

**Lymfom z buněk pláště,
genová exprese v patogeneze onemocnění**

Helena Břízová

Disertační práce

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta
2009

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla upřímně poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Romanu Kodetovi, CSc. za vynikající odborné vedení, přátelskou pomoc, cenné rady a připomínky v průběhu celého studia.

Neméně bych chtěla poděkovat RNDr. Markétě Kalinové, Ph.D., RNDr. Lence Krskové, Ph.D. a RNDr. Marcele Mrhalové, Ph.D. za odbornou a metodickou pomoc, podporu a spolupráci na společných projektech. V neposlední řadě děkuji všem spolupracovníkům kolektivu Laboratoře molekulární patologie Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK.

OBSAH

1 Úvod	4
1.1 Lymfom z buněk pláště	4
1.2 Molekulární marker onemocnění MCL	5
1.3 Regulace buněčného cyklu, význam cyklinu D1 v buněčném cyklu a patogenezi onemocnění	7
1.4 Molekulární patogeneze onemocnění MCL	11
1.5 Prognóza onemocnění a prognostické faktory MCL	16
1.6 Infiltrace KD a MRN	20
2 Cíle práce	23
3 Materiál a metody	25
3.1 Materiál	25
3.2 Imunohistochemické a FISH vyšetření	25
3.3 Izolace nukleových kyselin	26
3.4 Kontrola kvality nukleových kyselin	26
3.5 Reverzní transkripce	27
3.6 Detekce t(11;14) a klonální přestavby imunoglobulinů	27
3.7 qRT-PCR	27
3.7.1 Relativní kvantifikace.....	28
3.7.2 Absolutní kvantifikace.....	29
3.8 Statistické hodnocení	29
4 Výsledky	30
4.1 qRT-PCR pro stanovení exprese cyklinu D1- reproducibilita, spolehlivost a použitelnost	30
4.2 Expese cyklinu D1 ve vzorcích primárních nádorů	32
4.3 Korelace hladiny mRNA cyklinu D1 s t(11;14) stanovenou cytogeneticky (FISH), molekulárně (PCR) a s expresí proteinu stanovenou pomocí imunohistochemie	39
4.4 Expese cyklinu D1 ve vzorcích KD	42
4.4.1 relativní kvantifikace.....	42
4.4.2 absolutní kvantifikace.....	44
4.5 Expese cyklinu D1 v KD pacientů s MCL v průběhu onemocnění	45
4.6 Kvantitativní hodnocení proliferační aktivity buněk- reproducibilita, spolehlivost a použitelnost	50
4.7 Korelace hladiny mRNA proliferačních markerů s expresí proteinu stanovenou pomocí imunohistochemie	51
4.8 Expese proliferačních markerů ve vzorcích lymfomů	54
4.9 Korelace hladiny proliferačních markerů a hladiny exprese cyklinu D1	56
5 Diskuse	58
6 Závěr	68
7 Seznam použitých zkratk	70
8 Přílohy	71
8.1 Přiložené publikace	71
8.2 Publikační a přednášková činnost	75
9 Použitá literatura	79

1 Úvod

1.1 Lymfom z buněk pláště

Lymfom z buněk pláště (mantle cell lymphoma, MCL) tvoří samostatnou histopatologickou jednotku non-Hodgkinovských lymfomů z B buněk (B-NHL) vznikajících klonální proliferací lymfoidních buněk různého stupně diferenciaci. MCL zahrnuje 3–10% B-NHL. Jedná se o onemocnění původně definované na základě charakteristické morfologie a imunofenotypu.

Nádor je tvořen uniformní populací centrocytoidních buněk střední velikosti s charakteristickými jadernými zářezy, nenápadnými jádérky a většinou jen málo zřetelnou cytoplasmou. Po stránce strukturálního růstu nádor v iniciální fázi expanduje plášťové zóny s alespoň částečným zachováním zárodečných center lymfatických folikulů. Později jsou nádorovými buňkami postupně kolonizována také zárodečná centra a z plášťového růstu se struktura mění na nodulární. Při pokračujícím nárůstu nádorové hmoty uzlíky postupně splývají a růst se stává difúzní.¹ Někdy je možné zastihnout různá stadia uvedeného strukturálního vývoje nádoru, zejména při postižení lymfatických uzlin.

Nádorové buňky MCL vznikají maligní transformací naivní B buňky během diferenciaci v kostní dřeni (KD) ve stadiu pre-B lymfocytu. Buňky MCL tak exprimují geny charakteristické pro naivní B lymfocyty a normální plášťové B buňky (CD19, CD20, CD22 a CD79a). Nádorové buňky dále exprimují některé molekuly T lymfocytů (CD5). Fyziologicky CD5 pozitivní B buňky představují naivní B buňky cirkulující v krvi, produkující nízkoafinitní polyreaktivní protilátky a kolonizující primární folikuly nebo folikulární plášťové zóny sekundárních folikulů. Tyto buňky jsou pravděpodobně fyziologickým protipólem, jejichž maligní transformací vzniká MCL. U buněk MCL jsou také

obvykle pozitivní povrchové imunoglobuliny IgM a IgD. Často jsou spojeny s expresí lambda řetězce. Molekula CD23 je většinou negativní.¹

Přestože popsané základní morfologické projevy jsou nejčastější, v rámci variační šíře MCL existuje spektrum cytologických a strukturálních projevů a některé MCL mohou vykazovat aberantní imunofenotyp.² To komplikuje iniciační diagnostiku pouze na základě histopatologických kritérií. V řadě případů je tak pro stanovení správné diferenciální diagnózy potřeba doplnit morfologické a imunohistochemické vyšetření o vyšetření cytogenetické nebo molekulární. Molekulární analýza NHL poskytuje nejen významnou informaci o biologii onemocnění, ale slouží také jako podpora pro klasifikaci a odhad prognózy těchto onemocnění.

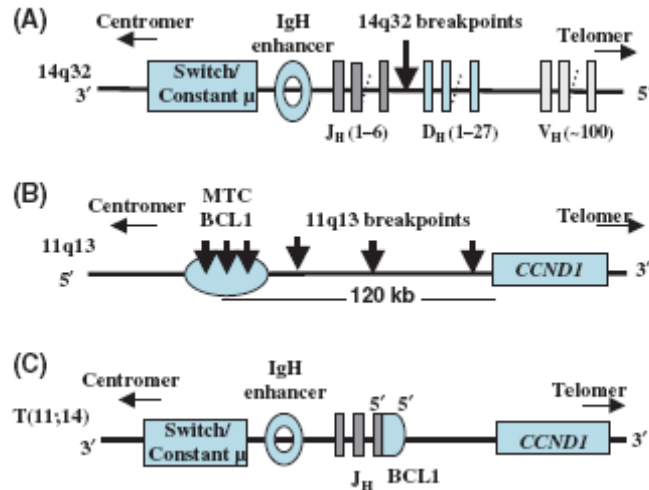
1.2 Molekulární marker onemocnění MCL

Geneticky je MCL charakterizován přítomností reciproké translokace t(11;14)(q13;q32) vedoucí k přesunu genu *CCND1* na chromosomu 11 v lokusu *BCL-1* (B-cell lymphoma 1) pod kontrolu „enhancerů“ těžkých řetězců imunoglobulinu (IgH) v lokusu 14q32 (obr. 1).³⁻⁸ Důsledkem je transkripční deregulace genu *CCND1* a overexprese proteinu cyklinu D1.^{6, 9-13}

Translokace t(11;14) byla u lymfoproliferativních onemocnění klonována již v roce 1984.¹⁴ Zlomová místa chromosomu 11 se mohou nalézat v rozsáhlé oblasti lokusu 11q13 zahrnující region 120 kb centromericky od genu *CCND1*. Nicméně 30–50% pacientů nese zlomy soustředěny v oblasti tzv. hlavního translokačního shluku (major translocation cluster, MTC). U ostatních pacientů jsou zlomy rozptýleny v rozsáhlém regionu a dosud byly lokalizovány tzv. minoritní translokační shluky v oblastech 24 kb a 63 kb telomericky od MTC a rovněž na 5' konci genu *CCND1* (obr. 1).^{3, 8, 10, 15, 16}

Translokaci t(11;14) lze nalézt v 90–100% pacientů s MCL pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH).^{4, 5, 17, 18} Přítomnost translokace t(11;14) je tedy spolehlivým genetickým

markerem onemocnění MCL a FISH je vhodnou technikou napomáhající diferenciální diagnostice MCL. Pro molekulární sledování pacientů však FISH není dostatečně citlivá, neumožňuje stanovení minimální residuální nemoci (MRN) a kvantitativní hodnocení rozvoje onemocnění v čase. Moderní technologie, která splňuje podmínky molekulárního sledování pacientů, včetně hodnocení dynamiky onemocnění, je kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR). Pomocí PCR lze však translokaci t(11;14) prokázat pouze u 30–50% pacientů s MCL nesoucích zlom v oblasti MTC.¹⁹ U pacientů nesoucích zlom v některé z minoritních oblastí nelze využít PCR pro stanovení translokace z důvodu obrovského rozsahu úseků, na nichž jsou zlomy lokalizovány (obr. 1).^{3, 15, 16, 20} S využitím translokace tedy nelze molekulárně sledovat až 70% pacientů s MCL. Přitom molekulární monitorování rozvoje onemocnění umožňuje lépe definovat kvalitu remise, kontrolovat účinnost terapie, predikovat klinický relaps a včas zahájit léčebnou reakci. Proto bylo třeba hledat nové markery pro diagnostiku a sledování nemocných s MCL. Vhodným molekulárním markerem pro sledování pacientů s MCL by mohla být exprese cyklinu D1 v důsledku charakteristické translokace. Cyklin D1 totiž není přirozeně exprimován v proliferujících lymfocytech, protože lymfocyty využívají k řízení buněčného cyklu cyklin D2 nebo cyklin D3.^{21, 22} Na rozdíl od MCL, kde je v nádorových buňkách přítomen cyklin D1 a naopak exprese cyklinu D3 chybí nebo je snížena, jak je prokázáno na úrovni proteinu pomocí imunohistochemie.^{22, 23} Exprese cyklinu D1 je tak pro MCL specifická a imunohistochemické vyšetření proteinu cyklinu D1 se využívá v diferenciální diagnostice MCL.²⁴⁻²⁶ Imunohistochemické značení proteinu však není prostředkem pro molekulární sledování onemocnění ani pro účinnou kvantifikaci úrovně exprese sledovaného markeru. V naší práci jsme se proto jako jeden z cílů rozhodli testovat, a v případě úspěšného využití zavést, kvantitativní sledování exprese mRNA cyklinu D1 jako molekulárního markeru onemocnění.



Obrázek č. 1. Schéma translokace t(11;14)(q13;q32). (A) lokus *IgH*, (B) lokus *BCL-1*, (C) translokace t(11;14) vedoucí k fúzi lokusu *BCL-1* s lokusem *IgH* (převzato z Jares a Campo).²⁷

1.3 Regulace buněčného cyklu, význam cyklinu *D1* v buněčném cyklu a patogenezi onemocnění

Udržení stálého počtu buněk a přísná regulace buněčného dělení je základní vlastností mnohobuněčných organismů. V průběhu buněčného cyklu buňka prochází několika kontrolními body, které zajišťují regulované buněčné dělení ve správném čase, na správném místě a za vhodných podmínek. Jedním z klíčových kontrolních bodů je tzv. restriční bod v pozdní fázi G1 buněčného cyklu. Pro průchod restričním bodem je nutná přítomnost růstových faktorů, které zajišťují přísnou regulaci buněčného dělení v souladu s potřebami organismu. Po překonání restričního bodu buňky přecházejí do fáze S buněčného cyklu a další průchod buněčným cyklem se odehrává již nezávisle na růstových faktorech. Jakmile tedy buňka projde restričním bodem v pozdní fázi G1, zpravidla celý proces buněčného cyklu dokončí. Pro rychlost buněčné proliferace je tedy zásadní řízení přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu.²⁸⁻³⁰

Zásadní úlohu pro řízení průchodu buněčným cyklem plní komplexy cyklinů s cyklin dependentními kinázami (CDK) a jejich asociované inhibitory (CDKi). Hladina cyklinů jednotlivých typů se v průběhu buněčného cyklu koordinovaně cyklicky mění. Je určována

rovnováhou mezi syntézou, která je aktivována specifickými transkripčními faktory v reakci na složitý mechanismus regulace buněčného cyklu, a zpětnovazebnou proteasomovou degradací zprostředkovanou ubiquitinem. Hladina CDK zůstává v průběhu buněčného cyklu relativně konstantní. Cyklicky se mění enzymatická aktivita CDK v závislosti na přítomnosti příslušného typu cyklinu. Měnící se hladiny jednotlivých typů cyklinů jsou tedy pro řízení správného průběhu buněčného cyklu zásadní.³⁰⁻³²

Cyklin D1 patří do rodiny cyklinů D, které zahrnují tři molekuly, zmíněný cyklin D1 a dále cyklin D2 a cyklin D3. Mají klíčovou úlohu v řízení přechodu buněk z fáze G1 do fáze S. Cykliny D typu slouží jako molekuly řídící postup buněčným cyklem v reakci na vnější signály (zejména signály růstových faktorů) pro aktivaci buněčného cyklu. Za přítomnosti růstových faktorů se v rámci sekundární odpovědi aktivuje exprese genů pro cykliny D typu a zvyšuje se hladina proteinů cyklinů D, které tvoří aktivní komplexy s CDK4 a CDK6. Aktivuje se kinázová aktivita enzymu, a tím dochází k fosforylaci proteinu pRb. Fosforylovaný protein pRb se inaktivuje a uvolňuje z komplexu pRb/E2F transkripční faktor E2F. Protein E2F zajistí transkripci genů potřebných ve fázi S (obr. 2).³³ Mezi aktivovanými geny jsou geny pro cyklin D1, cyklin E a cyklin A.³⁴⁻³⁷ Positivní zpětnou vazbou dochází ke zvýšení koncentrace cyklinu D1. Zároveň je však cyklin D1 substrátem vlastního komplexu cyklin D1/CDK4. Dochází k fosforylaci proteinu cyklinu D1 a vytváří se ubiquitinové cílové místo. Je zahájena ubiquitinem řízená degradace cyklinu D1, což zajišťuje ukončení aktivity komplexu cyklin D/CDK4 a tím jednosměrný průběh buněčným cyklem.³⁸ Postupně narůstá hladina proteinu cyklinu E, který vytváří aktivní komplex s CDK2. Kináza CDK2 se v komplexu s cyklinem E podílí na fosforylaci proteinu pRb a postupně přejímá úlohu CDK4/6 v komplexu s cyklinem D typu.³⁰ Tím se další fosforylace proteinu pRb a průchod buněčným cyklem stává nezávislým na růstových faktorech a nevratným. Další průběh fází S je závislý na cyklinu A v komplexu s CDK2.³⁰ Protože jsou cyklin E i cyklin A

syntetizovány v rámci buněčné odpovědi na působení cyklinu D typu reagujícího na přítomnost růstových faktorů, pak, jakmile je aktivována dráha cyklin D/CDK4, buněčný cyklus proběhne. U MCL nádorová buňka s overexpresí cyklinu D1 v důsledku translokace t(11;14) udržuje vysokou úroveň proteinu cyklinu D1 v reakci na působení zesilovačů transkripce IgH, a tedy nezávisle na transkripčních faktorech aktivovaných růstovými faktory, a tím je podněcována k dělení i za nepřítomnosti růstových faktorů (onkogenní stimulace).³⁹ Závislost buněčného dělení na růstových faktorech je vyřazena.

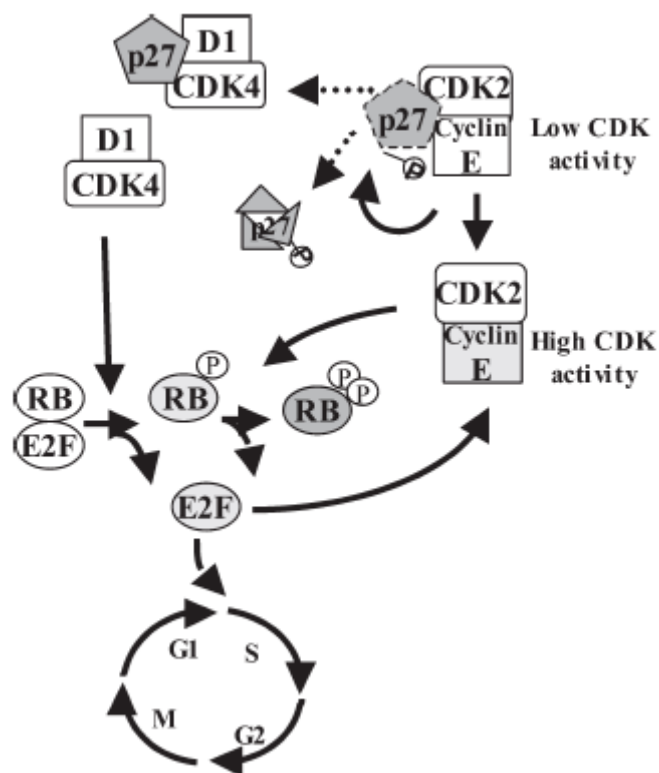
Kromě koordinované syntézy cyklinů se na specifické regulaci aktivity komplexů cyklinu s CDK podílí CDKi, které zahrnují dvě rodiny inhibitorů. Rodina INK4 sestává z inhibitorů p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, které inhibují komplex cyklin D/CDK4. Rodina CIP/Kip obsahuje p21, p27 a p57, které s různou intenzitou inhibují všechny komplexy cyklinu s CDK.⁴⁰ Inhibitory jsou v regulované rovnováze vyvazovány příslušnými komplexy cyklinu s CDK. Proto zvýšení hladiny cyklinu D1 vede k poruše rovnováhy mezi pro-růstovými a inhibičními faktory. V důsledku overexprese cyklinu D1 je veškerý protein p27 vyvázan a není dostupný k inhibici nadbytečných komplexů cyklin D/CDK4. Kináza CDK4 je tak v aktivním komplexu s cyklinem D1 a plní svou fosforylační funkci.⁴¹

Také účinnost a vazebná afinita CDKi k jednotlivým komplexům cyklinu s CDK je různá. Vazebná afinita CDKi p21 je vyšší ke komplexu cyklin D/CDK4 ve srovnání s komplexem cyklin E/CDK2.⁴² Protein p27 zase váže účinněji komplex cyklin A/CDK2 ve srovnání s komplexem cyklin D/CDK4.⁴³ Také různé hladiny CDKi mají vliv na funkci komplexů cyklinů s CDK. Při nízké hladině proteinů p21 a p27 dochází ke stabilizaci komplexu cyklinu D/CDK4, zatímco vysoká koncentrace inhibitorů působí na komplexy inhibičně.⁴⁴ Komplexy cyklinu D/CDK pravděpodobně fungují jako lapače inhibitorů p21 a p27. Fyziologicky jsou hladiny regulovány tak, že je možná správná úloha inhibitorů p21 a p27 za daných podmínek. V případě overexprese cyklinu D1 se rovnováha vychýlí na stranu

cyklinu D1 a komplex cyklin D1/CDK4 absorbuje více proteinu p21/p27. V buňkách MCL je tak protein p27 vyvazován overexprimovaným cyklinem D1, což je prokázáno na úrovni proteinu. Buňky MCL totiž nemají ve srovnání s ostatními NHL imunohistochemicky detekovatelný protein p27, ačkoli delece genu pro p27 nebyla zjištěna.⁴⁵ V důsledku overexprese cyklinu D1 se protein p21/p27 nedostává pro vazbu s komplexem cyklin E,A/CDK2. Volný komplex cyklin E,A/CDK2 je aktivní a zajišťuje průběh buněčným cyklem. Overexprese cyklinu D1 tak zabraňuje p21/p27 dependentní inhibici komplexu cyklin E,A/CDK2. Tím je vyřazena zástava buněčného cyklu zprostředkovaná inhibitory p21 nebo p27 (obr. 2).

Citlivá rovnováha hladiny jednotlivých komplexů cyklinu s CDK je tedy pro řízení buněčného cyklu klíčová, a tedy buněčný cyklus je pravděpodobně regulován spíše kvantitativně než kvalitativní přítomností jednotlivých typů cyklinů. Jakákoli patologická změna regulované hladiny cyklinů pak má pro buňku závažné důsledky, jak vyplývá z overexprese cyklinu D1 v maligních buňkách MCL. Patologická overexprese cyklinu D1 může narušovat regulaci buněčného cyklu 1) přímo zvýšeným množstvím komplexu s CDK4/6, který fosforyluje protein pRb, 2) „upregulací“ aktivity komplexu cyklinu D/CDK4 tím, že cyklin D1 titruje CDKi, který inhibuje komplex cyklin D/CDK4, a 3) aktivací CDK2 v komplexu s cykliny tím, že cyklin D1 zvýšeně vyvazuje CDKi, které inhibují komplexy cyklinu A nebo cyklinu E s CDK2.

Cyklin D1 může působit jako onkogen i nezávisle na regulaci CDK. Cyklin D1 reguluje transkripční faktory STAT3, C/EBP β a B-MYB.⁴⁶ U pacientů s MCL však úloha cyklinu D1 jako regulátoru transkripce není prostudována.



Obrázek č. 2. Role cyklinu D1 v řízení přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu (převzato z Jares a Campo).²⁷

1.4 Molekulární patogeneze onemocnění MCL

Základní model molekulární kancerogeneze předpokládá současné vyřazení některé ze složek tří základních drah regulace buněčné homeostázy. První dráhu tvoří regulace buněčného cyklu. Druhou dráhu představuje udržení genomové integrity prostřednictvím reparačních mechanismů genetického materiálu buněk. Poslední složkou řízení buněčné homeostázy je regulace přežití buněk.

Patogeneze a prognóza MCL závisí zejména na deregulaci buněčného cyklu, a tedy buněčné proliferaci. Pro MCL charakteristicky overexprimovaný cyklin D1 je klíčovou molekulou regulace buněčného cyklu. Overexprese cyklinu D1 tak buňkám poskytuje důležitou proliferační výhodu. U vzácně se vyskytujících MCL bez nalezené exprese cyklinu D1 jsou „upregulovány“ alternativní cykliny D typu, cyklin D2 a cyklin D3.⁴⁷ Ačkoli není mechanismus této alternativní „upregulace“ cyklinu D2 a cyklinu D3 obecně známý, je

popsána translokace t(2;12)(p12;p13) vedoucí k přesunu genu pro cyklin D2 pod kontrolu „enhancerů“ lehkých řetězců kappa.⁴⁸ K deregulaci cyklinu D2 pak dochází podobným mechanismem jako v případě přesunu genu pro cyklin D1 pod kontrolu „enhanceru“ IgH. Nadměrná exprese cyklinu D1, nebo vzácně alternativních cyklinů D typu, je považována za iniciální událost v patogenezi MCL. Fakt, že alespoň jeden z cyklinů D typu musí být u MCL „upregulován“, představuje overexpresi cyklinu D typu jako esenciální podmínku pro maligní transformaci buněk.

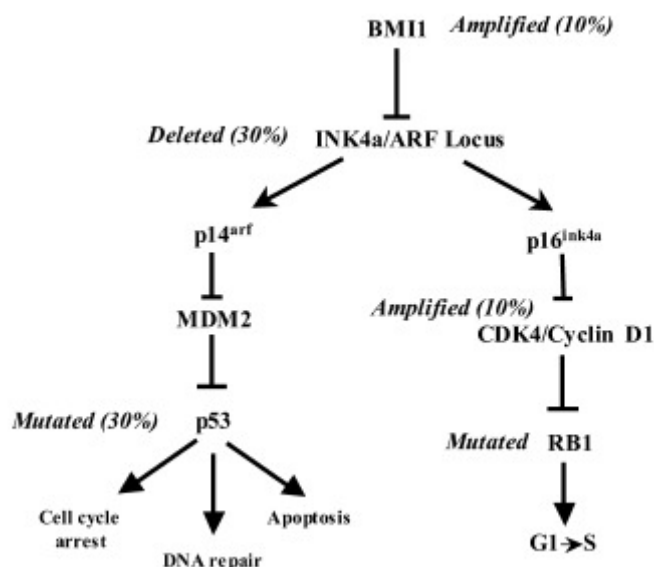
I přes nepostradatelný význam biologie cyklinu D1 v patogenezi MCL je pro rozvoj nádoru nutná deregulace dalších drah. Je prokázáno, že u myší s overexpresí cyklinu D1 bez spoluúčasti dalších onkogenů a tumorsupresorů lymfom nevzniká.⁴⁹⁻⁵¹ Onemocnění MCL vykazuje vysokou genetickou nestabilitu.^{52, 53} Genetické změny popisované u pacientů s MCL postihují všechny tři zmíněné dráhy udržení buněčné homeostázy: a) buněčný cyklus, b) reparační mechanismy a c) buněčné přežití. Deregulace genů uplatňujících se v těchto klíčových procesech se podílí na složitém procesu maligní transformace B lymfocytu.

a) V kooperaci s overexpresí cyklinu D1 se na deregulaci buněčného cyklu u pacientů s MCL podílí časté delece chromosomu 9p21 zahrnující lokus *CDKN2A* (obr. 3), který obsahuje 2 geny kódující proteiny řízení buněčného cyklu. Gen kódující protein p16^{INK4a}, který slouží jako inhibitor CDK4, a gen pro protein p14^{ARF}, který negativně reguluje proteinem MDM2 zprostředkovanou „ubiquitinaci“ proteinu p53.^{54, 55} Druhou možností inhibice genů lokusu *CDKN2A* je amplifikace a overexprese genu *BM11*, který funguje jako transkripční represor lokusu *CDKN2A*.⁵⁶ V obou případech je důsledkem nedostatečná syntéza proteinu p16^{INK4a} a současně nadměrná degradace proteinu p53 proteasomem. Nedostatečná tvorba proteinu p16^{INK4a} vede společně s overexpresí cyklinu D1 ke zvýšenému množství aktivního komplexu cyklinu D1/CDK4. Nadměrná degradace proteinu p53 vede k poruše stabilizace proteinu p53. Postižení genů lokusu *CDKN2A* delecí chromosomu 9p21

nebo overexpresí genu *BM11* má za následek souběžné vyřazení regulace buněčného cyklu a proteinem p53 řízené apoptózy nebo zástavy buněčného cyklu.

U pacientů s lokusem *CDKN2A* divokého typu je popsána amplifikace genu *CDK4*, která spolu s overexpresí cyklinu D1 vede ke zvýšenému množství komplexu cyklinu D1/CDK4. Amplifikace genu *CDK4* tak má podobný účinek jako nedostatečná syntéza proteinu p16^{INK4a}. Dále byly zjištěny inaktivující mutace nebo mikrolece genu *RBI*. Důsledkem uvedených mechanismů je nadměrná aktivace dráhy řízené proteinem pRb. Současně s poruchami dráhy proteinu pRb často u pacientů s *CDKN2A* divokého typu nalézáme mutace genu *TP53* nebo delecce lokusu 17p, kde je gen *TP53* lokalizován. U malého procenta pacientů je známa overexprese proteinu MDM2.⁵⁷⁻⁵⁹ Tím nastává vyřazení dráhy p53 podobně jako při změnách postihujících funkci lokusu *CDKN2A*. Tyto změny nalezené výhradně u pacientů s neporušenou expresí genů lokusu *CDKN2A* představují alternativní mechanismus souběžné deregulace restričního bodu a zároveň dráhy p53.

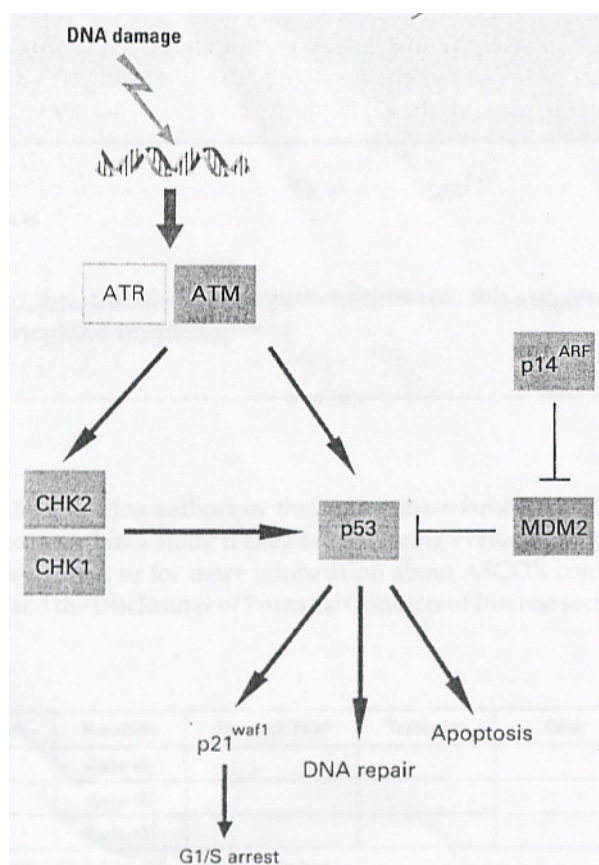
Současné poškození regulace řízené proteiny pRb a p53, a to buď delecí lokusu *CDKN2A*, nebo amplifikací genu *BM11*, nebo mutací genu *TP53* současně s amplifikací genu *CDK4* nebo delecí genu *RBI* poukazuje na nutnost souběžné poruchy několika regulačních drah pro maligní transformaci buněk. Jedná se o deregulaci dráhy aktivující (pRb), a tedy onkogenní, i dráhy brzdící (p53), a tedy tumor supresorové, buněčný cyklus. Zároveň tyto nálezy napovídají, proč samotná overexprese cyklinu D1, která narušuje pouze dráhu proteinu pRb a nikoli p53, nestačí k rozvoji MCL.



Obrázek č. 3. Deregulace mechanismů řídicích buněčný cyklus, jak jsou popsány u pacientů s MCL (převzato z Jares a Campo).²⁷

b) MCL patří mezi lymfomy s velkým množstvím chromosomálních aberací, které vznikají vyřazením mechanismu reparace DNA. U pacientů s MCL je častou změnou delece lokusu 11q22-23, který zahrnuje gen *ATM* (ataxia telangiectasia mutated). Protein ATM plní klíčovou roli v reakci buněk na dvouřetězcové zlomy DNA (obr. 4).⁶⁰⁻⁶² Vedle delece lokusu 11q22-23 je poškození funkce proteinu ATM také důsledkem mutací v genu *ATM*. Mutace v genu *ATM* jsou prokazovány u 40–75% pacientů s MCL.⁶³⁻⁶⁵ Dráha ATM může být narušena také deregulací některého z podřízených proteinů (CHEK1, CHEK2).^{66, 67} Porucha dráhy regulované proteinem ATM vede k defektní odpovědi na dvouřetězcové zlomy DNA, a tedy akumulaci chromosomálních aberací.^{68, 69} Defekt v této reparační dráze se projeví rovněž v reakci na dvouřetězcové zlomy vznikající během normální V-D-J rekombinace imunoglobulinových genů.⁷⁰ Narušení V-D-J rekombinace nebo tolerance chybné kombinace V-D-J pak může mít význam v procesu vzniku translokací zahrnujících oblasti imunoglobulinových genů (včetně translokace t(11;14) specifické pro MCL). Sekvenční motivy nalezené v oblasti MTC totiž nasvědčují, že ke vzniku translokace dochází během defektní V-D rekombinace, která vede k ilegitimnímu spojení s lokusem *BCL-1*.⁷¹ Protože V-D-J přeskupování probíhá pouze v lymfocytech, jsou translokace s lokusy

imunoglobulinových genů významné v patogenezi celé řady dalších lymfomů, nejen MCL.⁷² V důsledku poruchy reparačních drah se v buňkách mohou hromadit další genetické změny. Vzniká genomová nestabilita umožňující buňkám získat nové vlastnosti a rozvíjet adaptační mechanismy, v jejichž důsledku dochází ke vzniku agresivních, relabujících a resistantních klonů onemocnění.



Obrázek č. 4. Deregulace mechanismů reparační DNA, jak jsou popsány u pacientů s MCL (převzato z Fernandez a kol.).⁵⁴

c) Genetické změny vedoucí k „upregulaci“ mechanismů pro přežití (AKT, NFκB, mTOR, BCL2, MCL1, FLIP) a „downregulaci“ pro-apoptotických mechanismů (BCL2L11, DR4, DR5, FAS, FADD) zajišťují buňkám selekční výhodu a nepochybně se také uplatňují v patogenezi MCL.²⁷

Onemocnění MCL je tedy vzorem molekulární kancerogeneze, protože je výsledkem kombinované poruchy řídicích mechanismů buněčného cyklu, reparačních procesů a některých signálů pro přežití.

Molekulární patogeneze MCL tedy zahrnuje komplexní změny, jejichž společnou složkou je deregulace buněčného cyklu prostřednictvím overexprese cyklinu D1 (vzácně alternativních cyklinů D typu). Další nutné genetické změny jsou u pacientů s MCL variabilní, a protože na různé úrovni a prostřednictvím různých regulačních mechanismů a signálních drah ovlivňují dráhy řídicí proliferaci buněk, je míra buněčné proliferace jejich spojovatelem. Ze složitého mechanismu molekulární kancerogeneze jsme se proto u pacientů s MCL zaměřili na sledování hladiny exprese cyklinů D typu a proliferační aktivity nádoru, která je navíc určující pro biologické chování a prognózu onemocnění MCL (viz. kap. 1.5). Očekáváme, že výzkum v této oblasti povede k návrhu nových terapeutických strategií, které by mohly zlepšit přežití pacientů s MCL.

1.5 Prognóza onemocnění a prognostické faktory MCL

Průběh onemocnění MCL je agresivní a spojuje špatné vlastnosti „high grade“ a „low grade“ lymfomů. Jedná se o onemocnění s rychlou progresí a resistencí ke konvenční terapii B-NHL. Proto křivky přežití zobrazují kontinuální a strmý pokles s mediánem přežití mezi 3–4 roky a s dlouhodobým přežíváním nižším než 15%.^{73,74} Existuje však skupina pacientů, kde má onemocnění relativně indolentní průběh a přežití se pohybuje mezi 5–10 lety bez nutnosti terapie.⁷⁴⁻⁷⁷ Biologické chování MCL je tedy heterogenní. Vzhledem ke klinické variabilitě a náročnosti intenzivních terapeutických protokolů má význam stanovit odhad prognózy a volit vhodnou terapii respektující individuální riziko onemocnění.

Proto je sledován význam řady histologických, klinických i laboratorních parametrů pro prognózu onemocnění.^{26, 78-86} V souvislosti s odhadem prognózy jsou často uváděny

cytomorfologické nebo růstové varianty. Ve srovnání s průměrem je vysloveně horší prognóza popisována u pacientů s blastickou variantou nádoru nebo s difúzním růstem.^{75, 78, 79,}

⁸⁷ Současné studie sledující rozsáhlé soubory pacientů však význam těchto variant pro odhad prognózy nepotvrzují.^{47, 83, 88} Také význam klinických parametrů jako vysoký věk v době diagnózy, stadium onemocnění, generalizovaná lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, B symptomy, infiltrace KD nebo extranodální infiltrace, anémie, nízká hladina sérového albuminu a vysoká hladina laktátdehydrogenázy (LDH), stejně jako význam mezinárodního prognostického indexu (IPI), je stále diskutován a výsledky jednotlivých studií jsou rozporné.^{75, 78, 82-86}

Role klinických a cytomorfologických parametrů pro určení prognózy onemocnění tedy není jednoznačná. Proto se současné studie zaměřují na využití biologických faktorů, které by mohly být přesnější v predikci prognózy pacientů s MCL.

Multivarietní analýzy poskytly jednoznačný závěr, že jediným statisticky významným nezávislým prognostickým faktorem je míra buněčné proliferace.^{75, 83, 88} Evropská skupina pro MCL („European MCL network“) provedla rozsáhlou klinicko-patologickou studii 304 pacientů s MCL a prokázala ústřední roli buněčné proliferace pro stanovení prognózy onemocnění. Míra buněčné proliferace je demonstrována jako nejefektivnější parametr pro určení prognózy pacientů s MCL, který je nadřazený všem dosud sledovaným histopatologickým a klinickým kritériím.⁸⁸ To může souviset s tím, že měření proliferační aktivity buněk odráží skutečné biologické chování nádoru, které je přímo spojené s prognózou onemocnění, a jedná se tedy o první biologický prognostický marker.

Proto byla buněčná proliferace zavedena u MCL jako jediný buněčný marker pro odhad prognózy a využita v mezinárodním prognostickém indexu pro MCL (MIPI). Faktor MIPI je nově popsaným a zároveň prvním parametrem, který byl specificky navržen pro pacienty s MCL. Index MIPI zahrnuje věk v době diagnózy, skóre ECOG (Eastern Cooperative

Oncology Group), hladinu LDH v séru a počet leukocytů; a jako první biologický marker odhadu prognózy využívá buněčnou proliferaci.⁸⁹

Jako proliferační marker, jehož exprese je striktně asociována s buněčnou proliferací, je tradičně využíván index Ki-67. Ačkoli funkce proteinu Ki-67 v buňce není spolehlivě známa, je exprese proteinu detekována pouze v aktivních fázích buněčného cyklu (G1, S, G2 a M).⁹⁰ Index Ki-67, který hodnotí procento imunohistochemicky pozitivních buněk, má přímý vztah k nepříznivé prognóze pacientů s MCL.^{78, 83, 88, 91, 92} S ohledem na tato zjištění se uvažuje o využití Ki-67 pro stratifikaci pacientů do klinických studií. Také další molekuly uplatňující se v průběhu buněčného cyklu, jako topoisoméráza II α a TPX2, mají význam jako prognosticky významné faktory, jak potvrdily některé studie využívající multivarietní analýzy.^{93, 94} Exprese topoisomérázy II α je rovněž úzce spojena s buněčnou proliferací. Jedná se o enzym s funkcí DNA gyrázy, který rozplétá superhelikální struktury DNA, což se uplatňuje v procesu replikace, výměny sesterských chromatid, transkripce, organizace chromosomálních smyček a segregace chromosomů v mitóze. Exprese topoisomérázy II α počíná s počátkem replikace a pokračuje, dokud není buněčný cyklus dokončen.^{95, 96} Molekula TPX2 je nově popsáný protein patřící do skupiny proteinů asociovaných s mikrotubuly. Jeho funkce je spojena s organizací mitotického vřeténka a polymerizací mikrotubulů. Podílí se na interakci s motorovým proteinem podobným kinesinu, který je odpovědný za dynamiku mikrotubulů. Funkce TPX2 se uplatňuje při segregaci mitotických chromosomů a buněčném dělení. Jeho exprese je úzce spjata s buněčnou proliferací, začíná v pozdní fázi G1 a pokračuje během fáze S, G2 a M.^{97, 98} Topoisoméráza II α i TPX2 představují nové proliferační markery, které mohou doplnit Ki-67 v měření úrovně buněčné proliferace.

Podrobné molekulární studie rovněž potvrdily ústřední roli buněčné proliferace v prognóze MCL. Analýza pomocí „microarray“ identifikovala expresní profil 20 genů v asociaci s prognózou. Všechny geny tohoto profilu jsou spojeny s buněčnou proliferací.⁹⁹

Také některé chromosomální abnormality, které vykazovaly prognostický význam, zasahují do dráhy určující míru buněčné proliferace, zejména řízení přechodu mezi fází G1 a S buněčného cyklu (viz CDKN2A, p53, cyklin D1, MDM2, CDK4, p27).²⁷

Protože většina prognosticky významných parametrů odráží proliferační aktivitu nádorových buněk, zaměřili jsme se u pacientů s MCL na sledování buněčné proliferace. Pro analýzu buněčné proliferace jsme vybrali tradičně využívaný index Ki-67, doplněný o další zmíněné proliferační markery, topoisomérázu II α a TPX2. Jak jsme uvedli v předchozích statích, MCL je modelovým onemocněním, jehož patogeneze závisí na deregulaci buněčného cyklu a buněčné proliferaci. Buněčná proliferace je faktorem, který odráží biologické chování nádoru. Stanovení buněčné proliferace může být podkladem správné stratifikace pacientů na základě individuálního biologického rizika a může v budoucnu přispět k volbě cílené individuální péče o pacienty s MCL a ke zlepšení celkového průběhu onemocnění.

Všechny dosavadní studie zaměřené na posouzení prognostického významu buněčné proliferace využívaly ke stanovení exprese proliferačních markerů imunohistochemické značení proteinu. Ačkoli metodika umožňuje dobrou korelaci morfologie nádoru s expresí proteinu a je využívána většinou pracovišť patologie, neumožňuje přesnou kvantifikaci. Jedná se o techniku, která poskytuje pouze semikvantitativní informaci o expresi dané molekuly. Získané výsledky jsou navíc obtížně standardizovatelné a reprodukovatelné. Odhad intenzity exprese i procenta pozitivních buněk je subjektivní a liší se mezi jednotlivými pozorovateli i při opakované reprodukci jednou osobou. Navíc je imunohistochemické značení citlivé na rozdíly ve fixaci materiálu a podmínky barvení. Pro využití buněčné proliferace jako prvního biologického faktoru v prognózování pacientů s MCL je nutné přesné a reprodukovatelné stanovení, které lze standardizovat napříč spektrem vyšetřujících pracovišť.^{89, 92} Jako optimální se jeví expresní profilování pomocí reverzní transkriptázové kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR). Metoda umožňuje přesně numericky hodnotit míru exprese

sledovaných genů. Jedná se o moderní technologii, která je při správném provedení a využití systému kontroly kvality standardizovatelná a reprodukovatelná po celém světě.

1.6 Infiltrace KD a MRN

Onemocnění MCL je často provázeno nádorovou infiltrací KD. Postižení KD je mnohdy zjištěno již v době diagnózy, což svědčí pro pokročilé stadium onemocnění. Přítomnost maligních buněk v KD má prognostický a terapeutický význam.^{73, 75, 83}

Infiltrace KD se tradičně hodnotí na základě morfologického nálezu. Tento způsob hodnocení je však pro záchyt nádorových buněk v KD málo citlivý. Navíc je u „low-grade“ lymfomů někdy obtížné odlišit benigní lymfoidní agregáty od infiltrace KD „low-grade“ NHL. To platí zejména pro starší pacienty, u nichž je výskyt jak benigních lymfoidních agregátů, tak NHL nejvyšší. Naproti tomu, molekulární hodnocení přítomnosti maligních buněk v KD je specifické a umožňuje detekci minimálního množství cílových molekul. Citlivost stanovení nádorově specifického markeru pomocí PCR se pohybuje v řádu 10^{-5} – 10^{-6} .¹⁰⁰ S využitím vysoce citlivých technik PCR je tak možné zachytit i nízký stupeň infiltrace, což se může uplatnit při posuzování prognózy onemocnění. Vyšetření PCR navíc splňuje podmínky detekce MRN, která je definována jako přítomnost residuálních nádorových buněk v množství pod detekčním limitem konvenčních přístupů „stagingu“ pacientů, jako klinické vyšetření, morfologická analýza KD a vyšetření počítačovou tomografií.^{101, 102} Toto submikroskopické množství však může být vysoké a nádorové buňky přetrvávající po terapii v KD mohou způsobit relaps onemocnění. Proto je eliminace molekulárně zjištěné nemoci, která je označována jako molekulární remise, studována jako možný terapeutický cíl. Stanovení MRN pomocí PCR tedy umožňuje lépe definovat kvalitu remise a včas zachytit nastupující relaps a tak přesněji řídit terapii.¹⁰³ Kvantitativní varianta

vyšetření navíc umožňuje stanovit, zda dochází k poklesu, stagnaci nebo nárůstu maligních buněk v čase, a to v období léčby i po jejím skončení.

Klinický význam sledování MRN je spolehlivě potvrzen u pacientů s leukémiemi, kde je součástí rutinně využívaných terapeutických protokolů.¹⁰⁴ U pacientů s lymfomy jsou výsledky existujících studií zatím ojedinělé. U pacientů s MCL negativní výsledek vyšetření PCR predikoval trvalou klinickou a molekulární remisi, zatímco molekulární relaps předznamenal následující klinický relaps.^{105, 106} Molekulární monitorování residuální choroby po transplantaci se také osvědčilo jako důležitý ukazatel průběhu onemocnění MCL.^{107, 108} Podle těchto počátečních zkušeností tedy má u pacientů s lymfomy sledování onemocnění v KD pomocí citlivých technik PCR podobnou klinickou důležitost jako u pacientů s leukémiemi. Nicméně ucelené studie zabývající se významem hladiny infiltrace KD v době diagnózy i v průběhu onemocnění pro predikci terapie a relapsu onemocnění u pacientů s B-NHL chybí.

Jako molekulární marker sledování onemocnění může sloužit specifická přestavba imunoglobulinů, charakteristická chromosomální translokace nebo fúzní genový produkt, aberantní gen, nebo aberantní genová exprese.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Podmínkou je přítomnost molekulárního markeru specificky v maligní populaci. U pacientů s MCL je sice charakteristickou změnou přítomnost t(11;14), ale translokaci lze molekulárně prokázat pouze u 30–50% pacientů se zlomem v oblasti MTC, a tedy až 70% pacientů s MCL není možné s využitím specifické translokace molekulárně sledovat.¹⁹ Také vyšetření nádorově specifické imunoglobulinové přestavby má pro monitoring onemocnění svá úskalí. Citlivost PCR je snížena extrémní diversitou vznikajících přeskupení. Díky přítomnosti řady fyziologických variant a využití multiplex reakce může nastat amplifikace podobných sekvencí normálních buněk na pozadí klonálního přeskupení. Může dojít k sekundárním přeměnám původního cíle PCR, které vedou ke ztrátě molekulárního markeru v průběhu nemoci. Analýza může být komplikována

také přítomností oligoklonální populace a somatickými hypermutacemi. Navíc je technika detekce přestaveb specifických pro pacienta značně technicky, časově i finančně náročná.¹⁰³

Kromě toho bylo možné kombinovaným využitím molekulární detekce t(11;14) a imunoglobulinové přestavby získat molekulární marker pouze pro 73% pacientů s MCL.¹⁰⁵

Celkově jsou tedy pro molekulární sledování průběhu onemocnění u pacientů s MCL dosud využívané postupy nedostačující a naší představou bylo zavést přístup, který by zlepšil možnosti detekce choroby na molekulární kvantitativní úrovni.

2 Cíle práce

V patogenezi onemocnění MCL je nejvýznamnější deregulace buněčného cyklu, a to zejména řízení přechodu mezi fázemi G1 a S. Tím je přímo ovlivněna proliferační aktivita buněk. A ta je nejvýznamnější v predikci prognózy. Míra buněčné proliferace je určena rychlostí a délkou buněčného cyklu a je v přímém vztahu k regulaci buněčného cyklu. Analýza proliferační aktivity tedy může sloužit jako spojující faktor všech mechanismů podílejících se na deregulaci buněčného cyklu v patogenezi MCL. V disertační práci jsme se proto zaměřili na studium exprese vybraných molekul ve vztahu k nejvýznamnějším událostem patogeneze onemocnění MCL. Klíčovou molekulou regulace přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu MCL je cyklin D1. Exprese cyklinu D1 je navíc v důsledku specifické chromosomové změny t(11;14) pro pacienty s MCL charakteristická a lze ji využít jako marker onemocnění. Proliferační aktivita je určována pomocí proliferačních markerů, jejichž exprese je specificky spjata s aktivním průchodem buněčným cyklem. Pro přesnější pochopení významu exprese cyklinu D1 v regulaci buněčného cyklu, proliferační aktivity a v progresi MCL je třeba vyšetřit hladinu exprese cyklinu D1 a proliferačních markerů na kvantitativní úrovni.

Naším cílem bylo: 1) vyvinout metodiku umožňující spolehlivě detekovat hladinu exprese cyklinu D1 na molekulární úrovni

2) stanovit hraniční hladinu exprese cyklinu D1 a vyvinout diferenciálně diagnostický přístup pro diagnostiku MCL

3) korelovat výsledky analýzy exprese mRNA s výsledky vyšetření proteinu a genu pro cyklin D1 a stanovit vzájemné vztahy na úrovni genu, mRNA a proteinu

4) sledovat hladinu cyklinu D1 v KD pacientů a v buňkách zdravých dárců

5) stanovit hraniční hladinu exprese cyklinu D1 v KD a zjistit, zda slouží jako molekulární marker průběhu onemocnění

6) sledovat dynamiku exprese cyklinu D1 v KD pacientů s MCL a stanovit význam sledování

7) vyvinout techniku umožňující kvantitativně hodnotit proliferační aktivitu buněk

8) porovnat hladiny mRNA proliferačních markerů stanovené nově vyvinutou metodikou s expresí proteinu stanoveného pomocí imunohistochemie

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Vyšetřili jsme vzorky primárních nádorů a/nebo relapsu onemocnění od pacientů diagnostikovaných na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF v rámci iniciální diagnózy nebo v rámci druhého čtení a konzultačních vyšetření. Primární diagnóza lymfomu se opírala o komplexní morfologické vyšetření, imunofenotypové vyšetření pomocí imunohistochemie nebo průtokové cytometrie, cytogenetické vyšetření pomocí FISH a molekulární vyšetření pomocí PCR. Analyzovali jsme jak archivní materiál Ústavu patologie a molekulární medicíny, tak materiál nově diagnostikovaných pacientů. Jednalo se o vzorky hluboce zmrazené nebo fixované ve formolu (u jednoho vzorku v 70% etanolu) a zalité do parafinu.

Kromě základní diagnózy lymfomu z vyšetření lymfatické uzliny nebo extranodální tkáně jsme vyšetřili aspiráty KD odebrané pacientům a zaslané na naše pracoviště při diagnóze v rámci „stagingu“ a následně v průběhu onemocnění v rámci „restagingu“. Jako kontrolní soubor jsme analyzovali KD pocházející od zdravých dárců. Vzorky KD od zdravých dárců jsme měli k dispozici v rámci mezinárodní kontroly kvality.

Všechny vzorky byly zpracovány a analyzovány v Laboratoři molekulární patologie Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK.

3.2 Imunohistochemické a FISH vyšetření

Imunohistochemické vyšetření proteinu pro cyklin D1 jsme provedli s využitím směsi primárních protilátek (klon SP4, NeoMarkers, CA, USA; klon AB447P, BioGenex, CA, USA). Stanovení translokace t(11;14) pomocí FISH jsme realizovali s využitím lokus specifické dvojbarevné translokační sondy (IgH SpectrumGreen/CCND1 Spectrum Orange,

Vysis Inc, IL, USA) hybridizující k lokusu 14q32 (IgH) a 11q13 (*CCND1*). Diagnostické imunohistochemické vyšetření a FISH vyšetření bylo provedeno dříve publikovaným postupem.¹¹²

Imunohistochemické stanovení proteinové exprese proliferačních markerů bylo provedeno s využitím detekčního systému streptavidin-biotin. Využili jsme monoklonální protilátku pro Ki-67 (klon MIB-1, Dako, Glostrup, Dánsko) a pro topoisomérázu II α (klon SWT3D1, Dako) a postupovali jsme podle protokolu výrobce. Protein TPX2 jsme testovali s využitím protilátky Ki-S2, kterou jsme laskavě získali od prof. R. Parwareshe a Dr. W. Klappera (Ústav hematopatologie a Registr lymfatických uzlin, Universitní nemocnice Schleswig-Holstein, Kiel, Německo). Postupovali jsme dle publikovaného postupu.⁹⁴

3.3 Izolace nukleových kyselin

Ze zmrazené tkáně byla celková RNA a DNA izolována trizolovou metodou. K 10 řezům zmrazené tkáně o šířce 5 μ m byl přidán 1 ml „Trizol reagent“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a dále jsme postupovali podle protokolu výrobce.

Ze vzorků fixovaných ve formolu a zalitých do parafinu (10 řezů šířky 5 μ m) jsme izolovali nukleové kyseliny s použitím komerčních kitů firmy Roche podle protokolu výrobce. Využili jsme High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Applied Science, Pfenzberg, Německo) pro izolaci RNA a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) pro izolaci DNA.

V případě vzorků KD jsme jaderné buňky izolovali metodou osmotické lýzy a uskladnili při -80°C. Další izolace nukleových kyselin probíhala stejně jako v případě zmrazených tkáňových vzorků.

3.4 Kontrola kvality nukleových kyselin

Integritu a amplifikovatelnost nukleových kyselin jsme testovali pomocí amplifikace kontrolních „housekeeping“ genů a vizualizovali na agarosovém gelu.

3.5 Reverzní transkripce

Reverzní transkripci jsme provedli v reakční směsi, která obsahovala 4 μ l 5x reakčního pufru pro reverzní transkriptázu, 2 μ l 0,1 M roztoku dithiothreitol (DTT), 1 μ l (250 pM) náhodných hexamerních primerů, po 0,2 μ l každého deoxyribonukleosid trifosfátu (dNTP) (100 mM), 1 μ l (200 jednotek) MMLV reverzní transkriptázy (Invitrogen), 10 μ l celkové denaturované RNA. Reakční směs jsme doplnili sterilní redestilovanou vodou tak, aby celkový objem činil 20 μ l. Směs jsme inkubovali při 37°C po dobu 1 hodiny.

3.6 Detekce t(11;14) a klonální přestavby imunoglobulinů

Pro analýzu t(11;14) a klonální přestavby imunoglobulinů pomocí PCR jsme využili mezinárodní protokol Biomed II.¹¹³

3.7 qRT-PCR

Kvantitativní detekci exprese cyklinu D1 a kontrolního genu β 2 mikroglobulinu jsme provedli na přístroji LightCycler 2.0 (Roche). Využili jsme specifické primery a hydrolyzační sondy systému TaqMan dle Bijwaard a kol.¹¹⁴

Expresi proliferčních markerů jsme analyzovali na přístroji iQTM5 Multicolor Real-Time PCR detection instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Navrhli a optimalizovali jsme systémy specifických primerů a LNA (Locked Nucleic Acid) sond systému „Universal Probe Library“ (Roche) (tab. 1). Analýzu jsme uskutečnili v reakční směsi 10 μ l Fast Start TaqMan Probe Master (Roche), 1 μ l každého ze specifických primerů (10 μ M) (Invitrogen), 0,2 μ l příslušné LNA sondy (10 μ M) (Roche), 1 μ l cDNA v celkovém objemu 20 μ l. Vzorky

byly amplifikovány v duplikátu. Reakce byla zahájena 2 min při 50°C, následovala pre-denaturace při 95°C 10 min. Dále probíhalo 40 cyklů amplifikace sestávajících z 15 sec při 95°C a 1 min při 60°C.

Expresi cyklinu D2, cyklinu D3 a molekuly CD19 jsme testovali na přístroji LightCycler 480 (Roche). Pro měření exprese mRNA cyklinu D2 a cyklinu D3 jsme navrhli a optimalizovali systém specifických primerů a LNA sond „Universal Probe Library“ (Roche) (tab. 1). Analýza probíhala za stejných podmínek jako analýza exprese proliferačních markerů. Pro analýzu CD19 jsme využili primery a sondu podle práce Howe a kol.¹¹⁵

<i>Transkript</i>	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>	<i>LNA sonda číslo</i>
Cyklin D2	gacttcattgagcacatcttgc	Ggtgggtacatggcaaactt	43
Cyklin D3	gcttactggatcctggagta	aagacaggtagccatccaggt	68
Ki-67	gaggtgtgcagaaaatccaaa	ctgtccctatgactctggtgt	30
Topoisoméráza II α	cagtgaagaagacagcagcaa	Agctggatccccttttagttcct	43
TPX2	acatctgaactacgaaagcatcc	ggcttaacaatggtacatccctta	51

Tabulka č. 1. Sekvence primerů a LNA sonda využitá k analýze pomocí systému „Universal Probe Library“.

3.7.1 Relativní kvantifikace

Všechny vzorky jsme amplifikovali v duplikátu. Výsledkem kvantitativní PCR v reálném čase je tzv. „crossing point“ (Cp) reakce. Jedná se o bod, kdy fluorescence vzrůstá nad fluorescenci pozadí. K tomu dochází tím dříve, čím více je analyzované molekuly ve vzorku, a tedy je tím nižší, čím vyšší je počáteční koncentrace cílové sekvence.

Protože jednotlivé analyzované molekuly se liší kvalitou, amplifikovatelností ale i množstvím buněčného materiálu a nukleových kyselin, je nutné získaná kvantitativní data normalizovat ke kvalitě i kvantitě nukleových kyselin. K tomu se využívá měření exprese tzv. „housekeeping“ genu. Pro normalizaci kvantitativní expresní analýzy jsme použili gen pro $\beta 2$ mikroglobulin, který neobsahuje žádné pseudogeny, nemá extrémně nízkou ani extrémně

vysokou expresi a jeho exprese je stabilní.¹¹⁶ Normalizovaná hodnota C_p se označuje jako ΔC_p a je srovnatelná pro variabilní vzorky.

3.7.2 Absolutní kvantifikace

Počet kopií transkriptu jsme určili z kalibrační křivky získané kvantitativní analýzou ředící řady standardu o známém počtu kopií. Jako standard jsme použili rekombinantní plasmidy, které jsme připravili klonováním transkriptu pro cyklin D1, respektive $\beta 2$ mikroglobulin.

Nejprve jsme provedli amplifikaci lokusu pro cyklin D1 a následně vložili amplifikovaný lokus do plasmidu a transformovali buňky *E. Coli* (TOPO T/A Cloning Kit, Invitrogen). Z namnožených transformovaných bakterií jsme izolovali rekombinantní plasmid pomocí kitu JetSPIN Plasmid Midiprep (Genomed, Löhne, Německo). Se znalostí délky rekombinantního plasmidu a jeho spektrofotometricky stanovené koncentrace jsme vypočítali množství kopií inzeru ve vzorku, a tak jsme získali standardní vzorek o známém počtu kopií. Následné logaritmické ředění standardu a kvantitativní PCR analýza ředící řady umožnila, spolu se znalostí konkrétního počtu kopií v jednotlivých vzorcích, sestavit standardní kalibrační křivku, ze které je možné podle C_p neznámého vzorku odečíst množství kopií daného transkriptu v konkrétním neznámém vzorku, tzv. absolutní kvantifikace.

Stejným způsobem jsme postupovali při absolutní kvantifikaci kontrolního „housekeeping“ genu pro $\beta 2$ mikroglobulin.

3.8 Statistické hodnocení

Statistické zpracování a hodnocení získaných dat jsme provedli s využitím softwaru JMP 8 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

4 Výsledky

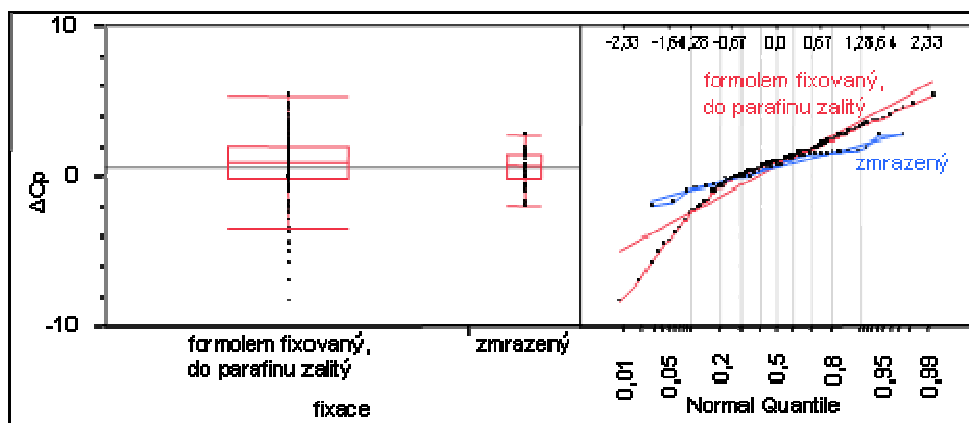
4.1 qRT-PCR pro stanovení exprese cyklinu D1- reproducibilita, spolehlivost a použitelnost

Výsledky jsou shrnuty v publikaci: Quantitative measurement of cyclin D1 mRNA, a potent diagnostic tool to separate mantle cell lymphoma from other B-cell lymphoproliferative disorders, Diagnostic Molecular Pathology, str. 72

Na našem pracovišti jsme zavedli, optimalizovali a ověřili platnost výsledků qRT-PCR pro detekci exprese transkriptu cyklinu D1 a „housekeeping“ genu ($\beta 2$ mikroglobulin) za využití hydrolyzačních sond. Provedli jsme analýzu reprodukovatelnosti výsledků vyšetřením 58 vzorků opakovaně po jednom dni, po měsíci a po půl roce. U 55/58 vzorků jsme získali vysoce reprodukovatelné výsledky. Stanovili jsme medián variability 0,090 pro testovaný transkript cyklinu D1 a 0,095 pro kontrolní transkript $\beta 2$ mikroglobulinu. Nepozorovali jsme žádný posun při opakování analýzy ani při změně produktu reverzní transkripce. Každý vzorek byl analyzován v duplikátu. Všechny duplikáty poskytly překrývající se amplifikační křivky, což potvrzuje vysokou reprodukovatelnost a spolehlivost získaných výsledků. Za amplifikovatelný produkt jsme považovali každý vzorek, který dosáhl při analýze kontrolního genu C_p reakce před 35. cyklem. Pro každý testovaný vzorek jsme získali amplifikovatelný výsledek. Vypracovali jsme optimální postup poskytující účinnou, použitelnou a reprodukovatelnou technologii qRT-PCR pro rutinní vyšetření.

Optimalizovali jsme metodiku vyšetření hladiny exprese cyklinu D1 pro vzorky zmrazené i pro vzorky fixované ve formolu a zalité do parafinu. Vyšetřili jsme 114 vzorků MCL fixovaných ve formolu a 35 zmrazených vzorků MCL. Kvantifikovatelný výsledek jsme získali pro všechny vzorky, a to i v případě, kdy kontrolní kvalitativní PCR neposkytla

z důvodu špatné kvality nukleových kyselin hodnotitelný výsledek. Kontrolní kvalitativní amplifikace totiž vyžaduje velikost amplifikovatelných úseků alespoň 200 bp, což je často z důvodu degradace nukleových kyselin při formolové fixaci limitující. Velikost produktů qRT-PCR se pohybuje mezi 60–80 bp, což zlepšuje možnosti molekulární analýzy i fragmentovaných nukleových kyselin. S využitím qRT-PCR jsme nepozorovali žádný rozdíl v efektivitě a reprodukovatelnosti analýzy mezi formolem fixovanými a zmrazenými vzorky. Celkově byly hodnoty C_p nižší ve vzorcích fixovaných ve formolu ve srovnání se vzorky zmrazenými, což vyplývá z celkově nižší kvality a integrity nukleových kyselin získaných z formolem fixovaných vzorků. Díky normalizaci naměřených dat k expresi „housekeeping“ genu pro $\beta 2$ mikroglobulin neprokázaly hodnoty ΔC_p žádný rozdíl v hladině exprese cyklinu D1 u MCL mezi vzorky fixovanými ve formolu a zalitými do parafinu a zmrazeným materiálem. U všech MCL jsme získali hodnoty ΔC_p mezi -8,35–5,33. Hodnoty ΔC_p zmrazeného materiálu se pohybovaly mezi -1,99–2,70 s mediánem 0,65, ΔC_p formolem fixovaných vzorků dosahovaly -8,35–5,33 s mediánem 0,91 (obr. 5). Statistické hodnocení získaných dat potvrdilo srovnatelné hodnoty pro zmrazené i formolem fixované vzorky (Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test: $p > 0,3425$). U 3 vzorků jsme navíc provedli přímé srovnání hladiny cyklinu D1 ve formolem fixovaném a zmrazeném materiálu, kterého jsme dosáhli současným měřením exprese cyklinu D1 ve vzorcích pocházejících ze stejného bioptického odběru a fixovaných různým způsobem. Nejistili jsme žádný rozdíl hladiny exprese. Metodu qRT-PCR jsme optimalizovali a prokázali jsme její použitelnost i pro rutinní archivní materiál, kterým jsou vzorky fixované ve formolu a zalité do parafinu.



Obrázek č. 5. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích primárních MCL podle fixace materiálu. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).

4.2 Exprese cyklinu D1 ve vzorcích primárních nádorů

První část studie shrnuta v článku: *Quantitative measurement of cyclin D1 mRNA, a potent diagnostic tool to separate mantle cell lymphoma from other B-cell lymphoproliferative disorders*, *Diagnostic Molecular Pathology*, str. 72

Studie týkající se extranodálních lymfomů presentována a shrnuta v abstraktu: *Molekulární diagnostika lymfomu z buněk pláště (MCL) extranodální lokalizace*, *Transfuze a hematologie dnes 2009, supplementum 1: 1456, str. 76*

Studie týkající se extranodálních lymfomů presentována formou vyzvané přednášky na konferenci *Clinical Cancer Immunotherapy and Translational Research, 2009, Kuba*.

Vyšetřili jsme celkem 149 vzorků MCL, 52 vzorků jiných NHL a 5 vzorků pocházejících od pacientů s reaktivní lymfadenopatií (reactive lymph node, RLN). Diagnóza byla stanovena na základě kombinovaného vyšetření morfologie a imunofenotypu. U 137/149 vzorků MCL byla navíc diagnóza potvrzena průkazem charakteristické translokace t(11;14) pomocí FISH. Ze 12 vzorků MCL, kde tkáň nebyla k dispozici pro vyšetření pomocí FISH, byla diagnóza u 6 ověřena stanovením t(11;14) pomocí FISH z jiného biotického materiálu

příslušného pacienta, u zbývajících 6 pak byla diagnóza MCL podpořena imunohistochemickým průkazem exprese proteinu cyklinu D1 v nádorových buňkách.

Hladiny exprese mRNA cyklinu D1 jsme normalizovali k hladině „housekeeping“ genu pro $\beta 2$ mikroglobulin. Hodnotu ΔC_p jsme získali odečtením C_p pro $\beta 2$ mikroglobulin od C_p pro cyklin D1. Normalizované ΔC_p se pak pohybovaly v rozmezích znázorněných tabulkou č. 2.

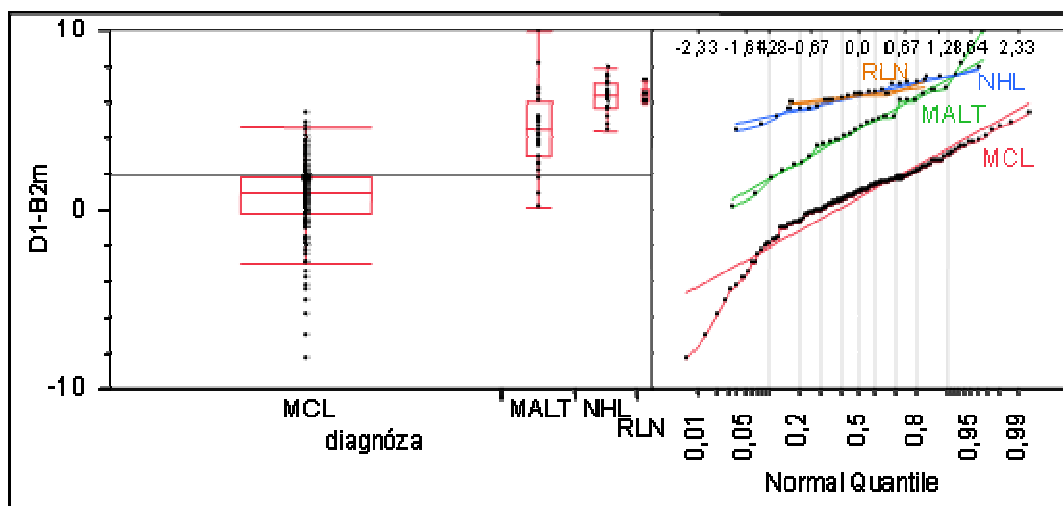
<i>Diagnóza</i>	<i>Rozmezí ΔC_p</i> (C_p cyklin D1- C_p $\beta 2$ mikroglobulin)	<i>Medián ΔC_p</i> (C_p cyklin D1- C_p $\beta 2$ mikroglobulin)
MCL	-8,35–5,33	0,87
MALT lymfom	0,13–9,88	4,45
NHL jiný	4,28–7,94	6,36
RLN	5,93–7,07	6,30

Tabulka č. 2. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích primárních nádorů.

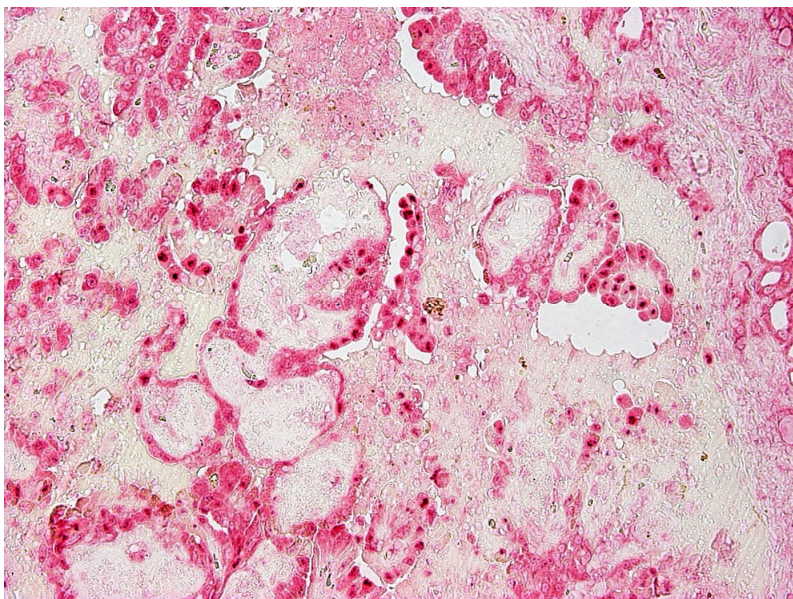
Statistická analýza prokázala významně zvýšenou expresi cyklinu D1 ve vzorcích MCL ve srovnání s ostatními NHL a s reaktivními uzlinami (Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$). Podrobnou analýzou rozložení získaných dat (obr. 6) jsme stanovili hraniční diagnostickou tzv. „cut-off“ hladinu exprese ΔC_p více než 4. Žádný vzorek ze skupiny NHL jiných než MCL ani reaktivních lymfadenopatií nevykazoval expresi nad hraniční hladinu (tzn. $\Delta C_p < 4$). U 145/149 MCL jsme s využitím stanoveného „cut-off“ limitu našli overexpresi cyklinu D1 nad hraniční hladinu ($\Delta C_p < 4$).

Skupinu „mucosa associated lymphoid tissue“ (MALT) lymfomů jsme analyzovali zvlášť, protože se jedná o skupinu extranodálních lymfomů. V rámci extranodálních lymfomů jsme zjistili zvýšenou hladinu exprese cyklinu D1 u 13/28 extranodálních MALT lymfomů. V těchto vzorcích jsme následně pomocí imunohistochemického značení lokalizovali expresi proteinu cyklinu D1 v epiteliálních a endoteliálních buňkách, zatímco nádorové buňky byly pro cyklin D1 negativní (obr. 7). V případě extranodálních MALT lymfomů se jedná často o postižení žaludku, plic, štítné žlázy nebo slinné žlázy, tedy tkáně obsahující množství

epiteliálních a endoteliálních buněk, které k regulaci buněčného cyklu fyziologicky využívají cyklin D1.¹¹⁷ A protože extranodální lymfomy obsahují často značnou příměs nenádorové populace, epiteliální a v menší míře i endoteliální buňky pak svou přirozenou expresí zkreslují kvantitativní analýzu exprese cyklinu D1. Ačkoli hladina exprese u extranodálních lymfomů byla statisticky nižší ve srovnání se vzorky MCL, zaznamenali jsme překrývající se hladiny ΔC_p u extranodálních lymfomů, což znemožňuje využití detekce hladiny exprese cyklinu D1 pro diferenciální diagnostiku lymfomů při extranodální lokalizaci.



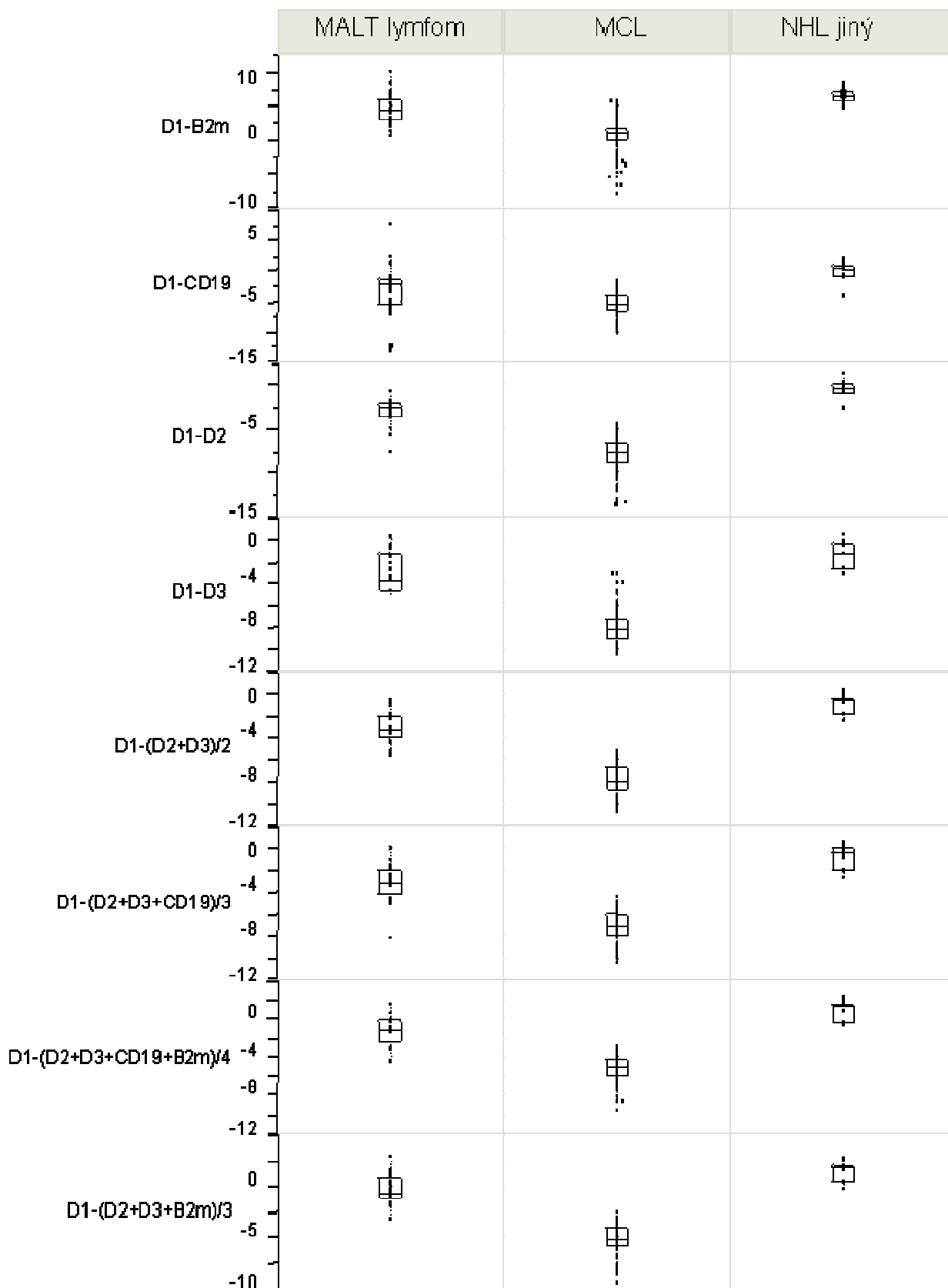
Obrázek č. 6. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích primárních nádorů. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).



Obrázek č. 7. Imunohistochemické značení proteinu cyklinu D1 v MALT lymfomu s vysokým obsahem epiteliálních cyklin D1 pozitivních buněk.

Pro využití technologie qRT-PCR i pro pacienty s primárně extranodálním postižením jsme metodiku dále upravili. Navrhli a zavedli jsme kvantitativní měření dalších genů. Pomocí hydrolyzační sondy systému TaqMan jsme detekovali hladinu exprese molekuly CD19, která je specificky exprimována v B lymfocytech a je prokázána u B lymfoproliferativních onemocnění.¹¹⁸ Pomocí systému LNA sond „Universal Probe Library“ (www.universalprobelibrary.com) jsme zavedli a optimalizovali měření hladiny exprese cyklinu D2 a cyklinu D3, které jsou B lymfocyty využívány k fyziologické regulaci buněčného cyklu.¹¹⁹⁻¹²¹ Testovali jsme variabilitu v rámci jedné reakce, mezi různými reakcemi v čase a při změně produktu reverzní transkripce. Dosáhli jsme vysoké reprodukovatelnosti, citlivosti a spolehlivosti měření. Analyzovali jsme všechny extranodální lymfomy a kontrolní skupinu lymfomů nodální lokalizace. Expresi CD19 jsme vyšetřili u 80 vzorků MCL, 21 MALT lymfomů a 12 ostatních NHL, kde se v 11 případech jednalo o uzlinovou lokalizaci a u 1 vzorku ze skupiny ostatních NHL byl vyšetřen nádor ve slezině. Expresi cyklinu D2 jsme měřili u 74 MCL, 18 MALT lymfomů a 8 jiných NHL (7 uzlinových vzorků, 1 slezina), cyklinu D3 u 70 MCL, 16 MALT lymfomů a 8 jiných NHL (7 uzlin, 1

slezina). Provedli jsme normalizaci hladiny exprese cyklinu D1 k možným kombinacím hladiny exprese β 2 mikroglobulinu, CD19, cyklinu D2 a cyklinu D3 (obr. 8). Získané hodnoty zobrazuje tabulka č. 3.

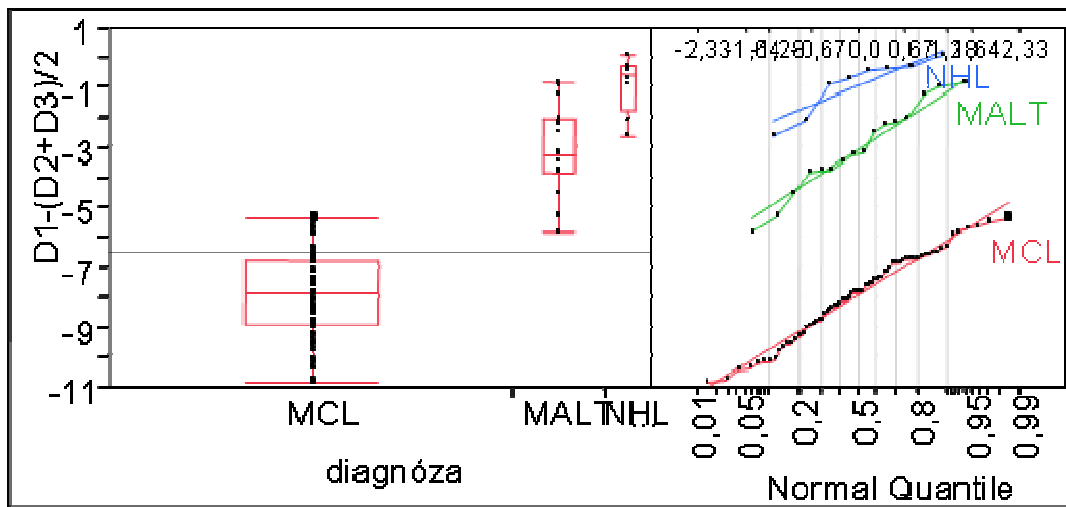


Obrázek č. 8. Přehled normalizačních transkriptů a získaných ΔC_p hodnot při využití různých kombinací normalizace.

<i>Normalizace cyklinu D1</i>	<i>MCL (rozmezí; medián)</i>	<i>MALT lymfom (rozmezí; medián)</i>	<i>NHL jiný (rozmezí; medián)</i>
Cyklin D1-CD19	-10,29–(-2,28); -5,36	-13,59–7,45; -2,20	-4,29–1,66; 0,04
Cyklin D1-cyklin D2	-13,82–(-4,58); -7,68	-7,71–(-0,95); -2,63	-2,70–1,06; -0,26
Cyklin D1-cyklin D3	-10,72–(-3,29); -8,27	-4,96–0,11; -3,66	-3,28–0,22; -1,13
Cyklin D1-(cyklin D2+cyklin D3)/2	-10,84–(-5,40); -7,87	-5,88–(-0,84); -3,25	-2,68–0,07; -0,61
Cyklin D1-(cyklin D2+cyklin D3+CD19)/3	-10,66–(-4,63); -7,04	-8,45–(-0,18); -3,02	-2,84–0,30; -0,37
Cyklin D1-(cyklin D2+cyklin D3+CD19+ β 2 mikroglobulin)/4	-9,86–(-3,11); -5,08	-4,70–1,36; -1,15	-0,95–2,05; 1,45
Cyklin D1-(cyklin D2+cyklin D3+ β 2 mikroglobulin)/3	-9,74–(-2,66); -5,19	-3,32–2,73; -0,71	-0,36–2,45; 1,74

Tabulka č. 3. Normalizované Δ Cp cyklinu D1 ve vzorcích primárních nádorů.

Jako nejúčinnější jsme prokázali normalizaci ke kombinaci exprese cyklinu D2 a cyklinu D3 (Δ Cp=Cp cyklin D1-(Cp cyklin D2+Cp cyklin D3)/2), která umožnila stanovit spolehlivý „cut-off“ limit exprese Δ Cp -5,4 a správně zařadit 93/94 lymfomů podle hladiny exprese cyklinu D1 (obr. 9). Overexpresi cyklinu D1 nad hraniční hladinu (Δ Cp<-5,4) jsme detekovali u všech 70 MCL, žádného lymfomu ze skupiny jiných NHL a pouze u 1/16 extranodálních MALT lymfomů. U tohoto případu (žena, MALT lymfom v uzlině) jsme následně pomocí metody FISH zjistili 3 signály pro lokus cyklinu D1, což pravděpodobně zvýšilo genovou dávku cyklinu D1 a vedlo k detekci zvýšené hladiny mRNA cyklinu D1. Metodika normalizace exprese cyklinu D1 ke kombinaci cyklinu D2 a cyklinu D3 tak poskytuje velmi spolehlivou informaci o hladině exprese cyklinu D1 specificky v lymfocytech. Jak zobrazuje distribuce získaných dat na obrázku 9, nedochází k překryvu hladiny exprese mezi jednotlivými diagnózami a hraničním hladinám se blíží pouze ojedinělé případy. Statistické hodnocení potvrzuje pozorovaný rozdíl (Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$) a stanovené mediány Δ Cp zdůrazňují výraznou overexpresi cyklinu D1 u MCL.



Obrázek č. 9. ΔC_p cyklinu D1 normalizované k expresi alternativních cyklínů D typu ve vzorcích primárních nádorů. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).

4.3 Korelace hladiny mRNA cyklinu D1 s *t(11;14)* stanovenou cytogeneticky (FISH), molekulárně (PCR) a s expresí proteinu stanovenou pomocí imunohistochemie

U 139 vzorků ze 145 odběrů, u kterých jsme detekovali overexpresi mRNA cyklinu D1, jsme prokázali přítomnost charakteristické translokace *t(11;14)* pomocí FISH. U 6/145 nebyl k dispozici materiál pro vyšetření pomocí FISH. Zaznamenali jsme 4 případy z celkového počtu 149 vyšetřených MCL vzorků, u kterých jsme nezjistili overexpresi mRNA cyklinu D1, ačkoli jsme našli *t(11;14)* pomocí FISH. U 2 pacientů s B-NHL jiným než MCL jsme prokázali trisomii lokusu *CCND1*. Detekovaná hladina cyklinu D1 byla u těchto pacientů zvýšená oproti fyziologické kontrole, ačkoli se nejednalo o hladinu na úrovni typické overexprese způsobené translokací. U jednoho pacienta s MCL jsme pomocí FISH našli variantní translokaci *t(11;14)* a hladina cyklinu D1 byla zvýšená pouze hraničně. Protože u 96% pacientů jsme prokázali korelaci mezi overexpresí mRNA cyklinu D1 a přítomností genetické změny ovlivňující expresi genu *CCND1*, je charakteristická *t(11;14)* a stav lokusu *CCND1* klíčovým mechanismem vedoucím k transkripční deregulaci genu pro cyklin D1.

U 75 pacientů s MCL, u kterých byla k dispozici amplifikovatelná DNA pro analýzu pomocí PCR, jsme testovali přítomnost t(11;14) v oblasti MTC. V souladu s literárními údaji jsme detekovali t(11;14) v lokusu MTC u 24 (32%) pacientů. U 51 (68%) pacientů jsme t(11;14) v MTC neprokázali. Protože jsme u všech pacientů testovaných pomocí PCR našli přítomnost t(11;14) pomocí FISH, můžeme konstatovat, že pacienti bez nalezené t(11;14) v oblasti MTC mají zlom v některém z minoritních lokusů na chromosomu 11, který nelze pomocí PCR zachytit. Zjišťovali jsme, zda lokalizace místa zlomu na chromosomu 11 může ovlivnit hladinu exprese cyklinu D1. Při srovnání pacientů se zlomem v oblasti MTC a pacientů se zlomem v některém z minoritních lokusů jsme nepozorovali žádný rozdíl v úrovni exprese mRNA cyklinu D1 (Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test: $p > 0,3708$) (tab. 4, obr. 10). Vzdálenost místa zlomu od genu *CCND1* tedy nemá vliv na úroveň exprese cyklinu D1.

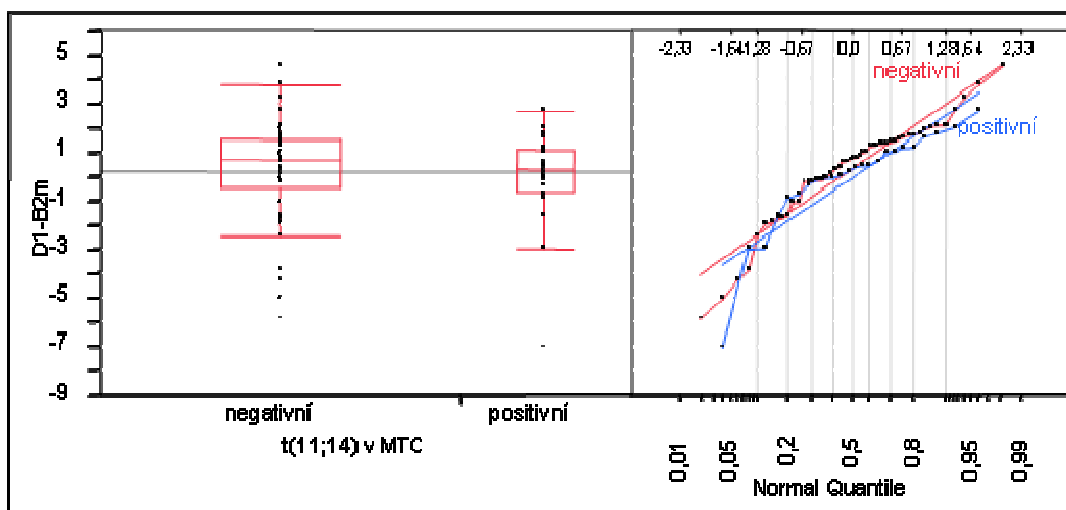
Expresi proteinu cyklinu D1 jsme pomocí imunohistochemie vyšetřovali u 139 vzorků MCL. U 10 MCL vzorků jsme neměli k dispozici materiál pro imunohistochemické vyšetření. Ze 139 imunohistochemicky vyšetřených vzorků jsme u 135 detekovali overexpresi mRNA cyklinu D1. U 4/139 jsme nenalezli overexpresi mRNA cyklinu D1, ačkoli jsme v těchto vzorcích pozorovali expresi proteinu cyklinu D1. U 132/135 MCL vzorků s overexpresí mRNA cyklinu D1 jsme našli expresi proteinu cyklinu D1. U 2 vzorků neposkytla imunohistochemická analýza reprezentativní výsledek. U 1 MCL jsme expresi proteinu pomocí imunohistochemie neprokázali, ačkoli jsme u vzorku zjistili overexpresi mRNA cyklinu D1 i přítomnost charakteristické t(11;14) pomocí FISH. Protože u 98% vzorků odpovídala hladina mRNA nalezené proteinové expresi, je důsledkem overexprese mRNA cyklinu D1 patologická syntéza proteinu v nádorových buňkách.

Analýza výsledků cytogenetického, molekulárního a imunohistochemického vyšetření poskytuje podporu zařazení qRT-PCR do vyšetřovacího postupu pacientů s MCL. Pomocí qRT-PCR jsme byli schopni získat molekulární marker pro diferenciální diagnózu u 97%

pacientů s normalizací pomocí $\beta 2$ mikroglobulinu a u 100% pacientů s normalizací cyklinem D2 a cyklinem D3. U všech vzorků jsme navíc dosáhli hodnotitelného výsledku bez ohledu na způsob fixace nebo dobu archivace materiálu. V případě vyšetření FISH jsme docílili srovnatelné specifity, avšak citlivost vyšetření neumožňuje analýzu vzorků s minimem maligních buněk. Molekulární vyšetření translokace sice splňuje podmínky detekce minimálního množství buněk, nicméně translokaci jsme zachytili pouze u 32% pacientů. Navíc u 74/149 vzorků nebylo možné z důvodu nízké kvality DNA získat hodnotitelný výsledek. Imunohistochemické stanovení exprese proteinu je v případě stanovení cyklinu D1 v lymfocytech velmi komplikované. Intenzita barvení je variabilní, pozitivita je často kolísavá a často viditelná jen u části nádorové populace, což ztěžuje reprodukovatelné hodnocení výsledků. Nicméně v současné době jsme překonali technické obtíže imunohistochemické detekce proteinu cyklinu D1 využitím vhodné kombinace primárních protilátek.

<i>Lokalizace zlomu</i>	<i>Rozmezí ΔCp</i> (Cp cyklin D1-Cp $\beta 2$ mikroglobulin)	<i>Medián ΔCp</i> (Cp cyklin D1-Cp $\beta 2$ mikroglobulin)
t(11;14) v MTC	-7,07–2,69	0,26
t(11;14) mimo MTC	-5,86–4,53	0,69

Tabulka č. 4. Normalizované ΔCp cyklinu D1 podle lokalizace zlomu.



Obrázek č. 10. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 podle lokalizace zlomu. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).

4.4 Exprese cyklinu D1 ve vzorcích KD

4.4.1 relativní kvantifikace

Výsledky shrnuty v publikaci: *Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: A molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma, International Journal of Cancer, str. 73*

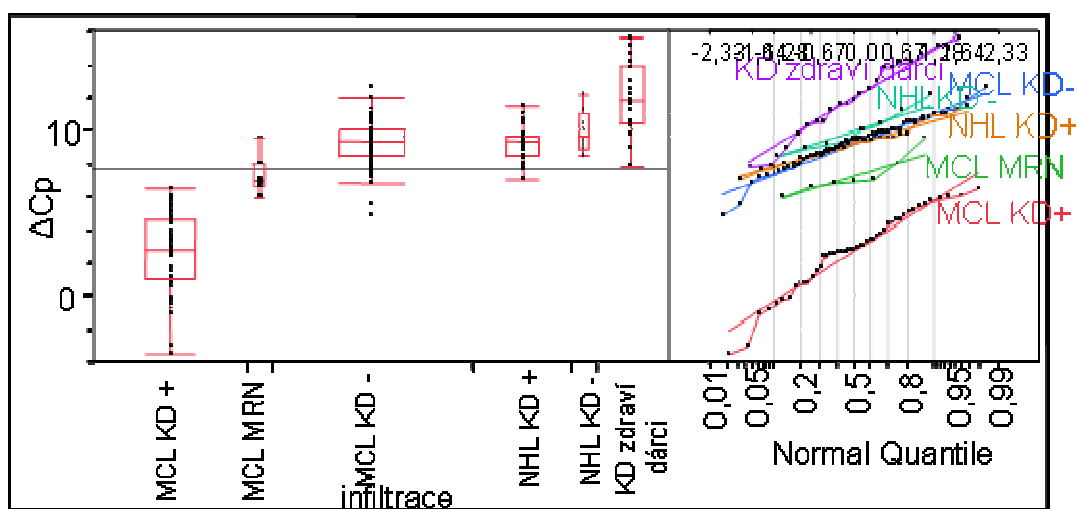
Z uvedených výsledků vyplývá, že overexprese cyklinu D1 je spolehlivým markerem buněk MCL. Testovali jsme hladinu exprese cyklinu D1 v KD odebrané pacientům s MCL, pacientům s ostatními NHL a zdravým dárcům. Infiltraci KD buňkami lymfomu jsme stanovili vyšetřením klonální přestavby imunoglobulinů nebo charakteristické translokace pomocí PCR a/nebo vyšetřením průtokovou cytometrií. Při negativním nálezu vyšetření jsme KD zařadili jako KD bez infiltrace nádorovými buňkami. Celkem jsme vyšetřili 46 KD infiltrovaných MCL, 7 KD s MRN MCL, 60 KD bez infiltrace maligními buňkami odebraných pacientům s diagnostikovaným MCL, 29 KD s infiltrací jiným NHL než MCL, 8

KD bez infiltrace od pacientů s jinými typy NHL a pro kontrolu jsme analyzovali 21 KD pocházejících od zdravých dárců. Hladinu exprese cyklinu D1 jsme normalizovali k expresi „housekeeping“ genu pro $\beta 2$ mikroglobulin. Normalizace se ukázala jako dostačující, protože KD neobsahuje buňky s přirozenou expresí cyklinu D1, kromě endotelií cév, jejichž množství však nepřesahuje stanovenou hraniční hladinu exprese cyklinu D1 pro vzorky KD. Ve všech vyšetřených vzorcích KD jsme získali amplifikovatelný výsledek, což prokazuje metodiku jako vhodný přístup vyšetření vzorků KD. Hladinu cyklinu D1 jsme korelovali s infiltrací stanovenou pomocí průtokové cytometrie a detekce klonální přestavby imunoglobulinů. Získaná data zobrazuje tabulka č. 5 a obrázek č. 11. Statistické hodnocení potvrzuje významně zvýšenou hladinu exprese cyklinu D1 v KD s infiltrací MCL (Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test: $p < 0,0001$). Stanovili jsme „cut-off“ limit exprese cyklinu D1 v KD ($\Delta C_p = 7,0$). Overexpresi cyklinu D1 ($\Delta C_p < 7$) jsme našli u 46/46 (100%) KD infiltrovaných MCL, zvýšenou expresí na hranici overexpresi cyklinu D1 jsme zjistili u 6/7 KD s MRN MCL. Velmi nízkou expresí pod hladinou „cut-off“ ($\Delta C_p > 7$) jsme pozorovali u 21/21 KD zdravých dárců, 37/37 KD od pacientů s jinými NHL a 58/60 KD bez infiltrace od pacientů s MCL. U 2/60 vzorků bez infiltrace pocházejících od pacientů s MCL jsme detekovali zvýšenou expresí. Zde může hladina exprese cyklinu D1 odrážet minimální infiltraci KD, která je pod úrovní detekovatelnosti pomocí průtokové cytometrie a klonální přestavby imunoglobulinů.

Protože žádný z vyšetřených kontrolních vzorků KD pocházejících od pacientů s jiným NHL než MCL nebo od zdravých dárců nevykazoval expresí cyklinu D1 na hladině srovnatelné s expresí v infiltrované KD pacientů s MCL (100% specifita), nezaznamenali jsme žádný falešně pozitivní výsledek. Vyloučili jsme možnost zkreslení analýzy cyklinu D1 přítomností podobných sekvencí v KD bez infiltrace buňkami MCL. Sledování hladiny exprese cyklinu D1 ve vzorcích KD je spolehlivým molekulárním markerem onemocnění MCL v KD pacientů.

Vzorek KD a stav infiltrace	Rozmezí ΔC_p (Cp cyklin D1-Cp $\beta 2$ mikroglobulin)	Medián ΔC_p (Cp cyklin D1-Cp $\beta 2$ mikroglobulin)
MCL KD +	-3,54–6,50	2,78
MCL MRN	5,86–9,54	6,91
MCL KD -	4,73–12,54	9,36
NHL KD +	7,02–11,40	9,20
NHL KD -	8,5–12,14	9,71
KD zdraví dárce	7,82–15,59	11,81

Tabulka č. 5. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích KD.



Obrázek č. 11. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích KD. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).

4.4.2 absolutní kvantifikace

Metoda qRT-PCR umožňuje získat kvantitativní informaci. To může mít význam zejména při sledování úrovně infiltrace KD. Pro přesnější posouzení hladiny infiltrace jsme zavedli metodiku absolutní kvantifikace, která umožňuje zjistit počet molekul analyzovaného transkriptu ve vzorku. S pomocí měření ředící řady jsme stanovili minimální citlivost metodiky, která zachytí přítomnost 3,2 kopie mRNA pro cyklin D1 ve vzorku.

Absolutní počet kopií jsme vyšetřili u 39 vzorků KD s infilrací MCL, 56 KD bez infiltrace odebraných pacientům s MCL, 6 KD s MRN od pacientů s MCL, 27 KD pocházejících od pacientů s jiným NHL a 12 KD od zdravých dárců (tab. 6). Analýzou

získaných dat jsme stanovili hraniční hladinu normalizovaného počtu kopií v KD (počet molekul cyklinu D1/počet molekul $\beta 2$ mikroglobulinu=0,00131). Zvýšený počet molekul jsme detekovali u 39/39 KD infiltrovaných MCL. Počet molekul lehce nad hraniční hladinou jsme identifikovali u 4/6 KD s MRN MCL. Nízkou hladinu exprese jsme našli u 54/56 KD bez infiltrace pocházejících od pacientů s MCL a u 27/27 KD pacientů s jiným NHL a 12/12 KD zdravých dárců. Stanovení absolutního počtu molekul je spolehlivým ukazatelem onemocnění MCL v KD a umožňuje sledovat dynamiku onemocnění. Potvrdili jsme vysokou specifitu hladiny exprese cyklinu D1 pro určení infiltrace KD buňkami MCL. Ve srovnání s relativní kvantifikací však nepřineslo stanovení přesného počtu kopií zvýšení specifity a citlivosti techniky a výsledky jsou vzájemně srovnatelné.

<i>Vzorek KD a stav infiltrace</i>	<i>Rozmezí N_{Cp}</i> (N kopií cyklin D1/N kopií $\beta 2$ mikroglobulin)	<i>Medián N_{Cp}</i> (N kopií cyklin D1/N kopií $\beta 2$ mikroglobulin)
MCL KD +	0,00149–0,46000	0,01634
MCL MRN	0,00063–0,02546	0,00168
MCL KD -	4,53e-5–0,00183	0,00023
NHL KD +	8,26e-5–0,00131	0,00025
NHL KD -	0,00004–0,00026	6,83e-5
KD zdraví dárce	6,08e-6–0,00011	3,76e-5

Tabulka č. 6. Normalizované počty kopií (N_{Cp}) cyklinu D1 ve vzorcích KD.

4.5 Exprese cyklinu D1 v KD pacientů s MCL v průběhu onemocnění

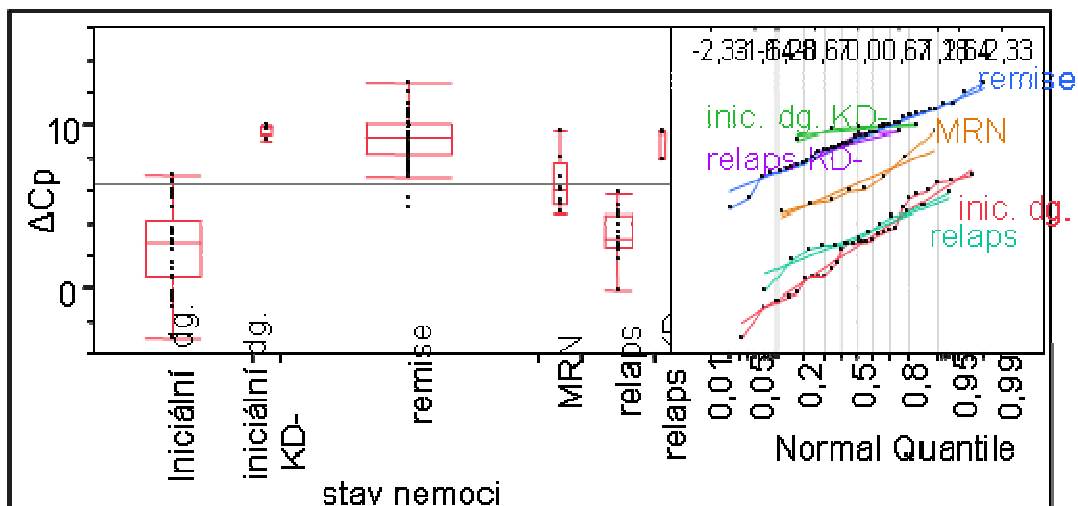
Výsledky shrnuty v publikaci: Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: A molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma, International Journal of Cancer, str. 73

Výhodou kvantitativní analýzy nádorového markeru je možnost sledování dynamiky onemocnění v průběhu i po skončení terapie. Hladinu exprese cyklinu D1 jsme korelovali s klinickým stavem onemocnění. Celkem jsme vyšetřili 34 vzorků KD odebraných pacientům

v době iniciální diagnózy (z toho 5 vzorků bez infiltrace), 16 vzorků KD v době relapsu (z toho 3 KD bez infiltrace), 8 vzorků KD z doby parciální remise a 47 KD z období kompletní remise pacientů s MCL. Získané hodnoty shrnuje tabulka č. 7 a rozložení dat zobrazuje obrázek č. 12. S využitím hraniční exprese stanovené pomocí rozsáhlé analýzy kontrolních vzorků KD jsme v době iniciální diagnózy detekovali overexpresi ($\Delta C_p < 7$) cyklinu D1 u 29/29 infiltrovaných KD. U 5 KD bez infiltrace MCL v době diagnózy jsme stanovili nízkou hladinu cyklinu D1 ($\Delta C_p > 7$). V době relapsu jsme zaznamenali signifikantní zvýšení hladiny cyklinu D1 ($\Delta C_p < 7$) u 13/13 vzorků KD. U 3 KD bez prokázané infiltrace maligními buňkami v době relapsu jsme našli nízkou hladinu cyklinu D1 ($\Delta C_p > 7$). U 45/47 KD odebraných pacientům v době remise jsme zjistili signifikantní pokles hladiny cyklinu D1 ($\Delta C_p > 7$). U 6/7 pacientů jsme v době parciální remise prokázali zvýšenou hladinu cyklinu D1 v KD, která odpovídala MRN. Celkově tedy hladina cyklinu D1 korespondovala s klinickým stavem onemocnění a sledování hladiny exprese cyklinu D1 v KD může poskytnout klinicky významnou informaci.

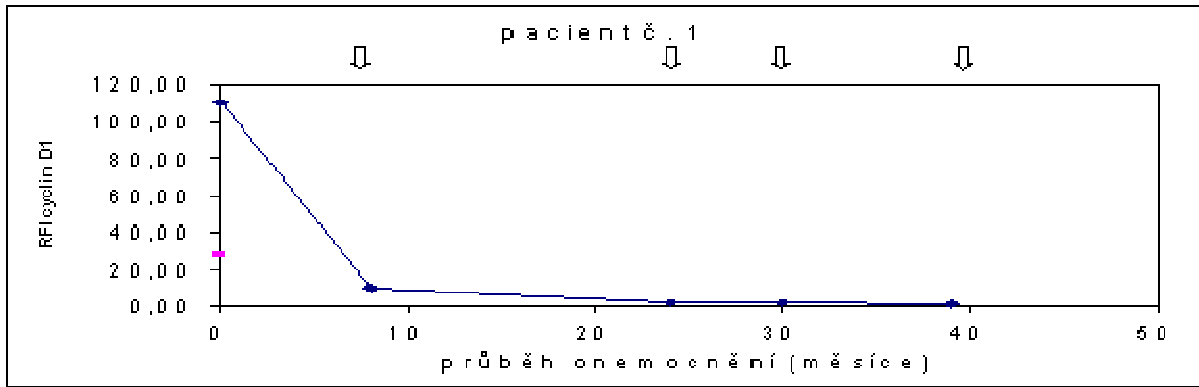
<i>Vzorek onemocnění</i>	<i>KD</i>	<i>a</i>	<i>stav</i>	<i>Rozmezí ΔC_p (C_p cyklin D1 - C_p $\beta 2$ mikroglobulin)</i>	<i>Medián ΔC_p (C_p cyklin D1 - C_p $\beta 2$ mikroglobulin)</i>
Iniciální dg				-3,06–6,91	2,74
Iniciální dg, infiltrace		KD	bez	9,05–9,94	9,76
Remise				4,73–12,54	9,21
Parciální remise				4,57–9,54	5,96
Relaps				-0,18–5,82	2,98
Relaps, KD bez infiltrace				7,84–9,60	9,40

Tabulka č. 7. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích KD odebraných pacientům s MCL dle stavu onemocnění.



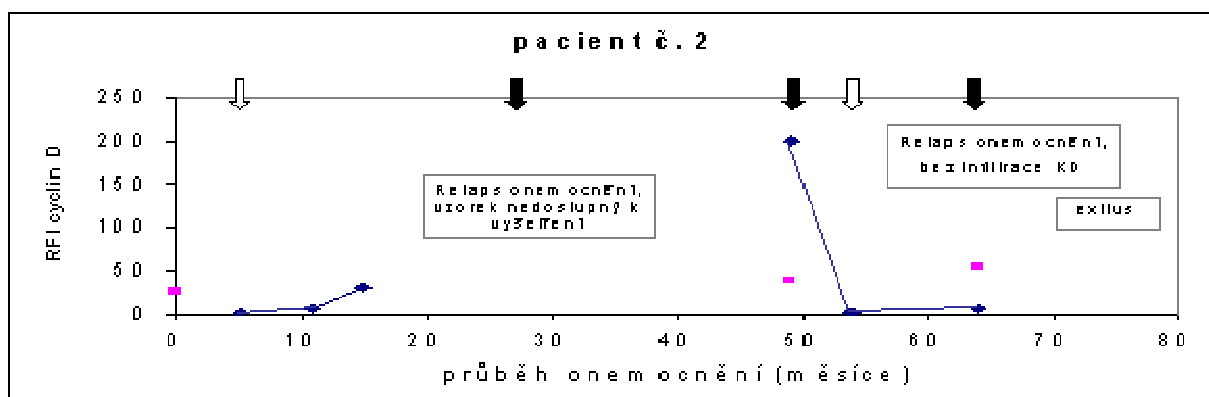
Obrázek č. 12. Normalizované ΔC_p cyklinu D1 ve vzorcích KD odebraných pacientům s MCL dle stavu onemocnění. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).

U pacientů, u kterých jsme měli k dispozici více než jeden vzorek KD odebraný v průběhu onemocnění, jsme sledovali dynamiku hladiny exprese cyklinu D1. Vyšetřili jsme celkem 81 vzorků KD odebraných 21 pacientům s MCL. Příklady individuálního sledování rozvoje onemocnění jsou znázorněny obrázky č. 13–15. Individuální sledování pomocí qRT-PCR v průběhu onemocnění ukazuje kvantitativní změny hladiny cyklinu D1, které doprovází relaps nebo remisi onemocnění. U několika pacientů, u kterých bylo možné vyšetřit KD v krátké době před relapsem, jsme zaznamenali nárůst hladiny cyklinu D1 předcházející klinickému relapsu nemoci. Tento nálezní poukazuje na význam detekce nárůstu hladiny cyklinu D1 v predikci relapsu onemocnění. Pomocí hladiny exprese cyklinu D1 můžeme spolehlivě sledovat dynamiku onemocnění v KD, kinetiku reakce na terapii, případně přítomnost aktivního onemocnění na molekulární úrovni, což může mít významný klinicko-terapeutický efekt.



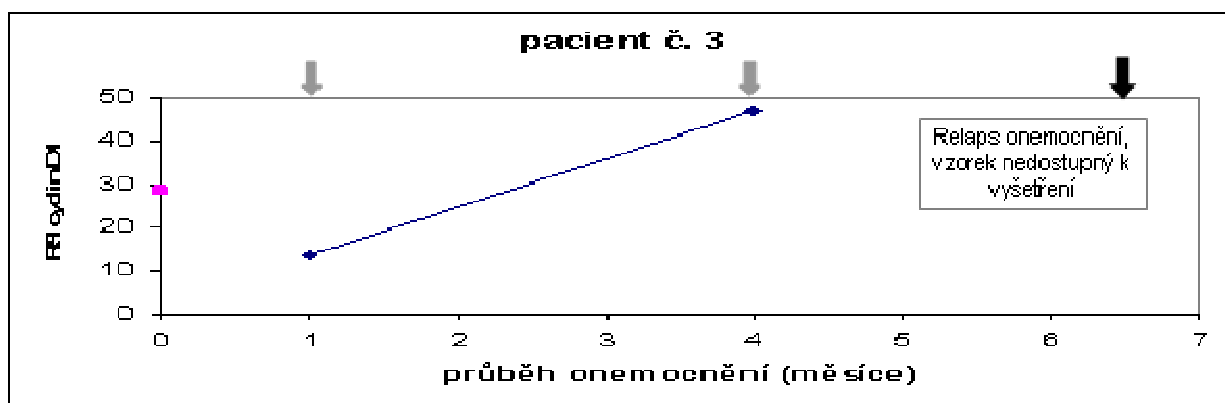
Obrázek. č. 13. Příklad individuálního sledování hladiny cyklinu D1 v průběhu onemocnění. Hladina cyklinu D1 je znázorněna pomocí „relative fold increase“ (RFI). Hodnota RFI je relativní zvýšení normalizované exprese ve srovnání s kontrolním materiálem (reaktivní uzlina, KD zdravého dárce). Purpurovým čtverečkem je znázorněn vzorek nádoru, modrými kosočtverci vzorky KD. Bílá šipka znázorňuje remisi onemocnění.

Obrázek znázorňuje overexpresi cyklinu D1 zachycenou u pacienta v primárním nádoru (uzlina) a v KD v době iniciální diagnózy. V průběhu terapie došlo k eliminaci nádorových buněk z KD a pacient dosáhl celkové remise onemocnění, což je doprovázeno poklesem hladiny cyklinu D1 v KD. Nízká hladina cyklinu D1 trvá v průběhu sledování pacienta a, jak predikováno pomocí hladiny cyklinu D1, pacient dosahuje kompletní remise onemocnění, která trvá a je klinicky potvrzena, což koresponduje s přetrvávající nízkou hladinou cyklinu D1.



Obrázek č. 14. Příklad individuálního sledování hladiny cyklinu D1 v průběhu onemocnění. Hladina cyklinu D1 je znázorněna pomocí „relative fold increase“ (RFI). Hodnota RFI je relativní zvýšení normalizované exprese ve srovnání s kontrolním materiálem (reaktivní uzlina, KD zdravého dárce). Purpurovými čtverečky jsou znázorněny vzorky nádoru, modrými kosočtverci vzorky KD. Bílá šipka znázorňuje remisi, černá šipka relaps onemocnění.

Obrázek znázorňuje overexpresi cyklinu D1 zachycenou u pacienta v primárním nádoru (uzlina). V reakci na terapii nastává celková remise onemocnění, která je doprovázena detekcí nízké hladiny cyklinu D1. V následujícím odběru KD zaznamenáváme pozvolný nárůst následovaný dramatickým vzestupem hladiny exprese cyklinu D1 v dalším odběru, ačkoli není stav spojen s klinickým projevem onemocnění a klinicky je pacient v remisi. Elevace hladiny cyklinu D1 v KD indikuje molekulární relaps onemocnění a je následována klinickým relapsem onemocnění s manifestací v uzlinách a v KD. K dalšímu vyšetření je k dispozici až lymfatická uzlina a KD v době dalšího relapsu onemocnění. U obou vzorků jsme zachytili overexpresi cyklinu D1. V reakci na terapii dochází k remisi onemocnění, které odpovídá pokles hladiny cyklinu D1 v KD. V dalším rozvoji nemoci vyšetřujeme vzorek relabujícího nádoru v rektu s vysokou hladinou exprese cyklinu a současně v této době odebranou KD, která však nevykazuje známky infiltrace buňkami MCL a tomu odpovídá detekovaná nízká hladina exprese cyklinu D1. V důsledku progrese onemocnění pacient jedenáct měsíců po tomto nálezů umírá.



Obrázek č. 15. Příklad individuálního sledování hladiny cyklinu D1 v průběhu onemocnění. Hladina cyklinu D1 je znázorněna pomocí „relative fold increase“ (RFI). Hodnota RFI je relativní zvýšení normalizované exprese ve srovnání s kontrolním materiálem (reaktivní uzlina, KD zdravého dárce). Purpurovým čtverečkem je znázorněn vzorek nádoru, modrými kosočtverci vzorky KD. Černá šipka znázorňuje relaps onemocnění a šedá šipka značí parciální remisi.

Obrázek znázorňuje sledování pacienta s overexpresí cyklinu D1 v primárním nádoru, u kterého jsme v průběhu onemocnění detekovali narůstající hladinu cyklinu D1 v KD. Po zahájení terapie jsme zaznamenali hraničně zvýšenou hladinu cyklinu D1 v KD. Hladina cyklinu D1 v následujícím odběru dále narůstá. V tomto vzorku KD následujícím tři měsíce po záchytu hraničně zvýšené exprese cyklinu D1 již prokazujeme infiltraci KD na úrovni zachytitelné histologicky. Dva měsíce po tomto nález v KD pacient relabuje klinicky s manifestací onemocnění v jazyku.

4.6 Kvantitativní hodnocení proliferační aktivity buněk- reproducibilita, spolehlivost a použitelnost

Výsledky shrnuty v publikaci: A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in mantle cell lymphoma, připravené k recenznímu řízení, str. 74

Proliferační aktivita byla dosud rutinně vyšetřována pomocí imunohistochemického značení exprese proteinu Ki-67. Imunohistochemické hodnocení však neumožňuje přesně stanovit míru exprese proliferačních markerů a pro potřeby klinických studií a stratifikace pacientů není jako semikvantitativní odhad dostačující. Navrhli jsme proto kvantitativní detekci hladiny proliferačních markerů (Ki-67, topoisomerasy II α a TPX2) pomocí qRT-PCR. Jedná se o zcela nový přístup hodnocení proliferačních markerů, který nebyl dosud ve světě

využit, proto uvádíme návrh, vývoj a optimalizaci metodiky ve výsledcích práce. Metodiku jsme optimalizovali a testovali jsme reprodukovatelnost a spolehlivost. Pro každý transkript jsme následně vybrali nejvhodnější kombinaci primerů a LNA sondy. Reprodukovatelnost výsledků jsme ověřili měřením opakovaně po dni, měsíci a po půl roce. Opakovaně jsme analyzovali 66, 71, a 67 vzorků a dosáhli jsme reprodukovatelných výsledků v 97%, 96%, a 99% případů s mediánem variability mezi jednotlivými běhy -0,55, 0,12, a 0,11 pro Ki-67, pro topoisomerasu II α a pro TPX2. Nepozorovali jsme žádný posun při opakované analýze cDNA. Současně jsme testovali reprodukovatelnost uvnitř reakčního běhu a získali jsme překrývající se amplifikační křivky s reprodukovatelností 97%, 94%, a 100% a s mediánem variability 0,27, 0,17, a 0,18 pro Ki-67, pro topoisomerasu II α a pro TPX2. Nezaznamenali jsme žádný posun při opakování analýzy ani při změně produktu reverzní transkripce. Potvrdili jsme vysokou spolehlivost a reprodukovatelnost zavedené metodiky pro stanovení hladiny exprese Ki-67, topoisomerasu II α a TPX2.

Metodiku jsme dále optimalizovali pro vyšetření zmrazeného i formolem fixovaného a do parafinu zalitého materiálu. Testovali jsme hladinu exprese Ki-67, topoisomerasu II α a TPX2 v 51 zmrazených a 46 formolem fixovaných bioptických vzorcích. Všechny vzorky poskytly hodnotitelné výsledky. Získali jsme výsledky s vysokou účinností a reprodukovatelností mezi i uvnitř jednotlivých běhů jak v případě zmrazených, tak v případě formolem fixovaných vzorků. Navíc jsme u 5 vzorků současně vyšetřili zmrazený a formolem fixovaný materiál pocházející ze stejného odběru a nepozorovali jsme rozdíl v normalizovaných hladinách. Metodiku jsme úspěšně optimalizovali pro vyšetření archivního materiálu, jakým jsou vzorky fixované ve formolu a zalité v parafinu.

4.7 Korelace hladiny mRNA proliferačních markerů s expresí proteinu stanovenou pomocí imunohistochemie

Výsledky shrnuty v publikaci: A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in mantle cell lymphoma, připravené k recenznímu řízení, str. 74

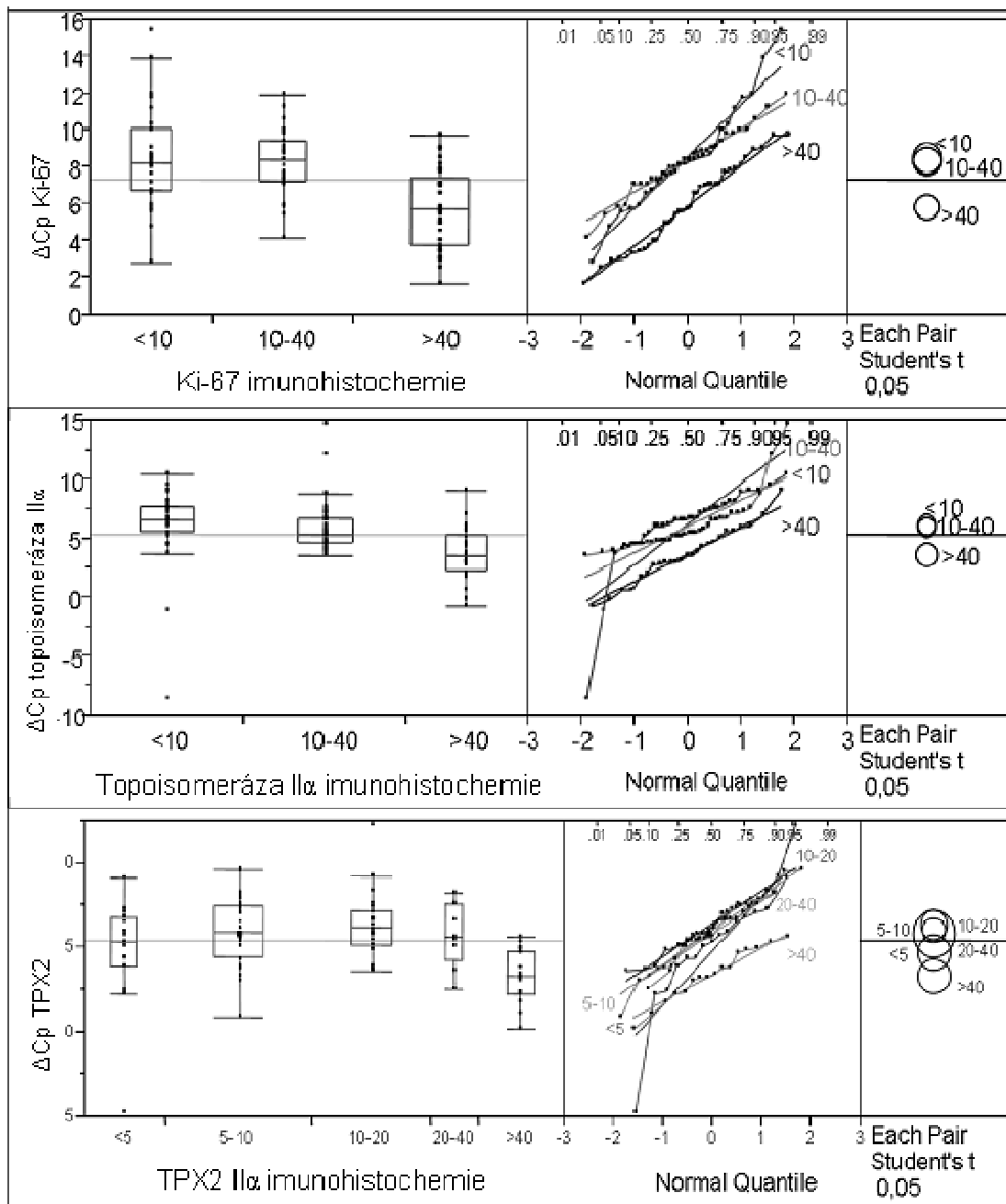
Spolehlivost nově zavedené metodiky pro hodnocení proliferační aktivity buněk jsme ověřili srovnáním výsledků měření mRNA s výsledky imunohistochemického značení proteinové exprese, kterou jsme hodnotili jako odhad procenta pozitivních buněk přítomných ve vzorku (index Ki-67, topoisomerase II α , TPX2). Vyšetřili jsme proteinovou expresi Ki-67, topoisomerase II α a TPX2 pomocí imunohistochemie u 97, 94 a 93 biotických vzorků, kde jsme měli k dispozici diagnostický materiál pro imunohistochemické vyšetření. Nehodnotitelné výsledky jsme získali v jednom vzorku pro Ki-67 a topoisomerase II α a u 3 vzorků při vyšetření TPX2. Exprese proteinu Ki-67 byla o 10–20% vyšší než exprese topoisomerase II α a o 20–40% vyšší než exprese TPX2, což odráží jejich odlišné expresní profily. Protein Ki-67 je exprimován ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (G1, S, G2 a M),⁹⁰ zatímco topoisomerase II α a TPX2 jsou přítomné v pozdní fázi S, G2 a M.^{95, 97} Index TPX2 je pak ještě o něco nižší vzhledem k velmi nízké intenzitě barvení protilátkou Ki-S2.

Protože imunohistochemické vyšetření neumožňuje přesně stanovit procento pozitivních buněk a poskytuje pouze semikvantitativní odhad hladiny exprese, zvolili jsme hodnocení imunohistochemického značení proliferačních markerů podle postupu „*European MCL network*“, které využívá členění do skupin 1+: s indexem nižším než 10%, 2+: s indexem mezi 11–40% a 3+: s indexem vyšším než 40%.⁸⁸ Výsledky jsme korelovali s hladinou mRNA stanovenou pomocí nově zavedené metodiky qRT-PCR (obr. 16). Statistická analýza pro Ki-67 a topoisomerase II α prokázala významný rozdíl hladiny mRNA mezi skupinami 2+ a 3+ a mezi skupinami 1+ a 3+ (Studentův t-test: $p=0,00002$, $p=0,00001$ pro Ki-67, respektive a $p=0,00150$, $p=0,00082$ pro topoisomerase II α , respektive). Pozorovali jsme rovněž rozdílné

hladiny mRNA mezi skupinami 1+ a 2+, které však nedosáhly hladiny statistické významnosti (Studentův t-test: $p=0,723$ pro Ki-67 a $p=0,805$ pro topoisomerasu II α). Výsledky odráží těžkosti spojené s hodnocením imunohistochemického průkazu uvedených proteinů. Poměrně dobře bylo možné rozlišit mezi skupinou nad 40% a pod 40%. Interpretace výsledků s nižší úrovní exprese byla obtížná, a to zejména v oblasti tzv. šedé zóny, kde bylo velmi nesnadné přesně rozeznat nádory s proliferací více a méně než 10%, což vedlo ke snížení statistické významnosti pozorovaných rozdílů.

V případě exprese proteinu TPX2 jsme zaznamenali celkově nižší úroveň exprese, a proto jsme rozdělili vzorky do následujících skupin 1+: 0–5%, 2+: 6–10%, 3+: 11–20%, 4+: 21–40% a 5+: 41–100%. Významně rozdílné hladiny mRNA jsme zjistili mezi skupinami 1+ a 3+ (Studentův t-test: $p=0,03060$), 2+ a 5+ (Studentův t-test: $p=0,00017$), 3+ a 5+ (Studentův t-test: $p=0,00006$) a 4+ a 5+ (Studentův t-test: $p=0,00763$). Rozdíly mezi ostatními skupinami nedosáhly statistické významnosti v důsledku problematické interpretace značení proteinu protilátkou Ki-S2. Protilátka Ki-S2 vykazovala značně variabilní intenzitu barvení, což vedlo ke komplikacím s interpretací procenta pozitivních buněk.

Korelace metodiky qRT-PCR s metodikou imunohistochemického stanovení proteinu zvýraznila obtíže spojené se stanovením proteinu na kvantitativní úrovni, kdy s pomocí imunohistochemického průkazu nebylo možné získat standardizovatelné, reprodukovatelné a přesné hodnocení hladiny exprese sledovaných molekul. Přesto jsme pozorovali korelaci mezi semikvantitativně stanovenou hladinou proteinu a hladinou exprese mRNA, což podporuje využití zavedené metodiky qRT-PCR jako spolehlivého nástroje kvantitativní analýzy proliferčních markerů.



Obrázek č. 16. Hladina exprese proliferačních markerů v korelaci s imunohistochemicky stanoveným proteinem. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Obrázek znázorňuje graf „normal quantile“ zobrazující rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky) a grafické zobrazení statistického porovnání získaných dat (paramaterický Studentův t-test).

4.8 Expese proliferačních markerů ve vzorcích lymfomů

Výsledky shrnuty v publikaci: *A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in mantle cell lymphoma, připravené k recenznímu řízení, str. 74*

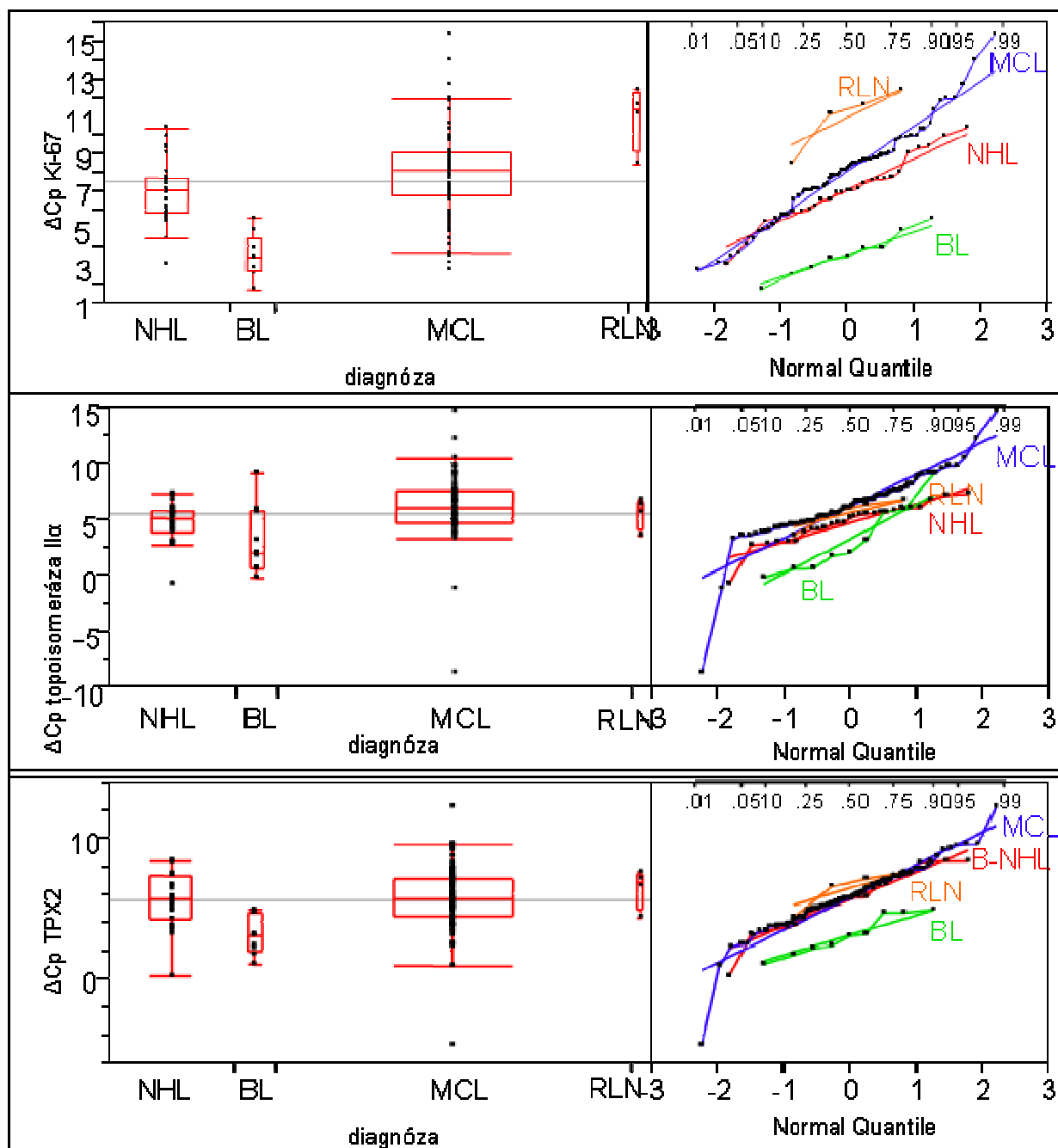
Hladinu mRNA proliferačních markerů jsme testovali u 93 vzorků primárních nádorů (63 MCL, 21 jiných B-NHL a 9 Burkittových lymfomů (BL) jako pozitivní kontrola proliferace).

Zjistili jsme lineární korelaci hladiny mRNA jednotlivých proliferačních markerů (Spearmanův korelační koeficient: 0,5831, $p < 0,0001$ pro vztah mezi Ki-67 a topoisomérázou II α , 0,675, $p < 0,0001$ pro Ki-67 a TPX2 a 0,6502, $p < 0,0001$ pro topoisomérázou II α a TPX2).

Normalizované hladiny proliferačních markerů se u jednotlivých skupin nádorů pohybovaly od velmi vysokých po velmi nízké, jak shrnuje tabulka č. 8 a zobrazuje obrázek č. 17. Nejvyšší proliferaci jsme, podle očekávání, pozorovali ve skupině BL, které jsou známy jako onemocnění s nejvyšší proliferací. Individuálně byla hladina exprese proliferačních markerů mezi jednotlivými pacienty s lymfomy variabilní, což je ve vztahu k heterogenitě buněčné proliferace a může mít klinický význam.

<i>Diagnóza</i>	<i>Rozmezí Ki-67 ΔC_p</i>	<i>Medián Ki-67 ΔC_p</i>	<i>Rozmezí Topoisoméráza IIα ΔC_p</i>	<i>Medián Topoisoméráza IIα ΔC_p</i>	<i>Rozmezí TPX2 ΔC_p</i>	<i>Medián TPX2 ΔC_p</i>
RLN	8,42–11,12	9,77	3,59–6,36	4,98	6,65–7,56	7,11
MCL	2,78–15,41	8,22	-8,73–14,70	6,53	-4,71–12,30	5,75
NHL	3,02–9,99	7,03	0,77–7,23	5,02	0,17–8,41	5,64
BL	1,69–5,58	3,50	0,27–9,16	2,04	1,05–4,97	3,07

Tabulka č. 8. Normalizované ΔC_p proliferačních markerů ve vzorcích primárních nádorů dle diagnózy.



Obrázek č. 17. Normalizované ΔC_p proliferačních markerů ve vzorcích primárních nádorů dle diagnózy. Box ploty reprezentují hodnoty mezi 25^{tým} a 75^{tým} percentilem s mediánem, podélné čáry vymezují 10^{tý} a 90^{tý} percentil a body zobrazují odlehle hodnoty. Graf „normal quantile“ zobrazuje rozložení dat (vertikální pozice) a varianci hodnot (sklon křivky).

4.9 Korelace hladiny proliferačních markerů a hladiny exprese cyklinu D1

Výsledky shrnuty v publikaci: *A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in mantle cell lymphoma, připravené k recenznímu řízení, str. 74*

Významnou korelaci jsme našli mezi hladinou exprese cyklinu D1 a úrovní proliferace stanovené pomocí mRNA topoisomérázy II α (Spearmanův korelační koeficient: 0,3664, $p > 0,0037$) a TPX2 (Spearmanův korelační koeficient: 0,2591, $p > 0,0403$). Exprese mRNA cyklinu D1 je vyšší u pacientů s vyšší hladinou exprese proliferčních markerů topoisomérázy II α a TPX2, které se objevují ve fázi S, G2 a M. Korelace mezi hladinou exprese cyklinu D1 a Ki-67 nedosáhla hladiny statistické významnosti (Spearmanův korelační koeficient: 0,1451, $p > 0,2687$). Odlišný expresní profil Ki-67, který je přítomen také ve fázi G1 buněčného cyklu, působí snížení síly korelace mezi expresí cyklinu D1 a Ki-67 na kvantitativní úrovni.

Celkově u pacientů odpovídala hladina exprese mRNA cyklinu D1 proliferční aktivitě buněk měřené pomocí hladiny exprese mRNA proliferčních markerů.

5 Diskuse

Cykliny D typu hrají důležitou úlohu v regulaci přechodu mezi fázemi G1 a S buněčného cyklu, což je klíčový bod vstupu do buněčného cyklu, a tedy regulace proliferační aktivity. Cykliny D mají tkáňově specifickou expresi. Cyklin D1 není přirozeně exprimován v hematopoetických buňkách dřeně, ani v lymfatických tkáních, v lymfocytech a jejich vývojových stádiích.¹¹⁷ Jakákoliv exprese cyklinu D1 je v těchto tkáních abnormální a může svědčit pro malignitu, nezávisle na mechanismu, který overexpresi cyklinu D1 způsobuje. V buňkách MCL je klíčovým mechanismem deregulace exprese cyklinu D1 přítomnost t(11;14).⁷³ Cyklin D1 je pak exprimován nezávisle na přítomnosti růstových faktorů a funkčně nahrazuje působení cyklinu D2 a cyklinu D3 v lymfocytech.^{23, 74} Pro patogenezi MCL se ukazuje přítomnost cyklinu D1 jako zásadní, a proto průkaz přítomnosti cyklinu D1 (nikoli t(11;14)) je důležitý pro diagnózu MCL.

Cyklin D1 může být detekován na úrovni proteinu pomocí imunohistochemie nebo na úrovni RNA pomocí blotovacích technik nebo RT-PCR.^{12, 24-26, 120, 122-124} Imunohistochemické značení proteinu bylo donedávna v případě cyklinu D1 v lymfocytech značně problematické vzhledem k citlivosti proteinu na běžně používaná fixativa, která protein degradují. Současné primární protilátky a námi využitá technologie značí cyklin D1 podstatně spolehlivěji než tomu bylo před 3 roky a dříve. Imunohistochemické vyšetření navíc neumožňuje pacienty sledovat molekulárně. Analýza RNA je vysoce citlivá, a může být tedy zkreslena přítomností malého množství nenádorových buněk s expresí cyklinu D1 (epitelie, endotelie), které jsou přítomné ve vzorku. Na pouhé kvalitativní úrovni pak vyšetření RNA poskytuje falešně pozitivní výsledky a není možné podle exprese cyklinu D1 odlišit MCL od jiných lymfomů.¹²⁴

Pomocí kvantitativní PCR v reálném čase lze stanovit množství exprese cyklinu D1 i na minimální úrovni. Detekčním limitem metodiky je záchyt 1 nádorové buňky přítomné v 10⁴–

10^5 buněk ve vzorku.^{114, 115} Lze navíc hodnotit přímo množství sledovaného transkriptu ve vzorku, a tím odlišit velmi nízkou expresi danou minimální příměsí nenádorových buněk. Metodiku qRT-PCR jsme optimalizovali tak, že poskytla hodnotitelný výsledek i v případě vyšetření archivního bioptického materiálu, kterým jsou vzorky fixované ve formolu a zalité do parafinu. To představuje významnou výhodu, neboť využití řady molekulárních technik je omezeno nízkou kvalitou nukleových kyselin způsobenou formolovou fixací. Některé molekulární analýzy tak nejsou k dispozici, ačkoli formolem fixovaná tkáň je často jediným dostupným materiálem pro diagnostické vyšetření. Prokázali jsme, že sledování hladiny mRNA cyklinu D1 slouží jako spolehlivý marker MCL. V rozsáhlém souboru pacientů s MCL jsme stanovili overexpresi cyklinu D1 nad hraniční hladinu u 97% pacientů. Tím jsme získali účinnou, specifickou a reprodukovatelnou metodiku, která rozšiřuje naše diagnostické možnosti u pacientů s lymfomy. Navíc se jedná o metodiku, která výsledky poskytuje v krátkém čase a není náročná na množství vstupního materiálu. Navzdory očekávání jsme však u MCL a dalších B-NHL při vyšetření extranodálních tkání (sliznice gastrointestinálního traktu a plic) nebyli schopni s využitím normalizace k tradičnímu „housekeeping“ genu pro $\beta 2$ mikroglobulin odlišit přirozenou expresi cyklinu D1 danou nenádorovou příměsí epiteliálních/endoteliálních buněk. Volbou vhodných normalizačních transkriptů jsme metodiku stanovení upravili a nově jsme docílili možnosti zachytit expresi cyklinu D1 specificky v lymfocytární populaci. Tím jsme získali spolehlivý molekulární marker i pro vyšetření pacientů s extranodálními lymfomy, což dosud nebylo možné. Zavedený přístup poskytuje cíl pro molekulární sledování až pro 97% pacientů s MCL, což představuje výrazné zlepšení ve srovnání s dosud využívanými metodikami.

U 4/149 MCL jsme nezachytili overexpresi mRNA cyklinu D1. Jsou popsány vzácné případy MCL, které postrádají charakteristickou expresi cyklinu D1, ale morfologicky, imunofenotypově i expresním profilem odpovídají typickým MCL.⁴⁷ Pacienti s MCL bez

overexprese cyklinu D1 alternativně overexprimují cyklin D2 v důsledku translokace t(2;12) nebo cyklin D3 jako důsledek zatím neznámé deregulace.^{47, 48} My jsme však u čtyř našich pacientů bez overexprese mRNA cyklinu D1 našli t(11;14) pomocí FISH a expresi proteinu cyklinu D1 pomocí imunohistochemie. Nejedná se tedy o tzv. cyklin D1 negativní MCL. Předpokládáme zapojení post-transkripčního mechanismu, který může zahrnovat zvýšení stability mRNA nebo zvýšení účinnosti translace proteinu cyklinu D1 a následně vést k charakteristické expresi proteinu cyklinu D1 prokázané imunohistochemicky. V literatuře jsou známy případy, kde ztráta 3' nepřekládaného konce vede ke vzniku krátkého transkriptu cyklinu D1 (1,7 kb ve srovnání s 4,5 kb dlouhým normálním transkriptem) s poločasem rozpadu mnohem delším než transkript plné délky.¹²⁵ U pacientů s MCL jsou navíc nízké hladiny dlouhého transkriptu spojeny s vyšší proliferací.¹²⁶ Transkripty s vyšší stabilitou mohou vzniknout také důsledkem mutace vedoucí k vytvoření předčasného polyadenylačního signálu nebo důsledkem delece v oblasti 3' nepřekládaného konce.¹²⁷ Také poruchy na post-translační úrovni (např. nedostatečná „ubiquitinace“) mohou vést ke zvýšené stabilizaci proteinu, a tím k imunohistochemicky prokazatelné expresi.¹²⁸ Tyto možnosti mohou vysvětlovat pozorovanou diskrepanci mezi genomickou, transkripční a proteinovou analýzou. Nesourodé výsledky analýzy mRNA a proteinu cyklinu D1 byly nalezeny nejen u MCL, ale také u B chronické lymfoidní leukémie a leukémie z vlasatých buněk.¹²⁸ Podobně práce autorů Thomazy a kol. popisuje případ s nižší hladinou mRNA a overexpresí proteinu zachycenou imunohistochemicky.¹²⁹ Naopak overexprese mRNA cyklinu D1 za současné absence proteinu byla vzácně zaznamenána u periferních T lymfomů.¹³⁰ Vzácné rozporné výsledky mezi analýzou DNA, mRNA a proteinu naznačují přetrvávající existenci dalších řídicích mechanismů na post-transkripční nebo post-translační úrovni u maligních buněk. Alternativně se může jednat o současné snížení exprese cyklinu D1 a zvýšení exprese $\beta 2$ mikroglobulinu, ačkoli je $\beta 2$ mikroglobulin popsán jako nejvhodnější normalizační transkript

se stabilní expresí v různých tkáních a různých buněčných typech.¹¹⁶ Nelze vyloučit ani existenci polymorfismu nebo mutace, která brání účinné detekci sledované sekvence pomocí PCR.

Přes negativní nález u zmíněných 4 nemocných jsme však našli korelaci na úrovni DNA (translokace t(11;14) stanovená FISH), mRNA (cyklin D1 měřený pomocí qRT-PCR) a na úrovni proteinu (cyklin D1 detekovaný imunohistochemicky). To dokládá, že v patogenezi MCL je zásadní přítomnost charakteristické translokace vedoucí k overexpresi mRNA a následné patologické syntéze proteinu cyklinu D1. Jednoznačným patogenním mechanismem je u většiny pacientů přímá dráha translokace genu → „upregulace“ mRNA → patologická tvorba proteinu. Přímý vztah mezi stavem lokusu *CCND1* a úrovní exprese mRNA cyklinu D1 potvrzuje také zjištění, že u pacientů s trisomií odpovídala hladina mRNA zvýšené genové dávce a u pacientů s variantní translokací jsme pozorovali mírné zvýšení exprese, která nedosahovala overexprese cyklinu D1. Pouze vzácně (v naší studii 4/149 pacientů) může do této základní regulační dráhy vstoupit mechanismus regulace post-transkripční nebo post-translační a vést k charakteristickému fenotypu MCL. Prokázali jsme, že pro patogenezi MCL je zásadní přítomnost exprese cyklinu D1 nezávisle na mechanismu, který k patologické expresi cyklinu D1 v lymfocytech vede. Proto také pro diagnostiku a molekulární sledování pacientů s MCL je vhodné využít expresi cyklinu D1 spíše než přítomnost charakteristické translokace.

Prokázali jsme, že exprese cyklinu D1 je také velmi účinným markerem sledování onemocnění MCL v KD. Spolehlivě jsme identifikovali infiltraci KD buňkami MCL u 97% pacientů, zatímco u žádného pacienta s jiným NHL ani u vzorků KD odebraných zdravým dárčům jsme zvýšenou hladinu cyklinu D1 nezaznamenali (100% specifita). Hladina cyklinu D1 odpovídala procentu maligních buněk MCL stanovenému pomocí průtokové cytometrie. Měření hladiny exprese cyklinu D1 v KD pacientů s MCL dává spolehlivou informaci o

úrovni infiltrace KD. Ve srovnání s dosud využívaným přístupem detekce klonální přestavby imunoglobulinů nebo translokace t(11;14), který neposkytuje molekulární cíl pro všechny pacienty, jsme byli schopni molekulárně sledovat 97% pacientů s MCL. Metodika stanovení exprese cyklinu D1 pomocí qRT-PCR navíc umožňuje získat přesnou kvantitativní informaci a lze tak hodnotit nárůst nebo pokles přítomnosti nádorových buněk ve srovnání s předchozím odběrem a potenciálně tak sledovat průběh onemocnění na molekulární úrovni (včetně detekce MRN). Vyšetření MRN se v současnosti stává součástí moderních terapeutických protokolů, využívá se pro řízení dávkování léčby, stanovení terapeutické odpovědi, případně k analýze účinnosti nových léčebných přístupů.¹⁰³ Pomocí hladiny exprese cyklinu D1 jsme získali přístup umožňující spolehlivě sledovat dynamiku onemocnění v KD, kinetiku reakce na terapii, případně přítomnost aktivního onemocnění na molekulární úrovni, což může mít klinicko-terapeutický efekt.

U 2 vzorků, u kterých průtoková cytometrie ani průkaz klonální přestavby nezachytili infiltraci KD, jsme zaznamenali overexpresi cyklinu D1. U 1 vzorku, kde byla pomocí průtokové cytometrie a klonální přestavby detekována MRN, jsme zvýšenou hladinu cyklinu D1 nenalezli. Tyto vzácné nejednotné výsledky mohou být způsobeny metodikou detekce MRN: odlišná citlivost a detekční limit použitých metodik nebo využití odlišných cílů pro sledování MRN. Také mohou odrážet skutečnou biologickou situaci. Cyklin D1 jako klíčová molekula regulace buněčného cyklu může vypovídat více o přítomnosti aktivního onemocnění než prosté stanovení infiltrace s využitím průtokové cytometrie nebo klonální přestavby. Nárůst hladiny cyklinu D1 pak může odrážet nadcházející relaps ještě v době, kdy ostatní metodiky infiltraci nezachytí.

Zjistili jsme, že hladina cyklinu D1 odpovídá klinickému stavu onemocnění. Je vysoká při iniciální diagnóze v KD s infiltrací. Pokles cyklinu D1 doprovází dosažení remise onemocnění a k výraznému nárůstu dochází při relapsu. Výsledky indikují možné využití

cyklinu D1 v predikci klinického stavu onemocnění. Vzorky odebrané v době před relapsem rovněž poukazují na možnost predikovat relaps při nárůstu hladiny cyklinu D1 v KD. Sledování dynamiky hladiny exprese cyklinu D1 v KD v průběhu onemocnění umožňuje monitorovat dynamiku rozvoje nemoci. Pro spolehlivé potvrzení prediktivního významu je však nutné testovat více vzorků v době před relapsem. V současnosti neexistuje protokol určující nutnost vyšetřovat KD v průběhu léčby, proto jsou často k dispozici až vzorky odebrané v rámci „restagingu“ při relapsu nemoci a vzorky odebrané v krátké době před relapsem pro analýzu chybí. Teprve prospektivní studie, která bude měřit hladiny cyklinu D1 v KD odebrané v pravidelných intervalech v průběhu terapie, umožní určit časování a frekvenci odběrů pro účinné sledování léčby a predikci relapsu. Je však nutné brát v úvahu také etické omezení pravidelné aspirace KD u pacientů v remisi. Nicméně se ukazuje, že sledování kinetiky terapeutické odpovědi, kterou pro pacienty s MCL může poskytnout měření hladiny exprese cyklinu D1 v KD, má větší výpovědní hodnotu než prosté stanovení MRN v daném čase. Proto lze doporučit odběr a kvantitativní analýzu KD v pravidelných intervalech v průběhu i po skončení léčby.

Cyklin D1 má důležitou úlohu v deregulaci buněčného cyklu MCL a současně může měření hladiny exprese cyklinu D1 sloužit jako molekulární marker onemocnění ke sledování a predikci rozvoje choroby u pacientů s MCL. Předpokládáme tedy využití cyklinu D1 jako markeru u dalších onemocnění, u kterých je overexprese cyklinu D1 popsána v patogenezi. Zejména se jedná o karcinom mléčné žlázy a některá zhoubná onemocnění dětí a dospělých, zejména Ewingův sarkom a neuroblastom.¹³¹⁻¹³⁵ U těchto onemocnění je přítomnost mikrometastáz v uzlině nebo MRN ve dřeni a periferní krvi významná pro odhad prognózy.¹³⁶⁻¹³⁹ Očekáváme, že kvantitativní PCR může s pomocí vhodného nádorového markeru, kterým by mohla být exprese cyklinu D1, poskytnout prostředek sledování mikrometastáz a MRN. Navíc má cyklin D1 u pacientek s nádory mléčné žlázy vztah k

terapeutické odpovědi. Suprese translace mRNA cyklinu D1 pomocí mikroRNA vedla k omezení proliferace nádorových buněk.¹⁴⁰ Overexprese cyklinu D1 také tlumí růstově inhibiční účinek anti-estrogenů a progestinů využívaných k léčbě karcinomů mammy.¹⁴¹ Zvýšená exprese cyklinu D1, cyklinu E1 a E2 je navíc u pacientek s primárním nádorem mléčné žlázy spojena s rychlejší progresí a s agresivnějším průběhem onemocnění,^{142, 143} což může ilustrovat podobně přímý vztah mezi hladinou exprese cyklinu D1 a proliferační aktivitou, jak jsme prokázali u pacientů s MCL. Zásadní úloha cyklinu D1 v patogenezi popsaných onemocnění je zřejmá a analýza prostřednictvím qRT-PCR může v budoucnu přinést nahlédnutí do regulačních mechanismů i využití exprese cyklinu D1 jako molekulárního markeru nemoci, podobně jako jsme v této práci demonstrovali pro pacienty s MCL.

Kromě kvantitativního stanovení mRNA cyklinu D1 jsme vyvinuli a zavedli nový přístup umožňující na kvantitativní úrovni přesně, spolehlivě a reprodukovatelně měřit hladinu exprese proliferačních markerů. Prokázali jsme účinnost metodiky v čerstvě zmrazené tkáni, ale také pro archivní bioptický materiál. Kvantitativní PCR je v současnosti navíc technicky i finančně dostupná na mnoha pracovištích molekulární diagnostiky. Přístup pomocí qRT-PCR tak splňuje požadavky klinických studií, kterým přesné a standardizovatelné hodnocení na kvantitativní úrovni dosud chybělo, ačkoli podle doporučení „Lymphoma, Leukemia Molecular Profiling Project“ je nutné zahrnout kvantitativní stanovení buněčné proliferace do klinických studií.⁹⁹ S využitím rutinně využívaného imunohistochemického vyšetření však bylo dosud možné míru proliferační aktivity pouze odhadovat, což je uváděno jako tzv. semikvantitativní hodnocení. Pro klinické aplikace je technika imunohistochemického značení proteinu tedy málo objektivní a tím nevhodná. V naší studii jsme zavedli a prokázali účinnost metodiky qRT-PCR pro kvantitativní

hodnocení buněčné proliferace. Technika qRT-PCR tak má potenciál stát se rutinním nástrojem pro odhad prognózy v klinické praxi.

Protože prognostický význam imunohistochemicky stanovené proliferální aktivity je spolehlivě dokumentován v písemnictví a my jsme v naší studii prokázali korelaci zavedené metodiky qRT-PCR s imunohistochemickým značením proteinu, předpokládáme prognostický význam detekce exprese mRNA pomocí qRT-PCR. Navíc se ukazuje, že délka přežití pacientů je závislá právě na kvantitativním rozdílu progresu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu,⁹⁹ což zdůrazňuje význam analýzy proliferálních markerů na přesné kvantitativní úrovni. Teprve rozsáhlá prospektivní klinicko-patologická studie může odpovědět na otázky odhadu prognózy, stratifikace a individualizace léčby na základě měření hladiny mRNA proliferálních markerů. Hladina exprese topoisomerázy II α může být navíc ve vztahu k úrovni sensitivity k inhibitorům topoisomerázy II α , které jsou součástí léčebných protokolů MCL. In vitro je pozorováno, že buňky s vyšší hladinou proteinu topoisomerázy II α jsou citlivější k účinkům terapie založené na inhibici působení tohoto enzymu.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Jak vyplývá z funkce topoisomerázy, která je odpovědná za správný zlom a znovuspojení DNA v procesu replikace a reparace, následkem vyřazení enzymu je hromadění zlomů, které buňka v procesu reparace nesprávně spojí, což vede ke vzniku komplexních změn a spojení DNA, které jsou pro buňku letální.^{96, 146} Na základě vztahu chemosensitivity k množství proteinu nalezeného v buňkách in vitro lze předpokládat, že pacienti s vyšší úrovní exprese topoisomerázy II α budou lépe reagovat na terapii inhibitory topoisomerázy II α a naopak nemusí tuto agresivní terapii podstupovat pacienti s nízkými hladinami exprese.¹⁴⁷ Pro verifikaci vztahu hladiny topoisomerázy II α a chemoresistence k inhibitorům topoisomerázy II α je třeba další klinická korelace, dlouhodobé sledování pacientů a navazující klinicko-patologická studie. V budoucnu umožní získaná data využít měření hladiny exprese

topoisomerázy II α k indikaci terapeutických dávek na základě individuálního genetického profilu nádoru, a tak postupovat v rámci tzv. individualizované medicíny.

Vzájemně spolu exprese mRNA Ki-67, topoisomerázy II α a TPX2 korelovaly, což vyplývá z jejich podobného expresního profilu v proliferujících buňkách. Protein Ki-67 je exprimován v průběhu fáze G1, S, G2 a M buněčného cyklu.⁹⁰ Topoisomeráza II α a TPX2 jsou exprimovány v průběhu pozdní fáze S, G2 a M.^{95, 97} Protože fáze G1 může být variabilně dlouhá a buňka může před průchodem restričním bodem v pozdní fázi G1 během buněčným cyklem zpomalit nebo dokonce zastavit, dává index Ki-67 spíše informaci o schopnosti buněk dělit se než o aktuálním proliferujícím stavu buněk.⁹⁰ Jak vyplývá z regulace buněčného cyklu, kterou jsme uvedli v úvodu, buňka po překonání restričního bodu zpravidla buněčný cyklus v krátké době dokončí. Proto exprese topoisomerázy II α a TPX2, která je detekována až po průchodu restričním bodem, poskytuje přesnější informaci o skutečném procentu aktivně se dělících buněk. Navíc exprese těchto markerů je popsána jako spolehlivější prognostický ukazatel pro pacienty s MCL,^{93, 94} což je ve shodě s jejich aplikací jako přesnějších proliferačních markerů.

Ve své práci jsme našli korelaci mezi hladinou exprese cyklinu D1 a proliferačními markery, topoisomerázou II α a TPX2. Korelaci mezi Ki-67 a cyklinem D1 jsme neprokázali. Předpokládáme vliv odlišného expresního profilu, kdy index Ki-67 je vedle fáze S, G2 a M buněčného cyklu exprimován již v brzké fázi G1, tedy před průchodem restričním bodem. Vzhledem k variabilní délce fáze G1 a možnosti buněčný cyklus zastavit i v době, kdy již je exprese Ki-67 zahájena, může být index Ki-67 nadhodnocen a není zcela přesným ukazatelem aktivní proliferace.

Nicméně průkazná korelace hladiny mRNA cyklinu D1 s markery buněčné proliferace exprimovanými až po překonání restričního bodu poukazuje na závislost regulace průchodu restričním bodem na hladině cyklinů D typu. Tím dokládá, že řízení buněčného cyklu se

odehrává více kvantitativně spíše než spuštěním aktivní proliferace po dosažení kritické hladiny cyklinu D1. To je v souladu s moderními poznatky řízení buněčného cyklu, podle kterých jsou klíčové hladiny jednotlivých komplexů cyklin/CDK, které ovlivňují vlastní aktivitu a titrují aktivitu vlastních inhibitorů i inhibitorů jiných komplexů cyklinů s CDK.

Pro patogenezi MCL průkaz takové korelace znamená, že čím vyšší bude exprese cyklinu D1, tím vyšší bude proliferace nádorových buněk. Navržená dráha, kdy translokace přímo působí transkripční deregulaci a overexpresi mRNA cyklinu D1 a ta vede k patologické syntéze proteinu cyklinu D1, pak může být doplněna o poslední krok, a tím je přímá „upregulace“ přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu zvýšením proteinu cyklinu D1. V práci jsme tedy objasnili vztah mezi stavem genetického materiálu, transkripční aktivitou, proteinovou syntézou a výsledným efektem na proliferaci buněk u MCL. Kromě nesporného významu cyklinu D1 a proliferačních markerů v aplikované medicíně, jsme tak napomohli odkrýt část regulační dráhy, která se uplatňuje při maligní transformaci MCL.

6 Závěr

Vypracovali jsme optimální postup umožňující přispět k diferenciální diagnóze MCL na molekulární úrovni. Zavedená metodika poskytuje podporu diferenciální diagnózy MCL s vysokou spolehlivostí, včetně diagnostiky lymfomů extranodální lokalizace, a poskytuje molekulární cíl pro sledování dynamiky onemocnění. Dosud bylo možné molekulárně sledovat pouze 30–50% pacientů s MCL nesoucích translokaci t(11;14) v MTC. Kvantitativní detekce cyklinu D1 tak představuje významné zlepšení možnosti molekulárně podpořit diagnózu MCL a sledovat rozvoj onemocnění (až 100% MCL pacientů s overexpresí cyklinu D1). Vyšetření hladiny exprese cyklinu D1 umožňuje spolehlivou, citlivou a relativně snadnou analýzu onemocnění v KD, včetně stanovení MRN. Korelace s klinickým stavem onemocnění prokázala, že měření hladiny exprese cyklinu D1 jako nádorového markeru onemocnění v KD poskytuje významnou informaci o rozvoji onemocnění a reakci na terapii na molekulární úrovni a je vhodným prostředkem hodnocení dynamiky onemocnění v KD, včetně dynamiky MRN. Sledování dynamiky hladiny exprese cyklinu D1 ve vzorcích KD je spolehlivým nástrojem monitorování kinetiky onemocnění a má význam v predikci relapsu onemocnění.

Zavedli jsme techniku přesného a objektivního měření exprese proliferačních markerů, které bylo dosud možné hodnotit pouze semikvantitativně pomocí imunohistochemického značení proteinu, což je pro objektivizaci výsledků a tedy pro prospektivní klinické potřeby nedostačující. Potvrdili jsme spolehlivost, reprodukovatelnost a objektivizaci hodnocení míry exprese proliferačních markerů jako významných prognostických faktorů. Zavedená metodika splňuje požadavky klinických studií a otvírá možnost rutinního vyšetření prognostických faktorů na kvantitativní úrovni, jak je doporučeno v rámci mezinárodních projektů „Lymphoma, Leukemia Molecular Profiling Project.“

Zjistili jsme úzký vztah mezi genem *CCND1*, hladinou mRNA, patologickou expresí proteinu cyklinu D1 a proliferační aktivitou MCL, což napomohlo k objasnění části regulačních mechanismů MCL na buněčné úrovni. Pro deregulaci buněčného cyklu je klíčová změna v regulované hladině cyklinu D1, která pomáhá překonat restriční bod v pozdní fázi G1 a buňkám poskytuje proliferační výhodu. Klíčovým mechanismem deregulace hladiny cyklinu D1 je overexprese mRNA v důsledku translokace t(11;14). Význam ostatních mechanismů uplatňujících se v řízení buněčného cyklu, jak jsou popsány v úvodu, zbývá dále prostudovat. Navazující experimenty *in vitro* mohou vzájemné vztahy gen, mRNA, protein a řízení buněčného cyklu experimentálně ověřit a navrhanou dráhu deregulace buněčného cyklu u MCL dále rozšířit.

7 Seznam použitých zkratk

ATM	"ataxia telangiectasia mutated"
BCL-1	"B-cell lymphoma 1"
BL	Burkittův lymfom
B-NHL	non-Hodgkinův lymfom z B buněk
CDK	cyklin dependentní kináza
CDKi	inhibitor cyklin dependentní kinázy
Cp	"crossing point"
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DTT	dithiothreitol
ECOG	"Eastern Cooperative Oncology Group"
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
IgH	těžký řetězec imunoglobulinu
IPI	mezinárodní prognostický index
KD	kostní dřeň
LDH	laktát dehydrogenáza
LNA	"locked nucleic acid"
MALT	"mucosa associated lymphoid tissue"
MCL	lymfom z buněk pláště
MIPI	mezinárodní prognostický index pro MCL
MRN	minimální residuální nemoc
MTC	"major translocation cluster"
NHL	non-Hodgkinův lymfom
PCR	polymerázová řetězová reakce
qRT-PCR	reverzní transkriptázová kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RFI	„relative fold increase“
RLN	"reactive lymph node"
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce

8 Přílohy

8.1 Přiložené publikace

P1. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative Measurement of Cyclin D1 mRNA, a Potent Diagnostic Tool to Separate Mantle Cell Lymphoma From Other B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Diagnostic Molecular Pathology* 2008 Mar;17(1):39-50

P2. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: A molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma. *International Journal of Cancer* 2008 Sep 17;132(12):2865-2870

P3. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in mantle cell lymphoma, *připraveno k recenznímu řízení.*

P1. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative Measurement of Cyclin D1 mRNA, a Potent Diagnostic Tool to Separate Mantle Cell Lymphoma From Other B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Diagnostic Molecular Pathology* 2008 Mar;17(1):39-50

P2. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: A molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma. *International Journal of Cancer* 2008 Sep 17;132(12):2865-2870

P3. Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in mantle cell lymphoma, *připraveno k recenznímu řízení*.

8.2 *Publikační a přednášková činnost*

Publikace

Krsková L, Kalinová M, **Břízová H**, Mrhalová M, Sumerauer D, Kodet R. BCL2 as a suitable molecular target for therapy in synovial sarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2009 Aug;193(1):1-8 (IF 1,482)

Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of cyclin D1 expression: A molecular marker for minimal residual disease monitoring and a predictor of the disease outcome in patients with mantle cell lymphoma. *International Journal of Cancer* 2008 Sep 17;132(12):2865-2870 (IF 4,734)

Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative Measurement of Cyclin D1 mRNA, a Potent Diagnostic Tool to Separate Mantle Cell Lymphoma From Other B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Diagnostic Molecular Pathology* 2008 Mar;17(1):39-50 (IF 1,770)

Kalinova M, Krskova L, **Brizova H**, Kabickova E, Kepak T, Kodet R. Quantitative PCR detection of NPM/ALK fusion gene and CD30 gene expression in patients with anaplastic large cell lymphoma – residual disease monitoring and a correlation with the disease status. *Leukemia Research* 2008 Jan;32(1):25-32 (IF 2,390)

Krsková L, Kalinová M, **Břízová H**, Mrhalová M, Sumerauer D, Kodet R. Molecular and immunohistochemical analysis of ERBB2 expression in correlation with proliferation rate in synovial sarcoma. *Diagnostic Molecular Pathology* 2007 Dec;16(4):211-7 (IF 1,770)

Krátká sdělení v peer-review časopisech

Brizova H, Mrhalova M, Augustinakova, Hilska I, Neradova M, Kodet R. Quantitative monitoring of minimal residual disease and prognostic markers in patients with mantle cell lymphoma. *Journal of Hematology and Transfusion Medicine* 2008, Volume 18 (supplement)

Brizova H, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of the mRNA levels of cyclin D1 and proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in patients with mantle cell lymphoma. *Virchows Archiv* 2007 Aug;451:144-145

Břízová H, Kalinová M, Krsková L, Augustiňáková A, Hilská I, Kodet R: Quantitative analysis of cyclinD1 expression by Real-time RT-PCR in bone marrow and tissue specimens of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. *Biomedical Papers* 2006 May;150 (S1):34-35.

Krátká sdělení v zahraničních sbornících

Brizova H, Mrhalova M, Augustinakova A, Hilska I, Neradova M, Kodet R. Quantitative monitoring of minimal residual disease and prognostic markers in patients with mantle cell lymphoma. The XXXIInd World Congress of the International Society of Hematology, 19-23 October 2008, Bangkok, Thajsko

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Kvantitativní sledování minimální residuální choroby a proliferační aktivity u pacientů s MCL. XIX. Izakovičov memoriál, Celoslovenská konferencia lekárskej genetiky s medzinárodnou účasťou, 3.-5.9.2008, Podbanské, Slovenská republika

Augustiňáková A, Krsková L, Hilská I, **Břízová H**, Kodet R. Význam mutační analýzy genů receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFRalpha u pacientů s gastrointestinálními stromálními nádory. XIX. Izakovičov memoriál, Celoslovenská konferencia lekárskej genetiky s medzinárodnou účasťou, 3.-5. 9. 2008, Podbanské, Slovenská republika

Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. A novel quantitative molecular monitoring of minimal residual disease and proliferation activity in patients with mantle cell lymphoma. International Scientific Meeting, Association of Clinical Pathologists, 12-13 June 2008, Prague, Česká republika

Augustinakova A, Krskova I, Hilska I, **Brizova H**, Kodet R. Significance of mutation analysis of the receptor tyrosin kinases KIT and PDGFRalpha in patients with gastrointestinal stromal tumor. International Scientific Meeting, Association of Clinical Pathologists, 12-13 June 2008, Praha, Česká republika

Kodet R, **Břízová H**, Campr V, Kalinová M, Krsková L, Mandáková P, Mrhalová M. Komplex diagnostic approach to non-Hodgkin lymphomas in hands of pathologists and molecular biologists. The 35th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2007, 15-19 September 2007, Praha, Česká republika

Brizova H, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of the mRNA levels of cyclin D1 and proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in patients with mantle cell lymphoma. 21st European Congress of Pathology, 08-13 September 2007, Istanbul, Turecko

Břízová H, Mrhalová M, Kodet R. Monitoring of the mRNA levels of cyclin D1 and proliferation markers (ki-67, topoisomerase IIalpha and TPX2) associated with unfavorable prognosis in patients with MCL. The 3rd Symposium and Workshop on Molecular Pathology, 4.-5.5.2007, Olomouc, Česká republika

Břízová H, Kalinová M, Krsková L, Augustiňáková A, Hilská I, Kodet R. Quantitative analysis of cyclinD1 expression by Real-time RT-PCR in bone marrow and tissue specimens of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. The 33rd Congress of the Czech Society of Pathologists, 2nd Satellite Symposium and Workshop on Molecular Pathology, 4.5.-6.5.2006, Olomouc, Česká republika

Krátká sdělení v domácích časopisech

Břízová H, Kalinová M. Molekulární diagnostika lymfomu z buněk pláště (MCL) extranodální lokalizace. Transfuzie a hematologie dnes 2009 červen;S1:21

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Kvantitativní sledování minimální residuální choroby a proliferační aktivity u pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL). Vnitřní lékařství 2008 květen;5:P41-P42

Zahraníční přednášky

vyzvaná přednáška: **Brizova H**, Augustinakova A, Hilska I, Kalinova M, Kodet R. Improved molecular diagnostics of extranodal mantle cell lymphomas. Clinical Cancer Immunotherapy and Translational Research, 19-21 November 2009, Habana, Kuba

Kodet R, **Břízová H**, Campr V, Kalinová M, Krsková L, Mand'áková P, Mrhalová M. Complex diagnostic approach to non-Hodgkin lymphomas in hands of pathologists and molecular biologists. The 35th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2007, 15-19 September 2007, Praha, Česká republika

Brizova H, Mrhalova M, Kodet R. Quantitative monitoring of the mRNA levels of cyclin D1 and proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2) associated with unfavorable prognosis in patients with mantle cell lymphoma. 21st European Congress of Pathology, 08-13 September 2007, Istanbul, Turecko

Zahraníční posterové presentace

Brizova H, Mrhalova M, Augustinakova A, Hilska I, Neradova M, Kodet R. Quantitative monitoring of minimal residual disease and prognostic markers in patients with mantle cell lymphoma. The XXXIInd World Congress of the International Society of Hematology, 19-23 October 2008, Bangkok, Thajsko

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Kvantitativní sledování minimální residuální choroby a proliferční aktivity u pacientů s MCL. XIX. Izakovičov memoriál, Celoslovenská konferencia lekárskej genetiky s medzinárodnou účasťou, 3.-5.9.2008, Podbanské, Slovenská republika

Augustiňáková A, Krsková L, Hilská I, **Břízová H**, Kodet R. Význam mutační analýzy genů receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFR α u pacientů s gastrointestinálními stromálními nádory. XIX. Izakovičov memoriál, Celoslovenská konferencia lekárskej genetiky s medzinárodnou účasťou, 3.-5. 9. 2008, Podbanské, Slovenská republika

Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. A novel quantitative molecular monitoring of minimal residual disease and proliferation activity in patients with mantle cell lymphoma. International Scientific Meeting, Association of Clinical Pathologists, 12-13 June 2008, Praha, Česká republika

Augustinakova A, Krskova I, Hilska I, **Brizova H**, Kodet R. Significance of mutation analysis of the receptor tyrosin kinases KIT and PDGFR α in patients with gastrointestinal stromal tumor. International Scientific Meeting, Association of Clinical Pathologists, 12-13 June 2008, Praha, Česká republika. **Cena za Best poster presentation.**

Domácí přednášky

Břízová H, Kalinová M. Molekulární diagnostika lymfomu z buněk pláště (MCL) extranodální lokalizace. XXIII Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 24.-26.6.2009, Olomouc

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Kvantitativní sledování minimální residuální choroby a proliferční aktivity u pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL). 35. Sjezd českých patologů, 18.-19.6.2008, Brno

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Kvantitativní sledování minimální residuální choroby a proliferční aktivity u pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL). XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 28.-30.5.2008, Olomouc

Břízová H, Kalinová M, Augustiňáková A, Hilská I, Kodet R. Molekulární diagnostika, follow-up a stanovení minimální residuální nemoci u pacientů s non-hodgkinovskými lymfomy. XIV. Jihočeské onkologické dny, 11.-13.10.2007, Český Krumlov

Břízová H, Mrhalová M, Kodet R. Sledování hladiny exprese cyklinu D1 v korelaci s proliferací u pacientů s lymfomem z buněk pláště. XI. Onkogenetický den SLG ČLS JEP, 7.6.2007, Praha

Břízová H, Mrhalová M, Kodet R. Monitoring of the mRNA levels of cyclin D1 and proliferation markers (ki-67, topoisomerase IIalpha and TPX2) associated with unfavorable prognosis in patients with MCL. The 3rd Symposium and Workshop on Molecular Pathology, 4.-5.5.2007, Olomouc

Břízová H, Mrhalová M, Kodet R. Sledování exprese genu pro cyklin D1 v korelaci s proliferací u pacientů s lymfomem z buněk pláště. XXXI. Brněnské Onkologické dny, 23.-25.4.2007, Brno

Břízová H, Kalinová M, Krsková L, Kodet R. Kvantitativní stanovení exprese cyklinu D1, spolehlivý nástroj v diagnostice a sledování pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL). II. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 7.-9.12.2006, Olomouc

Břízová H, Kalinová M, Krsková L, Augustiňáková A, Hilská I, Kodet R. Kvantifikace mRNA cyklinu D1 pomocí RT RQ PCR. XXX. Brněnské onkologické dny, 11.-13.5.2006, Brno

Domácí posterové presentace

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Kvantitativní sledování minimální residuální choroby a proliferací u pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL). Studentská vědecká konference, 23.-24.4.2008, Praha

Břízová H, Mrhalová M, Neradová M, Kodet R. Robotická bezkontaktní laserová mikrodisekce- nová dimenze molekulární analýzy. III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 28.-30.11.2007, Olomouc

Břízová H, Mrhalová M, Kodet R. Monitoring of the mRNA levels of cyclin D1 and proliferation markers (ki-67, topoisomerase IIalpha and TPX2) associated with unfavorable prognosis in patients with MCL. The 3rd Symposium and Workshop on Molecular Pathology, 4.-5.5.2007, Olomouc

9 Použitá literatura

1. Swerdlow SH, Campo E, Seto M, Müller-Hermelink HK: Mantle Cell Lymphoma. Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2008, 229-232
2. Wohlschlaeger C, Lange K, Merz H, Feller AC. Aberrant immunophenotypes of mantle cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:269-273
3. Williams ME, Meeker TC, Swerdlow SH. Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: analysis with multiple breakpoint probes. *Blood* 1991; 78:493-498
4. Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1999; 154:1449-1452
5. Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, Bailey RJ, Proffitt J, Wyatt WA, Hanson CA, Dewald GW. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2000; 110:856-862
6. Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, Arnold A. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:9638-9642
7. Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, van den Oord J, Wlodarska I, Delabie J, Stul M, Thomas J, Michaux JL, Mecucci C, Cassiman JJ, et al. Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J Pathol* 1991; 163:13-18
8. Williams ME, Swerdlow SH, Rosenberg CL, Arnold A. Chromosome 11 translocation breakpoints at the PRAD1/cyclin D1 gene locus in centrocytic lymphoma. *Leukemia* 1993; 7:241-245
9. Rosenberg CL, Kim HG, Shows TB, Kronenberg HM, Arnold A. Rearrangement and overexpression of D11S287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in benign parathyroid tumors. *Oncogene* 1991; 6:449-453
10. Rimokh R, Berger F, Delsol G, Charrin C, Bertheas MF, Ffrench M, Garoscio M, Felman P, Coiffier B, Bryon PA, et al. Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias. *Blood* 1993; 81:3063-3067
11. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350:512-515
12. de Boer CJ, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Schuurung E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1995; 10:1833-1840
13. Seto M, Yamamoto K, Iida S, Akao Y, Utsumi KR, Kubonishi I, Miyoshi I, Ohtsuki T, Yawata Y, Namba M, et al. Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene* 1992; 7:1401-1406
14. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984; 224:1403-1406
15. Meeker TC, Grimaldi JC, O'Rourke R, Louie E, Juliusson G, Einhorn S. An additional breakpoint region in the BCL-1 locus associated with the t(11;14)(q13;q32) translocation of B-lymphocytic malignancy. *Blood* 1989; 74:1801-1806
16. de Boer CJ, Loyson S, Kluin PM, Kluin-Nelemans HC, Schuurung E, van Krieken JH. Multiple breakpoints within the BCL-1 locus in B-cell lymphoma: rearrangements of the cyclin D1 gene. *Cancer Res* 1993; 53:4148-4152

17. Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zuhlke-Jenisch R, Plendl H, Metzke S, Joos S, Zucca E, Weber-Matthiesen K, Roggero E, Grote W, Schlegelberger B. Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol* 1998; 9:519-526
18. Vaandrager JW, Schuurin E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK, Kluin PM. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996; 88:1177-1182
19. Rimokh R, Berger F, Delsol G, Digonnet I, Rouault JP, Tigaud JD, Gadoux M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood* 1994; 83:1871-1875
20. Meeker TC, Sellers W, Harvey R, Withers D, Carey K, Xiao H, Block AM, Dadey B, Han T. Cloning of the t(11;14)(q13;q32) translocation breakpoints from two human leukemia cell lines. *Leukemia* 1991; 5:733-737
21. Ando K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Griffin JD. Regulation of G1/S transition by cyclins D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:9571-9575
22. Doglioni C, Chiarelli C, Macri E, Dei Tos AP, Meggiolaro E, Dalla Palma P, Barbareschi M. Cyclin D3 expression in normal, reactive and neoplastic tissues. *J Pathol* 1998; 185:159-166
23. Ott MM, Bartkova J, Bartek J, Durr A, Fischer L, Ott G, Muller-Hermelink HK, Kreipe H. Cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity. *Blood* 1997; 90:3154-3159
24. de Boer CJ, Schuurin E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, van Krieken JH. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995; 86:2715-2723
25. Swerdlow SH, Yang WI, Zukerberg LR, Harris NL, Arnold A, Williams ME. Expression of cyclin D1 protein in centrocytic/mantle cell lymphomas with and without rearrangement of the BCL1/cyclin D1 gene. *Hum Pathol* 1995; 26:999-1004
26. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, Yamaguchi M, Tamaru J, Uike N, Hashimoto Y, Morishima Y, Suchi T, Seto M, Nakamura S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95:2253-2261
27. Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 142:149-65
28. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246:603-608
29. Oshima J, Campisi J. Fundamentals of cell proliferation: control of the cell cycle. *J Dairy Sci* 1991; 74:2778-2787
30. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem, Espero Publishing, 2005.
31. Michalides RJ. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52:555-568
32. Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:559-573
33. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81:323-330
34. Watanabe G, Albanese C, Lee RJ, Reutens A, Vairo G, Henglein B, Pestell RG. Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3212-3222

35. Muller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:2945-2949
36. Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K, Jansen-Durr P, Henglein B. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:11264-11268
37. Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:12146-12150
38. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997; 11:957-972
39. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 1993; 8:3447-3457
40. Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 1997; 29:91-107
41. Quintanilla-Martinez L, Davies-Hill T, Fend F, Calzada-Wack J, Sorbara L, Campo E, Jaffe ES, Raffeld M. Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood* 2003; 101:3181-3187
42. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 1995; 6:387-400
43. Blain SW, Montalvo E, Massague J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* 1997; 272:25863-25872
44. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; 11:847-862
45. Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, Jaffe ES, Raffeld M. Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* 1998; 153:175-182
46. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002; 299:35-55
47. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, Chiorazzi M, Iqbal J, Gesk S, Siebert R, De Jong D, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Ott G, Dave BJ, Sanger WG, Smith LM, Rimsza L, Braziel RM, Muller-Hermelink HK, Campo E, Gascoyne RD, Staudt LM, Chan WC. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005; 106:4315-4321
48. Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI, Nagel I, Harder L, Fu K, Bernd HW, Weisenburger DD, Parwaresch R, Siebert R. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 2006; 108:1109-1110
49. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *Embo J* 1994; 13:3487-3495
50. Gladden AB, Woolery R, Aggarwal P, Wasik MA, Diehl JA. Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma. *Oncogene* 2006; 25:998-1007
51. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *Embo J* 1994; 13:2124-2130

52. Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 2006; 91:11-16
53. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, Campo E. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999; 93:4365-4374
54. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 2005; 23:6364-6369
55. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92:713-723
56. Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, Fernandez PL, van Lohuizen M, Colomer D, Campo E. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2001; 61:2409-2412
57. Hernandez L, Bea S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, Bosch F, Lopez-Guillermo A, Delabie J, Colomer D, Montserrat E, Campo E. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res* 2005; 65:2199-2206
58. Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, Campo E, Jares P. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 2007; 109:5422-5429
59. Hartmann E, Fernandez V, Stoecklein H, Hernandez L, Campo E, Rosenwald A. Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309. *Haematologica* 2007; 92:574-575
60. Monni O, Oinonen R, Elonen E, Fransila K, Teerenhovi L, Joensuu H, Knuutila S. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:298-307
61. Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, Schaffner C, Leupolt E, Bentz M, Moller P, Muller-Hermelink HK, James MR, Lichter P, Dohner H. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* 1999; 94:3262-3264
62. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schroder M, Schlegelberger B, Fischer K, Bentz M, Lichter P, Dohner H. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:11837-11841
63. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Bea S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL, Campo E. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002; 99:238-244
64. Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:2773-2778
65. Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, Chan WC, Vose JM, Smith LM, Armitage JO, Mayer RA, Pike BL, Collins FS, Hacia JG. Oligonucleotide microarrays demonstrate the

- highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:5372-5377
66. Tort F, Hernandez S, Bea S, Martinez A, Esteller M, Herman JG, Puig X, Camacho E, Sanchez M, Nayach I, Lopez-Guillermo A, Fernandez PL, Colomer D, Hernandez L, Campo E. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002; 100:4602-4608
 67. Tort F, Hernandez S, Bea S, Camacho E, Fernandez V, Esteller M, Fraga MF, Burek C, Rosenwald A, Hernandez L, Campo E. Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2005; 19:112-117
 68. Rotman G, Shiloh Y. ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1555-1563
 69. Rotman G, Shiloh Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* 1999; 18:6135-6144
 70. Perkins EJ, Nair A, Cowley DO, Van Dyke T, Chang Y, Ramsden DA. Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev* 2002; 16:159-164
 71. Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, Kyriazopoulos P, Papadaki T, Anagnostou D, Loukopoulos D. Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol* 1999; 105:190-197
 72. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001; 20:5580-5594
 73. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age. *Blood* 1996; 87:4483-4494
 74. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36:115-127
 75. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S, Montserrat E. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 1998; 82:567-575
 76. Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann Hematol* 2004; 83:71-77
 77. Gleissner B, Kuppers R, Siebert R, Glass B, Trumper L, Hiddemann W, Dreyling M. Report of a workshop on malignant lymphoma: a review of molecular and clinical risk profiling. *Br J Haematol* 2008;
 78. Raty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002; 69:11-20
 79. Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, Muller-Hermelink HK. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* 1997; 89:1421-1429
 80. Matutes E, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Morilla R, Atkinson S, Elnenaie MO, Jain P, Giustolisi GM, A'Hern RP, Catovsky D. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:2007-2015
 81. Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, Catovsky D, Thomas PW, Avet-Loiseau H, Oscier D. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003; 101:4975-4981

82. Andersen NS, Jensen MK, de Nully Brown P, Geisler CH. A Danish population-based analysis of 105 mantle cell lymphoma patients: incidences, clinical features, response, survival and prognostic factors. *Eur J Cancer* 2002; 38:401-408
83. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997; 89:2067-2078
84. Samaha H, Dumontet C, Ketterer N, Moullet I, Thieblemont C, Bouafia F, Callet-Bauchu E, Felman P, Berger F, Salles G, Coiffier B. Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* 1998; 12:1281-1287
85. Oinonen R, Franssila K, Teerenhovi L, Lappalainen K, Elonen E. Mantle cell lymphoma: clinical features, treatment and prognosis of 94 patients. *Eur J Cancer* 1998; 34:329-336
86. Zucca E, Roggero E, Pinotti G, Pedrinis E, Cappella C, Venco A, Cavalli F. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 1995; 6:257-262
87. Bernard M, Gressin R, Lefrere F, Drenou B, Branger B, Caulet-Maugendre S, Tass P, Brousse N, Valensi F, Milpied N, Voilat L, Sadoun A, Ghandour C, Hunault M, Leloup R, Mannone L, Hermine O, Lamy T. Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia* 2001; 15:1785-1791
88. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Moller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 2005; 131:29-38
89. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wormann B, Ludwig WD, Duhrsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111:558-565
90. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-322
91. Katzenberger T, Petzoldt C, Holler S, Mader U, Kalla J, Adam P, Ott MM, Muller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006; 107:3407
92. Determann O, Hoster E, Ott G, Wolfram Bernd H, Loddenkemper C, Leo Hansmann M, Barth TE, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M, Klapper W. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2008; 111:2385-2387
93. Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R, Tiemann M. Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia* 2004; 18:1200-1206
94. Schrader C, Janssen D, Meusers P, Brittinger G, Siebmann JU, Parwaresch R, Tiemann M. Repp86: a new prognostic marker in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2005; 75:498-504
95. Heck MM, Earnshaw WC. Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 1986; 103:2569-2581
96. Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400:139-154

97. Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* 1997; 90:226-233
98. Heidebrecht HJ, Adam-Klages S, Szczepanowski M, Pollmann M, Buck F, Endl E, Kruse ML, Rudolph P, Parwaresch R. repp86: A human protein associated in the progression of mitosis. *Mol Cancer Res* 2003; 1:271-279
99. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltner JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Staudt LM. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003; 3:185-197
100. Kang YH, Park CJ, Seo EJ, Huh J, Kim SB, Kang YK, Chi HS. Polymerase chain reaction-based diagnosis of bone marrow involvement in 170 cases of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2002; 94:3073-3082
101. Darby AJ, Johnson PW. Molecular remission and non-Hodgkin's lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15:549-562
102. Schultze JL, Gribben JG. Minimal residual disease in non-Hodgkin's lymphoma. *Biomed Pharmacother* 1996; 50:451-458
103. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17:1013-1034
104. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85:1416-1434
105. Andersen NS, Donovan JW, Borus JS, Poor CM, Neuberg D, Aster JC, Nadler LM, Freedman AS, Gribben JG. Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 1997; 90:4212-4221
106. Corradini P, Astolfi M, Cherasco C, Ladetto M, Voena C, Caracciolo D, Pileri A, Tarella C. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 89:724-731
107. Kasamon YL. Blood or marrow transplantation for mantle cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2007; 19:128-135
108. Pott C, Schrader C, Gesk S, Harder L, Tiemann M, Raff T, Bruggemann M, Ritgen M, Gahn B, Unterhalt M, Dreyling M, Hiddemann W, Siebert R, Dreger P, Kneba M. Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006; 107:2271-2278
109. Andersen NS, Donovan JW, Zuckerman A, Pedersen L, Geisler C, Gribben JG. Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol* 2002; 30:703-710
110. Pott C, Schrader C, Bruggemann M, Ritgen M, Harder L, Raff T, Tiemann M, Dreger P, Kneba M. Blastoid variant of mantle cell lymphoma: late progression from classical mantle cell lymphoma and quantitation of minimal residual disease. *Eur J Haematol* 2005; 74:353-358

111. Olsson K, Gerard CJ, Zehnder J, Jones C, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Real-time t(11;14) and t(14;18) PCR assays provide sensitive and quantitative assessments of minimal residual disease (MRD). *Leukemia* 1999; 13:1833-1842
112. Kodet R, Mrhalova M, Krskova L, Soukup J, Campr V, Neskudla T, Szepe P, Plank L. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch* 2003; 442:538-547
113. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17:2257-2317
114. Bijwaard KE, Aguilera NS, Monczak Y, Trudel M, Taubenberger JK, Lichy JH. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for cyclin D1 expression: utility in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clin Chem* 2001; 47:195-201
115. Howe JG, Crouch J, Cooper D, Smith BR. Real-time quantitative reverse transcription-PCR for cyclin D1 mRNA in blood, marrow, and tissue specimens for diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clin Chem* 2004; 50:80-87
116. Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2002; 16:25-30
117. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cell cycle-related variation and tissue-restricted expression of human cyclin D1 protein. *J Pathol* 1994; 172:237-245
118. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51:364-369
119. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995; 20:187-190
120. Uchamaru K, Taniguchi T, Yoshikawa M, Asano S, Arnold A, Fujita T, Motokura T. Detection of cyclin D1 (bcl-1, PRAD1) overexpression by a simple competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay in t(11;14)(q13;q32)-bearing B-cell malignancies and/or mantle cell lymphoma. *Blood* 1997; 89:965-974
121. Solvason N, Wu WW, Parry D, Mahony D, Lam EW, Glassford J, Klaus GG, Sicinski P, Weinberg R, Liu YJ, Howard M, Lees E. Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. *Int Immunol* 2000; 12:631-638
122. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, Cardesa A. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994; 84:2726-2732
123. Jadayel D, Matutes E, Dyer MJ, Brito-Babapulle V, Khohkar MT, Oscier D, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: analysis of BCL-1 rearrangements and expression of the cyclin D1 gene. *Blood* 1994; 83:3664-3671
124. Aguilera NS, Bijwaard KE, Duncan B, Krafft AE, Chu WS, Abbondanzo SL, Lichy JH, Taubenberger JK. Differential expression of cyclin D1 in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1998; 153:1969-1976
125. Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, Rouault JP, Santa Lucia B, Duret L, Vuillaume M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP. Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood* 1994; 83:3689-3696

126. Sander B, Flygare J, Porwit-Macdonald A, Smith CI, Emanuelsson E, Kimby E, Liden J, Christensson B. Mantle cell lymphomas with low levels of cyclin D1 long mRNA transcripts are highly proliferative and can be discriminated by elevated cyclin A2 and cyclin B1. *Int J Cancer* 2005; 117:418-430
127. Wiestner A, Tehrani M, Chiorazzi M, Wright G, Gibellini F, Nakayama K, Liu H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Vose J, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Montserrat E, Bosch F, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Fisher RI, Grogan TM, Miller TP, Wilson WH, Jaffe ES, Staudt LM. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* 2007; 109:4599-4606
128. Sola B, Salaun V, Ballet JJ, Troussard X. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms induce cyclin-D1 over-expression in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Int J Cancer* 1999; 83:230-234
129. Thomazy VA, Luthra R, Uthman MO, Davies PJ, Medeiros LJ. Determination of cyclin D1 and CD20 mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR from archival tissue sections of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas. *J Mol Diagn* 2002; 4:201-208
130. Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Jenson SD, Lin Z, Monnin KA, Lim MS. Fluorescence PCR quantification of cyclin D1 expression. *J Mol Diagn* 2002; 4:90-96
131. Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res* 2002; 4:14-17
132. Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9:95-104
133. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, Versteeg R, Caron HN. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 2008; 68:2599-2609
134. Bui MM, Bagui TK, Boulware DC, Letson DG, Nasir A, Kaiser HE, Pledger WJ, Coppola D. Altered expression of cell cycle regulatory proteins in benign and malignant bone and soft tissue neoplasms. *In Vivo* 2007; 21:729-737
135. Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PH, Triche TJ. Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 2004; 64:6026-6034
136. Chen SL, Hoehne FM, Giuliano AE. The prognostic significance of micrometastases in breast cancer: a SEER population-based analysis. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:3378-3384
137. Garcia V, Garcia JM, Pena C, Silva J, Dominguez G, Lorenzo Y, Diaz R, Espinosa P, de Sola JG, Cantos B, Bonilla F. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. *Cancer Lett* 2008; 263:312-20
138. Cheung IY, Feng Y, Danis K, Shukla N, Meyers P, Ladanyi M, Cheung NK. Novel markers of subclinical disease for Ewing family tumors from gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2007; 13:6978-6983
139. Cheung IY, Feng Y, Vickers A, Gerald W, Cheung NK. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma. *J Mol Diagn* 2007; 9:237-241
140. Yu Z, Wang C, Wang M, Li Z, Casimiro MC, Liu M, Wu K, Whittle J, Ju X, Hyslop T, McCue P, Pestell RG. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol* 2008; 182:509-517
141. Ishii Y, Waxman S, Germain D. Tamoxifen stimulates the growth of cyclin D1-overexpressing breast cancer cells by promoting the activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* 2008; 68:852-860

142. Aaltonen K, Amini RM, Landberg G, Eerola H, Aittomaki K, Heikkila P, Nevanlinna H, Blomqvist C. Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113:75-82
143. Guo LL, Gao P, Wu YG, Jian WC, Hao CY, Li H, Lin XY. Alteration of cyclin D1 in Chinese patients with breast carcinoma and its correlation with Ki-67, pRb, and p53. *Arch Med Res* 2007; 38:846-852
144. Friche E, Danks MK, Schmidt CA, Beck WT. Decreased DNA topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51:4213-4218
145. Deffie AM, Batra JK, Goldenberg GJ. Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res* 1989; 49:58-62
146. Davies SM, Robson CN, Davies SL, Hickson ID. Nuclear topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J Biol Chem* 1988; 263:17724-17729
147. Korkolopoulou P, Vassilakopoulos TP. Topoisomerase IIalpha as a prognostic factor in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2004; 18:1347-1349