zvýšeným počtem B-lymfocytů v periferní krvi pacienta (Hallek *et al.*, 2008). Narozdíl od CLL je však doprovázen lymfadenopatií (zvětšení mízních uzlin) a/nebo splenomegálií (zvětšení sleziny). Navíc zde počet B-lymfocytů v periferní krvi nepřesáhne hranici 5x10⁹ B-ly/litr. Buňky SLL exprimují stejnou kombinaci molekul jako B-lymfocyty CLL jen s jediným rozdílem – jsou CD22⁺ (Dillman, 2008).

Fenotyp CLL lze na základě molekul CD odlišit od MCL (lymfom z plášťových buněk, mantle cell lymphoma), který je CD19⁺, CD5⁺, CD22⁺ a CD23⁻ (Dillman, 2008). Buňky MCL také exprimují více sIg a navíc cyclin D1. V diagnostice je třeba odlišit CLL i od ostatních lymfoproliferativních onemocnění jako jsou např. HCL (leukémie z vlasatých buněk, hairy cell leukemia), lymfom marginální zóny či folikulární lymfom (Hallek *et al.*, 2008).

Tabulka 2. Imunofenotypové markery maligních lymfocytů (převzato od: Dillman, 2008)

Onemocnění	sIg	CD5	CD19	CD20	CD10	CD11c	CD22	CD23	CD43	CD103
CLL	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
MCL	++	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-
HCL	++	-	+	+	-	+	+	-	-	+
LPL	++	-	+	+	-	-	+	-	-	-
SML	++	-	+	+	-	-	+	-	-	-
FCL	++	-	+	+	+	-	+	-	-	-

CLL – chronic lymphocytic leukemia, chronická lymfocytární leukémie; MCL – mantle cell lymphoma, lymfom z plášťových buněk; HCL – hairy cell leukemia, leukémie z vlasatých buněk; LPL – lymphoplasmacytic lymphoma, lymfoplazmatický lymfom; SML – splenic marginal zone lymphoma, splenický lymfom marginální zóny; FCL – follicular cell lymphoma, folikulární lymfom

Imunofenotypizace se stala důležitou součástí procesu klasifikace CLL a je nutná pro diagnózu (Hsi *et al.*, 2000).

V diagnostice probíhá nejprve určení imunofenotypu buněk periferní krve (Gribben, 2010). Jestliže se buňky s totožnými imunofenotypovými a morfologickými znaky nacházejí v periferní krvi, je onemocnění identifikováno jako CLL. V případě, že se klonální šíření prokáže v některé z lymfatických uzlin či tkání, pravděpodobně se jedná o SLL. Buňky CLL typicky exprimují na svém povrchu molekuly CD19, CD20, CD5, CD23, CD43 a CD79a se slabou produkcí IgM. Exprese molekuly CD38 je proměnlivá a má u tohoto typu onemocnění prognostický význam. Stanovení diagnózy CLL vyžaduje také přítomnost alespoň 5000 B-ly/μl. Biopsie kostní dřeně není v diagnostice CLL nutná. Součástí diagnostiky je i určení molekulárního profilu pacienta a to především proto, že poskytne informaci o předpokládané délce přežití pacienta či nutnosti léčby. Molekulární profil se skládá z několika biomarkerů, mezi něž patří cytogenetická analýza, mutační status genu pro IGVH či exprese genů *ZAP70*, *LPL* či molekuly CD38. Avšak více než schopnost předvídat klinický průběh u jednotlivých pacientů je určitý biomarker schopen předpovídat, jak se bude chovat daný soubor většího množství pacientů.

1.1.5. Určení klinického stadia nemoci

Možnosti rozdělení pacientů s CLL do kategorie s vyšším či nižším rizikem se v posledních dvaceti letech poměrně dost zlepšily, avšak zkoumání dalších cytogenetických a molekulárních profilů je nezbytné (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011).

K určení klinického stadia nemoci jsou běžně používány dva systémy: Raiův a Binetův. Systémy klasifikace pacientů s CLL, které jsou založeny na sledování klinických příznaků a laboratorním vyšetření, byly poprvé uveřejněny před více než 30 lety ve studiích Raie *et al.* (1975) a Bineta *et al.* (1981). Oba tyto systémy umožnily stanovit prognózu pacientů již v době diagnózy (van Bockstaele *et al.*, 2009). Systémy byly přijaty a jejich správnost byla potvrzena mnohými studiemi. Průběh nemoci byl také předpovídán pomocí morfologie buněk a kostní dřeně. Atypická buněčná morfologie s přítomností prolymfocytů a poničených lymfocytů značila horší prognózu. Ale protože dnes spadá většina pacientů do kategorie s nízkým rizikem a tedy lepší prognózou, je prediktivní hodnota tohoto přístupu snížena.

Prvním z obou prognostických modelů byl Raiův systém, který byl publikován roku 1975 (Rai *et al.*, 1975). K určení klinického stadia nemoci je zde posuzována přítomnost či absence

lymfadenopatie (zvětšení mízních uzlin), zvětšení orgánů, anémie a trombocytopenie (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). Systém je rozdělen do pěti stádií označovaných 0 – IV. Medián přežití se pohybuje od 19 měsíců (pro stadia III a IV) po více než 150 měsíců v případě stadia 0.

Tabulka 3. Stadia podle Raie (převzato od: Rai *et al.*, 1975)

Stadium	Příznak	Délka přežití (měsíce)
0	lymfocytóza v krvi a kostní dřeni	> 150
I	lymfocytóza se zvětšením mízních uzlin	101
II	lymfocytóza se zvětšením sleziny, jater či obojího	71
III	lymfocytóza s anémií	19
IV	lymfocytóza s trombocytopenií	19

Lymfocytóza – zvýšený počet lymfocytů v krvi, anémie – snížený počet červených krvinek, trombocytopenie – snížený počet krevních destiček.

Binetův systém určování klinického stadia dělí pacienty do tří skupin označovaných A až C (Binet *et al.*, 1981). Pacienti jsou posuzováni na základě množství zasažené tkáně, mezi něž se řadí lymfatické uzliny (podpažní, tříslivé), játra a slezina (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). Hodnocena je i přítomnost anémie či trombocytopenie. Pacienti skupiny A nevykazují trombocytopenii ani anémii a zasaženy jsou méně než tři lymfoidní tkáně. V případě pacientů skupiny B se neobjevuje anémie či trombocytopenie, ale zasaženy jsou více než tři lymfoidní tkáně. Ve skupině C je prokázána anémie a/nebo trombocytopenie.

Obdobně lze určit prognózu nemoci např. pomocí doby nutné ke zdvojnásobení celkového počtu lymfocytů od diagnózy či také vzory objevujícími se při vyšetření kostní dřene. Tyto a jiné způsoby však mají svá omezení (celkové množství lymfocytů se liší v závislosti na událostech jen málo souvisejících s leukémií a odběr kostní dřene pro zmíněné vyšetření je invazivním zákrokem, navíc zde hraje roli subjektivní názor), proto je třeba hledat spolehlivější prognostické faktory.

1.1.6. Léčba

CLL je maligní onemocnění převážně starších lidí, které je stále považováno za nevléčitelnou nemoc (Hartmann *et al.*, 2009). I přes současné možnosti léčby je zde vysoké riziko relapsu (návrat příznaků nemoci, která byla v klidu), které je navíc velmi často doprovázeno vznikem rezistence k danému typu léčby. Je proto třeba zkoušet nové kombinace léků a vyvíjet nové léčebné postupy. Léčebná strategie CLL byla dosud zaměřena spíše

na kontrolu nemoci než na snahu o její léčení. U lidí vyššího věku je často vyžadováno přizpůsobení léčby dle celkové zdatnosti pacienta a také míry toxicity, kterou je pacient ještě schopen tolerovat (Hallek, 2010). Právě z toho důvodu je terapie CLL častokrát individuální s přihlédnutím k prognóze a stavu pacienta.

V současnosti zahrnuje terapie CLL chlorambucil, fludarabin, alemtuzumab, bendamustin nebo ofatumumab (Furman, 2010).

Chemoterapeutika

Po několik desetiletí byl za „zlatý standard“ považován chlorambucil (Hallek, 2010). Pro svou nízkou toxicitu a možnost perorálního podání je vhodný pro léčbu imunodeficientních, či jinak oslabených pacientů nebo starších lidí, výhodou je také nízká cena. Mohou se však objevit vedlejší účinky a také bylo zaznamenáno jen velmi nízké procento případů kompletní remise (vymizení příznaků a projevů nemoci). Používají se i jiné léky (např. analogy purinu - fludarabin, pentostatin a cladribin, či bendamustin, který byl hojně používán např. v Německu), avšak u starších lidí a pacientů ve špatném stavu se ukázalo, že léky s vyšší toxicitou než chlorambucil přinášely pacientům spíše komplikace než úspěšné výsledky léčby.

Monoklonální protilátky

Mezi další možnosti léčby patří použití monoklonálních protilátek, ať už samostatně nebo v kombinaci s chemoterapií (Hallek, 2010). Jsou to např. anti-CD20 (rituximab) či rekombinantní humanizovaná anti-CD52 (alemtuzumab).

Příkladem využití monoklonální protilátky v léčbě CLL jsou pacienti s delecí krátkého raménka chromozomu č. 17 (viz dále) či mutovanou formou genu pro protein p53 (Furman, 2010). Tito lidé téměř nereagují na léčbu purinovými analogy, ale při podání léku alemtuzumab, který zřejmě využívá metabolické dráhy nezávislé na proteinu p53, léčba funguje.

1.2. Prognostické markery

V současnosti se rutinně využívají tyto čtyři prognostické markery: (Furman, 2010)

1. IGVH mutační status (variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu)
2. chromozomové aberace s využitím techniky interfázní FISH
3. ZAP70 (protein kináza asociovaná s řetězcem zeta)
4. molekula CD38 (glykoprotein)

V posledních deseti letech se začalo se sledováním exprese různých genů jako prognostických faktorů (Kaderi *et al.*, 2011). Mezi tyto faktory byly zahrnuty geny pro IGVH, přičemž sledován byl mutační status. Následně začaly být metodou průtokové cytometrie sledovány jako prognostické markery molekula CD38 a gen *ZAP70*. V posledních několika letech byly objeveny další geny, jejichž exprese se dá využít k predikci vývoje CLL (jako např. lipoprotein lipáza). Dnes je nejčastější sledování exprese vybraných prognostických markerů (genů) v kombinaci s již zavedenými faktory (mutační status genů pro IGVH). Mutační status IGVH se stal jedním z nejdůležitějších prognostických markerů CLL (Mertens *et al.*, 2011). Mimo to jsou významnými prognostickými údaji také věk, klinické stadium nemoci, markery stanovované v séru pacienta a v neposlední řadě také vyšetření pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace, fluorescence *in situ* hybridization). Jednou z novějších technologií, která se nabízí k využití v diagnostice a určení prognózy CLL jsou mikročipy (microarrays).

1.2.1. Variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu

Jak již bylo uvedeno, v průběhu normálního vývoje B-lymfocytů dochází k seskupování segmentů V, D a J imunoglobulinového genu (Parker *et Strout*, 2011). Vzniklá kombinace je součástí zralých B-lymfocytů, přičemž každý z nich exprimuje na svém povrchu unikátní receptor (BCR). Po proběhlém setkání s patogenním antigenem proběhne somatická hypermutace variabilní oblasti Ig, která vede k selekci B-lymfocytů, které produkují protilátky s vysokou afinitou k cílovému antigenu (patogenu). U 45 % pacientů se vyskytuje větší než 98% sekvenční homologie, tedy nemutovaná oblast IGVH, zatímco 55 % pacientů vykazuje somatické hypermutace v této oblasti. Mutovaná IGVH oblast značí lepší prognózu a delší předpokládanou dobu přežití.

Hamblin *et al.* a Damle *et al.* rozdělili v roce 1999 nezávisle na sobě pacienty s CLL do dvou skupin na základě rozdílného stupně somatické hypermutace v genu pro IGVH. Zjistili, že pacienti s mutovaným genem pro IGVH žijí déle ve srovnání s pacienty bez mutace.

Mutační status genu pro IGVH je důležitým prognostickým faktorem CLL (Kharfan-Dabaja *et al.*, 2008). Určuje se srovnáním sekvence tohoto genu v B-lymfocytech a odpovídajících genech v zárodečných centrech. V případě, že se sekvence těchto genů liší o více než 2 %, je gen pro IGVH považován za mutovaný. Mutovaný gen pro IGVH je spojen s delší dobou přežití a tedy lepší prognózou (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). Určení přítomnosti mutace v oblasti genu pro IGVH však vyžaduje sekvenování DNA

(deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid), přičemž dostupnost této technologie a interpretace výsledků může být komplikovaná.

1.2.2. Chromozomové aberace

Obecně lze říct, že specifické chromozomové aberace jsou ve vazbě s možností určení klinického stadia a prognostických znaků nemoci (Quijano *et al.*, 2008). Je známo, že u několika z těchto chromozomových defektů jsou zasaženy geny, které jsou významné v procesu regulace buněčné proliferace a dalších životně důležitých procesech. Patří zde např. gen pro protein p53, RB (gen retinoblastomu, retinoblastoma gene), cyclin D2 či CDK4 (cyklin dependentní kináza 4).

Výskyt chromozomových abnormalit

Výskyt a identifikace chromozomových aberací jsou důležitou součástí diagnostiky CLL, jakož i určování předpokládané délky přežití. Döhner *et al.* (2000) popsal výskyt chromozomových aberací u více než 80 % pacientů s CLL. Aberace, které se vyskytovaly nejčastěji a procentuální zastoupení u pacientů s CLL, popisuje Tab. 4. K identifikaci využíval molekulárně cytogenetické metody FISH.

Tabulka 4. Nejčastěji diagnostikovaný typ chromozomové aberace včetně procenta výskytu. (převzato od Döhner *et al.*, 2000)

Typ aberace	Zkratka	Výskyt (%)
delece 13q14	del(13q14)	55
delece 11q22	del(11q22)	18
trizomie části chromozomu 12	trizomie 12q13	16
delece 17p13	del(17p13)	7
delece 6q21	del(6q21)	6

Podle různých autorů se však četnost výskytu jednotlivých chromozomových abnormalit liší. Podle Quijano *et al.* (2008) se chromozomové aberace vyskytují u 62 % pacientů s CLL. Celkově byly nejčastěji nalézány delece 13q a to v 35 % případů, následně pak trizomie chromozomu č. 12 u 23 % pacientů. Dále se objevovaly delece 11q (9,4 %) a delece 17p (8 %).

Před objevem metody FISH byly k identifikaci chromozomových aberací standardně používány cytogenetické postupy (Döhner *et al.*, 2000). Avšak vlivem poměrně nízké mitotické aktivity leukemických buněk *in vitro* byla některá z abnormalit detekována pouze u 40 až 50 %

případů CLL, přičemž nejčastěji odhalená mutace byla trizomie chromozomu 12. K vyšetření chromozomových abnormalit je třeba použití buněčných mitogenů k zastavení buněčného cyklu B-lymfocytů v metafázi (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). S rozšířením metody FISH se technika vyšetření chromozomových abnormalit zjednodušila, protože je nyní možno použít i buněk v interfázi.

Charakteristika nejčastějších chromozomových aberací

Jedním z typů chromozomových aberací je del(17p13), tedy delecí krátkého raménka chromozomu 17, která je spojována s velmi agresivním klinickým průběhem, špatnou odpovědí na léčbu a kratší dobou přežití (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). U pacientů s touto delecí se často objevují i jiné chromozomové přestavby. Důvodem horší prognózy je pravděpodobně skutečnost, že na krátkém raménku chromozomu 17 se nachází gen *TP53*. Tento gen kóduje protein p53, což je tumor supresorový gen.

Mezi další chromozomové abnormality, u kterých je známa souvislost s CLL, patří i delecí 11q22. Na dlouhém raménku chromozomu 11 se nachází gen *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), jehož mutace je spojována s výskytem malignit, zvláště pak lymfatických tkání (Bulrich *et al.*, 1999). V případě ztráty heterozygoty (LOH, loss of heterozygoty - jedna alela je již mutovaná, následně dojde k mutaci i té druhé alely) či chybějícího proteinu ATM je průběh a prognóza pacientů s CLL horší. Zvýšený výskyt malignit je přičítán mutaci či chybění právě tohoto genu (Döhner *et al.*, 2000). Del(11q) se mimo jiné vyznačuje také kratšími intervaly mezi diagnózou a prvními projevy nemoci a dále např. rozsáhlou lymfadenopatií (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). Podle Quijano *et al.* (2008) v případě delecí 11q chyběl gen *ATM* (11q22.3), v některých případech však bylo zároveň zjištěno chybění genu *MLL* (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia) v pozici 11q23.3.

Velmi častou přestavbou je del(13q14). Kromě zmíněných chromozomových aberací hrají roli v patogenezi CLL pravděpodobně také epigenetické modifikace (Mertens *et al.*, 2011). Metylace cytosinu v DNA je fyziologický proces, který probíhá např. při inaktivaci jednoho chromozomu X u žen, alelově specifickém imprintingu (kdy je stejný gen od matky a otce exprimován s různou důležitostí, nejsou exprimovány stejnou měrou, což vede k monoalelické expresi), či tkáňově specifické genové regulaci (Rush *et al.*, 2004). Předběžné analýzy genomů pacientů s CLL odhalily, že až 8 % všech CG oblastí (oblast výskytu guaninu a cytosinu v DNA) je metylovaných. Příkladem může být oblast genomu 13q14, která je u pacientů s CLL často deletována (Mertens *et al.*, 2011). Je totiž možné, že mutační události v této oblasti významně přispívají k rozvoji CLL. V prvním kroku proběhne epigenetické umlčování tumor

supresorových genů, které se nacházejí v této oblasti a následně dojde i k celkové inaktivaci prostřednictvím del(13q14).

Predikce vývoje nemoci

Pacienti s del(17p) mají jednu z nejhorších prognóz, následování pacienty s del(11q), trizomií 12q a normálním karyotypem (Döhner *et al.*, 2000). Naopak nejdelší dobu přežití lze předpokládat u pacientů s delecí 13q, u nichž je však toto jediná identifikovaná aberace.

Určení chromozomových aberací pacienta je vhodným nástrojem k predikci odpovědi pacienta na léčbu (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). Např. pacienti s del(17p) příliš nereagují na léčbu purinovými analogy, ale dobře reagují na léčbu protilátkou s názvem alemtuzumab. V případě del(11q) byla také zjištěna spojitost s reakcí na léčbu. Pacienti dobře odpovídají na léčbu cyklofosfamidem.

1.2.3. Molekula CD38

Molekula CD38 je glykoprotein normálně exprimovaný na povrchu hematopoetických (krvetočných) buněk (Schellhorn Mougalian *et O'Brien*, 2011). Nadprodukce CD38 je spojena s rychlejším průběhem nemoci, horší odpovědí na léčbu a kratší dobou přežití. Exprese molekul CD38 také koreluje s mutačním statutem IGVH. Hladina CD38 se může v průběhu nemoci měnit.

1.2.4. Geny se změněnou expresí - prognostické markery CLL

(databáze Gene, NCBI)

LAG3

- **Celý název genu: lymphocyte-activation gene 3**
- **ID genu: 3902, Oficiální symbol genu: LAG3**

Gen *LAG3* (také označovaný jako CD223) kóduje protein, který patří do nadrodiny imunoglobulinů. Obsahuje čtyři domény (extracelulární, Ig-like). Svou strukturou a také počtem exonů (má jich osm) je velmi podobný molekule CD4. Gen *LAG3* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 12 v oblasti 13.32 (12p13.32)

Výsledky práce Kotaškové *et al.* (2010) potvrdily, že vysoká exprese genu *LAG3* koreluje s nemutovaným statutem genu pro IGVH a tedy poukazuje na špatnou prognózu pacienta. Na základě těchto výsledků lze tedy gen *LAG3* zařadit mezi prognostické markery CLL.

LPL

- **Celý název genu: lipoprotein lipase**
- **ID genu: 4023, Oficiální symbol genu: LPL**

Gen *LPL* kóduje protein (lipoprotein lipáza), který je exprimován v srdci, svalu a tukové tkáni. Lipoprotein lipáza funguje jako homodimer a má dvě funkce - je hydrolázou triglyceridů a také vazebným faktorem pro příjem lipoproteinů (zprostředkovaný receptorem). Mutace v tomto genu vedou k hyperlipoproteinémii typu I či poruchám metabolismu lipoproteinu. Gen je umístěn na krátkém raménku chromozomu 8 v oblasti 22 (8p22).

Kaderi *et al.* (2011) srovnávali hladiny exprese jednotlivých genů jako prognostických faktorů v léčbě CLL u skandinávské populace. Do srovnání zařadili geny *LPL*, *ZAP70*, *TCL1A* (T-cell leukemia/lymphoma 1), *CLL1* (CLL upregulated gene-1) a *MCL1* (myeloid cell factor-1). Tyto a další geny jsou považovány za prognostické markery CLL. Výsledná data hodnotili ve spojitosti s již zavedenými prognostickými ukazateli jako jsou Binet stage, CD38, mutační status genu pro IGVH či chromozomové aberace. Výsledky studie potvrdily, že vysoká exprese sledovaných genů značí kratší dobu přežití pacientů s CLL, přičemž gen *LPL* byl označen jako nejprůkaznější a nejspolehlivější marker.

Ve studii Kotaškové *et al.* (2010) se ukázalo, že hladina exprese genu *LPL* je vhodným ukazatelem délky přežití u pacientů s CLL, stejně vhodným jako je mutační status genu pro IGVH a dokonce lepším než sledování hladiny exprese samotného genu *ZAP70*. Přičemž výhodou je, že gen *LPL* není exprimován u jiných krevních buněk než u lymfocytů pacientů s CLL a to navíc pouze v případě nemutovaného statusu genu pro IGVH.

ZAP70

- **Celý název genu: zeta chain (TCR) associated protein kinase 70 kDa**
- **ID genu: 7535, Oficiální symbol genu: ZAP70**

Gen *ZAP70* kóduje protein, enzym patřící do rodiny tyrosinkináz. Tento protein hraje roli ve vývoji T-lymfocytů a jejich aktivaci. Je esenciální pro vývoj thymocytů. Enzym kódovaný genem *ZAP70* je fosforylován přes stimulování TCR a také hraje roli v prvním kroku přenosu signálu (zprostředkováno TCR) v kombinaci s kinázami rodiny Src, Lck a Fyn. Mutace v tomto genu vedou ke SCID (závažný kombinovaný imunodeficit, severe combined immunodeficiency) nebo poruše, při které chybí CD8⁺ (cytotoxické T-lymfocyty). Gen je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 2 v oblasti 12 (2q12).

Protein ZAP70 patří mezi tyrozin kinázy, které jsou zapojeny do buněčné signalizace T-lymfocytů (Schellhorn Mougalian *et al.* O'Brien, 2011). Navíc jsou nadměrně exprimovány v B-lymfocytech některých pacientů s CLL. Exprese proteinu ZAP70 je měřena metodou průtokové cytometrie. Ukázalo se, že hodnota exprese ZAP70 souvisí s přítomností nemutovaného IGVH. Hladina exprese ZAP70 se v průběhu nemoci příliš nemění.

Byla zjištěna závislost mezi nemutovaným genem pro IGVH a expresí genu ZAP70 (Catherwood *et al.*, 2006). Až 94 % (16/17) pacientů s nemutovaným IGVH vykazovalo zvýšenou expresi genu ZAP70, zatímco u 92 % (23/25) pacientů s mutovaným statusem byla detekována exprese snižená.

1.3. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase v kombinaci s reverzní transkripcí

Dnes je již známa sekvence lidského genomu a její znalost může být použita k poznání, určení či léčbě komplexních onemocnění, mezi něž patří i rakovina (Ståhlberg *et al.*, 2005). Normální buněčná regulace může být ovlivněna různými faktory, jako jsou např. virové infekce, metylace DNA či změna sekvence DNA. V případě nádorových onemocnění jsou právě tyto změny důvodem narušení kontrolních mechanismů buněčného dělení, opravných procesů nebo apoptózy (buněčná smrt).

V oblasti onkologie lze nalézt mnoho molekulárních cílů, jež mohou být užitečné v diagnostice a při léčbě rakoviny. Jedním z druhů rakoviny je i leukémie, jejíž klinický průběh je častokrát velmi nevyzpytatelný. Zde se často uplatňují molekulárně biologické metody s možností určení subtypu choroby či způsobu léčby. Za metodu první volby je považována právě polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase v kombinaci s reverzní transkripcí (RT-qPCR) je metodou používanou v jednotlivých medicínských, biotechnologických či diagnostických oborech ke kvantifikaci genové exprese (Nolan *et al.*, 2006). Je to velmi citlivá metoda používaná k určení množství specifické DNA v komplexních biologických vzorcích (Ståhlberg *et al.*, 2005). Tato metoda zahrnuje dva základní kroky (Nolan *et al.*, 2006). Prvním z nich je reverzní transkripce, při které je mediátorová RNA (mRNA, messenger RNA) přepsána enzymem reverzní transkriptázou do komplementární DNA (cDNA, complementary DNA). Dalším krokem je amplifikace (namnožení) zmíněné cDNA pomocí metody real-time PCR, kdy zároveň probíhá detekce a kvantifikace amplifikovaného produktu

v reálném čase. Kvantifikaci genové exprese pomocí metody real-time PCR lze provést dvěma způsoby: buď použitím absolutních hodnot vztažených ke standardu, nebo s využitím relativních hodnot, kdy je exprese cílového genu srovnávána mezi dvěma vzorky. (Ståhlberg *et al.*, 2005).

1.3.1. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je v případě vzorku RNA (ribonukleová kyselina, ribonucleic acid) nezbytným krokem. Ze vzorku RNA je pomnožena mRNA a prostřednictvím reverzní transkripce přepsána do cDNA (Ståhlberg *et al.*, 2005). Mediátorová RNA je opatřena polyA-koncem a čepičkou (Gerard *et al.*, 1997). Při reverzní transkripci nasedne na polyA-konec enzym reverzní transkriptáza a nesyntetizuje vlákno cDNA, přičemž mRNA je enzymem RNázou H degradována a zůstane pouze ssDNA (jednořetězcová DNA, single-stranded DNA). Ta je však nestabilní a na 3' konci tvoří vlásenky. Tato poslouží jako primer pro enzym DNA polymerázu pro syntézu druhého vlákna DNA.

Nejčastěji používané enzymy reverzní transkriptázy jsou ty izolované z Molonyho viru myší leukémie (MMLV, murine Molony leukemia virus) či viru ptačí myeloblastózy (AMV, avian myeloblastosis virus) (Ståhlberg *et al.*, 2005). Reverzní transkripce s následnou real-time PCR může probíhat buď jednokrokově, kdy obě reakce probíhají v jediné zkumavce, nebo dvoukrokově, kdy jsou obě dílčí reakce rozděleny. Z důvodu rozdílných optimálních reakčních podmínek RT a qPCR a tudíž i horší citlivosti u jednokrokové reverzní transkripce, je lépe používat postup dvoukrokový.

1.3.2. Ribonukleová kyselina

Logickým důsledkem toho, že je metoda RT-qPCR v praxi široce využívána, je poměrně velká variabilita postupů přípravy vzorku a vůbec nastavení podmínek reakce jako takové (Nolan *et al.*, 2006). Jako vstupní materiál, u něhož chceme kvantifikovat genovou expresi, lze použít např. bioptické vzorky či tkáňové kultury a z nich dále izolovat, buď celkovou ribonukleovou kyselinu (RNA) buňky, či pouze mRNA.

U izolované RNA je třeba posoudit její kvalitu. Kromě čistoty RNA (kontaminace proteiny či DNA, přítomnost inhibitorů), která je hodnocena na základě poměru absorbance při 260/280 nanometrech a dále analýzou ribozomální RNA (rRNA, ribosomal RNA) na agarózovém gelu, je posuzována také integrita RNA. K tomuto účelu slouží hodnota RIN (RNA integrity number). Nověji je integrita RNA posuzována prostřednictvím kapilárního

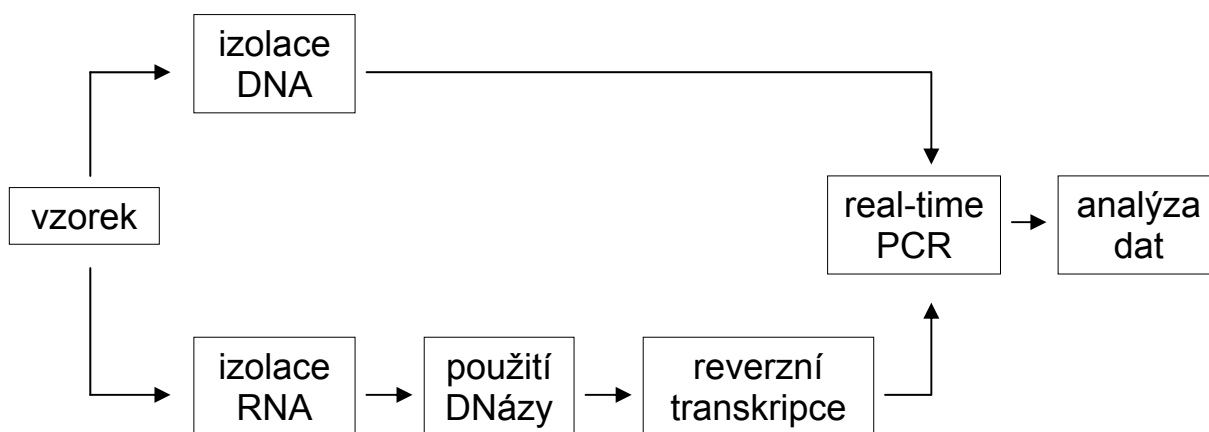
elektroforetického systému s využitím technologie mikrofluidních čipů. Výsledné hodnoty RIN se pohybují v rozmezí 1-10, přičemž hodnota 10 značí vysokou kvalitu RNA.

RNA je sice termodynamicky stabilní molekula, nicméně její stabilita je narušována působením všudypřítomných enzymů RNáz, které způsobují degradaci molekul RNA (Schroeder *et al.*, 2006). Jednou z možností určení stupně degradace RNA je agarózová elektroforéza, kdy se rRNA (která je v buňce zastoupena ze všech typů molekul RNA nejvíce) na gelu rozdělí do dvou zřetelných pruhů. Tyto pruhy značí ribozomální podjednotky 28S a 18S.

Úloha molekul RNA spočívá v přenosu informace kódované v genomu. Z DNA je informace prostřednictvím molekul RNA přenesena do mnoha různých proteinů. Proto je RNA používána ke sledování buněčné aktivity prostřednictvím genové exprese. Nejčastěji používanými metodami ke studiu genové exprese jsou real-time PCR a technologie DNA mikročipů.

Obrázek 2. Postup zpracování vzorku RNA / DNA

(Převzato a upraveno podle: Ståhlberg *et al.*, 2005)



1.3.3. Způsoby generování fluorescenčního signálu

K detekci a zároveň ke kvantifikaci používá metoda real-time PCR fluorescenční barvy, přičemž kvantifikace je založena na měření množství fluorescenčního signálu, které je úměrné koncentraci DNA (Nolan *et al.*, 2006). Navíc je možno díky sondám značeným různými barvami využít detekce a kvantifikace více cílových genů v jediné reakci. Dobrá sonda by měla mít nízkou hladinu fluorescence pozadí, poskytovat vysoký signál (neboli vysoký poměr signálu k šumu) a také být vysoce specifická k cílové sekvenci (Ståhlberg *et al.*, 2005). Fluorescenční sondy se dělí do dvou kategorií: sekvenčně specifické a nespecifické.

Nespecifické sondy

U nespecifické sondy, jako je např. SYBR Green I, lze detekovat fluorescenci až po vmezení do dvouřetězcové DNA (dsDNA, double-stranded DNA) (Ståhlberg *et al.*, 2005). Jestliže jsou tyto fluorescenční barvy přítomny v reakční směsi, fluorescence se zvyšuje přímoúměrně s rostoucím množstvím vznikající dsDNA. Nevýhodou je detekce všech produktů včetně nespecifických. Nespecifické sondy nelze použít v multiplex PCR.

Sekvenčně specifické sondy

Tento typ hybridizačních sond je založen na principu přenosu energie mezi dvěma molekulami. Daný mechanismus přenosu energie je označován jako FRET (Förster resonance energy transfer) (Förster, 1948). Dochází zde k neradioaktivnímu přenosu fotonu z energeticky excitovaného fluoroforu (donor) na jinou molekulu (akceptor), která je tímto uvedena do vyššího energetického stavu. Následně dojde k návratu donorového fluoroforu do základního energetického stavu bez emise fluorescence. Tento mechanismus přenosu energie je však omezen vzdáleností mezi molekulami, kdy za vhodnou vzdálenost je považováno rozmezí 10 - 100 Å (Ångström), což odpovídá vzdálenosti asi 3 - 30 nukleotidů v dsDNA (Marras, 2006). Akceptorovou molekulou může být jak další fluorofor, tak nefluoreskující molekula (zhášec). Je-li akceptorem molekula fluoroforu, je přenesená energie vyzářena ve formě fluorescence o vlnové délce charakteristické pro daný fluorofor. Je-li akceptorem molekula zhášeče, dojde ke ztrátě energie formou tepla.

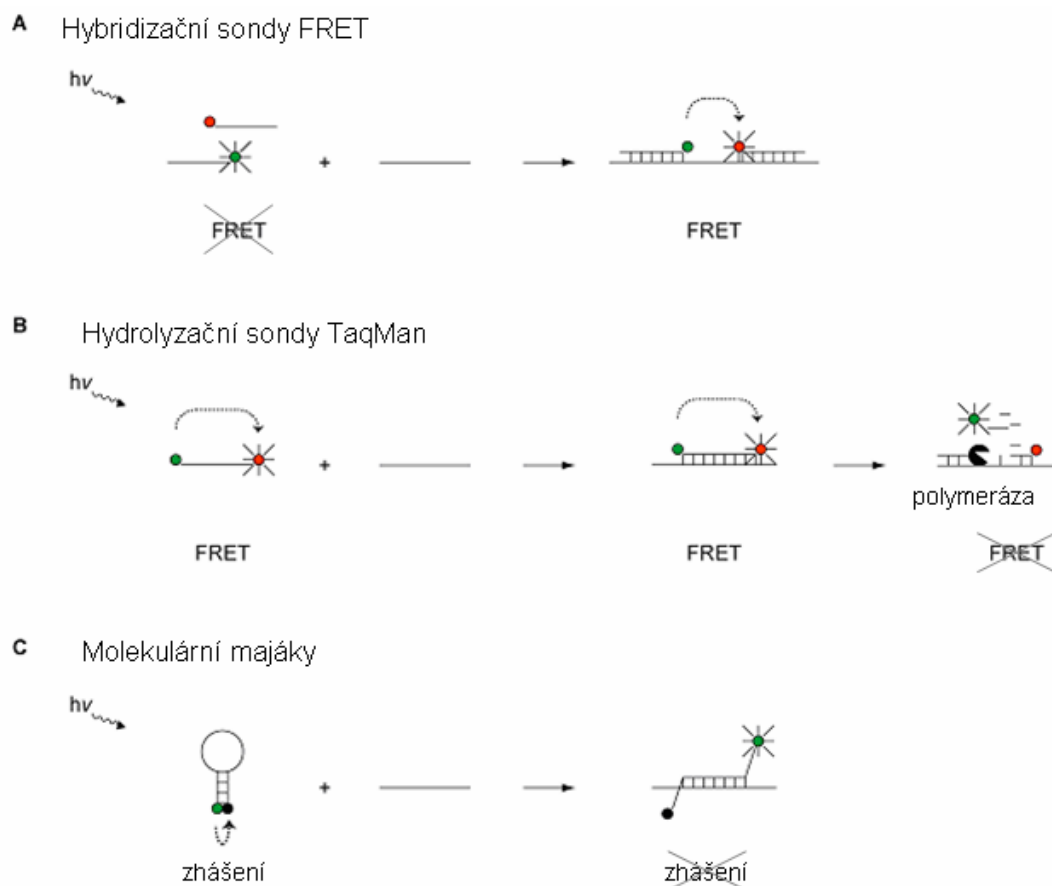
Mezi nejčastěji používané sekvenčně specifické sondy patří hybridizační sondy značené pomocí dvou fluorescenčních barev (dual-labeled fluorogenic hybridization probes) (Heid *et al.*, 1996). Do této skupiny jsou řazeny např. hydrolyzační sondy TaqMan, hybridizační sondy FRET či molekulární majáky (molecular beacons, viz Obr. 3C) (Marras, 2006).

Sondy TaqMan® (viz Obr. 3B) využívají k získání fluorescenčního signálu 5'-3' exonukleázové aktivity enzymu *Taq* DNA polymerázy (Marras, 2006). Sondy jsou navrhovány tak, aby hybridizovaly s templátovou ssDNA ve stejný čas jako PCR primer. V případě hydrolyzačních sond TaqMan slouží jedna z obou fluorescenčních barev umístěných na sondě jako zdroj fluorescenčního záření (fluorofor, např. 6-karboxyfluorescein), přičemž záření jeho emisního spektra je zhášeno druhou fluorescenční barvou, která je označována jako zhášec (quencher, např. 6-karboxy-tetrametylrhodamin) (Heid *et al.*, 1996). Následně se začaly používat zhášec typu BHQ (black hole quencher), které nemají autofluorescenci (Yeung *et al.*, 2004). Předpokladem je, aby se hodnota vlnové délky emisního maxima fluoroforu překrývala s hodnotou vlnové délky absorpčního maxima zhášeče (Heid *et al.*, 1996). Je-li sonda neaktivní

(není navázána na templát), dochází k přenosu energie mezi barvami (FRET), kdy je emisní záření pohlcováno zhášečem. V průběhu prodlužovací fáze každého cyklu PCR je sonda štěpena enzymem DNA polymerázou s 5'-3' exonukleázovou aktivitou. Degradací sondy pomocí enzymu s nukleázovou aktivitou se od sebe obě barvy vzdálí natolik, že zhášeč přestane být aktivní, což vede k uvolnění fluorescenčního záření fluoroforu. Fluorescenční záření je následně detekováno v průběhu celého procesu amplifikace (zmnožení) templátu, jehož rostoucí množství je tedy sledováno průběžně a v reálném čase.

U hybridizačních sond FRET (viz Obr. 3A) je využito dvou jednořetězcových sond (Marras, 2006). Jedna sonda je značena donorovým fluoroforem na svém 3' konci, zatímco druhá má akceptorový fluorofor umístěn na svém 5' konci. Obě sondy se vážou k templátové ssDNA blízko sebe tak, aby jejich vzájemná vzdálenost odpovídala vhodné vzdálenosti pro přenos energie (FRET). Energie emitovaného záření je nižší než energie absorbovaná, proto je také vlnová délka emitovaného záření akceptorové molekuly delší než vlnová délka záření absorbovaného. Jsou-li obě sondy nenavázané a volně v roztoku, k přenosu energie nedochází.

Obrázek 3. Schematické znázornění přenosu energie a vzniku fluorescenčního signálu u fluorescenčních hybridizačních sond (převzato a upraveno podle: Marras, 2006)



1.3.4. Metody kvantifikace genové exprese

Prahový cyklus (Ct)

Hodnota Ct odpovídá počtu cyklů, při kterém hladina fluorescence dosáhne detekovatelné (tedy prahové) hodnoty (Nolan *et al.*, 2006). Pro výpočet prahového cyklu byl definován vztah: (převzato a upraveno podle: Ståhlberg *et al.*, 2005)

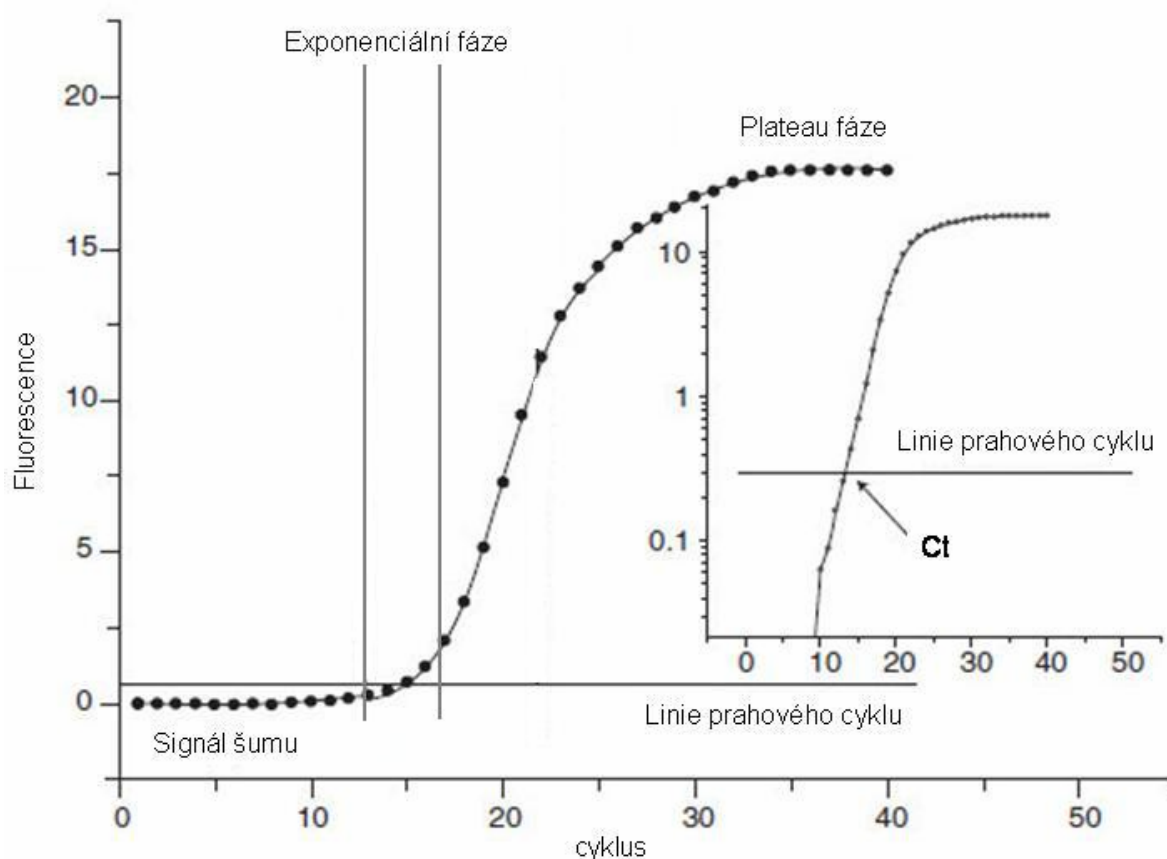
$$N_{Ct} = N_0 \cdot E^{Ct}$$

N_{Ct} = počet molekul dsDNA po amplifikaci

N_0 = výchozí počet molekul cílových dsDNA

E = efektivita, $E = 10^{-\frac{1}{k}}$, kde k je směrnice přímky

Obrázek 4. Křivka real-time PCR (včetně zobrazení v logaritmické stupnici) zobrazující správné umístění linie prahového cyklu. (převzato a upraveno podle: Ståhlberg *et al.*, 2005)



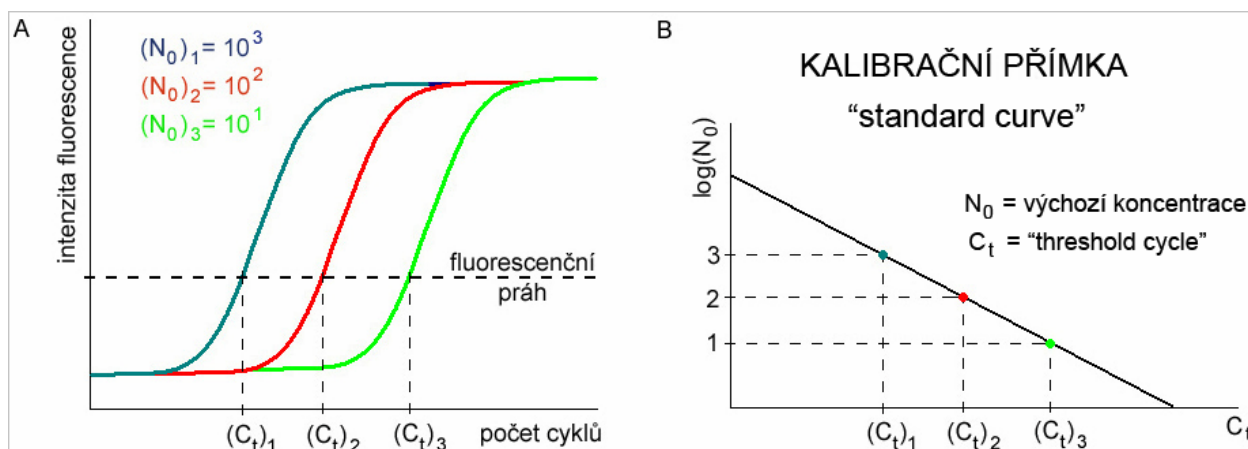
Křivka je rozdělena do tří částí. První z nich je charakterizována signálem šumu, kdy je hodnota fluorescence příliš nízká, než aby mohla být detekována. Druhou částí je fáze exponenciální, kdy fluorescence stoupá nad mez detekovatelnosti a její hodnota odpovídá množství produktu. Linie prahového cyklu by měla být umístěna právě v exponenciální fázi, která je zřetelnější po převedení do logaritmické stupnice. Poslední částí je plateau fáze.

Absolutní kvantifikace

Metoda absolutní kvantifikace umožňuje poměrně přesné určení výchozího počtu kopií cílových molekul na buňku, na množství celkové RNA či tkáň (Bustin, 2000). Tato metoda vyžaduje sestavení kalibrační přímky, ke které se vztahuje výchozí množství molekul mRNA ve vzorku. K sestavení kalibrační přímky se používá standardní ředící řady o známé koncentraci kopií templátu (viz Obr. 5A). Následně je sestaven graf závislosti hodnot C_t (threshold cycle) na logaritmu počtu kopií (viz Obr. 5B). Mezi logaritmem počtu výchozích kopií a hodnotou C_t existuje lineární vztah. Rozmezí koncentrací je nutno zvolit tak, aby zahrnovalo předpokládanou koncentraci mRNA v neznámém vzorku. Výchozí množství kopií mRNA v neznámém vzorku se pak vypočítá z rovnice lineární regrese kalibrační přímky. Kalibrační přímku je možno sestavit z fragmentů PCR, RNA přepsané *in vitro* enzymem T7, oligonukleotidů či komerčně dostupných referenčních RNA.

Obrázek 5. Standardní ředící řada a kalibrační přímka

(převzato z: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr>)



Relativní kvantifikace

Pro většinu aplikací qPCR není třeba znát přesnou koncentraci cílových sekvencí, stačí informace o velikosti změny exprese. Platí, že čím větší je množství templátové DNA vstupující do reakce, tím nižší hodnotu C_t dostaneme (Nolan *et al.*, 2006). Této závislosti hodnoty fluorescence a množství DNA vložené do reakce se využívá při kvantifikaci genové exprese.

Metoda real-time PCR není náročná na provedení, poskytuje nezbytnou přesnost a zároveň umožňuje rychlou a spolehlivou kvantifikaci genové exprese (Pfaffl *et al.*, 2001).

Nezbytností je také vhodný matematický model pro analýzu získaných dat. Relativní kvantifikace genové exprese je vyjádřena jako poměr exprese mezi dvěma vzorky (cílovým a referenčním genem). Exprese cílového genu je normalizována expresí genu referenčního, u kterého se předpokládá konstantní exprese (Ståhlberg *et al.*, 2005).

V případě relativní exprese hraje roli efektivita – základ mocniny, kterou lze vypočítat podle vztahu: (převzato a upraveno podle: Pfaffl *et al.*, 2001)

$$E = 10^{\frac{1}{k}}$$

k je směrnice přímky

Pro výpočet relativní genové exprese s využitím efektivity je následně možno použít vztah: (převzato a upraveno podle: Ståhlberg *et al.*, 2005)

$$\frac{\text{Vzorek1}}{\text{Vzorek2}} = \frac{E_B^{Ct_{B1}-Ct_{B2}}}{E_A^{Ct_{A1}-Ct_{A2}}}$$

Hodnoty Ct cílového genu: B1 = kontrola, B2 = vzorek

Hodnoty Ct referenčního genu: A1 = kontrola, A2 = vzorek

E_B = efektivita cílového genu, E_A = efektivita referenčního genu

Za předpokladu, že efektivita cílového i referenčního genu je považována za 100% (základ mocniny je tedy roven hodnotě 2), lze kvantifikovat genovou expresi pouze na základě hodnot Ct (metoda delta delta) (Pfaffl *et al.*, 2001). Metoda delta delta slouží k relativní kvantifikaci exprese cílového genu ve srovnání s expresí genu referenčního. Exprese referenčního genu by měla být stabilní.

Pro výpočet relativní genové exprese metodou delta delta se používá vztah: (převzato a upraveno podle: Pfaffl *et al.*, 2001)

$$\frac{\text{Vzorek1}}{\text{Vzorek2}} = \frac{2^{Ct_{B1}-Ct_{B2}}}{2^{Ct_{A1}-Ct_{A2}}} = 2^{(Ct_{B1}-Ct_{B2})-(Ct_{A1}-Ct_{A2})} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

Hodnoty Ct cílového genu: B1 = kontrola, B2 = vzorek,

Hodnoty Ct referenčního genu: A1 = kontrola, A2 = vzorek

1.4. Referenční geny

Referenční geny označované také jako „housekeeping genes“ je možno nalézt ve všech buňkách s jádrem (Pfaffl *et al.*, 2001). Jsou to geny, které jsou nezbytně nutné k přežití buňky. Množství přeepsané mRNA v této buňce je považováno za stabilní a neliší se ani v rámci stejné tkáně.

Referenční geny jsou často využívány jako interní pozitivní kontrola především u metody real-time PCR (Hruz *et al.*, 2011). Potřeba využití těchto genů vychází hlavně z několika předpokladů, jimiž jsou např. existence rozdílných hodnot exprese mezi vzorky, různá stabilita vzorků RNA, rozdílná účinnost enzymů, apod. V rámci sjednocení výsledků je tedy potřeba získaná data normalizovat. Referenční geny by tedy měly mít vždy stabilní hodnotu genové exprese a zároveň vystihovat celkové množství mRNA přítomné v každém vzorku. Nicméně je velmi složité nalézt univerzální referenční gen, protože se hodnota exprese v různých tkáních liší (Silver *et al.*, 2006). Rozdílná je také u jednotlivých buněčných typů, vývojových stádií buněk či v případě různých experimentálních podmínek. Proto je volba vhodného referenčního genu velmi důležitá.

1.4.1. Referenční geny v kitu pro diagnostiku CLL

(databáze Gene, NCBI)

B2M

- **Celý název genu: beta-2-microglobulin**
- **ID genu: 567, Oficiální symbol genu: B2M**

Gen *B2M* kóduje sérový protein asociovaný s molekulami MHC třídy I (hlavní histokompatibilní systém, major histocompatibility system), který se nachází na povrchu všech jaderných buněk. Dominantní je struktura β listu. Mutace v tomto genu vede k hyperkatabolické hypoproteinémii. Zvýšení hladiny tohoto proteinu je způsobeno malignitami lymfocytárního systému (monoklonální gamapatie, maligní lymfom). Gen je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 15 v oblasti 21-22.2 (15q21-22.2).

Beta-2-mikroglobulin je protein o velikosti 12 kDa, který je součástí molekuly HLA třídy I (human leukocyte antigen) (Berrebi *et al.*, 2010). Je exprimován na povrchu buněk mnoha tkání a jakožto produkt těchto buněk je detekovatelný v séru a dalších tělních tekutinách. Hodnoty B2M v séru bývají zvýšeny v případech různých poruch (např. revmatických, virových

či u poruch funkce ledvin) a také u lymfoproliferativních hematologických onemocnění. Zvýšená hladina B2M v séru může mít prognostický význam u lymfoproliferativních onemocnění jako je např. CLL.

GUSB

- **Celý název genu: glukuronidase, beta**
- **ID genu: 2990, Oficiální symbol genu: GUSB**

Gen kóduje protein, který funguje jako hydroláza: degraduje heparan sulfát a chondroitin-4,6-sulfát. Homotetramer enzymu se vyskytuje v lysozomech. Mutace vede k mukopolysacharidóze typu VII (záměna alaninu v pozici 619 za valin). Gen se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7 v oblasti 21.11 (7q21.11).

HPRT1

- **Celý název genu: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1**
- **ID genu: 3251, Oficiální symbol genu: HPRT1**

Gen kóduje protein – transferázu. Ta katalyzuje přeměnu hypoxantinu na inosin-mono-fosfát a guaninu na guanosin-mono-fosfát. HPRT1 hraje hlavní roli při tvorbě purinů (přes záchrannou cestu). Mutace v tomto genu má za následek Lesch-Nyhanův syndrom či dnu. Gen je umístěna na dlouhém raménku pohlavního chromozomu X v oblasti 26.1 (Xq26.1).

1.5. Hodnocení kvality diagnostických testů

Jednou z možností, jak v oblasti medicíny hodnotit kvalitu a sílu diskriminace diagnostických či screeningových testů, nebo např. při zavádění nových léčebných postupů do medicínské praxe, je analýza ROC (Receiver Operating Characteristic Curve, graf prahové operační charakteristiky) (Vránová *et al.*, 2009).

Základem je definování čtyř skupin jedinců / pacientů:

- Pravdivě pozitivní (TP, true positive) – což jsou pacienti s nemocí, které test označil správně jako nemocné
- Pravdivě negativní (TN, true negative) – zdraví jedinci, kteří byli správně označeni jako zdraví

- Falešně pozitivní (FP, false positive) – zdraví jedinci, kteří však byli testem určeni nesprávně jako nemocní
- Falešně negativní (FN, false negative) – nemocní pacienti, které test nezachytil (jsou tedy nesprávně zařazeni jako zdraví)

Pomocí těchto čtyř hodnot je následně možno určit senzitivitu a také specificitu. Senzitivita (nebo též TRP, true positive rate, pravdivě pozitivní poměr) je definována jako poměr mezi pacienty, kteří byli pomocí testu správně určeni jako nemocní a všemi skutečně nemocnými pacienty. Senzitivitu lze vyjádřit jako pravděpodobnost, že test bude pozitivní u nemocných. Vypočítá se podle vztahu:

- $TPR \text{ (senzitivita)} = TP / (TP + FN)$

Specificita (nebo též TNR, true negative rate, pravdivě negativní poměr) je poměr mezi zdravými jedinci, kteří byli testem správně určeni jako zdraví a všemi skutečně zdravými jedinci. Specificita udává pravděpodobnost, že test bude negativní u zdravých. Udává podíl správně určených negativit, a tedy odhaluje falešně pozitivní nálezy, které snižují kvalitu diagnostického testu. Je dána vztahem:

- $TNR \text{ (specificita)} = TN / (FP + TN)$

Lze také definovat hodnoty falešně pozitivní poměr (FPR, false positive rate) a falešně negativní poměr (FNR, false negative rate). Tyto hodnoty lze vypočítat pomocí vztahů:

- $FPR = FP / (FP + TN)$ a $FNR = FN / (TP + FN)$

Křivka ROC je následně vyjádřením hodnot falešně pozitivního poměru (pro každého jedince) vůči senzitivě (určené také u každého jedince). Posledním důležitým krokem je výpočet plochy pod křivkou, přičemž platí, že čím je plocha větší, čím více se blíží k jedné a křivka se posouvá do levého horního rohu grafu, tím je test kvalitnější.

I bez přímého použití této analýzy jsou pojmy jako např. falešná a pravdivá pozitivita či negativita, specificita a senzitivita velmi užitečné a jejich stanovení může napomoci ověřit prediktivní hodnotu zvoleného postupu.

2. CÍLE PRÁCE

- Srovnání hladiny genové exprese vybraných genů / markerů ve vzorcích RNA B-lymfocytů mezi skupinou pacientů s CLL s mutovaným a nemutovaným genem pro IGVH, především pak rozdílnost úrovně exprese mezi oběma skupinami.
- Ověření prediktivních vlastností cílových genů u souboru patientských vzorků s využitím relativní kvantifikace, tedy zjištění procenta vzorků, u nichž exprese cílových (prognostických) genů koreluje s mutačním statusem genu pro IGVH.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Klinický materiál

- 70 vzorků onkologických pacientů Fakultní nemocnice Brno
(RNA z purifikovaných B-lymfocytů izolovaných z periferní krve) - 22.6.2011
- 50 vzorků onkologických pacientů Fakultní nemocnice Brno
(RNA z purifikovaných B-lymfocytů izolovaných z periferní krve) - 29.9.2011

Fakultní nemocnice v Brně poskytla dvě sady anonymizovaných patientských vzorků RNA. Celkový počet byl 120 (70+50), z nichž 60 bylo mutovaných (mutace ve variabilním segmentu těžkého řetězce imunoglobulinového genu - IGVH) a 60 nemutovaných.

Vzorky byly rozděleny do dvanácti skupin po deseti a testovány:

Seznam vzorků – sada I (počet 70) – viz Tab. 1. - přílohy

Seznam vzorků – sada II (počet 50) – viz Tab. 2. - přílohy

3.2. Reakční komponenty

3.2.1. Reverzní transkripce

- Oligo dT UNI_VN; 0,1 mM (GENERI BIOTECH, ČR)
- Hexamery (GENERI BIOTECH, ČR)
- 5x Reaction Buffer for M-MuLV RT (Fermentas, Kanada)
- RiboLock™ RNase Inhibitor; 40 U/μl (Fermentas, Kanada)
- dNTP Mix; 10 mM ((Fermentas, Kanada)
- voda (MilliQ)

Enzym

- RevertAid™ M-MuLV-RT Reverse Transcriptase; 200 U/ μl (Fermentas, Kanada)

3.2.2. qPCR

- Kompletní qPCR assay příslušného genu (složení: reagentie pro PCR včetně enzymu polymerázy, primery a sonda) (GENERI BIOTECH, ČR)
- qPCR standardy; 10^5 kopií/ μ l (plazmidová DNA, která nese cílový úsek DNA)
- Voda (milliQ)

Tabulka 5: Použité qPCR assay s délkou amplifikovaného produktu a rozhraním exonů

assay	délka produktu (bp)	accession ID	rozhraní exonů
hB2M_Q3	93	NM_004048	exon2 / exon4
hHPRT1_Q5	101	NM_000194	exon4 / exon5
hGUSB_Q3	112	NM_000181	exon8 / exon9
hGZMA_Q1	71	NM_006144	exon4 / exon5
hCD3D_Q3	122	NM_000732	exon1 / exon2
hLAG3_Q1	134	NM_002286	exon5 / exon6
hLPL_Q5	86	NM_000237	exon9 / exon10
hZAP70_Q3	99	NM_001079	exon10 / exon11

3.3. Přístroje

Real-time termocykléry

- CFX 96™ Real-Time Systém (BioRad, ČR)
- Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Austrálie)

Ostatní přístroje

- Thermal Cycler T100 (BioRad, ČR)
- Chlazená centrifuga 5810R (Eppendorf Czech & Slovakia)
- Mikrobiologický bezpečnostní box (MSC) Labox MB 120, bezpečnostní třída II (Labox, ČR)
- Centrifuga malá, Hermle Z100M (BioTech, ČR)
- BioVortex V1 (Biosan, USA)
- MiliQ (Milipore, USA)
- IceFlaker (Brema, Itálie)

3.4. Pomůcky

- Nastavitelné mikropipety - Multipette Xstream, špičky (Eppendorf Czech & Slovakia)
- Zkumavky (1,5 ml; 500 μ l) (Sarstedt, Německo)
- Mikrozukavky PCR (200 μ l) (Thermo Scientific, USA)
- Centrifugační tuby (50 ml) (Coring, USA)
- Plata pro použití v real-time cykléru CFX 96™ (Thermo Scientific, USA)
- Fólie na plato Adhesive PCR film (Thermo Scientific, USA)
- Chirurgické rukavice DONA SENSiplus (Vulcan Medical, ČR)
- Polystyrenová nádoba na led, ledová tříšť, nůžky, pinzeta

3.5. Metody

3.5.1. Reverzní transkripce

(dle doporučení výrobce Fermentas)

Cyklér: Thermal Cycler T100

Teplotní profil: 60 °C 10 min. (denaturace)

42 °C 60 min. (inkubace)

Vzorky RNA byly přepsány do cDNA, reverzní transkripce probíhala v monoplikátech. Množství RNA přidané do reakce bylo 1 μ g/20 μ l (výsledná koncentrace cDNA byla 50 ng/ μ l). Dále byla cDNA 10x ředěna vodou na výsledný objem 200 μ l (výsledná koncentrace cDNA byla 5 ng/ μ l).

3.5.2. Real-time PCR

(podle protokolu GENERI BIOTECH, s.r.o.)

Analýza exprese všech vzorků v rámci jednoho genu byla rozložena do pěti runů. Každý vzorek byl analyzován v triplikátu, přičemž 56 μ l assay + 14 μ l ředěné cDNA bylo smícháno, centrifugováno a následně rozděleno 3x po 20 μ l do reakce.

V každém runu byl přítomen kalibrátor (4x triplikát) v podobě roztoku cirkulárního qPCR standardu o koncentraci 10⁵ kopií/ μ l. Každá ze čtyř kopií kalibrátoru byla analyzována

v triplikátu (56 µl assay + 14 µl standardu bylo smícháno, zcentrifugováno a rozděleno 3x po 20 µl do reakce).

Přestože byly hodnoty Ct kalibrátorů z jednotlivých runů velmi homogenní (viz Tab. 4. a 5. - přílohy) tento způsob provazování jednotlivých runů kalibrátory jejich homogenitu ověřil a zároveň umožnil vyjádřit výsledky analýz všech vzorků pro daný gen v jednotné škále jako hodnotu delta Ct mezi vzorkem a kalibrátorem.

Cyklér: CFX 96™

Teplotní profil: 95 °C 3 min.
95 °C 10 sec. ← opakovat
60 °C 30 sec. — 50 x

Fluorescenční kanál: FAM (absorpční maximum 492 nm, emisní maximum 520 nm)

Stanovení efektivity:

- každý bod kalibrační přímky (a kalibrátor) byl analyzován v triplikátu (56 µl assay + 14 µl standardu bylo smícháno, zcentrifugováno a rozděleno 3x po 20 µl do reakce)
- kalibrační řada s rozmezím koncentrací linearizovaných standardů 10^7 - 10^0
- kalibrační řady byly připraveny dvě (dvakrát pipetováno z jednoho ředění), do výsledků byly vybrány hodnoty pouze jedné z obou kalibračních řad
- ředěno do pufru TE low EDTA v poměru 1:10 (20+180 µl), u ředění z 10^9 na 10^7 zahrnut normalizační faktor
- do výpočtu nebylo zahrnuto ředění 10^0 u žádného z genů

3.5.3. Analýza dat

3.5.3.1. Srovnávání hodnot genové exprese u skupiny vzorků MUT a UNMUT

Postup zpracování dat sestával z následujících kroků:

1. Výpočet rozdílu mezi průměrnou hodnotou Ct vzorku (Tab. 3. – přílohy) a průměrnou hodnotou Ct kalibrátoru (Tab. 4. – přílohy) pro každý gen. Do průměru nebyly zahrnuty hodnoty Ct, které se výrazně odlišovaly od zbývajících dvou hodnot (o více než dva cykly, přičemž zbývajících dvě hodnoty se navzájem lišily o méně než jeden cyklus).

$$a) \Delta Ct = Ct_{\text{vzorek}} - Ct_{\text{kalibrátor}}$$

2. Výpočet průměrné hodnoty delta Ct pro referenční geny *B2M*, *HPRT1* a *GUSB* (výsledkem je hodnota ΔCt_{Ref} v Tab. 6. – přílohy)

$$b) \Delta Ct_{Ref} = \frac{\Delta Ct_{B2M} + \Delta Ct_{HPRT1} + \Delta Ct_{GUSB}}{3}$$

3. Převedení hodnot delta Ct (Tab. 6. – přílohy) na hodnoty relativní exprese všech genů (a to jak cílových, tak referenčních) vůči kalibrátoru (Tab. 9. – přílohy). Hodnota představuje poměr exprese vzorku vůči expresi kalibrátoru, tedy udává kolikrát je daný vzorek v rámci daného genu exprimován ve srovnání s kalibrátorem. Vycházíme z předpokladu, že efektivita je stoprocentní, tedy rovna hodnotě 2.

$$c) ExR = 2^{\Delta Ct}$$

4. Normalizace exprese, kdy byly cílové geny *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* normalizovány geometrickým průměrem expresí referenčních genů *B2M*, *HPRT1* a *GUSB*. Geometrický průměr n nezáporných čísel je definován jako n -tá odmocnina jejich součinu. Průměr expresí referenčních genů je v Tab. 9. – přílohy zobrazen jako hodnota ExR_{Ref} . Výsledné hodnoty normalizovaných expresí (ExN) jsou v Tab. 10. – přílohy.

$$d) ExN_{TG} = \frac{ExR_{TG}}{ExR_{Ref}}$$

5. Stanovení relativní exprese jednotlivých vzorků vůči průměrné hodnotě ve skupině s mutovaným IGVH. Průměrná hodnota mutovaných vzorků $AverExN_{TG,MUT}$ je rovna geometrickému průměru normalizovaných expresí ve skupině s mutovaným IGVH (Tab. 11. – přílohy). K této hodnotě je vztažena normalizovaná hodnota exprese každého ze vzorků (Tab. 12. - přílohy). Získaná hodnota tedy vypovídá o tom, kolikrát se exprese daného vzorku liší od průměru všech vzorků ve skupině MUT (pro daný gen).

$$e) ExN_{TG,MUT} = \frac{ExN_{TG}}{AverExN_{TG,MUT}}$$

6. Výpočet dekadických logaritmů exprese (Tab. 13. – přílohy). Zvýšená exprese nabývá v normální škále hodnot $(1, \infty)$ zatímco snížená exprese se pohybuje v intervalu $(0, 1)$. Nevyváženost těchto distribucí se odstraní zlogaritmováním hodnot.

$$f) \text{Log}ExN_{TG,MUT} = \log(ExN_{TG,MUT})$$

7. Stanovení průměru, směrodatné odchylky a SEM (střední chyba průměru, standard error of the mean) pro relativní exprese sledovaných genů ve skupinách s mutovaným a nemutovaným IGVH (Tab. 14. – přílohy). Střední chyba průměru je číslo, které označuje, jak moc se námi získaný průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru dat. Tato veličina

měří rozptýlenost vypočítaného aritmetického průměru v různých výběrových souborech vybraných z jednoho základního souboru dat. Střední chyba průměru byla použita z důvodu vysoké variability a počtu analyzovaných vzorků. Míra variability souboru by mohla být vyjádřena směrodatnou odchylkou, nicméně z důvodu již zmíněného vyššího rozptylu exprese vzorků je lepší použít veličinu SEM.

3.5.3.2. Ověření prediktivní hodnoty vybraných genů

Postup zpracování dat sestával z následujících kroků:

1. Výpočet hodnot delta Ct a ΔCt_{Ref} shodný s kroky 1. a 2. v kapitole 3.5.3.1.
2. Normalizace hodnot delta Ct – výpočet průměrné hodnoty delta delta Ct pro jednotlivé prediktivní (cílové) geny (Tab. 6. – přílohy). V Tab. 6. - přílohy je navíc uvedena hodnota ΔCt_{Ref} , což je průměr hodnot delta Ct referenčních genů *B2M*, *HPRT1* a *GUSB*. Tato hodnota byla následně použita k normalizaci hodnot delta Ct u prediktivních genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70*. Výsledné normalizované hodnoty delta delta Ct jsou v Tab. 7. – přílohy uvedeny pod názvy nLAG, nLPL a nZAP.

$$a) \Delta\Delta Ct_{TG} = \Delta Ct_{TG} - \Delta Ct_{Ref}$$

3. Stanovení normalizované průměrné hodnoty delta delta Ct všech prediktivních genů. Tato hodnota je v Tab. 7. – přílohy uvedena pod zkratkou nALL.

$$b) \Delta\Delta Ct_{ALL} = \frac{\Delta Ct_{LAG3} + \Delta Ct_{LPL} + \Delta Ct_{ZAP70}}{3} - \Delta Ct_{Ref}$$

4. Určení prahové hodnoty pro jednotlivé parametry a srovnání parametrů s prahovou hodnotou stanovenou manuálně tak, aby rozdělení vzorků bylo v co nejvyšší shodě s mutačním statutem genu pro IGVH (Tab. 8. – přílohy).
5. Přiřazení hodnot TP, TN, FP a FN podle prahových hodnot. (Tab. 8.- přílohy). V Tab. 8. – přílohy je také uvedena hodnota EP ALL. Tento parametr značí, jestli byly alespoň dva ze tří prediktivních genů zařazeny správně, přičemž posuzovány jsou prahové hodnoty jednotlivých genů samostatně, nikoli jako průměrná hodnota všech genů dohromady (všechny geny dohromady viz bod 3.). V tom případě je přiřazeno označení TN u skupiny MUT a TP u skupiny UNMUT. Pokud byly dva a více parametrů zařazeny špatně, je zde přiřazeno označení FP u skupiny MUT a FN u skupiny UNMUT.

Tabulka 6. Způsob přiřazování hodnot TP, TN, FP a FN podle prahových hodnot.

skupina vzorků	$\Delta\Delta Ct$ vůči prahové hodnotě	přiřazeno
MUT	je-li hodnota < práh	TN
MUT	je-li hodnota > práh	FP
UNMUT	je-li hodnota > práh	TP
UNMUT	je-li hodnota < práh	FN

6. Výpočet senzitivity (TPR) a specifity (TNR)

$$c) \quad TPR = \frac{TP}{(TP + FN)} \quad TNR = \frac{TN}{(FP + TN)}$$

3.6. Další geny vybrané do kitu k diagnostice CLL - markery T-lymfocytů

(databáze Gene, NCBI)

CD3D

- **Celý název genu: CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)**
- **ID genu: 915, Oficiální symbol genu: CD3D**

Gen *CD3D* je markerem T-lymfocytů, v našem případě značí kontaminaci vzorku T-lymfocyty. Kóduje protein, který je částí TCR (receptor T-lymfocytů, T-cell receptor). Dále je zahrnut do vývoje tohoto receptoru a má funkci v přenosu signálu. CD3D kóduje podjednotku delta komplexu CD3 (a s dalšími čtyřmi podjednotkami váže i TCR alfa/beta nebo TCR gama/delta a tvoří společně komplex TCR/CD3 na povrchu T lymfocytů). Defekt v genu vede ke SCID ($T^+B^+NK^+$), což je závažný kombinovaný imunodeficit. Gen se nalézá na dlouhém raménku chromozomu 11 v oblasti 23 (11q23).

GZMA

- **Celý název genu: granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)**
- **ID genu: 3001, Oficiální symbol genu: GZMA**

Gen *GZMA* je také markerem přítomnosti T-lymfocytů. Buňky Tc (cytotoxické T-lymfocyty) a NK (natural killer) umí rozpoznat, vázat a lyzovat specifické cílové buňky. Je to serin proteáza, kódovaná právě genem *GZMA*, která funguje jako součást systému nezbytného k lyzi cílové buňky Tc-lymfocyty a NK buňkami. Gen je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 5 v oblasti 11-12 (5q11-q12).

4. VÝSLEDKY

4.1. Stanovení efektivity

U jednotlivých genů byly vypočítány tyto hodnoty:

Slope: vyjadřuje směrnici regresní přímky proloženou zadanými body. Na ose x leží hodnota logaritmu ředění, na ose y pak hodnota Ct.

Efektivita: vypočítána podle vztahu $E = 10^{(1/k)}$, kde k je směrnice přímky. V případě stoprocentní efektivity je výsledek roven hodnotě 2.

Intercept: je bod, který je určen proložením nejlepší regresní přímky známými hodnotami na osách x a y . Funkce se používá v případě, že chceme znát hodnotu závislé proměnné při nezávislé proměnné rovné 0.

Pearson: je hodnota Pearsonova korelačního koeficientu r . Vyjadřuje lineární vztah mezi dvěma množinami dat. V ideálním případě by byla hodnota r rovna jedné.

Výsledky stanovení efektivity reakce u jednotlivých genů jsou zobrazeny v Tab. 7.

Tabulka 7. Výsledné hodnoty efektivity (a dalších hodnot) pro jednotlivé geny:

geny	B2M	HPRT1	GUSB	GZMA	CD3D	LAG3	LPL	ZAP70
slope	-3,35	-3,40	-3,40	-3,05	-3,33	-3,31	-3,44	-3,16
efektivita	1,99	1,97	1,97	2,13	1,99	2,00	1,95	2,07
intercept	34,44	36,61	35,82	34,87	36,87	36,28	36,60	34,71
pearson	-0,9995	-0,9997	-0,9999	-0,9984	-0,9951	-0,9996	-0,9985	-0,9943

V případě stoprocentní efektivity je výsledek roven hodnotě dvě. Zde byla u jednotlivých genů stanovena efektivita v rozmezí hodnot od 1,95 do 2,13. Pearsonův korelační koeficient se pohyboval v rozmezí hodnot -0,9943 až -0,9999.

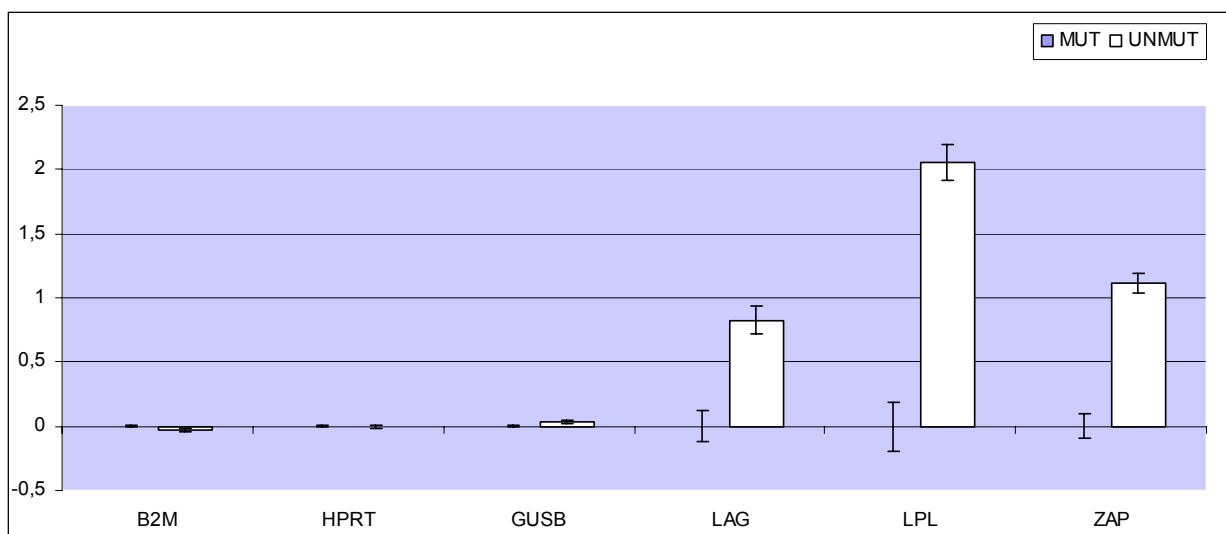
Získané hodnoty efektivity přispěly k potvrzení, že efektivita jednotlivých assayí se navzájem nelišila. Hodnoty nad 2 lze považovat za odchylku během přípravy ředění standardu a zásadní jsou tedy hodnoty nižší než 2 (max. teoretická efektivita). Na základě těchto výsledků byla v dalších výpočtech používána maximální teoretická efektivita (tzn. základ mocniny 2).

4.2. Srovnání hodnot genové exprese u skupiny vzorků MUT a UNMUT

Výsledky srovnání hodnot genové exprese u vzorků s mutovaným a nemutovaným genem pro IGVH jsou souhrnně zobrazeny v Grafu 1. Referenční geny *B2M*, *HPRT1* a *GUSB* vykazují poměrně stabilní expresi, což je vidět na logaritmech průměrných hodnot jejich genové exprese, které se příliš neliší od nuly.

Logaritmy hodnot průměrné exprese cílových genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* skupiny UNMUT se liší od skupiny MUT, což poukazuje na rozdílnost průměrné genové exprese jednotlivých genů u obou skupin. Hodnoty exprese cílových genů (*LAG3*, *LPL* a *ZAP70*) vzorků skupiny MUT se od nuly liší jen málo, protože jsou vztaženy k průměru všech vzorků skupiny MUT, zatímco právě hodnoty vzorků cílových genů UNMUT vyjadřují velikost rozdílu mezi expresemi obou skupin.

Graf 1: Rozdíly exprese u vzorků skupiny MUT a UNMUT



V grafu jsou zobrazeny logaritmy hodnot průměrných změn exprese vztažených ke skupině vzorků s mutovaným IGVH (na ose x) v rámci jednotlivých genů (na ose y). Průměrná exprese mutovaných vzorků je zde zobrazena jako nulová hladina a to z toho důvodu, že jsou k ní vztaženy hodnoty exprese všech vzorků (s ohledem na jednotlivé geny) obou skupin (MUT i UNMUT). Jako zdrojová data byly použity hodnoty z Tab. 14. - přílohy. Chybové úsečky jsou vyjádřeny pomocí veličiny střední chyba průměru (SEM).

Z výsledků vyplývá, že je průměrná exprese všech vzorků skupiny UNMUT v rámci genu *LAG3* až o 0,83 řádu vyšší než průměrná exprese vzorků skupiny MUT (je-li průměrná hodnota exprese skupiny MUT považována za nulovou). Pro geny *LPL* a *ZAP70* se exprese pohybuje o 2,06 řádů a 1,2 řádu výše. Největší rozdíly v expresi mezi skupinami vykazuje gen *LPL*.

4.3. Ověření prediktivní hodnoty vybraných genů

Jednotlivé vzorky byly již před analýzou rozděleny do dvou skupin (mutovaný či nemutovaný gen pro IGVH). Cílem analýzy bylo zjistit procento vzorků, u nichž exprese cílových (prognostických) genů (TG) korelovala s mutačním statutem genu pro IGVH. Záměrem tedy bylo zjistit shodu. Způsob vyhodnocení získaných dat byl založen na srovnání hodnot delta Ct vůči kalibrátoru, přičemž hodnoty delta Ct byly normalizovány pomocí referenčních genů.

Na základě výsledků qPCR byla kvantifikována exprese všech patientských vzorků (v rámci jednotlivých genů) a srovnána shoda s mutační variantou genu pro IGVH. Výsledné procento shody s mutačním statutem genu pro IGVH pro jednotlivé geny, ale i pro všechny geny společně jsou zobrazeny v Tab. 8.

Tabulka 8. Výsledky získané s využitím relativní kvantifikace

geny	LAG3	LPL	ZAP70	nALL	EP ALL
TP	54	51	44	55	54
TN	31	58	56	51	58
FP	29	2	4	9	2
FN	6	9	16	5	6
senzitivita	0,90	0,85	0,73	0,92	0,90
specifita	0,52	0,97	0,93	0,85	0,97
% shoda	70,8%	90,8%	83,3%	88,3%	93,3%

Z tabulky je patrné, že nejvyšší procento shody s mutační variantou genu pro IGVH dosáhl gen *LPL*, nejnižší naopak gen *LAG3*. Všechny cílové geny dohromady (EP ALL) vykazují 93,3 % shody s mutačním statutem genu pro IGVH (hodnotíme-li prahové hodnoty jednotlivých genů samostatně, nikoli jako průměrnou hodnotu všech genů dohromady), což má vyšší prediktivní hodnotu než jednotlivé geny samostatně. Při hodnocení prahové hodnoty průměru všech genů dohromady (nALL) bylo dosaženo 88,3 % shody.

Z hodnot pravdivé positivity / negativity a falešné positivity / negativity byly vypočítány hodnoty senzitivity a specifity jak pro jednotlivé geny, tak pro všechny geny společně. V případě hodnoty nALL byla senzitivita vyšší než u hodnoty EP ALL, avšak na úkor specifity, která se ukázala vyšší u hodnoty EP ALL.

5. DISKUZE

5.1. Vývoj v oblasti stanovení diagnózy u pacientů s CLL

V posledních dvaceti letech se velmi zlepšila schopnost odborných pracovníků zařadit na základě diagnostických metod pacienty do skupiny s vysokým či nízkým rizikem (Schellhorn Mougalian *et* O'Brien, 2011). Cytogenetické a molekulárně biologické postupy vedoucí k charakterizaci CLL se staly důležitou součástí diagnostiky, určení klinického průběhu nemoci a volby vhodné léčby. Hledání a identifikace nových prognostických genů či vhodných kombinací markerů je v oblasti onkologie velmi důležité (Bernard *et* Wittwer, 2002). Ověření prediktivní hodnoty cílových genů bylo také jedním z cílů této diplomové práce. Jako vhodná se ukázala kombinace tří prognostických markerů – genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70*. Výsledky analýzy patientských vzorků potvrdily, že je prediktivní hodnota všech tří genů dohromady vyšší než u jednotlivých genů samostatně.

Propojení molekulárních biomarkerů spolu s histologickým nálezem vede k přesnější diagnóze (Bernard *et* Wittwer, 2002). Výsledky molekulárně biologických postupů navíc pomohou rozhodnout o vhodné léčebné terapii.

5.2. Geny používané v diagnostice CLL

5.2.1. Prognostické markery

Podle Gribbena (2010) jsou jednotlivé prognostické geny schopny předpovídat, jak se bude chovat daný soubor většího množství pacientů spíše, než by měly schopnost předvídat klinický průběh u jednotlivých pacientů. Z toho důvodu je lepší použít k určení prognózy u pacienta kombinaci více molekulárně biologických markerů (zde to jsou geny *LAG3*, *LPL* a *ZAP70*) a z hodnoty jejich exprese pak předvídat klinický průběh nemoci. Kombinace více cílových genů vede ke zpřesnění diagnózy.

V případě tří prognostických genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* se tato kombinace ukázala jako vhodná, protože prediktivní hodnota všech tří genů společně je vyšší než u jednotlivých genů samostatně. Procento shody s mutačním statusem genu pro IGVH vyšší než 90 %.

Metodou volby pro určení prognózy u pacientů s CLL je dnes analýza mutačního statusu genu pro IGVH (Kotašková *et al.* 2010). Tento postup je však poměrně dost časově náročný a zahrnuje několik kroků. Naproti tomu analýza genové exprese pomocí metody RT-qPCR vhodné kombinace prognostických markerů umožňuje rychlé zpracování vzorků pouze ve dvoukrokovém procesu. Proto by expresní analýza kombinace genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* mohla být dobře využita v diagnostice CLL.

5.2.2. Referenční geny

Pro kvantifikaci genové exprese vzorků pacientů s CLL byly vybrány referenční geny *B2M*, *HPRT1* a *GUSB*. Berrebi *et al.* (2010) uvádí, že zvýšená exprese genu *B2M* v séru může mít prognostický význam u lymfoproliferativních onemocnění, jakým je i CLL. V případě výběru referenčních genů pro diagnostický kit CLL však testování probíhalo na vzorcích RNA purifikovaných B-lymfocytů, nikoli z plné krve či séra (Kotašková *et al.* 2010). Na základě výsledků analýzy několika referenčních genů byl gen *B2M* hodnocen jako gen se stabilní expresí a proto byl vybrán jako jeden ze tří referenčních genů, které byly zařazeny do dalšího vývoje komerčního kitu k diagnostice CLL. Výsledky analýzy patientských vzorků metodou real-time PCR v této diplomové práci rovněž potvrdily stabilitu exprese genu *B2M*.

5.3. Význam a využití metody real-time PCR v onkodiagnostice

Real-time PCR se díky možnosti detekovat i velmi malé množství nukleové kyseliny v mnoha rozdílných typech vzorku stala často využívanou metodou molekulární diagnostiky (Bustin *et al.*, 2009). Postupem času byly vyvinuty mnohé aplikace, mezi něž patří i využití v diagnostice onkologických onemocnění či sledování rizika návratu choroby. Rozšíření metody real-time PCR do téměř každé laboratoře je asi nejlépe prokazatelné rostoucím množstvím publikací, které prezentují data získaná touto metodou. Real-time PCR nachází využití v onkologické diagnostice proto, že je to rychlá a přesná metoda ke kvantifikaci genové exprese a není příliš finančně ani časově náročná (Bernard *et Wittwer*, 2002).

5.3.1. Rozdílnost aplikace real-time PCR ve výzkumu a diagnostice

Velmi obecně lze použití metody qPCR rozdělit na odvětví výzkumné a diagnostické (Bustin *et al.*, 2009). V oblasti výzkumu je obvykle analyzováno množství rozdílných typů vzorku, přičemž cílem analýz je zjistit, kolik kopií templátové DNA je možno ve vzorku detekovat a jestli negativní kontroly neobsahují opravdu žádné zachytitelné množství templátu. Tímto způsobem také probíhala analýza klinických vzorků v této práci. Naopak v diagnostice se obvykle nevyšetřuje tolik vzorků, nicméně je třeba, aby bylo možno u těchto vzorků vyšetřit co nejvíce různých genů (high-throughput přístup) (Bustin *et al.*, 2009). Takto budou pravděpodobně testovány klinické vzorky pomocí diagnostického kitu pro CLL v praxi.

5.4. Vyjádření prediktivní hodnoty cílových genů

5.4.1. Změna genové exprese u skupiny vzorků MUT a UNMUT

Základem pro zařazení vzorku do skupiny zdravých či nemocných pacientů je v praxi rozdílnost genové exprese v rámci obou skupin. Pro prediktivní geny platí, že čím je rozdíl v expresi genu u zdravých a nemocných pacientů větší, tím více je zřejmé, do které skupiny vyšetřovaný jedinec patří. Proto bylo jedním z cílů této práce zjistit rozdílnost exprese skupin vzorků s mutovaným a nemutovaným genem pro IGVH.

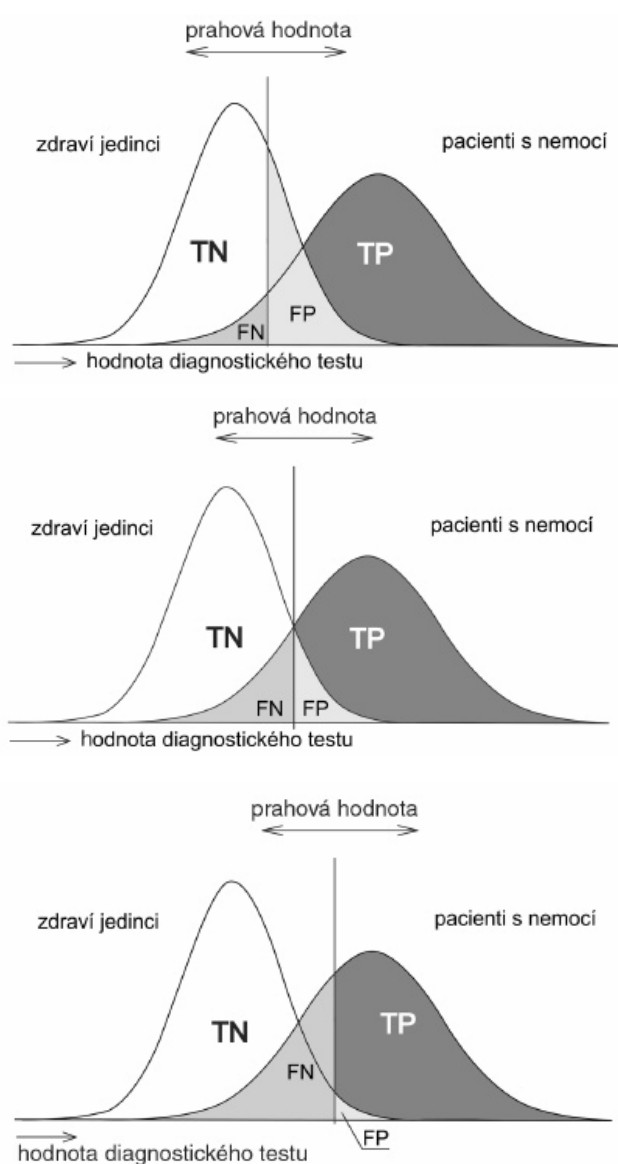
Pro ověření rozdílné exprese u vzorků skupiny MUT a UNMUT byly mezi sebou srovnány exprese obou skupin. Pro srovnání rozdílnosti v expresi bylo zvoleno porovnání velikosti exprese všech vzorků vůči průměrné expresi vzorků ve skupině s mutovaným genem pro IGVH, které byly tímto považovány za základní hladinu, vůči které srovnávání probíhalo.

Výsledná exprese byla porovnáвана jak pro geny referenční, tak pro ty cílové. U referenčních genů *B2M*, *HPRT1* a *GUSB* se předpokládala co nejmenší změna v expresi, což také výsledky potvrdily. Naopak v případě cílových genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* je prognostická hodnota tím lepší, čím větší je změna exprese mezi oběma skupinami vzorků. Zde se největší rozdílnost genové exprese ukázala v případě genu *LPL*, nejmenší pak u genu *LAG3*.

5.4.2. Určení optimální prahové hodnoty

U jednotlivých genů byly vypočítány hodnoty delta Ct cílových genů normalizované průměrnou hodnotou Ct všech referenčních genů. Na základě těchto hodnot byly jednotlivé vzorky vyhodnoceny jako správně či nesprávně zařazené do skupin MUT / UNMUT. Zde byla prahová hodnota jednotlivých genů nastavena vždy tak, aby byla prediktivní hodnota daného genu co nejvyšší, tedy aby bylo co nejvíce vzorků zařazeno správně. V případě diagnostiky onemocnění, mezi něž patří i CLL, je však prioritní odhalit co nejvíce správně diagnostikovaných pacientů s horší prognózou (tedy nemutovaným IGVH).

Obrázek 6. Posun prahové hodnoty (Převzato z: Vránová *et al.*, 2009)



Za účelem určení optimální prahové hodnoty lze použít ROC analýzu. Jak popisuje Vránová *et al.* (2009) na Obr. 6, spolu s posunem prahové hodnoty se mění všechny důležité parametry analýzy, mimo jiné i pravdivá pozitivita a negativita (TP, TN), falešná pozitivita a negativita (FP, FN).

Prahová hodnota se pohybuje od „nejpřísnějšího“ prahu po práh „nedbalý“. V oblasti přísné prahové hodnoty jsou kritéria nastavena tak, že diagnostický test klasifikuje jen málokterého pacienta jako nemocného (v našem případě s horší prognózou nemoci). Zde je minimalizován počet falešně pozitivních, avšak za cenu ztráty citlivosti, kdy v důsledku toho bude velká část pacientů se skutečně horší prognózou diagnostikována nesprávně. Naopak v oblasti nedbalého prahu je většina vyšetřovaných pacientů klasifikována jako skupina s horší prognózou. Roste tedy počet falešně pozitivních případů.

Nastavení prahové hodnoty je nutno volit s ohledem na požadavky klinické praxe. Zde byl práh nastaven manuálně tak, aby byla prediktivní hodnota co nejvyšší. Prediktivní hodnota všech tří cílových genů společně (hodnotíme-li prahové hodnoty jednotlivých genů samostatně) dosahuje 93,3 %, přičemž správně zařazených vzorků do skupiny UNMUT (tedy pacienti s horší prognózou) je 54 z celkových 60. Změnou prahové hodnoty je možno zvýšit počet správně diagnostikovaných jako UNMUT, avšak na úkor správně zařazených vzorků skupiny MUT (tedy pacientů s lepší prognózou nemoci).

Při hodnocení prahové hodnoty průměru všech genů dohromady (nALL) bylo dosaženo pouze 88,3% shody s mutačním statusem genu pro IGVH, avšak počet správně zařazených vzorků do skupiny UNMUT (tedy pacientů s horší prognózou, pravdivě pozitivních) byl vyšší než v případě EP ALL.

5.4.3. Posouzení prediktivní hodnoty genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70*

V tomto případě probíhalo posuzování správnosti zařazení pacientů do skupiny s dobrou či špatnou prognózou na základě srovnání s mutační variantou genu pro IGVH. Rozdělování pacientů s CLL do skupiny s lepší či horší prognózou podle mutačního statusu genu pro IGVH je dnes považováno za „zlatý standard“. Bylo by ovšem zajímavé posoudit prediktivní hodnotu kombinace genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* přímo v závislosti pouze na prognóze pacienta, bez ohledu na mutační variantu genu pro IGVH.

ZÁVĚR

Existují desítky jednotlivých markerů CLL, z nichž některé jsou považovány za „tradiční“, jiné jsou označovány jako „nové“. Ty modernější prognostické faktory, jakými jsou i určení mutačního statusu genu pro IGVH a s tím související analýza genové exprese prediktivních genů, jsou založeny na molekulárně-biologických aspektech onemocnění.

Důležitou vlastností prognostického faktoru je jeho prediktivní hodnota. Ta je určena především tím, do jaké míry koreluje hodnota genové exprese daného genu se stavem pacienta (v případě CLL pak s mutačním statusem genu pro IGVH a tedy lepší či horší prognózou). Platí zde, že čím větší je rozdíl genové exprese u pacientů s dobrou či špatnou prognózou, tím zřetelnější je zařazení vzorku do určité skupiny. Jedním z cílů této práce bylo srovnat rozdílnost genové exprese v rámci jednotlivých genů mezi skupinou vzorků s mutovaným či nemutovaným genem pro IGVH.

Dnes je nejběžnější metodou k určení prognózy u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií analýza mutačního statusu genu pro IGVH, přičemž tento postup je náročný nejen časově, ale i metodicky. Ve srovnání s tímto postupem je analýza genové exprese metodou RT-qPCR rychlejší a jednodušší. Zahrnuje-li vhodnou kombinaci prognostických markerů, umožňuje zpracování vzorků pouze ve dvoukrokovém procesu. Jako vhodná se ukázala kombinace prediktivních genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70*, kdy ověření jejich prediktivní hodnoty bylo dalším cílem této diplomové práce. Záměrem tedy bylo zjistit procentuální zastoupení vzorků, u nichž genová exprese cílových (prognostických) genů korelovala s mutační variantou genu pro IGVH. V této práci byly jednotlivé patientské vzorky už předem rozděleny do skupin s mutovaným či nemutovaným statusem genu pro IGVH, avšak v praxi toto známo není a je třeba vzorky na základě analýzy rozdělit správně. V případě tří prognostických genů *LAG3*, *LPL* a *ZAP70* byla prediktivní hodnota ověřena a byla kvantifikována exprese všech patientských vzorků v rámci jednotlivých genů. Ukázalo se, že prediktivní hodnota všech tří genů společně je vyšší než u jednotlivých genů samostatně.

LITERATURA

- Bernard, P.S. et Wittwer, C.T.** 2002. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clin Chem.* 48(8): 1178-1185.
- Berrebi, A., Bassous, L., Haran, M., Shtalrid, M. et Shvidela, L.** 2010. The significance of elevated beta 2-microglobulin (b2-m) in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Evidence of *in vitro* secretion following activation of CLL cells. *Leukemia Res.* 34(9): 248-249.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, 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., Belabbès, S. et Gremy, F.** 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 48(1): 198-206.
- Bullrich, F., Rasio, D., Kitada, S., Starostik, P., Kipps, T., Keating, M., Albitar, M., Reed, J.C. et Croce, C.M.** 1999. ATM Mutations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* 59: 24-27.
- Bustin, S.A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25: 169-193.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., et Wittwer, C.T.** 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 55(4): 611-622.
- Catherwood, M.A., Matthews, C., Niblock, R., Dobbin, E., Morris, T.C. et Alexander H.D.** 2006. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 76(4): 294-298.
- Crowther-Swanepoel, D et Houlston, S.** 2010. Genetic variation and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Canc Biol.* 20: 363-369.
- Databáze Gene**, National Centre for Biotechnology Information - NCBI
[online] [cit. 9. března 2012]
Dostupné na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- Češka, R.** 2010. Interna. Triton, Praha. ISBN: 978-80-7387-423-0
[online] [cit. 16. února 2012]
Dostupné na www: <http://www.medicabaze.cz>
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valento, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Husman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S.M., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K.R., Ferrarini, M. et Chiorazzi, N.** 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840-1847.

- Damle, R. N., Calissano, C. et Chiorazzi, N.** 2010. Chronic lymphocytic leukaemia: a disease of activated monoclonal B cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 23: 33-45.
- Dillman, R.O., Beauregard, J.C., Lea, J.W., Green, M.R., Sobol, R.E. et Royston, I.** 1983. Chronic lymphocytic leukemia and other chronic lymphoid proliferations: Surface marker phenotypes and clinical correlations. *J Clin Oncol.* 1(3): 190-197.
- Dillman, R.O.** 2008. Immunophenotyping of Chronic Lymphoid Leukemias. *J Clin Oncol.* 26(8): 1193-1194.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., et Lichter, P.** 2000. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New Eng J Med.* 343: 1910-1916.
- Förster, T.** 1948. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* 2: 55-75.
- Frezzato, M., Giaretta, I., Madeo, D., Rodeghiero, F.** 2010. Identical IGHV-D-J gene rearrangement may precede the clinical onset of chronic lymphocytic leukemia by several years. *Am J Hematol.* 85(11): 868-871.
- Furman, R.R.** 2010. Prognostic Markers and Stratification of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology (ASH Education Book)* vol. 2010(1): 77-81.
- Gerard, G.F., Fox, K.D., Nathan, M. et D'Alessio, J.M.** 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol.* 8(1): 61-77.
- Gribben, J.G.** 2010. How I treat CLL up front. *Blood* 115: 187-197.
- Hallek, M.** 2010. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 23: 85-96.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R. et Kipps, T.J.** 2008. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 111(12): 5446-5456.
- Hamblin, T.J., Davis, Z. Garddiner, A., Oscier, D.G. et Stevenson, F.K.** 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848-1854.
- Hartmann, T.N., Pleyer, L., Desch, P., Egle, A. et Greil, R.** 2009. Novel Therapeutic Approaches to Chronic Lymphocytic Leukemia Based on Recent Biological Insights. *Discov Med.* 8(42):157-164.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., et Mickey Williams, P.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.

- Hruz, T., Wyse, M., Docquier, M., Pfaffl, M.W., Masanetz, S., Borghi, L., Verbrugge, P., Kalaydjieva, L., Bleuler, S., Laule, O., Descombes, P., Gruissem, W. et Zimmermann, P.** 2011. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*. 12:156.
- Hsi, E.D., Hoeltge, G. et Tubbs, R.E.** 2000. Biclonal Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 113: 798-804.
- Kaderi, M.A., Kanduri, M., Buhl, A.M., Sevov, M., Cahill, N., Gunnarsson, R., Jansson, M., Smedby, K.E., Hjalgrim, H., Jurlander, J., Juliusson, G., Mansouri, L. et Rosenquist, R.** 2011. LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 96(8): 1153-1160.
- Kharfan-Dabaja, M.A., Chavez, J.C., Khorfan, K.A. et Pinilla-Ibarz, J.** 2008. Clinical and Therapeutic Implications of the Mutational Status of IgVH in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer*. 113(5): 897-906.
- Kotašková, J., Tichý, B., Trbušek, M., Skuhrová Francová, H., Kabáthová, J., Malčíková, J., Doubek, M., Brychtová, Y., Mayer, J. et Pospíšilová, Š.** 2010. High Expression of Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3) in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Associated with Unmutated Immunoglobulin Variable Heavy Chain Region (IGHV) Gene and Reduced Treatment-Free Survival. *J Mol Diagn*. 12(3):328-334.
- Marras, S.A.E.** 2006. Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. From: *Methods in Molecular Biology: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*. Edited by: V.V. Didenko © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006
- Mertens, D., Bullinger, L. et Stilgenbauer, S.** 2011. Chronic lymphocytic leukemia – genomics lead the way. *Haematologica*. 96(10): 1402-1405.
- Nolan, T., Hands, R.E. et Bustin, S.E.** 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 1(3): 1559-1582.
- Palásek, I., Doubek, M. et Vorlíček, J.** 2003. Chronická lymfatická leukémie. Příručka pro pacienty Interní hematologické kliniky LF MU a FN Brno. ISBN 80–210–3272–3 [online] [cit. 24. března 2012]
Dostupné na [www: www.fnbrno.cz/data/files/IHOK/CLL%20pro%20pacienty.pdf](http://www.fnbrno.cz/data/files/IHOK/CLL%20pro%20pacienty.pdf)
- Panovská, A., Doubek, M., Brychtová, Y., et Mayer, J.** 2010. Chronic Lymphocytic Leukemia and Focusing on Epidemiology and Management in Everyday Hematologic Practice: Recent Data From the Czech Leukemia Study Group for Life (CELL). *Clin Lymph Myeloma Leukemia*. 10(4): 297-300.
- Parker, T.L. et Strout, M.P.** 2011. Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Factors and Impact on Treatment. *Discov Med*. 11(57): 115-123.
- Pfaffl, M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29(9): 2002-2007.

- Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J.M., Barvena, S., Sánchez, M.L., Teodosio, C., Giraldo, P., Goraly, M., Pérez, M.C., Romero, M., Perdiguer, L. et Orval, A.** 2008. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-Cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B*; 74B: 139-149.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N. et Pasternack, B.S.** 1975. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 46: 219-234.
- Rush, L.J., Raval, A., Funchain, P., Johnson, A.J., Smith, L., Lucas, D.M., Bembea, M., Liu, T-H., Heerema, N.A., Rassenti, L., Liyanarachchi, S., Davuluri, R., Byrd, J.C., et Plass, C.** 2004. Epigenetic Profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia Reveals Novel Methylation Targets. *Cancer Res*. 64: 2424-2433.
- Schellhorn Mougalian, S. et O'Brien, S.** 2011. Adverse Prognostic Features in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncology*. 25(8).
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. et Ragg, T.** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 7(3).
- Silver, N., Best, S., Juany, J. et Thein, S.L.** 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 7:33.
- Ståhlberg, A., Zoric, N., Åman, P., et Kubista, M.** 2005. Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Rev Mol Diagn*. 5(2).
- Stephens, D.M., Ruppert, A.S., Blum, K., Jones, J., Flynn, J.M., Johnson, A.J., Ji, J., Phelps, M.A., Grever, M.R. et Byrd, J.C.** 2012. Flavopiridol treatment of patients aged 70 or older with refractory or relapsed chronic lymphocytic leukemia is a feasible and active therapeutic approach. *Haematol*. 97(3): 423-427.
- Van Bockstaele, F., Verhasselt, B. et Philippé, J.** 2009. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Rev*. 23: 25-47.
- Vránová, J., Horák, J., Krátká, K., Hendrichová, M. et Kovaříková, K.** 2009. ROC analýza a využití analýzy nákladů a přínosů k určení optimálního dělicího bodu. *Čas Lék čes*. 148: 410-415.
- Yeung, A.T., Holloway, B.T., Adams, P.S. et Shipley, G.L.** 2004. Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR. *BioTechniques* 36: 266-275.

PŘÍLOHY

Metodika:

Tabulka 1: Seznam vzorků – sada I (počet 70)

číslo RNA	konc RNA (ng/μl)	RIN	mutační status	skupina	číslo RNA	konc RNA (ng/μl)	RIN	mutační status	skupina
145	431,10	8,4	mut	1	134	500,5	9,9	unmut	4
158	373,20	7,8	mut	1	138	325,20	10,0	unmut	4
165	189,50	9,6	mut	1	196	309,40	9,8	unmut	4
187	273,40	9,9	mut	1	199	386,80	9,9	unmut	4
206	315,50	9,3	mut	1	233	321,00	9,9	unmut	4
251	200,30	7,5	mut	1	237	344,40	9,7	unmut	5
301	466	9,4	mut	1	258	317,40	9,3	unmut	5
314	255,2	9,4	mut	1	284	548,80	9,1	unmut	5
337	529,10	9,3	mut	1	285	410,20	8,9	unmut	5
338	319,00	9,3	mut	1	334	540,7	9,4	unmut	5
346	205,20	9,6	mut	2	364	299,40	9,5	unmut	5
348	239,20	9,4	mut	2	370	404,00	9,0	unmut	5
356	200,00	9,2	mut	2	387	288,70	9,4	unmut	5
363	444,90	9,6	mut	2	388	320,10	8,8	unmut	5
372	293,30	9,3	mut	2	392	355,80	9,4	unmut	5
375	182,90	7,7	unmut	2	395	349,00	8,5	unmut	6
377	300,00	9,4	mut	2	396	423,50	9,6	unmut	6
378	259,00	9,5	mut	2	399	532,70	8,5	unmut	6
381	323,80	8,4	mut	2	404	297,50	9,8	unmut	6
386	299,50	9,5	mut	2	408	333,80	9,5	unmut	6
398	546,30	8,4	mut	3	416	463,70	9,4	unmut	6
406	153,90	8,9	mut	3	441	690,80	10,0	unmut	6
414	156,40	8,8	mut	3	442	402,50	10,0	unmut	6
418	621,10	9,6	mut	3	443	342,60	9,6	unmut	6
428	225,20	8,5	mut	3	445	437,60	9,9	unmut	6
429	153,60	8,4	mut	3	447	533,80	10,0	unmut	7
437	229,60	9,3	mut	3	451	264,40	9,6	unmut	7
449	208,20	9,8	mut	3	474	386,30	10,0	unmut	7
496	679,00	8,5	mut	3	485	409,50	9,0	unmut	7
523	324,60	8,5	mut	3	486	937,20	8,8	unmut	7
542	225,00	8,7	mut	4	490	707,50	8,2	unmut	7
544	431,90	8,2	mut	4	499	735,50	8,5	unmut	7
546	279,90	8,2	mut	4	511	343,10	8,2	unmut	7
552	880,80	8,1	mut	4	539	1236,30	8,1	unmut	7
555	475,50	8,8	mut	4	564	641,50	9,0	unmut	7

Tabulka 2: Seznam vzorků – sada II (počet 50)

číslo RNA	konc RNA (ng/μl)	RIN	mutační status	skupina	číslo RNA	konc RNA (ng/μl)	RIN	mutační status	skupina
557	458,10	9,1	mut	8	567	684,20	8,5	unmut	10
645	279,90	9,3	mut	8	568	473,60	8,9	unmut	10
675	337,00	9,4	mut	8	570	1116,40	8,7	unmut	10
695	828,60	8,8	mut	8	573	422,80	8,8	unmut	10
703	1561,10	8,3	mut	8	574	465,90	8,6	unmut	10
726	493,80	9,2	mut	8	578	707,70	8,1	mut	11
781	209,00	9,3	mut	8	580	594,10	9,0	unmut	11
787	580,50	9,4	mut	8	581	823,00	9,1	unmut	11
790	422,80	8,6	mut	8	589	794,90	8,8	unmut	11
793	1245,30	8,2	mut	8	594	1353,40	8,6	unmut	11

číslo RNA	konc RNA (ng/μl)	RIN	mutační status	skupina	číslo RNA	konc RNA (ng/μl)	RIN	mutační status	skupina
800	239,30	8,9	mut	9	618	658,20	9,4	unmut	11
801	230,20	9,0	mut	9	627	1533,10	8,2	unmut	11
802	296,40	8,8	mut	9	631	1177,70	8,3	unmut	11
820	180,20	9,0	mut	9	632	501,60	8,5	unmut	11
821	372,30	9,5	mut	9	634	828,20	8,2	unmut	11
826	188,90	8,6	mut	9	644	1043,40	8,3	unmut	12
827	320,30	9,3	mut	9	646	1009,90	8,6	unmut	12
828	1164,90	9,2	mut	9	649	864,00	9,0	unmut	12
845	258,30	8,9	mut	9	661	1432,70	8,5	unmut	12
846	791,40	8,8	mut	9	677	371,00	9,2	unmut	12
853	819,20	9,2	mut	10	678	745,70	9,4	unmut	12
855	531,10	8,1	mut	10	680	458,20	9,1	unmut	12
857	318,10	9,4	mut	10	683	532,30	10,0	unmut	12
865	570,20	9,4	mut	10	692	1188,60	9,2	unmut	12
548B	542,50	8,5	mut	10	694	871,90	8,7	unmut	12

Tabulka 3: Průměr hodnot Ct daného triplikátu jednotlivých patientských vzorků

sk.	vz.	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP
1	145	16,91	26,03	25,06	34,93	NA	29,00	29,32	28,09
1	158	17,91	27,58	26,24	33,22	NA	29,65	43,25	24,90
1	165	17,38	26,99	25,05	NA	NA	33,01	NA	24,69
1	187	17,37	26,66	25,05	35,48	NA	29,15	35,54	28,71
1	206	17,50	26,55	24,92	NA	NA	29,18	NA	27,22
1	251	18,26	27,28	25,51	41,27	NA	26,64	NA	25,90
1	301	16,27	25,38	24,30	32,57	39,04	31,13	NA	28,55
1	314	17,17	26,16	24,74	32,09	NA	29,67	NA	26,88
1	337	17,06	26,24	24,91	32,59	NA	26,95	30,61	26,35
1	338	17,03	26,44	24,85	31,60	NA	26,72	27,54	25,01
2	346	17,93	27,21	25,66	39,12	NA	27,72	NA	26,17
2	348	17,30	26,93	25,57	35,39	NA	32,65	30,78	29,31
2	356	17,32	26,34	25,12	NA	NA	34,50	37,50	29,51
2	363	16,42	25,41	24,26	NA	NA	27,80	29,70	24,05
2	372	17,63	26,84	25,11	41,90	NA	33,44	31,64	29,15
2	375	17,36	26,96	23,98	34,52	NA	27,59	25,88	29,77
2	377	16,81	25,32	24,56	41,85	NA	28,99	31,62	27,01
2	378	17,43	26,23	24,99	NA	NA	26,88	NA	26,44
2	381	18,40	28,05	26,14	NA	NA	28,60	27,09	28,51
2	386	17,50	26,64	25,15	36,07	NA	30,24	NA	28,06
3	398	17,22	26,65	25,19	42,79	NA	29,07	29,68	27,48
3	406	17,83	27,07	25,58	36,32	NA	25,47	31,85	26,20
3	414	17,15	26,46	25,12	28,45	NA	28,06	37,95	27,19
3	418	17,97	27,60	26,54	NA	NA	32,09	NA	30,40
3	428	17,27	26,57	25,15	NA	NA	28,90	NA	31,58
3	429	16,93	26,48	24,76	32,62	NA	25,66	44,46	29,07
3	437	17,14	26,42	24,96	NA	NA	31,75	32,55	24,08
3	449	16,95	26,68	25,06	36,70	NA	28,51	27,39	26,89
3	496	16,19	26,02	24,20	36,34	NA	25,82	34,76	28,41
3	523	17,35	26,84	25,09	45,57	NA	27,28	27,88	25,33
4	542	17,50	26,44	25,17	34,77	NA	32,42	37,36	28,62
4	544	17,28	26,24	25,14	32,46	38,11	25,98	35,03	24,85
4	546	16,80	26,16	24,41	41,61	NA	27,27	37,88	25,59
4	552	16,75	25,71	24,55	32,13	NA	26,43	36,43	29,22
4	555	17,13	26,17	25,18	NA	NA	32,20	39,14	28,95
4	134	18,54	27,83	26,10	NA	36,51	36,80	39,44	29,66
4	138	17,02	25,52	24,36	41,04	NA	30,06	25,18	23,79
4	196	16,96	26,58	24,50	34,26	NA	36,27	24,18	23,32
4	199	16,34	26,19	24,63	38,42	NA	36,22	44,72	28,19
4	233	16,56	25,58	24,23	33,85	NA	24,20	23,29	22,59

sk.	vz.	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP
5	237	16,16	25,54	24,25	34,43	NA	25,64	24,19	22,38
5	258	17,62	26,76	25,14	32,48	NA	28,97	25,05	23,47
5	284	16,56	25,26	23,85	43,61	NA	26,08	24,46	23,06
5	285	16,56	26,46	24,47	34,67	NA	30,33	24,16	23,11
5	334	16,91	25,54	24,71	42,47	NA	28,25	35,05	23,90
5	364	17,44	26,18	24,42	38,26	NA	26,89	25,15	23,01
5	370	16,91	25,51	24,27	35,92	NA	31,01	25,76	22,99
5	387	16,82	25,23	24,35	34,71	NA	23,96	24,60	23,40
5	388	17,17	27,05	25,05	32,10	NA	24,65	25,19	23,11
5	392	17,20	26,28	24,59	NA	NA	29,63	25,25	23,69
6	395	15,96	25,11	23,54	36,45	NA	23,80	23,77	22,76
6	396	16,35	25,86	23,87	NA	33,99	24,85	23,51	22,82
6	399	18,63	28,24	26,99	38,13	NA	31,25	26,90	26,78
6	404	18,18	26,76	25,33	34,23	40,55	28,60	25,02	24,03
6	408	16,41	25,71	25,64	37,33	NA	24,39	23,76	22,61
6	416	15,55	24,75	23,63	37,10	NA	26,10	23,41	23,17
6	441	16,48	25,44	23,80	35,41	44,32	24,96	23,80	22,69
6	442	15,97	25,25	23,35	33,87	NA	25,65	24,23	22,30
6	443	16,16	24,63	23,53	35,04	NA	28,92	24,03	22,23
6	445	15,56	25,14	23,51	NA	42,72	23,83	23,49	22,22
7	447	16,12	25,04	23,93	34,57	NA	27,29	28,85	23,12
7	451	15,65	24,83	23,57	37,94	NA	24,35	23,88	22,36
7	474	15,73	24,77	22,77	32,31	NA	26,04	23,94	23,40
7	485	17,00	26,14	24,26	36,16	NA	26,22	25,68	22,77
7	486	16,85	25,89	24,17	36,09	NA	24,99	24,71	22,38
7	490	15,96	25,41	23,67	33,52	NA	24,89	23,81	21,92
7	499	15,52	24,75	23,61	37,55	NA	23,89	24,10	21,59
7	511	15,93	25,30	23,33	37,73	NA	28,39	23,68	29,02
7	539	16,56	25,88	25,19	32,54	NA	26,30	24,59	25,19
7	564	15,46	24,39	22,78	34,72	NA	27,71	23,14	22,01
8	557	17,13	26,96	26,07	NA	NA	31,32	38,93	33,83
8	645	17,81	27,22	26,05	34,34	NA	33,84	37,72	29,06
8	675	17,44	27,06	25,45	NA	NA	37,57	NA	28,80
8	695	17,49	26,99	26,01	38,58	NA	32,84	29,14	31,94
8	703	17,42	27,42	26,62	NA	NA	33,62	29,85	32,88
8	726	17,16	26,31	25,79	38,22	NA	32,08	32,89	28,70
8	781	17,68	26,84	25,69	45,13	NA	33,09	35,51	33,32
8	787	17,96	27,57	26,33	NA	NA	32,20	27,81	34,47
8	790	17,42	27,05	25,42	25,14	25,32	31,27	27,39	28,19
8	793	18,03	27,56	26,25	27,58	27,81	33,62	32,61	30,15
9	800	17,97	27,21	25,79	34,51	NA	35,41	29,32	31,91
9	801	17,35	27,21	25,22	NA	NA	33,19	24,38	27,79
9	802	17,07	26,44	25,46	33,55	NA	29,16	35,67	29,10
9	820	17,07	26,31	25,45	42,20	NA	30,22	NA	29,02
9	821	17,17	26,29	25,40	NA	NA	31,12	26,51	27,42
9	826	17,55	26,94	25,45	43,81	NA	31,43	NA	34,12
9	827	17,65	26,79	25,48	38,54	NA	30,22	33,16	28,70
9	828	17,14	27,03	25,52	25,90	26,13	33,39	37,60	28,13
9	845	17,89	27,34	26,11	NA	NA	37,74	36,05	29,56
9	846	17,15	26,44	25,29	NA	NA	36,75	27,99	31,53
10	853	16,94	26,40	25,70	NA	NA	35,95	35,84	32,37
10	855	17,55	27,14	26,24	38,29	NA	29,78	37,81	32,75
10	857	17,13	26,90	25,49	36,61	NA	34,22	NA	30,12
10	865	17,39	27,00	25,71	33,10	NA	34,72	43,50	32,61
10	548B	17,64	27,06	25,95	NA	NA	32,60	37,68	27,93
10	567	17,14	25,82	25,11	NA	NA	29,01	26,02	27,07
10	568	17,20	26,70	25,54	35,69	47,35	28,66	24,82	26,93
10	570	17,93	26,47	25,90	NA	NA	30,51	34,92	29,83
10	573	17,30	26,27	25,52	44,79	46,64	33,07	26,99	27,60
10	574	17,48	26,41	25,64	41,00	NA	26,42	25,42	27,62

sk.	vz.	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP
11	578	19,00	27,76	26,11	47,00	NA	35,55	NA	25,25
11	580	17,06	26,32	25,01	36,43	NA	27,07	24,48	23,31
11	581	18,11	26,26	24,76	37,66	NA	31,34	26,67	22,74
11	589	16,89	26,01	24,25	32,14	NA	24,34	23,09	22,69
11	594	17,38	26,37	24,50	36,11	NA	25,63	25,09	23,03
11	618	17,55	26,37	24,49	34,56	NA	27,54	25,39	23,13
11	627	18,00	27,12	25,35	34,31	45,82	27,13	24,34	26,01
11	631	17,12	26,14	24,39	NA	NA	23,33	24,37	22,43
11	632	17,42	26,36	24,64	40,30	NA	28,10	23,66	23,16
11	634	17,32	26,70	24,98	NA	NA	30,29	24,75	23,27
12	644	17,85	26,80	25,01	NA	NA	26,08	25,65	27,45
12	646	17,29	26,19	24,73	31,22	NA	29,25	25,77	23,04
12	649	17,65	26,49	24,74	32,53	NA	25,86	23,40	22,81
12	661	17,19	26,13	25,04	NA	NA	26,15	30,98	26,07
12	677	17,42	25,77	24,39	38,03	NA	24,91	25,48	23,89
12	678	17,25	25,58	24,13	39,24	NA	25,38	23,69	22,71
12	680	17,45	25,80	24,14	35,56	NA	25,14	27,27	22,62
12	683	16,73	25,50	24,43	30,88	45,91	24,61	24,73	23,38
12	692	18,86	27,73	26,13	39,29	NA	29,65	26,11	24,43
12	694	16,87	26,25	24,54	33,49	NA	24,15	25,11	22,64

Tabulka 4: Průměr hodnot Ct kalibrátorů (daného triplikátu)

run	kalibrátor	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP
1	CAL 1	23,60	20,51	23,60	23,49	23,45	25,04	22,96	24,59
1	CAL 2	23,46	20,38	23,52	23,13	23,34	24,90	22,75	24,48
1	CAL 3	23,44	20,36	23,41	23,26	23,33	24,74	22,82	24,78
1	CAL 4	23,45	20,64	23,64	23,42	23,45	24,97	23,16	24,59
2	CAL 1	23,54	20,44	23,48	23,35	23,58	24,97	22,85	24,54
2	CAL 2	23,48	20,44	23,44	23,33	23,42	24,97	22,83	24,56
2	CAL 3	23,28	20,23	23,34	23,16	23,33	24,63	22,43	24,37
2	CAL 4	23,25	20,27	23,34	23,15	23,24	24,75	22,51	24,29
3	CAL 1	23,57	20,41	23,51	23,26	23,38	25,05	22,63	24,42
3	CAL 2	23,45	20,34	23,45	23,22	23,49	24,91	22,65	24,56
3	CAL 3	23,38	20,18	23,29	23,10	23,30	24,73	22,32	24,23
3	CAL 4	23,29	20,24	23,28	22,99	23,20	24,71	22,42	24,27
4	CAL 1	23,54	20,70	24,00	23,25	23,32	25,19	22,97	25,04
4	CAL 2	23,45	20,54	23,84	23,13	23,15	24,97	22,71	24,99
4	CAL 3	23,39	20,58	23,76	23,07	23,11	24,94	22,78	24,80
4	CAL 4	23,36	20,48	23,93	23,21	23,49	24,99	22,90	24,94
5	CAL 1	23,98	20,68	23,81	23,18	23,28	25,00	22,93	24,78
5	CAL 2	23,79	20,33	23,69	23,09	23,08	24,75	22,66	24,50
5	CAL 3	23,70	20,39	23,65	23,12	23,08	24,70	22,71	24,52
5	CAL 4	23,69	20,47	23,70	23,20	23,10	24,89	22,80	24,54

Tabulka 5: Průměrná hodnota čtyř kalibrátorů (umístěných v jednom runu)

run	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP
1	23,49	20,47	23,54	23,32	23,40	24,91	22,92	24,61
2	23,39	20,34	23,40	23,25	23,39	24,83	22,65	24,44
3	23,42	20,29	23,38	23,14	23,34	24,85	22,50	24,37
4	23,43	20,58	23,89	23,17	23,27	25,02	22,84	24,94
5	23,79	20,47	23,71	23,15	23,14	24,83	22,78	24,58

Tabulka 6: Hodnoty delta Ct jednotlivých genů vůči kalibrátoru v každém runu

run	status	vz.	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP	ΔCt Ref
1	MUT	145	6,57	-5,56	-1,52	-11,61	NA	-4,09	-6,40	-3,48	-0,17
1	MUT	158	5,58	-7,11	-2,70	-9,90	NA	-4,74	-20,33	-0,29	-1,41
1	MUT	165	6,10	-6,52	-1,51	NA	NA	-8,10	NA	-0,08	-0,64
1	MUT	187	6,12	-6,19	-1,51	-12,16	NA	-4,24	-12,62	-4,10	-0,53
1	MUT	206	5,99	-6,08	-1,38	NA	NA	-4,27	NA	-2,61	-0,49
1	MUT	251	5,23	-6,81	-1,97	-17,95	NA	-1,72	NA	-1,29	-1,19
1	MUT	301	7,22	-4,91	-0,75	-9,24	-15,64	-6,22	NA	-3,94	0,52
1	MUT	314	6,32	-5,69	-1,20	-8,77	NA	-4,76	NA	-2,27	-0,19
1	MUT	337	6,42	-5,77	-1,37	-9,27	NA	-2,03	-7,69	-1,74	-0,24
1	MUT	338	6,46	-5,97	-1,31	-8,27	NA	-1,81	-4,62	-0,40	-0,28
1	MUT	346	5,56	-6,74	-2,12	-15,80	NA	-2,80	NA	-1,56	-1,10
1	MUT	348	6,18	-6,46	-2,03	-12,07	NA	-7,74	-7,85	-4,70	-0,77
1	MUT	356	6,17	-5,87	-1,58	NA	NA	-9,58	-14,58	-4,90	-0,43
1	MUT	363	7,06	-4,94	-0,72	NA	NA	-2,89	-6,77	0,56	0,47
1	MUT	372	5,86	-6,37	-1,57	-18,58	NA	-8,53	-8,72	-4,54	-0,69
1	MUT	377	6,67	-4,85	-1,02	-18,52	NA	-4,08	-8,70	-2,40	0,27
1	MUT	378	6,06	-5,76	-1,45	NA	NA	-1,97	NA	-1,83	-0,38
1	MUT	381	5,08	-7,58	-2,60	NA	NA	-3,68	-4,17	-3,90	-1,70
1	MUT	386	5,98	-6,17	-1,61	-12,75	NA	-5,33	NA	-3,44	-0,60
1	MUT	398	6,27	-6,18	-1,65	-19,47	NA	-4,16	-6,75	-2,87	-0,52
1	MUT	406	5,65	-6,60	-2,04	-13,00	NA	-0,56	-8,93	-1,59	-0,99
1	MUT	414	6,33	-5,99	-1,58	-5,12	NA	-3,15	-15,03	-2,58	-0,41
1	MUT	418	5,52	-7,13	-3,00	NA	NA	-7,18	NA	-5,79	-1,54
2	MUT	428	6,12	-6,23	-1,75	NA	NA	-4,07	NA	-7,13	-0,62
2	MUT	429	6,45	-6,14	-1,36	-9,37	NA	-0,83	-21,81	-4,63	-0,35
2	MUT	437	6,25	-6,07	-1,56	NA	NA	-6,92	-9,90	0,37	-0,46
2	MUT	449	6,43	-6,34	-1,66	-13,45	NA	-3,68	-4,74	-2,45	-0,52
2	MUT	496	7,20	-5,67	-0,80	-13,09	NA	-0,99	-12,11	-3,96	0,24
2	MUT	523	6,04	-6,50	-1,69	-22,32	NA	-2,45	-5,23	-0,89	-0,71
2	MUT	542	5,89	-6,09	-1,77	-11,52	NA	-7,59	-14,71	-4,18	-0,66
2	MUT	544	6,10	-5,90	-1,74	-9,21	-14,72	-1,15	-12,38	-0,41	-0,51
2	MUT	546	6,59	-5,82	-1,01	-18,36	NA	-2,44	-15,23	-1,15	-0,08
2	MUT	552	6,64	-5,36	-1,15	-8,88	NA	-1,60	-13,78	-4,78	0,04
2	MUT	555	6,26	-5,83	-1,78	NA	NA	-7,37	-16,49	-4,51	-0,45
4	MUT	557	6,30	-6,39	-2,19	NA	NA	-6,30	-16,09	-8,89	-0,76
5	MUT	578	4,80	-7,30	-2,40	-23,85	NA	-10,71	NA	-0,67	-1,63
4	MUT	645	5,62	-6,64	-2,17	-11,17	NA	-8,82	-14,88	-4,12	-1,06
4	MUT	675	6,00	-6,48	-1,56	NA	NA	-12,54	NA	-3,86	-0,68
4	MUT	695	5,94	-6,41	-2,13	-15,41	NA	-7,82	-6,30	-7,00	-0,86
4	MUT	703	6,01	-6,85	-2,73	NA	NA	-8,60	-7,01	-7,94	-1,19
4	MUT	726	6,27	-5,73	-1,90	-15,05	NA	-7,06	-10,05	-3,76	-0,45
4	MUT	781	5,76	-6,27	-1,81	-21,96	NA	-8,06	-12,67	-8,37	-0,77
4	MUT	787	5,47	-6,99	-2,45	NA	NA	-7,18	-4,97	-9,52	-1,32
4	MUT	790	6,01	-6,48	-1,54	-1,97	-2,05	-6,25	-4,56	-3,25	-0,67
4	MUT	793	5,40	-6,98	-2,37	-4,41	-4,54	-8,60	-9,77	-5,21	-1,31
4	MUT	800	5,46	-6,63	-1,91	-11,34	NA	-10,38	-6,49	-6,97	-1,03
4	MUT	801	6,08	-6,63	-1,33	NA	NA	-8,17	-1,54	-2,85	-0,63
4	MUT	802	6,36	-5,87	-1,57	-10,38	NA	-4,13	-12,83	-4,15	-0,36
4	MUT	820	6,36	-5,74	-1,57	-19,03	NA	-5,19	NA	-4,08	-0,31
4	MUT	821	6,26	-5,71	-1,52	NA	NA	-6,10	-3,68	-2,47	-0,32
4	MUT	826	5,89	-6,36	-1,57	-20,64	NA	-6,40	NA	-9,18	-0,68
4	MUT	827	5,79	-6,21	-1,59	-15,38	NA	-5,19	-10,32	-3,76	-0,67
4	MUT	828	6,30	-6,45	-1,64	-2,73	-2,86	-8,36	-14,76	-3,18	-0,60
4	MUT	845	5,54	-6,76	-2,23	NA	NA	-12,72	-13,21	-4,61	-1,15
4	MUT	846	6,29	-5,86	-1,40	NA	NA	-11,73	-5,15	-6,59	-0,33
4	MUT	853	6,49	-5,82	-1,81	NA	NA	-10,92	-13,01	-7,43	-0,38
4	MUT	855	5,88	-6,57	-2,35	-15,12	NA	-4,75	-14,98	-7,81	-1,01
4	MUT	857	6,30	-6,32	-1,61	-13,44	NA	-9,20	NA	-5,18	-0,54
4	MUT	865	6,04	-6,42	-1,83	-9,93	NA	-9,70	-20,66	-7,66	-0,73
4	MUT	548B	5,79	-6,49	-2,07	NA	NA	-7,57	-14,84	-2,98	-0,92

run	status	vz.	B2M	HPRT	GUSB	GZMA	CD3D	LAG	LPL	ZAP	Δ Ct Ref
2	UNMUT	134	4,85	-7,49	-2,70	NA	-13,12	-11,97	-16,79	-5,21	-1,78
2	UNMUT	138	6,37	-5,18	-0,96	-17,79	NA	-5,23	-2,53	0,66	0,08
2	UNMUT	196	6,43	-6,24	-1,10	-11,01	NA	-11,44	-1,53	1,12	-0,30
2	UNMUT	199	7,05	-5,84	-1,23	-15,17	NA	-11,39	-22,07	-3,74	-0,01
2	UNMUT	233	6,83	-5,24	-0,83	-10,60	NA	0,63	-0,64	1,86	0,26
2	UNMUT	237	7,23	-5,20	-0,85	-11,18	NA	-0,81	-1,54	2,07	0,39
2	UNMUT	258	5,76	-6,41	-1,74	-9,23	NA	-4,14	-2,40	0,98	-0,79
2	UNMUT	284	6,83	-4,92	-0,45	-20,36	NA	-1,25	-1,81	1,38	0,49
2	UNMUT	285	6,83	-6,12	-1,07	-11,42	NA	-5,50	-1,51	1,34	-0,12
2	UNMUT	334	6,48	-5,20	-1,31	-19,22	NA	-3,42	-12,40	0,55	-0,01
2	UNMUT	364	5,94	-5,83	-1,02	-15,01	NA	-2,06	-2,50	1,44	-0,30
2	UNMUT	370	6,47	-5,17	-0,87	-12,67	NA	-6,18	-3,11	1,45	0,15
1	UNMUT	375	6,12	-6,49	-0,44	-11,20	NA	-2,68	-2,96	-5,16	-0,27
3	UNMUT	387	6,60	-4,93	-0,96	-11,57	NA	0,89	-2,09	0,97	0,24
3	UNMUT	388	6,25	-6,76	-1,67	-8,95	NA	0,20	-2,68	1,26	-0,72
3	UNMUT	392	6,22	-5,99	-1,21	NA	NA	-4,79	-2,75	0,68	-0,32
3	UNMUT	395	7,46	-4,81	-0,15	-13,31	NA	1,04	-1,27	1,61	0,83
3	UNMUT	396	7,07	-5,57	-0,48	NA	-10,65	-0,01	-1,01	1,55	0,34
3	UNMUT	399	4,80	-7,94	-3,61	-14,99	NA	-6,40	-4,40	-2,41	-2,25
3	UNMUT	404	5,25	-6,46	-1,95	-11,09	-17,21	-3,75	-2,52	0,34	-1,05
3	UNMUT	408	7,01	-5,41	-2,26	-14,19	NA	0,45	-1,26	1,76	-0,22
3	UNMUT	416	7,87	-4,45	-0,24	-13,96	NA	-1,25	-0,91	1,20	1,06
3	UNMUT	441	6,94	-5,15	-0,41	-12,26	-20,98	-0,12	-1,29	1,68	0,46
3	UNMUT	442	7,45	-4,96	0,03	-10,72	NA	-0,81	-1,73	2,07	0,84
3	UNMUT	443	7,26	-4,33	-0,15	-11,89	NA	-4,07	-1,52	2,14	0,93
3	UNMUT	445	7,86	-4,85	-0,12	NA	-19,37	1,01	-0,99	2,15	0,96
3	UNMUT	447	7,30	-4,75	-0,54	-11,43	NA	-2,44	-6,34	1,25	0,67
3	UNMUT	451	7,77	-4,53	-0,19	-14,80	NA	0,49	-1,38	2,01	1,02
3	UNMUT	474	7,70	-4,47	0,61	-9,17	NA	-1,19	-1,44	0,97	1,28
3	UNMUT	485	6,42	-5,85	-0,88	-13,02	NA	-1,37	-3,18	1,60	-0,10
3	UNMUT	486	6,57	-5,60	-0,79	-12,95	NA	-0,15	-2,21	1,99	0,06
3	UNMUT	490	7,46	-5,12	-0,29	-10,38	NA	-0,05	-1,31	2,45	0,69
3	UNMUT	499	7,90	-4,45	-0,23	-14,41	NA	0,95	-1,60	2,78	1,07
3	UNMUT	511	7,49	-5,01	0,05	-14,59	NA	-3,54	-1,18	-4,65	0,85
3	UNMUT	539	6,87	-5,58	-1,81	-9,39	NA	-1,45	-2,08	-0,82	-0,18
3	UNMUT	564	7,96	-4,10	0,61	-11,58	NA	-2,86	-0,64	2,36	1,49
5	UNMUT	567	6,65	-5,35	-1,40	NA	NA	-4,18	-3,24	-2,49	-0,03
5	UNMUT	568	6,60	-6,23	-1,83	-12,55	-24,22	-3,83	-2,05	-2,35	-0,49
5	UNMUT	570	5,86	-6,00	-2,19	NA	NA	-5,68	-12,14	-5,25	-0,77
5	UNMUT	573	6,49	-5,80	-1,81	-21,64	-23,51	-8,23	-4,22	-3,02	-0,37
5	UNMUT	574	6,31	-5,95	-1,93	-17,85	NA	-1,59	-2,65	-3,03	-0,52
5	UNMUT	580	6,74	-5,86	-1,29	-13,28	NA	-2,24	-1,71	1,28	-0,14
5	UNMUT	581	5,68	-5,79	-1,05	-14,51	NA	-6,50	-3,90	1,84	-0,39
5	UNMUT	589	6,91	-5,54	-0,53	-9,00	NA	0,49	-0,31	1,89	0,28
5	UNMUT	594	6,42	-5,90	-0,79	-12,96	NA	-0,80	-2,32	1,56	-0,09
5	UNMUT	618	6,24	-5,91	-0,78	-11,41	NA	-2,70	-2,62	1,45	-0,15
5	UNMUT	627	5,80	-6,65	-1,64	-11,16	-22,69	-2,29	-1,56	-1,42	-0,83
5	UNMUT	631	6,68	-5,67	-0,68	NA	NA	1,51	-1,59	2,16	0,11
5	UNMUT	632	6,37	-5,89	-0,93	-17,15	NA	-3,26	-0,88	1,43	-0,15
5	UNMUT	634	6,47	-6,23	-1,27	NA	NA	-5,45	-1,97	1,32	-0,34
5	UNMUT	644	5,94	-6,33	-1,30	NA	NA	-1,24	-2,87	-2,87	-0,56
5	UNMUT	646	6,51	-5,72	-1,02	-8,07	NA	-4,41	-2,99	1,54	-0,08
5	UNMUT	649	6,15	-6,02	-1,03	-9,39	NA	-1,02	-0,62	1,77	-0,30
5	UNMUT	661	6,60	-5,67	-1,33	NA	NA	-1,31	-8,20	-1,49	-0,13
5	UNMUT	677	6,38	-5,30	-0,68	-14,88	NA	-0,07	-2,70	0,70	0,13
5	UNMUT	678	6,54	-5,11	-0,41	-16,10	NA	-0,54	-0,91	1,87	0,34
5	UNMUT	680	6,34	-5,33	-0,42	-12,42	NA	-0,31	-4,49	1,96	0,20
5	UNMUT	683	7,06	-5,04	-0,71	-7,74	-22,78	0,23	-1,96	1,20	0,44
5	UNMUT	692	4,93	-7,26	-2,42	-16,14	NA	-4,82	-3,33	0,16	-1,58
5	UNMUT	694	6,92	-5,78	-0,82	-10,34	NA	0,68	-2,33	1,94	0,10

Tabulka 7: Normalizované hodnoty delta delta Ct prediktivních genů

run	status	vz.	nLAG	nLPL	nZAP	nALL	run	status	vz.	nLAG	nLPL	nZAP	nALL
1	MUT	145	-3,92	-6,23	-3,31	-4,49	2	UNMUT	134	-10,19	-15,01	-3,43	-9,54
1	MUT	158	-3,33	-18,92	1,12	-7,04	2	UNMUT	138	-5,31	-2,61	0,58	-2,45
1	MUT	165	-7,46	-20,00	0,56	-8,96	2	UNMUT	196	-11,14	-1,22	1,42	-3,65
1	MUT	187	-3,71	-12,09	-3,57	-6,46	2	UNMUT	199	-11,38	-22,06	-3,74	-12,39
1	MUT	206	-3,78	-20,00	-2,12	-8,63	2	UNMUT	233	0,37	-0,90	1,60	0,36
1	MUT	251	-0,54	-20,00	-0,10	-6,88	2	UNMUT	237	-1,20	-1,93	1,67	-0,49
1	MUT	301	-6,74	-20,00	-4,46	-10,40	2	UNMUT	258	-3,35	-1,60	1,77	-1,06
1	MUT	314	-4,57	-20,00	-2,08	-8,88	2	UNMUT	284	-1,73	-2,30	0,89	-1,05
1	MUT	337	-1,79	-7,45	-1,50	-3,58	2	UNMUT	285	-5,38	-1,39	1,46	-1,77
1	MUT	338	-1,53	-4,34	-0,13	-2,00	2	UNMUT	334	-3,41	-12,39	0,56	-5,08
1	MUT	346	-1,70	-20,00	-0,46	-7,39	2	UNMUT	364	-1,76	-2,19	1,74	-0,74
1	MUT	348	-6,97	-7,09	-3,93	-6,00	2	UNMUT	370	-6,32	-3,26	1,30	-2,76
1	MUT	356	-9,16	-14,15	-4,48	-9,26	1	UNMUT	375	-2,41	-2,69	-4,89	-3,33
1	MUT	363	-3,36	-7,24	0,09	-3,50	3	UNMUT	387	0,65	-2,33	0,73	-0,31
1	MUT	372	-7,83	-8,03	-3,85	-6,57	3	UNMUT	388	0,92	-1,96	1,98	0,32
1	MUT	377	-4,35	-8,97	-2,67	-5,33	3	UNMUT	392	-4,46	-2,42	1,00	-1,96
1	MUT	378	-1,59	-20,00	-1,45	-7,68	3	UNMUT	395	0,21	-2,10	0,77	-0,37
1	MUT	381	-1,99	-2,47	-2,20	-2,22	3	UNMUT	396	-0,35	-1,35	1,21	-0,16
1	MUT	386	-4,73	-20,00	-2,85	-9,19	3	UNMUT	399	-4,15	-2,15	-0,15	-2,15
1	MUT	398	-3,64	-6,24	-2,35	-4,07	3	UNMUT	404	-2,70	-1,47	1,39	-0,92
1	MUT	406	0,44	-7,93	-0,59	-2,70	3	UNMUT	408	0,67	-1,04	1,98	0,54
1	MUT	414	-2,74	-14,62	-2,17	-6,51	3	UNMUT	416	-2,31	-1,97	0,14	-1,38
1	MUT	418	-5,64	-20,00	-4,25	-9,96	3	UNMUT	441	-0,58	-1,75	1,22	-0,37
2	MUT	428	-3,45	-20,00	-6,52	-9,99	3	UNMUT	442	-1,65	-2,57	1,22	-1,00
2	MUT	429	-0,48	-21,46	-4,28	-8,74	3	UNMUT	443	-5,00	-2,45	1,21	-2,08
2	MUT	437	-6,46	-9,44	0,83	-5,02	3	UNMUT	445	0,05	-1,95	1,18	-0,24
2	MUT	449	-3,16	-4,22	-1,93	-3,10	3	UNMUT	447	-3,11	-7,01	0,58	-3,18
2	MUT	496	-1,24	-12,35	-4,21	-5,93	3	UNMUT	451	-0,52	-2,39	0,99	-0,64
2	MUT	523	-1,74	-4,52	-0,17	-2,14	3	UNMUT	474	-2,47	-2,72	-0,31	-1,83
2	MUT	542	-6,93	-14,05	-3,52	-8,17	3	UNMUT	485	-1,27	-3,08	1,70	-0,88
2	MUT	544	-0,64	-11,87	0,10	-4,14	3	UNMUT	486	-0,21	-2,27	1,93	-0,18
2	MUT	546	-2,36	-15,15	-1,07	-6,19	3	UNMUT	490	-0,73	-1,99	1,77	-0,32
2	MUT	552	-1,64	-13,82	-4,82	-6,76	3	UNMUT	499	-0,12	-2,67	1,71	-0,36
2	MUT	555	-6,92	-16,04	-4,06	-9,00	3	UNMUT	511	-4,39	-2,03	-5,50	-3,97
4	MUT	557	-5,54	-15,34	-8,13	-9,67	3	UNMUT	539	-1,27	-1,91	-0,65	-1,28
5	MUT	578	-9,08	-20,00	0,96	-9,37	3	UNMUT	564	-4,35	-2,13	0,87	-1,87
4	MUT	645	-7,75	-13,82	-3,06	-8,21	5	UNMUT	567	-4,14	-3,21	-2,46	-3,27
4	MUT	675	-11,86	-20,00	-3,18	-11,68	5	UNMUT	568	-3,34	-1,56	-1,86	-2,25
4	MUT	695	-6,95	-5,44	-6,14	-6,17	5	UNMUT	570	-4,91	-11,37	-4,48	-6,92
4	MUT	703	-7,41	-5,82	-6,75	-6,66	5	UNMUT	573	-7,86	-3,85	-2,65	-4,79
4	MUT	726	-6,61	-9,60	-3,31	-6,50	5	UNMUT	574	-1,06	-2,13	-2,51	-1,90
4	MUT	781	-7,29	-11,90	-7,60	-8,93	5	UNMUT	580	-2,10	-1,57	1,41	-0,75
4	MUT	787	-5,85	-3,65	-8,20	-5,90	5	UNMUT	581	-6,12	-3,51	2,23	-2,47
4	MUT	790	-5,58	-3,89	-2,58	-4,02	5	UNMUT	589	0,22	-0,59	1,61	0,41
4	MUT	793	-7,28	-8,46	-3,89	-6,54	5	UNMUT	594	-0,71	-2,23	1,65	-0,43
4	MUT	800	-9,36	-5,46	-5,94	-6,92	5	UNMUT	618	-2,55	-2,47	1,60	-1,14
4	MUT	801	-7,54	-0,91	-2,22	-3,56	5	UNMUT	627	-1,46	-0,73	-0,59	-0,93
4	MUT	802	-3,77	-12,47	-3,80	-6,68	5	UNMUT	631	1,40	-1,70	2,05	0,58
4	MUT	820	-4,88	-20,00	-3,76	-9,55	5	UNMUT	632	-3,11	-0,73	1,58	-0,76
4	MUT	821	-5,77	-3,35	-2,15	-3,76	5	UNMUT	634	-5,11	-1,63	1,66	-1,69
4	MUT	826	-5,72	-20,00	-8,50	-11,41	5	UNMUT	644	-0,68	-2,31	-2,31	-1,77
4	MUT	827	-4,52	-9,65	-3,09	-5,75	5	UNMUT	646	-4,34	-2,91	1,62	-1,88
4	MUT	828	-7,77	-14,17	-2,59	-8,17	5	UNMUT	649	-0,72	-0,32	2,07	0,34
4	MUT	845	-11,57	-12,06	-3,46	-9,03	5	UNMUT	661	-1,18	-8,07	-1,36	-3,54
4	MUT	846	-11,40	-4,83	-6,26	-7,50	5	UNMUT	677	-0,21	-2,84	0,56	-0,83
4	MUT	853	-10,54	-12,63	-7,05	-10,07	5	UNMUT	678	-0,88	-1,25	1,53	-0,20
4	MUT	855	-3,74	-13,96	-6,80	-8,17	5	UNMUT	680	-0,51	-4,69	1,76	-1,14
4	MUT	857	-8,65	-20,00	-4,63	-11,10	5	UNMUT	683	-0,21	-2,39	0,76	-0,61
4	MUT	865	-8,97	-19,93	-6,93	-11,94	5	UNMUT	692	-3,24	-1,75	1,74	-1,08
4	MUT	548B	-6,65	-13,92	-2,06	-7,55	5	UNMUT	694	0,58	-2,44	1,83	-0,01

Tabulka 8: Srovnání exprese jednotlivých genů s mutačním statutem genu pro IGVH

prah. hodnota	-5,45	-3,35	0,25	-3,30	2,00	prah. hodnota	-5,45	-3,35	0,25	-3,30	2,00		
TP	54	51	44	55	54	TP	54	51	44	55	54		
TN	31	58	56	51	58	TN	31	58	56	51	58		
FP	29	2	4	9	2	FP	29	2	4	9	2		
FN	6	9	16	5	6	FN	6	9	16	5	6		
senzitivita	0,90	0,85	0,73	0,92	0,90	senzitivita	0,90	0,85	0,73	0,92	0,90		
specifcita	0,52	0,97	0,93	0,85	0,97	specifcita	0,52	0,97	0,93	0,85	0,97		
procento shody	70,8%	90,8%	83,3%	88,3%	93,3%	procento shody	70,8%	90,8%	83,3%	88,3%	93,3%		
status	vz.	nLAG	nLPL	nZAP	nALL	EP ALL	status	vz.	nLAG	nLPL	nZAP	nALL	EP ALL
MUT 145	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 134	FN	FN	FN	FN	FN	FN
MUT 158	FP	TN	FP	TN	FP	FP	UNMUT 138	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 165	TN	TN	FP	TN	TN	TN	UNMUT 196	FN	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 187	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 199	FN	FN	FN	FN	FN	FN
MUT 206	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 233	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 251	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 237	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 301	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 258	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 314	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 284	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 337	FP	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 285	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 338	FP	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 334	TP	FN	TP	FN	TP	TP
MUT 346	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 364	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 348	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 370	FN	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 356	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 375	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 363	FP	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 387	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 372	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 388	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 377	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 392	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 378	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 395	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 381	FP	FP	TN	FP	FP	FP	UNMUT 396	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 386	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 399	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 398	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 404	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 406	FP	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 408	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 414	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 416	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 418	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 441	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 428	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 442	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 429	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 443	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 437	TN	TN	FP	TN	TN	TN	UNMUT 445	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 449	FP	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 447	TP	FN	TP	TP	TP	TP
MUT 496	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 451	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 523	FP	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 474	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 542	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 485	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 544	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 486	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 546	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 490	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 552	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 499	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 555	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 511	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 557	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 539	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 578	TN	TN	FP	TN	TN	TN	UNMUT 564	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 645	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 567	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 675	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 568	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 695	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 570	TP	FN	FN	FN	FN	FN
MUT 703	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 573	FN	FN	FN	FN	FN	FN
MUT 726	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 574	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 781	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 580	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 787	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 581	FN	FN	TP	TP	FN	FN
MUT 790	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 589	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 793	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 594	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 800	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 618	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 801	TN	FP	TN	FP	TN	TN	UNMUT 627	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 802	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 631	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 820	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 632	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 821	TN	TN	TN	FP	TN	TN	UNMUT 634	TP	TP	TP	TP	TP	TP
MUT 826	TN	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 644	TP	TP	FN	TP	TP	TP
MUT 827	FP	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT 646	TP	TP	TP	TP	TP	TP

status	vz.	nLAG	nLPL	nZAP	nALL	EP ALL	status	vz.	nLAG	nLPL	nZAP	nALL	EP ALL
MUT	828	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	649	TP	TP	TP	TP	TP
MUT	845	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	661	TP	FN	FN	TP	FN
MUT	846	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	677	TP	TP	TP	TP	TP
MUT	853	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	678	TP	TP	TP	TP	TP
MUT	855	FP	TN	TN	TN	TN	UNMUT	680	TP	FN	TP	TP	TP
MUT	857	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	683	TP	TP	TP	TP	TP
MUT	865	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	692	TP	TP	TP	TP	TP
MUT	548B	TN	TN	TN	TN	TN	UNMUT	694	TP	TP	TP	TP	TP

Tabulka 9: Hodnota poměrné exprese jednotlivých genů vůči kalibrátoru

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP	ExR Ref
1	MUT	145	95,17	0,0211969	0,349089	0,0587541	0,0118621	0,089674	0,8896988
1	MUT	158	47,807553	0,007239	0,1544273	0,0375294	7,6E-07	0,816486	0,3766741
1	MUT	165	68,712468	0,0108713	0,3507058	0,0036468		0,9444197	0,6398623
1	MUT	187	69,510869	0,0137286	0,3507058	0,0530746	0,0001591	0,0583483	0,6942904
1	MUT	206	63,521218	0,0147822	0,3855527	0,0519824		0,1635156	0,7127109
1	MUT	251	37,422482	0,0089122	0,2549583	0,3030232		0,4101338	0,4397399
1	MUT	301	148,65594	0,0333385	0,5925464	0,0134228		0,0651918	1,4320239
1	MUT	314	79,84702	0,0193704	0,4347727	0,0370128		0,2069709	0,8760995
1	MUT	337	85,775873	0,0183255	0,3864446	0,2444311	0,0048398	0,3002355	0,8469084
1	MUT	338	87,780789	0,0159533	0,4028552	0,2860158	0,0407375	0,7565462	0,8262912
1	MUT	346	47,04056	0,0093769	0,2297813	0,1433387		0,3385639	0,4662471
1	MUT	348	72,630318	0,0113854	0,2445724	0,0046804	0,0043218	0,0384067	0,5869823
1	MUT	356	71,796088	0,0171379	0,3340957	0,0013043	4,09E-05	0,0334349	0,7435491
1	MUT	363	133,66704	0,0325771	0,6092051	0,1349815	0,0091363	1,4717167	1,3843096
1	MUT	372	57,913723	0,0120904	0,3371977	0,0027131	0,0023701	0,0429113	0,6180662
1	MUT	377	102,00528	0,0347543	0,4948283	0,0592996	0,0024087	0,1891365	1,20604
1	MUT	378	66,525398	0,0184957	0,3672922	0,2554005		0,2807776	0,7674026
1	MUT	381	33,883242	0,0052384	0,1655111	0,0778856	0,055649	0,0670245	0,3085575
1	MUT	386	63,228365	0,0139203	0,3287357	0,0249324		0,0918761	0,6614074
1	MUT	398	77,127138	0,0137922	0,3197464	0,0559714	0,0092639	0,1371823	0,6980435
1	MUT	406	50,300471	0,0103325	0,2434448	0,6786941	0,0020538	0,3323634	0,5020258
1	MUT	414	80,588384	0,0157701	0,3348685	0,1127214	2,994E-05	0,1677247	0,7521888
1	MUT	418	45,754234	0,0071228	0,1251445	0,0069161		0,0181255	0,3442167
2	MUT	428	69,430613	0,013361	0,2981617	0,0595399		0,0071187	0,6515485
2	MUT	429	87,679439	0,014221	0,3889078	0,5638305	2,723E-07	0,0403627	0,7856423
2	MUT	437	75,977482	0,0148592	0,339347	0,0082771	0,0010454	1,2886258	0,7262867
2	MUT	449	86,472331	0,0123515	0,316622	0,0780207	0,0374645	0,1833281	0,6967008
2	MUT	496	147,11834	0,0196068	0,5733548	0,5023158	0,0002265	0,0640718	1,1825855
2	MUT	523	65,837303	0,0110805	0,3108233	0,1825884	0,0266141	0,54055	0,6097919
2	MUT	542	59,198963	0,0146546	0,2940568	0,0051902	3,736E-05	0,0552646	0,6342201
2	MUT	544	68,791894	0,0167949	0,2995426	0,4506252	0,0001874	0,7539287	0,7020872
2	MUT	546	96,168999	0,0177115	0,4956865	0,1842837	2,605E-05	0,450365	0,9451473
2	MUT	552	99,560392	0,0243067	0,4508856	0,329877	7,117E-05	0,0364611	1,0295004
2	MUT	555	76,505947	0,0175892	0,2906793	0,0060452	1,088E-05	0,043965	0,7313384
4	MUT	557	79,043961	0,0119446	0,2199123	0,0126988	1,431E-05	0,0021115	0,5921472
5	MUT	578	27,793328	0,0063659	0,1896836	0,0005956		0,6295968	0,3225599
4	MUT	645	49,222635	0,010021	0,2224675	0,0022191	3,311E-05	0,0574785	0,4787555
4	MUT	675	63,907647	0,0111705	0,3387595	0,0001676		0,0688293	0,6230246
4	MUT	695	61,588254	0,0117258	0,229251	0,0044381	0,0126695	0,007808	0,5490993
4	MUT	703	64,650218	0,0086835	0,150552	0,0025846	0,0077451	0,0040792	0,4388517
4	MUT	726	77,238594	0,0188299	0,267634	0,0074986	0,0009417	0,0737694	0,7301425
4	MUT	781	54,113501	0,0129806	0,2855206	0,0037406	0,0001532	0,0030139	0,5853458
4	MUT	787	44,361923	0,0078623	0,1832223	0,0069161	0,0318514	0,0013581	0,399803
4	MUT	790	64,501017	0,0112222	0,3450793	0,0131466	0,0425165	0,1052944	0,6297786
4	MUT	793	42,260854	0,007917	0,1941172	0,0025846	0,0011434	0,0270636	0,4019642
4	MUT	800	44,055493	0,0100674	0,2664001	0,0007491	0,0111576	0,0079721	0,4907012
4	MUT	801	67,864413	0,0100674	0,397309	0,003474	0,3440841	0,1386161	0,6474841
4	MUT	802	82,400623	0,017128	0,3364195	0,0570156	0,0001374	0,0561657	0,7801403

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP	ExR Ref
4	MUT	820	82,210457	0,0187431	0,3379777	0,0273465		0,0592312	0,8045478
4	MUT	821	76,882499	0,0190927	0,349089	0,0146208	0,0782463	0,1799706	0,800222
4	MUT	826	59,216063	0,0121674	0,3379777	0,011821		0,001727	0,6244658
4	MUT	827	55,25054	0,0135006	0,3317879	0,0273465	0,0007809	0,0737694	0,6278415
4	MUT	828	78,679543	0,0114052	0,3219704	0,0030383	3,598E-05	0,1100197	0,6610891
4	MUT	845	46,567451	0,0092212	0,2134051	0,0001486	0,0001054	0,0408317	0,4508422
4	MUT	846	78,136063	0,0171676	0,3784916	0,0002952	0,0281153	0,0103744	0,7977606
4	MUT	853	89,962385	0,0176911	0,2848617	0,0005152	0,0001216	0,0057956	0,7682157
4	MUT	855	59,079403	0,0105435	0,1959196	0,0370984	3,103E-05	0,0044638	0,4960207
4	MUT	857	78,861541	0,0124806	0,327977	0,0017052		0,0276323	0,6859855
4	MUT	865	66,008657	0,0116718	0,2822411	0,001203	6,039E-07	0,0049301	0,6013388
4	MUT	548B	55,506443	0,0111447	0,2384348	0,0052535	3,404E-05	0,1263794	0,5283564
2	UNMUT	134	28,856678	0,0055659	0,1536266	0,0002493	8,835E-06	0,0269389	0,2911273
2	UNMUT	138	82,75837	0,0276643	0,5143539	0,0267065	0,1729388	1,5755257	1,0560009
2	UNMUT	196	86,272768	0,0132687	0,4678658	0,0003599	0,3474796	2,1722146	0,812096
2	UNMUT	199	132,28448	0,0174274	0,4255793	0,0003718	2,274E-07	0,0746266	0,9936663
2	UNMUT	233	113,8376	0,0264761	0,5641562	1,547565	0,640972	3,6196077	1,1935655
2	UNMUT	237	149,86296	0,0272834	0,5538242	0,5717012	0,3434884	4,1867574	1,3131717
2	UNMUT	258	54,348438	0,0117394	0,3002355	0,0567199	0,1901223	1,9667769	0,5764542
2	UNMUT	284	113,8376	0,0330509	0,7324658	0,4214208	0,2855206	2,6011808	1,4020133
2	UNMUT	285	113,57488	0,0143862	0,4765942	0,0221482	0,3515171	2,5242124	0,9200105
2	UNMUT	334	89,31517	0,0272204	0,4035539	0,0936442	0,0001848	1,4598634	0,9936663
2	UNMUT	364	61,57047	0,0175486	0,4922626	0,2392626	0,1773904	2,7053839	0,8102218
2	UNMUT	370	88,903399	0,0277924	0,547463	0,0138241	0,1156898	2,7305029	1,1059436
1	UNMUT	375	69,671658	0,0111511	0,7362835	0,1561315	0,1287371	0,0280504	0,8301183
3	UNMUT	387	97,230251	0,0327469	0,5128706	1,8542469	0,234474	1,9588406	1,1775867
3	UNMUT	388	76,109255	0,0092532	0,3149803	1,1493621	0,1557712	2,3894303	0,6053466
3	UNMUT	392	74,715379	0,0157792	0,4322686	0,0362511	0,1490808	1,5984423	0,7987596
3	UNMUT	395	176,47663	0,0355871	0,8991705	2,0621749	0,4158591	3,0454737	1,7807685
3	UNMUT	396	134,67454	0,0210627	0,715323	0,9959648	0,4979824	2,9214137	1,2660003
3	UNMUT	399	27,793328	0,0040651	0,0818996	0,011821	0,0473935	0,1885911	0,209941
3	UNMUT	404	37,966804	0,0113395	0,2594149	0,0741968	0,1744437	1,2657566	0,4815753
3	UNMUT	408	129,18845	0,0234788	0,208772	1,3699912	0,4177852	3,3791647	0,8587308
3	UNMUT	416	233,94085	0,0456735	0,8447912	0,4206911	0,5324926	2,2920947	2,0821234
3	UNMUT	441	123,06983	0,0281803	0,7508865	0,9228491	0,408243	3,1968846	1,3758067
3	UNMUT	442	175,25762	0,0321471	1,0233739	0,5720316	0,3016261	4,1891765	1,7931548
3	UNMUT	443	153,63183	0,0496349	0,9033352	0,0594368	0,3480822	4,4076205	1,9027098
3	UNMUT	445	232,86231	0,0347743	0,918064	2,0197359	0,504934	4,4280351	1,9516877
3	UNMUT	447	157,58648	0,0371842	0,6861837	0,1839646	0,012323	2,3729253	1,5901542
3	UNMUT	451	218,27453	0,0432097	0,8786335	1,4085069	0,3853301	4,0185267	2,0236285
3	UNMUT	474	207,45673	0,0450447	1,5297897	0,437544	0,3696333	1,9633717	2,4269875
3	UNMUT	485	85,825433	0,0173872	0,5446243	0,3871148	0,110657	3,0244371	0,9332127
3	UNMUT	486	95,229281	0,0206292	0,5796819	0,9038571	0,2167594	3,9815587	1,0442738
3	UNMUT	490	176,47663	0,0287725	0,819794	0,9687301	0,4044874	5,4768005	1,6086309
3	UNMUT	499	238,85645	0,0456735	0,8526349	1,9374602	0,3308311	6,8844115	2,1030746
3	UNMUT	511	180,18478	0,0310521	1,0376597	0,086021	0,4416065	0,03983	1,7973026
3	UNMUT	539	116,70048	0,0208689	0,2851909	0,3662329	0,2361049	0,5651347	0,885597
3	UNMUT	564	249,57564	0,0583483	1,5227369	0,1374997	0,6420837	5,1218559	2,8094306
5	UNMUT	567	100,42676	0,0244829	0,3802447	0,0552966	0,105782	0,1779035	0,9778187
5	UNMUT	568	96,781988	0,0133032	0,2815897	0,0704788	0,2419029	0,1964862	0,713054
5	UNMUT	570	58,081226	0,0156385	0,2199123	0,0195052	0,0002209	0,0262628	0,5845574
5	UNMUT	573	90,092389	0,0179225	0,286181	0,0033229	0,0537534	0,1232079	0,7731124
5	UNMUT	574	79,341293	0,0162275	0,2621262	0,3329398	0,1595964	0,1220745	0,6962314
5	UNMUT	580	106,64457	0,0172721	0,4080072	0,212176	0,3061902	2,4213864	0,9091807
5	UNMUT	581	51,268472	0,0180472	0,4824105	0,011023	0,067102	3,5780329	0,7642324
5	UNMUT	589	119,98138	0,0214618	0,6901587	1,4076936	0,806176	3,704212	1,2112761
5	UNMUT	594	85,429751	0,016761	0,5776763	0,5743492	0,2006148	2,940035	0,9387091
5	UNMUT	618	75,58353	0,0166837	0,5816944	0,1535379	0,1629499	2,7305029	0,901858
5	UNMUT	627	55,586655	0,0099661	0,320486	0,2040036	0,3389552	0,3726345	0,5620421
5	UNMUT	631	102,30031	0,0196579	0,6263322	2,8415275	0,3319796	4,4614108	1,0799558
5	UNMUT	632	82,710581	0,0168386	0,525465	0,1041451	0,5418004	2,6866965	0,9011637
5	UNMUT	634	88,852061	0,0133032	0,4160994	0,0228235	0,2551056	2,4894609	0,7893571

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP	ExR Ref
5	UNMUT	644	61,534915	0,012441	0,4075362	0,4223956	0,1363922	0,1367077	0,6782369
5	UNMUT	646	90,928879	0,0189444	0,4936864	0,0469304	0,1257968	2,9129885	0,9474248
5	UNMUT	649	70,848562	0,0153876	0,4914103	0,4919783	0,6487944	3,4164547	0,8121742
5	UNMUT	661	97,00586	0,0197033	0,398228	0,4023901	0,0033908	0,355807	0,91304
5	UNMUT	677	83,09367	0,0253463	0,6248868	0,9504395	0,1534492	1,6198198	1,0958751
5	UNMUT	678	93,054241	0,028981	0,7508865	0,6861837	0,5318778	3,653215	1,2651475
5	UNMUT	680	81,195808	0,0248821	0,7448387	0,8066418	0,0443732	3,8883731	1,145937
5	UNMUT	683	133,43562	0,0304922	0,6092051	1,1701283	0,2574742	2,2960701	1,3533432
5	UNMUT	692	30,554931	0,0065147	0,1870721	0,0354026	0,0991553	1,1140649	0,3339349
5	UNMUT	694	121,09538	0,0181727	0,5644822	1,6058458	0,1983105	3,8348407	1,0749768

Tabulka 10: Poměr exprese jednotlivých genů vůči expresi kalibrátoru normalizované průměrnou hodnotou exprese referenčních genů

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
1	MUT	145	106,97361	0,0238249	0,3923676	0,0660382	0,0133327	0,1007914
1	MUT	158	126,92019	0,0192181	0,4099759	0,0996337	2,018E-06	2,1676189
1	MUT	165	107,38634	0,01699	0,5480958	0,0056993		1,4759733
1	MUT	187	100,11786	0,0197736	0,5051285	0,0764444	0,0002292	0,0840401
1	MUT	206	89,126205	0,0207407	0,5409665	0,0729361		0,2294276
1	MUT	251	85,101409	0,020267	0,5797935	0,6890964		0,9326738
1	MUT	301	103,80828	0,0232807	0,4137825	0,0093733		0,0455242
1	MUT	314	91,139213	0,0221099	0,4962595	0,0422472		0,2362413
1	MUT	337	101,28117	0,0216382	0,4563003	0,2886158	0,0057147	0,3545077
1	MUT	338	106,23469	0,0193071	0,4875463	0,346144	0,0493016	0,9155926
1	MUT	346	100,89191	0,0201115	0,4928316	0,3074307		0,7261469
1	MUT	348	123,73511	0,0193966	0,4166606	0,0079736	0,0073627	0,0654307
1	MUT	356	96,558632	0,0230488	0,4493257	0,0017542	5,501E-05	0,0449667
1	MUT	363	96,558632	0,0235331	0,4400787	0,0975082	0,0065999	1,0631413
1	MUT	372	93,701485	0,0195616	0,5455689	0,0043897	0,0038347	0,0694283
1	MUT	377	84,578685	0,0288168	0,4102918	0,0491689	0,0019972	0,1568244
1	MUT	378	86,689045	0,0241017	0,4786173	0,3328116		0,3658805
1	MUT	381	109,81177	0,016977	0,5364029	0,2524184	0,1803522	0,217219
1	MUT	386	95,596698	0,0210465	0,4970245	0,037696		0,13891
1	MUT	398	110,49044	0,0197584	0,4580608	0,0801832	0,0132712	0,196524
1	MUT	406	100,195	0,0205816	0,4849249	1,3519108	0,004091	0,6620445
1	MUT	414	107,13851	0,0209656	0,4451921	0,1498579	3,981E-05	0,2229821
1	MUT	418	132,92277	0,0206929	0,3635631	0,0200922		0,0526573
2	MUT	428	106,56247	0,0205065	0,4576201	0,0913821		0,0109258
2	MUT	429	111,60224	0,0181011	0,4950189	0,7176682	3,466E-07	0,0513754
2	MUT	437	104,61086	0,0204591	0,4672356	0,0113964	0,0014394	1,7742659
2	MUT	449	124,11688	0,0177286	0,4544591	0,1119859	0,0537741	0,2631375
2	MUT	496	124,40398	0,0165796	0,4848316	0,4247607	0,0001915	0,0541794
2	MUT	523	107,96684	0,018171	0,5097203	0,2994273	0,0436445	0,88645
2	MUT	542	93,341351	0,0231065	0,463651	0,0081836	5,89E-05	0,0871379
2	MUT	544	97,981973	0,0239214	0,4266459	0,6418365	0,0002669	1,0738391
2	MUT	546	101,75028	0,0187394	0,5244543	0,1949788	2,756E-05	0,4765025
2	MUT	552	96,707479	0,0236102	0,4379654	0,3204243	6,913E-05	0,0354163
2	MUT	555	104,61086	0,0240507	0,397462	0,0082659	1,487E-05	0,0601158
4	MUT	557	133,48701	0,0201716	0,3713811	0,0214453	2,417E-05	0,0035659
5	MUT	578	86,164863	0,0197356	0,5880569	0,0018465		1,9518756
4	MUT	645	102,81371	0,0209313	0,4646787	0,0046351	6,915E-05	0,1200582
4	MUT	675	102,57644	0,0179294	0,5437337	0,000269		0,1104761
4	MUT	695	112,16233	0,0213547	0,4175038	0,0080826	0,0230732	0,0142196
4	MUT	703	147,31676	0,019787	0,3430588	0,0058895	0,0176486	0,0092952
4	MUT	726	105,78564	0,0257893	0,3665504	0,01027	0,0012897	0,1010343
4	MUT	781	92,447061	0,0221759	0,487781	0,0063905	0,0002617	0,0051489
4	MUT	787	110,95946	0,0196654	0,4582814	0,0172987	0,0796677	0,003397
4	MUT	790	102,41856	0,0178193	0,5479375	0,020875	0,0675102	0,1671927

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
4	MUT	793	105,13587	0,0196957	0,4829217	0,00643	0,0028444	0,0673285
4	MUT	800	89,780693	0,0205163	0,5428968	0,0015266	0,022738	0,0162462
4	MUT	801	104,81248	0,0155485	0,6136197	0,0053655	0,5314171	0,2140842
4	MUT	802	105,62282	0,021955	0,4312295	0,0730837	0,0001761	0,0719944
4	MUT	820	102,18219	0,0232964	0,4200841	0,0339899		0,0736204
4	MUT	821	96,076461	0,0238593	0,4362401	0,0182709	0,0977808	0,2249009
4	MUT	826	94,826752	0,0194845	0,5412269	0,0189298		0,0027656
4	MUT	827	88,000782	0,0215032	0,5284581	0,0435564	0,0012438	0,1174969
4	MUT	828	119,01503	0,0172521	0,4870303	0,004596	5,442E-05	0,1664218
4	MUT	845	103,28991	0,0204532	0,4733477	0,0003297	0,0002337	0,0905676
4	MUT	846	97,94425	0,0215198	0,4744426	0,0003701	0,0352428	0,0130044
4	MUT	853	117,10563	0,0230288	0,3708095	0,0006707	0,0001583	0,0075442
4	MUT	855	119,10673	0,0212562	0,3949826	0,074792	6,256E-05	0,0089993
4	MUT	857	114,96094	0,0181937	0,4781107	0,0024858		0,0402812
4	MUT	865	109,76949	0,0194096	0,4693545	0,0020005	1,004E-06	0,0081985
4	MUT	548B	105,05493	0,0210931	0,4512764	0,0099431	6,442E-05	0,2391935
2	UNMUT	134	99,120469	0,0191185	0,5276956	0,0008562	3,035E-05	0,092533
2	UNMUT	138	78,3696	0,0261972	0,4870772	0,0252902	0,1637676	1,4919738
2	UNMUT	196	106,23469	0,0163388	0,5761213	0,0004432	0,4278799	2,6748249
2	UNMUT	199	133,12767	0,0175385	0,428292	0,0003741	2,288E-07	0,0751023
2	UNMUT	233	95,376078	0,0221823	0,4726647	1,2965899	0,5370229	3,0326007
2	UNMUT	237	114,1229	0,0207767	0,4217455	0,4353591	0,2615716	3,1882788
2	UNMUT	258	94,28059	0,0203648	0,5208316	0,0983946	0,3298135	3,4118532
2	UNMUT	284	81,195808	0,0235739	0,5224386	0,3005826	0,2036504	1,8553182
2	UNMUT	285	123,44955	0,015637	0,5180313	0,0240739	0,3820794	2,7436779
2	UNMUT	334	89,884472	0,0273939	0,4061262	0,0942411	0,000186	1,4691686
2	UNMUT	364	75,992112	0,021659	0,6075652	0,295305	0,2189406	3,3390656
2	UNMUT	370	80,386921	0,02513	0,4950189	0,0124999	0,1046073	2,4689351
1	UNMUT	375	83,929793	0,0134332	0,8869621	0,1880834	0,1550829	0,0337909
3	UNMUT	387	82,567379	0,0278084	0,4355268	1,574616	0,199114	1,6634364
3	UNMUT	388	125,72839	0,0152858	0,5203304	1,8986842	0,2573256	3,9472102
3	UNMUT	392	93,539253	0,0197546	0,5411748	0,0453842	0,1866404	2,0011556
3	UNMUT	395	99,101386	0,0199841	0,504934	1,1580252	0,2335279	1,7102019
3	UNMUT	396	106,37797	0,0166372	0,5650259	0,7867019	0,3933509	2,3075932
3	UNMUT	399	132,3864	0,019363	0,3901077	0,0563065	0,2257469	0,8983053
3	UNMUT	404	78,838768	0,0235467	0,5386798	0,1540709	0,3622355	2,6283669
3	UNMUT	408	150,44116	0,0273412	0,2431169	1,5953676	0,4865148	3,9350689
3	UNMUT	416	112,35686	0,021936	0,4057354	0,2020491	0,255745	1,1008448
3	UNMUT	441	89,452851	0,0204828	0,545779	0,6707695	0,2967299	2,3236437
3	UNMUT	442	97,737028	0,0179277	0,5707114	0,3190085	0,1682098	2,3362047
3	UNMUT	443	80,743699	0,0260865	0,4747625	0,031238	0,1829403	2,3164964
3	UNMUT	445	119,3133	0,0178176	0,4703949	1,0348663	0,2587166	2,2688236
3	UNMUT	447	99,101386	0,023384	0,4315202	0,1156898	0,0077496	1,4922611
3	UNMUT	451	107,86295	0,0213526	0,4341871	0,6960304	0,1904154	1,9858026
3	UNMUT	474	85,479111	0,0185599	0,6303245	0,1802828	0,1523013	0,8089748
3	UNMUT	485	91,967713	0,0186315	0,5836015	0,4148195	0,1185764	3,2408874
3	UNMUT	486	91,191872	0,0197546	0,5551053	0,8655366	0,2075695	3,8127537
3	UNMUT	490	109,7061	0,0178863	0,5096222	0,6022078	0,2514482	3,4046347
3	UNMUT	499	113,57488	0,0217175	0,405423	0,9212513	0,1573083	3,2734985
3	UNMUT	511	100,25289	0,017277	0,5773428	0,0478612	0,2457051	0,022161
3	UNMUT	539	131,77606	0,0235648	0,3220324	0,4135435	0,2666054	0,6381398
3	UNMUT	564	88,834955	0,0207687	0,5420091	0,0489422	0,2285459	1,8230939
5	UNMUT	567	102,70489	0,0250383	0,3888703	0,0565509	0,1081817	0,1819391
5	UNMUT	568	135,72883	0,0186566	0,3949066	0,0988408	0,339249	0,2755559
5	UNMUT	570	99,359316	0,0267528	0,376203	0,0333674	0,0003779	0,0449277
5	UNMUT	573	116,53208	0,0231823	0,3701675	0,0042981	0,0695286	0,1593661
5	UNMUT	574	113,95821	0,0233076	0,3764929	0,4782028	0,2292289	0,175336
5	UNMUT	580	117,29744	0,0189974	0,4487637	0,2333706	0,336776	2,6632622
5	UNMUT	581	67,084923	0,0236148	0,6312354	0,0144237	0,0878032	4,681865
5	UNMUT	589	99,053695	0,0177184	0,5697782	1,1621575	0,6655592	3,058107
5	UNMUT	594	91,007697	0,0178553	0,6153944	0,61185	0,2137135	3,1319981

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
5	UNMUT	618	83,808681	0,0184993	0,6449955	0,1702462	0,1806824	3,0276416
5	UNMUT	627	98,901237	0,017732	0,5702171	0,3629686	0,6030781	0,6630012
5	UNMUT	631	94,726386	0,0182025	0,579961	2,6311517	0,3074011	4,1311051
5	UNMUT	632	91,781971	0,0186854	0,5830961	0,1155673	0,601223	2,9813634
5	UNMUT	634	112,56257	0,0168532	0,527137	0,0289141	0,3231815	3,1537829
5	UNMUT	644	90,727765	0,0183432	0,6008759	0,6227848	0,2010982	0,2015634
5	UNMUT	646	95,974773	0,0199957	0,5210824	0,0495347	0,1327776	3,0746382
5	UNMUT	649	87,233209	0,0189462	0,6050553	0,6057547	0,7988365	4,2065541
5	UNMUT	661	106,24492	0,0215799	0,4361562	0,4407146	0,0037137	0,3896948
5	UNMUT	677	75,824035	0,0231288	0,5702171	0,8672882	0,1400244	1,4781063
5	UNMUT	678	73,552091	0,0229072	0,5935169	0,5423744	0,4204077	2,8875804
5	UNMUT	680	70,855383	0,0217133	0,6499822	0,7039146	0,0387222	3,3931822
5	UNMUT	683	98,597026	0,022531	0,4501483	0,8646205	0,1902505	1,6965911
5	UNMUT	692	91,499658	0,0195089	0,5602054	0,1060165	0,2969299	3,3361738
5	UNMUT	694	112,64929	0,0169052	0,525111	1,4938422	0,1844789	3,5673706

Tabulka 11: Geometrický průměr poměrných hodnot exprese jednotlivých genů vůči kalibrátoru normalizovaných průměrnou hodnotou referenčních genů ($A_{\text{verExN}_{\text{TG,MUT}}}$)

geometrický \bar{x}	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
MUT	104,28056	0,0205986	0,4655429	0,0254793	0,0009777	0,1020942
UNMUT	98,037643	0,0203591	0,5010119	0,1715988	0,1120312	1,3402351

Tabulka 12: Rozdíly poměrných hodnot exprese jednotlivých vzorků v rámci daných genů vůči průměrné hodnotě poměru exprese všech vzorků skupiny MUT

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
1	MUT	145	1,0258251	1,1566269	0,8428172	2,591832	13,63746	0,9872396
1	MUT	158	1,2171031	0,9329836	0,8806404	3,9103712	0,0020638	21,231566
1	MUT	165	1,0297829	0,8248169	1,177326	0,223683		14,456981
1	MUT	187	0,9600818	0,9599524	1,0850309	3,0002513	0,2344384	0,823163
1	MUT	206	0,8546771	1,0069022	1,162012	2,8625593		2,2472161
1	MUT	251	0,8160813	0,9839046	1,2454137	27,045292		9,1354274
1	MUT	301	0,9954711	1,1302095	0,888817	0,3678796		0,4459042
1	MUT	314	0,8739809	1,0733688	1,0659801	1,6580963		2,3139555
1	MUT	337	0,9712374	1,0504698	0,9801466	11,32744	5,8453154	3,4723603
1	MUT	338	1,0187392	0,9373049	1,0472639	13,585278	50,428582	8,9681198
1	MUT	346	0,9675045	0,976356	1,0586169	12,065879		7,1125215
1	MUT	348	1,1865597	0,9416462	0,8949992	0,3129431	7,5309738	0,6408857
1	MUT	356	0,9259505	1,1189502	0,9651648	0,0688465	0,0562654	0,4404432
1	MUT	363	0,9259505	1,1424617	0,945302	3,8269484	6,7508008	10,413341
1	MUT	372	0,8985518	0,9496575	1,1718982	0,1722841	3,9223691	0,6800414
1	MUT	377	0,8110686	1,3989729	0,8813189	1,9297536	2,0428938	1,5360764
1	MUT	378	0,8313059	1,1700663	1,0280841	13,062015		3,5837555
1	MUT	381	1,0530417	0,8241819	1,1522093	9,9067831	184,47492	2,127634
1	MUT	386	0,916726	1,0217447	1,0676234	1,479473		1,3606066
1	MUT	398	1,0595498	0,9592133	0,9839282	3,1469892	13,574587	1,9249294
1	MUT	406	0,9608215	0,9991772	1,0416331	53,059081	4,1845098	6,4846458
1	MUT	414	1,0274064	1,0178177	0,9562859	5,881542	0,0407156	2,1840831
1	MUT	418	1,2746649	1,0045785	0,7809444	0,7885672		0,5157721
2	MUT	428	1,0218824	0,9955286	0,9829815	3,5865167		0,1070174
2	MUT	429	1,0702114	0,8787561	1,0633153	28,166661	0,0003545	0,5032161
2	MUT	437	1,0031675	0,9932311	1,003636	0,44728	1,4723434	17,378721
2	MUT	449	1,1902207	0,8606716	0,9761915	4,395163	55,003348	2,5774004
2	MUT	496	1,1929739	0,8048925	1,0414326	16,670783	0,1958898	0,530681

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
2	MUT	523	1,0353496	0,8821466	1,0948944	11,751765	44,642206	8,6826708
2	MUT	542	0,8950983	1,1217545	0,995936	0,3211841	0,0602457	0,8535054
2	MUT	544	0,9395996	1,1613131	0,916448	25,19046	0,2730057	10,518124
2	MUT	546	0,9757358	0,9097454	1,1265433	7,6524232	0,0281923	4,6672842
2	MUT	552	0,9273778	1,1462074	0,9407627	12,575844	0,0707128	0,346898
2	MUT	555	1,0031675	1,1675908	0,8537602	0,324416	0,015213	0,5888274
4	MUT	557	1,2800757	0,9792742	0,7977376	0,8416739	0,0247207	0,0349273
5	MUT	578	0,8262793	0,9581058	1,2631637	0,0724714		19,118387
4	MUT	645	0,9859337	1,0161533	0,9981437	0,1819146	0,0707332	1,1759554
4	MUT	675	0,9836583	0,8704207	1,1679562	0,0105594		1,0820996
4	MUT	695	1,0755824	1,0367061	0,8968105	0,31722	23,600624	0,1392796
4	MUT	703	1,4126963	0,9605995	0,7369005	0,231148	18,051996	0,0910449
4	MUT	726	1,014433	1,2519953	0,787361	0,4030725	1,3191805	0,9896185
4	MUT	781	0,8865225	1,0765769	1,0477681	0,25081	0,2676707	0,0504326
4	MUT	787	1,0640475	0,9546991	0,984402	0,6789293	81,488856	0,0332731
4	MUT	790	0,9821443	0,8650742	1,1769861	0,8192891	69,053468	1,6376319
4	MUT	793	1,008202	0,9561708	1,0373301	0,2523601	2,9094634	0,6594745
4	MUT	800	0,8609533	0,996008	1,1661585	0,0599171	23,257788	0,15913
4	MUT	801	1,0051009	0,7548329	1,3180733	0,2105806	543,56496	2,0969287
4	MUT	802	1,0128717	1,0658519	0,9262937	2,8683523	0,1801686	0,7051761
4	MUT	820	0,9798777	1,1309714	0,902353	1,3340177		0,7211033
4	MUT	821	0,9213267	1,1582984	0,9370568	0,7170881	100,01596	2,2028769
4	MUT	826	0,9093426	0,9459165	1,1625715	0,7429481		0,0270887
4	MUT	827	0,8438848	1,043917	1,1351437	1,7094776	1,2722831	1,1508679
4	MUT	828	1,1412965	0,8375395	1,0461554	0,18038	0,0556674	1,6300819
4	MUT	845	0,9905002	0,9929443	1,0167649	0,0129402	0,2390191	0,8870988
4	MUT	846	0,9392379	1,0447212	1,0191168	0,0145248	36,048422	0,1273761
4	MUT	853	1,1229863	1,1179811	0,7965097	0,0263226	0,1618776	0,0738945
4	MUT	855	1,1421758	1,0319265	0,8484344	2,9353968	0,0639943	0,088147
4	MUT	857	1,1024197	0,8832513	1,026996	0,0975607		0,3945494
4	MUT	865	1,0526362	0,9422809	1,0081874	0,0785149	0,0010272	0,0803037
4	MUT	548B	1,0074258	1,0240095	0,9693551	0,3902429	0,0658948	2,3428714
2	UNMUT	134	0,9505173	0,928146	1,1335057	0,0336047	0,0310414	0,9063492
2	UNMUT	138	0,7515265	1,2717967	1,0462562	0,9925764	167,51125	14,613704
2	UNMUT	196	1,0187392	0,7932002	1,2375256	0,0173949	437,66092	26,199588
2	UNMUT	199	1,2766298	0,8514414	0,9199839	0,0146837	0,0002341	0,7356175
2	UNMUT	233	0,9146104	1,0768879	1,0152977	50,887873	549,29888	29,703959
2	UNMUT	237	1,0943833	1,0086486	0,9059217	17,086743	267,55093	31,228807
2	UNMUT	258	0,9041052	0,988652	1,1187617	3,8617372	337,35277	33,418691
2	UNMUT	284	0,7786284	1,1444432	1,1222135	11,797106	208,30572	18,172619
2	UNMUT	285	1,1838214	0,7591325	1,1127465	0,944838	390,81348	26,873995
2	UNMUT	334	0,8619485	1,3298951	0,8723711	3,6987243	0,1902399	14,39033
2	UNMUT	364	0,7287275	1,0514816	1,305068	11,589975	223,94538	32,705746
2	UNMUT	370	0,7708716	1,2199889	1,0633153	0,4905878	106,99856	24,182922
1	UNMUT	375	0,804846	0,6521415	1,905221	7,3817978	158,62794	0,3309776
3	UNMUT	387	0,7917811	1,3500185	0,9355244	61,799693	203,66562	16,293159
3	UNMUT	388	1,2056743	0,7420796	1,1176852	74,518554	263,20784	38,662449
3	UNMUT	392	0,8969961	0,9590287	1,1624596	1,7812143	190,90688	19,601078
3	UNMUT	395	0,9503343	0,970172	1,0846131	45,449561	238,86615	16,751222
3	UNMUT	396	1,0201131	0,8076869	1,2136924	30,876058	402,34265	22,602597
3	UNMUT	399	1,2695214	0,9400158	0,8379629	2,2098864	230,90726	8,7987925
3	UNMUT	404	0,7560256	1,1431218	1,1571003	6,0468947	370,51599	25,744537
3	UNMUT	408	1,4426578	1,327337	0,5222224	62,614143	497,63617	38,543526
3	UNMUT	416	1,0774479	1,0649288	0,8715317	7,9299158	261,59112	10,782643
3	UNMUT	441	0,8578095	0,9943792	1,1723495	26,326004	303,51294	22,759811
3	UNMUT	442	0,9372507	0,8703369	1,225905	12,520276	172,05492	22,882844
3	UNMUT	443	0,7742929	1,2664209	1,0198038	1,2260113	187,12214	22,689804
3	UNMUT	445	1,1441568	0,864991	1,0104223	40,615886	264,63066	22,222854
3	UNMUT	447	0,9503343	1,1352257	0,9269182	4,5405313	7,9267271	14,616518
3	UNMUT	451	1,0343534	1,0366063	0,9326468	27,317433	194,76818	19,450698

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
3	UNMUT	474	0,8197032	0,9010292	1,3539557	7,0756423	155,78278	7,9238109
3	UNMUT	485	0,8819258	0,9045056	1,2535934	16,280615	121,28698	31,744102
3	UNMUT	486	0,8744858	0,9590287	1,1923826	33,970121	212,31443	37,345464
3	UNMUT	490	1,0520284	0,8683283	1,0946836	23,635134	257,19616	33,347987
3	UNMUT	499	1,0891281	1,0543198	0,8708607	36,156784	160,90425	32,063524
3	UNMUT	511	0,9613766	0,8387498	1,2401494	1,8784306	251,32179	0,2170643
3	UNMUT	539	1,2636685	1,1440026	0,6917351	16,230538	272,69979	6,2505027
3	UNMUT	564	0,8518842	1,0082602	1,1642515	1,9208568	233,77025	17,856986
5	UNMUT	567	0,9848901	1,215534	0,835305	2,2194808	110,65461	1,7820719
5	UNMUT	568	1,3015736	0,9057255	0,848271	3,8792501	347,00404	2,6990364
5	UNMUT	570	0,9528077	1,2987699	0,8080952	1,3095863	0,3865719	0,4400617
5	UNMUT	573	1,1174861	1,1254322	0,7951307	0,1686898	71,117957	1,5609718
5	UNMUT	574	1,092804	1,131516	0,8087178	18,76825	234,46895	1,7173954
5	UNMUT	580	1,1248256	0,9222674	0,9639576	9,159204	344,47443	26,086332
5	UNMUT	581	0,6433119	1,1464281	1,3559123	0,566093	89,810277	45,858305
5	UNMUT	589	0,9498769	0,8601746	1,2239004	45,611741	680,7734	29,95379
5	UNMUT	594	0,8727197	0,8668249	1,3218855	24,013566	218,59885	30,677545
5	UNMUT	618	0,8036846	0,8980848	1,3854695	6,6817325	184,81266	29,655386
5	UNMUT	627	0,9484149	0,8608373	1,2248433	14,2456	616,864	6,4940168
5	UNMUT	631	0,9083801	0,8836765	1,2457734	103,26605	314,42812	40,463678
5	UNMUT	632	0,8801446	0,9071217	1,2525077	4,5357255	614,96658	29,202096
5	UNMUT	634	1,0794205	0,8181738	1,132306	1,134805	330,56923	30,890924
5	UNMUT	644	0,8700353	0,8905086	1,2906992	24,442727	205,69518	1,9742892
5	UNMUT	646	0,9203516	0,9707326	1,1193004	1,9441117	135,81277	30,115712
5	UNMUT	649	0,8365242	0,9197847	1,2996767	23,774339	817,09737	41,202691
5	UNMUT	661	1,0188372	1,047642	0,9368763	17,296934	3,7986198	3,8170139
5	UNMUT	677	0,7271157	1,1228349	1,2248433	34,038867	143,22524	14,477873
5	UNMUT	678	0,7053289	1,1120772	1,274892	21,286825	430,01795	28,283503
5	UNMUT	680	0,6794688	1,0541168	1,3961811	27,626866	39,607385	33,235811
5	UNMUT	683	0,9454977	1,0938145	0,9669318	33,934166	194,5995	16,617906
5	UNMUT	692	0,8774374	0,9471011	1,2033378	4,1608806	303,71754	32,677421
5	UNMUT	694	1,0802521	0,8206982	1,1279541	58,629529	188,69596	34,941966

Tabulka 13: Logaritmus hodnoty poměru exprese jednotlivých genů a kalibrátoru vůči průměrné hodnotě poměru exprese všech vzorků skupiny MUT

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
1	MUT	145	0,0110733	0,0631933	-0,074267	0,4136069	1,1347335	-0,005577
1	MUT	158	0,0853274	-0,030126	-0,055201	0,592218	-2,685337	1,326982
1	MUT	165	0,0127457	-0,083642	0,0708967	-0,650367		1,1600776
1	MUT	187	-0,017692	-0,01775	0,0354421	0,4771576	-0,629971	-0,084514
1	MUT	206	-0,068198	0,0029873	0,0652106	0,4567545		0,3516448
1	MUT	251	-0,088267	-0,007047	0,0953136	1,4320917		0,9607289
1	MUT	301	-0,001971	0,053159	-0,051188	-0,434294		-0,350758
1	MUT	314	-0,058498	0,030749	0,0277491	0,2196097		0,364355
1	MUT	337	-0,012675	0,0213836	-0,008709	1,0541318	0,7668079	0,5406248
1	MUT	338	0,008063	-0,028119	0,0200561	1,1330685	1,7026768	0,9527014
1	MUT	346	-0,014347	-0,010392	0,0247388	1,081559		0,8520236
1	MUT	348	0,0742896	-0,026112	-0,048177	-0,504535	0,8768511	-0,193219
1	MUT	356	-0,033412	0,0488108	-0,015399	-1,162118	-1,249759	-0,35611
1	MUT	363	-0,033412	0,0578417	-0,024429	0,5828526	0,8293553	1,0175901
1	MUT	372	-0,046457	-0,022433	0,0688899	-0,763755	0,5935485	-0,167465
1	MUT	377	-0,090942	0,1458093	-0,054867	0,2855019	0,3102458	0,1864128
1	MUT	378	-0,080239	0,0682105	0,0120287	1,1160102		0,5543384
1	MUT	381	0,0224455	-0,083977	0,0615314	0,9959327	2,2659373	0,3278969
1	MUT	386	-0,03776	0,0093424	0,0284181	0,170107		0,1337326
1	MUT	398	0,0251214	-0,018085	-0,007037	0,4978953	1,1327266	0,2844148
1	MUT	406	-0,017357	-0,000357	0,0177148	1,7247597	0,6216446	0,8118863
1	MUT	414	0,0117423	0,00767	-0,019412	0,7694912	-1,390239	0,3392692

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
1	MUT	418	0,105396	0,0019839	-0,10738	-0,103161		-0,287542
2	MUT	428	0,0094009	-0,001946	-0,007455	0,5546729		-0,970546
2	MUT	429	0,0294696	-0,056132	0,0266621	1,4497354	-3,450371	-0,298245
2	MUT	437	0,0013734	-0,00295	0,0015762	-0,349421	0,1680091	1,2400178
2	MUT	449	0,0756275	-0,065163	-0,010465	0,642975	1,7403891	0,4111819
2	MUT	496	0,0766309	-0,094262	0,0176312	1,221956	-0,707988	-0,275167
2	MUT	523	0,015087	-0,054459	0,0393722	1,0701031	1,6497456	0,9386533
2	MUT	542	-0,048129	0,0498978	-0,001769	-0,493246	-1,220074	-0,068794
2	MUT	544	-0,027057	0,0649493	-0,037892	1,4012361	-0,563828	1,0219383
2	MUT	546	-0,010668	-0,04108	0,0517479	0,883799	-1,549869	0,6690643
2	MUT	552	-0,032743	0,0592632	-0,02652	1,0995371	-1,150502	-0,459798
2	MUT	555	0,0013734	0,0672907	-0,068664	-0,488898	-1,817785	-0,230012
4	MUT	557	0,1072357	-0,009096	-0,09814	-0,074856	-1,606939	-1,456835
5	MUT	578	-0,082873	-0,018587	0,1014597	-1,139833		1,2814512
4	MUT	645	-0,006152	0,0069592	-0,000807	-0,740132	-1,150377	0,0703908
4	MUT	675	-0,007156	-0,060271	0,0674265	-1,976362		0,0342672
4	MUT	695	0,0316437	0,0156557	-0,047299	-0,498639	1,3729235	-0,856113
4	MUT	703	0,1500488	-0,017458	-0,132591	-0,63611	1,2565252	-1,040744
4	MUT	726	0,0062234	0,0976027	-0,103826	-0,394617	0,1203042	-0,004532
4	MUT	781	-0,05231	0,0320451	0,0202652	-0,600655	-0,572399	-1,297289
4	MUT	787	0,026961	-0,020133	-0,006828	-0,168175	1,9110982	-1,477907
4	MUT	790	-0,007825	-0,062947	0,0707713	-0,086563	1,8391855	0,2142163
4	MUT	793	0,0035476	-0,019465	0,015917	-0,597979	0,4638129	-0,180802
4	MUT	800	-0,06502	-0,001737	0,0667576	-1,222449	1,3665684	-0,798248
4	MUT	801	0,0022096	-0,122149	0,1199395	-0,676582	2,7352515	0,3215837
4	MUT	802	0,0055544	0,0276969	-0,033251	0,4576325	-0,744321	-0,151702
4	MUT	820	-0,008828	0,0534516	-0,044624	0,1251616		-0,142003
4	MUT	821	-0,035586	0,0638204	-0,028234	-0,144428	2,0000693	0,3429902
4	MUT	826	-0,041272	-0,024147	0,0654197	-0,129042		-1,567212
4	MUT	827	-0,073717	0,018666	0,0550509	0,2328634	0,1045838	0,0610255
4	MUT	828	0,0573985	-0,076995	0,0195962	-0,743812	-1,254399	0,2122094
4	MUT	845	-0,004145	-0,003075	0,0072205	-1,88806	-0,621567	-0,052028
4	MUT	846	-0,027224	0,0190004	0,008224	-1,837888	1,5568863	-0,894912
4	MUT	853	0,0503744	0,0484345	-0,098809	-1,579672	-0,790813	-1,131388
4	MUT	855	0,057733	0,0136488	-0,071382	0,4676668	-1,193859	-1,054792
4	MUT	857	0,042347	-0,053916	0,0115687	-1,010725		-0,403899
4	MUT	865	0,0222783	-0,02582	0,0035413	-1,105048	-2,988332	-1,095264
4	MUT	548B	0,0032131	0,010304	-0,013517	-0,408665	-1,181149	0,3697485
2	UNMUT	134	-0,02204	-0,032384	0,0544237	-1,4736	-1,508059	-0,042704
2	UNMUT	138	-0,124056	0,1044177	0,019638	-0,003236	2,224044	1,1647603
2	UNMUT	196	0,008063	-0,100617	0,0925542	-1,759579	2,6411378	1,4182945
2	UNMUT	199	0,106065	-0,069845	-0,03622	-1,833164	-3,630655	-0,133348
2	UNMUT	233	-0,038764	0,0321705	0,0065934	1,7066143	2,7398087	1,4728143
2	UNMUT	237	0,0391694	0,0037399	-0,042909	1,2326593	2,4274065	1,4945554
2	UNMUT	258	-0,043781	-0,004957	0,0487376	0,5867827	2,5280843	1,5239894
2	UNMUT	284	-0,10867	0,0585942	0,0500755	1,0717755	2,3187012	1,2594175
2	UNMUT	285	0,0732862	-0,119682	0,0463962	-0,024643	2,5919695	1,4293322
2	UNMUT	334	-0,064519	0,1238174	-0,059299	0,568052	-0,720698	1,1580708
2	UNMUT	364	-0,137435	0,0218017	0,1156331	1,0640825	2,3501421	1,5146241
2	UNMUT	370	-0,113018	0,0863559	0,0266621	-0,309283	2,0293779	1,3835088
1	UNMUT	375	-0,094287	-0,185658	0,2799454	0,8681621	2,2003797	-0,480201
3	UNMUT	387	-0,101395	0,1303397	-0,028945	1,7909863	2,3089177	1,2120053
3	UNMUT	388	0,08123	-0,12955	0,0483195	1,8722644	2,4202988	1,5872894
3	UNMUT	392	-0,047209	-0,018168	0,0653779	0,2507162	2,2808216	1,29228
3	UNMUT	395	-0,022124	-0,013151	0,0352749	1,6575297	2,3781546	1,2240465
3	UNMUT	396	0,0086483	-0,092757	0,0841086	1,4896218	2,6045961	1,3541583
3	UNMUT	399	0,10364	-0,026865	-0,076775	0,34437	2,3634376	0,9444231
3	UNMUT	404	-0,121464	0,0580925	0,063371	0,7815324	2,5688069	1,4106851
3	UNMUT	408	0,1591633	0,1229812	-0,282145	1,7966724	2,6969119	1,5859514
3	UNMUT	416	0,0323963	0,0273206	-0,059717	0,8992686	2,417623	1,0327252
3	UNMUT	441	-0,066609	-0,002448	0,0690571	1,4203849	2,4821772	1,3571686

run	status	vz.	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
3	UNMUT	442	-0,028144	-0,060313	0,0884568	1,0976139	2,2356671	1,35951
3	UNMUT	443	-0,111095	0,1025781	0,0085166	0,0884945	2,2721252	1,3558307
3	UNMUT	445	0,0584855	-0,062988	0,0045029	1,6086959	2,4226402	1,3467998
3	UNMUT	447	-0,022124	0,0550822	-0,032959	0,6571067	0,8990939	1,1648439
3	UNMUT	451	0,0146689	0,0156138	-0,030283	1,4364399	2,289518	1,2889352
3	UNMUT	474	-0,086343	-0,045261	0,1316045	0,8497659	2,1925195	0,8989341
3	UNMUT	485	-0,054568	-0,043589	0,0981567	1,2116708	2,0838142	1,501663
3	UNMUT	486	-0,058247	-0,018168	0,0764156	1,5310971	2,3269795	1,5722379
3	UNMUT	490	0,0220275	-0,061316	0,0392886	1,3735581	2,4102645	1,5230696
3	UNMUT	499	0,037079	0,0229724	-0,060051	1,5581898	2,2065675	1,5060113
3	UNMUT	511	-0,017106	-0,076368	0,093474	0,2737951	2,4002302	-0,663412
3	UNMUT	539	0,1016332	0,058427	-0,16006	1,2103329	2,4356848	0,7959149
3	UNMUT	564	-0,069619	0,0035726	0,0660468	0,283495	2,3687892	1,2518082
5	UNMUT	567	-0,006612	0,0847671	-0,078155	0,3462514	2,0439695	0,2509252
5	UNMUT	568	0,1144687	-0,043003	-0,071465	0,5887478	2,5403345	0,4312087
5	UNMUT	570	-0,020995	0,1135322	-0,092537	0,1171341	-0,41277	-0,356486
5	UNMUT	573	0,0482421	0,0513193	-0,099561	-0,772911	1,8519793	0,193395
5	UNMUT	574	0,0385423	0,0536607	-0,092203	1,2734238	2,3700853	0,2348703
5	UNMUT	580	0,0510852	-0,035143	-0,015942	0,9618577	2,537157	1,416413
5	UNMUT	581	-0,191578	0,0593468	0,1322316	-0,247112	1,953326	1,661418
5	UNMUT	589	-0,022333	-0,065413	0,0877461	1,6590766	2,8330026	1,4764518
5	UNMUT	594	-0,059125	-0,062069	0,1211938	1,3804567	2,3396479	1,4868206
5	UNMUT	618	-0,094914	-0,046683	0,141597	0,8248891	2,2667317	1,4721036
5	UNMUT	627	-0,023002	-0,065079	0,0880805	1,1536807	2,7901894	0,8125134
5	UNMUT	631	-0,041732	-0,053707	0,0954391	2,0139576	2,4975214	1,6070654
5	UNMUT	632	-0,055446	-0,042334	0,0977804	0,6566468	2,7888515	1,465414
5	UNMUT	634	0,0331906	-0,087154	0,0539638	0,0549213	2,5192624	1,4898309
5	UNMUT	644	-0,060463	-0,050362	0,110825	1,3881497	2,3132241	0,2954108
5	UNMUT	646	-0,036046	-0,0129	0,0489466	0,2887212	2,1329406	1,4787931
5	UNMUT	649	-0,077521	-0,036314	0,1138353	1,3761085	2,9122738	1,6149256
5	UNMUT	661	0,0081048	0,0202129	-0,028318	1,2379691	0,5796258	0,5817237
5	UNMUT	677	-0,138396	0,0503159	0,0880805	1,5319751	2,1560196	1,1607048
5	UNMUT	678	-0,151608	0,0461349	0,1054734	1,3281109	2,6334866	1,4515332
5	UNMUT	680	-0,16783	0,0228887	0,1449418	1,4413316	1,5977762	1,5216063
5	UNMUT	683	-0,02434	0,0389437	-0,014604	1,5306372	2,2891417	1,2205763
5	UNMUT	692	-0,056784	-0,023604	0,0803876	0,6191853	2,4824699	1,5142478
5	UNMUT	694	0,0335251	-0,085817	0,0522914	1,7681164	2,2757626	1,5433473

Tabulka 14: Průměr, směrodatná odchylka a SEM (střední chyba průměru, standard error of the mean) pro relativní exprese sledovaných genů ve skupinách MUT a UNMUT

prům. hodnota	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
MUT	2,247E-16	1,451E-17	1,165E-17	-6,48E-17	8,388E-17	-1,99E-16
UNMUT	-0,0268	-0,0051	0,0319	0,8283	2,0592	1,1182
SD	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
MUT	0,0505	0,0503	0,0551	0,9035	1,4866	0,7372
UNMUT	0,0757	0,0691	0,0886	0,8567	1,0978	0,5769
SEM	B2M	HPRT1	GUSB	LAG	LPL	ZAP
MUT	0,0065	0,0065	0,0071	0,1166	0,1919	0,0952
UNMUT	0,0098	0,0089	0,0114	0,1106	0,1417	0,0745