

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



Role proteinů tepelného šoku v patogenezi leukémie

(Role of heat shock proteins in the pathogenesis of leukaemia)

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Olga Kopřivová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha 2010

Annotation (Abstract)

Some of heat shock proteins (Hsp), for example the inducible form Hsp70, are expressed on the surface of tumour cells. High Hsp expression is reflected in tumour cell features, such as ability to progression, to metastasize and resistance to apoptosis. The question is whether Hsp gene expression correlates with surface expression. The aim of this master thesis is to compare surface and gene expression of Hsp70 and observe the gene expression of some other Hsp proteins (Hsp27, Hsp60, Hsp90 and HspBP1) in leukaemia. The research was carried out on cell lines obtained from leukaemic blasts of patients with acute myeloid leukaemia: UoC-M1, HL-60, OCI/AML3, THP-1, HU-3 and TF-1 that had been cultivated *in vitro*. Hsp70 surface expression was detected using flow cytometry, and gene expression of each Hsp was studied using real-time RT-PCR. It was found out that high surface expression of Hsp70 did not correlate with gene expression in consequence of negative feedback applied in Hsp expression regulation. Hsp27 gene expression was increased compared to negative (healthy) control on all tumour cell lines, with the highest increase on the THP-1 line. Hsp60 gene expression was increased compared to negative (healthy) control on all tumour cell lines and there were not remarkable differences in expression between single lines. In comparison to gene expression of other Hsp, the Hsp90 gene expression showed the lowest increase compared to negative (healthy) control and there were not remarkable differences between lines. This is the first thesis that illustrates the gene expression of (mRNA) HspBP1 in leukaemic lines. The highest values of HspBP1 gene expression were detected in the TF-1 line and then in HL-60. The gene expression values of other lines were also higher compared negative (healthy) control. At the same time the HspBP1/Hsp70 ratio was higher compared to negative (healthy) control. Nevertheless the gene expression detected in particular lines may not reflect the Hsp protein expression, as it was proved in Hsp70. That is why the HspBP1/Hsp70 ratio calculated from Hsp70 and HspBP1 gene expression in each line may not correspond to real protein expression. Heterogenic character of Hsp gene expression among leukaemic lines was proved.

Regarding the fact that Hsp protein levels reflect the state of cell differentiation and proliferation, the mRNA profile research of Hsp was valuable. This thesis focused on study of gene expression in leukaemic lines. It would, however, be appropriate to compare these data with the results of patients who have a specific type of acute

myeloid leukaemia. Those findings may become the basis for study of a possible relation between protein and gene expression of Hsp and their possible association with disease prognosis.

Anotace (Abstrakt)

Některé z proteinů tepelného šoku (Hsp), např. inducibilní forma Hsp70, jsou exprimovány na povrchu nádorových buněk. Vysoká exprese Hsp se odráží ve vlastnostech nádorových buněk, jako je schopnost progresu, metastazování a odolnost vůči apoptóze. Otázkou zůstává, zda genová exprese Hsp koreluje s expresí povrchovou. Cílem mé práce bylo porovnat povrchovou a genovou expresi Hsp70 a sledovat genovou expresi některých dalších Hsp proteinů (Hsp27, Hsp60, Hsp90 a HspBP1) u leukémie. Výzkum byl proveden na buněčných liniích získaných z leukemických blastů pacientů s akutní myeloidní leukémií: UoC-M1, HL-60, OCI/AML3, THP-1, HU-3 a TF-1, které byly kultivovány *in vitro*. Povrchová exprese Hsp70 byla zjišťována pomocí průtokové cytometrie a genová exprese jednotlivých Hsp byla studována pomocí RT-PCR v reálném čase. Bylo zjištěno, že vysoká povrchová exprese Hsp70 nekoreluje s expresí genovou v důsledku negativní zpětné vazby, uplatňující se při regulaci exprese Hsp. Genová exprese Hsp27 byla zvýšena oproti hodnotám kontrolního souboru u všech nádorových linií, nejvíce pak u linie THP-1. Genová exprese Hsp60 byla zvýšena oproti hodnotám kontrolního souboru u všech nádorových linií, mezi jednotlivými liniemi nebyly výrazné rozdíly v expresi. Genová exprese Hsp90 byla nejméně zvýšená oproti hodnotám kontrolního souboru ve srovnání s genovou expresí ostatních Hsp a nebyly zde výrazné rozdíly mezi jednotlivými liniemi. Toto je první práce, která demonstruje genovou expresi (mRNA) HspBP1 u leukemických linií. Nejvyšší hodnoty genové exprese HspBP1 byly zjištěny u linie TF-1 a dále u HL-60, i u ostatních linií byly hodnoty genové exprese vyšší než u kontrolního souboru. Zároveň i poměr HspBP1/Hsp70 u leukemických linií byl vyšší oproti kontrolnímu souboru. Nicméně genová exprese, která byla zjištěna u konkrétních linií nemusí odrážet proteinovou expresi Hsp, jak bylo prokázáno u Hsp70. Proto poměr HspBP1/Hsp70, který byl vypočítán z genové exprese Hsp70 a HspBP1 u jednotlivých linií, nemusí korespondovat se skutečnou proteinovou expresí. Byl prokázán heterogenní charakter Hsp genové exprese mezi jednotlivými leukemickými liniemi.

Vzhledem k tomu, že proteinové hladiny Hsp odráží stav diferenciaci a proliferace buněk, bylo cenné studovat mRNA profily Hsp. Tato práce byla zaměřena na studium genové exprese u leukemických linií. Bylo by ale vhodné tato data porovnat s výsledky u pacientů, kteří mají konkrétní typ akutní myeloidní leukémie. Na základě

těchto zjištění by mohl být studován možný vztah mezi proteinovou a genovou expresí Hsp a jejich možné asociace s prognózou onemocnění.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Role proteinů tepelného šoku v patogenezi leukémie vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Praze 28.4.2010

Bc. Olga Kopřivová

Poděkování

Děkuji mé školitelce Doc. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. za odborné vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Sedláčkové, Ph.D. za veškerou odbornou pomoc při výuce metod a za čas, který mi po dva roky věnovala. Speciální poděkování také patří MUDr. Romanu Volchenkovi za jeho neocenitelné rady, pomoc a trpělivost v začátcích mého účinkování na Oddělení molekulární biologie a patologie buňky. Děkuji také Kateřině Kotlabové, Lence Žejškové, Tereze Jančužkové za to, že mi byly nápomocny v každé situaci, a za to, že se mi dostalo skvělého přijetí do jejich kolektivu. A hlavně děkuji mé rodině, bez které by tato práce nikdy nevznikla.

Místo vypracování diplomové práce

Práce byla vypracována na Oddělení molekulární biologie a patologie buňky
3. lékařské fakulty Univerzity Kalovy v Praze.

Obsah:

Úvod	11
1. Současný stav dané problematiky	12
1.1. Definice a klasifikace akutních myeloidních leukémií	12
1.2. Patogeneze a etiologie akutní myeloidní leukémie	20
1.3. Incidence akutní myeloidní leukémie	21
1.4. Rizikové faktory vzniku akutní myeloidní leukémie	22
1.5. Diagnostika akutních myeloidních leukémií	22
1.5.1. Klinický obraz	22
1.5.2. Cytologické, cytochemické a histologické vyšetření kostní dřeně	24
1.5.3. Imunofenotypizace AML	25
1.5.4. Cytogenetika	25
1.5.5. Molekulární genetik	26
1.5.6. Ostatní metody	26
1.6. Léčba akutní myeloidní leukémie	27
1.6.1. Kurativní léčba AML u nemocných od 18 do 60 let věku	27
1.6.2. Transplantace krvetvorných kmenových buněk jako součást postremisní terapie	28
1.6.3. Kurativní léčba AML u nemocných nad 60 let věku	29
1.7. Definice a charakteristika proteinů tepelného šoku tzv. „Heat shock proteins“ (Hsp)	30
1.7.1. Klasifikace proteinů tepelného šoku (Hsp)	30
1.7.2. Extracelulárně lokalizované proteiny tepelného šoku (Hsp)	35
1.8. Role proteinů tepelného šoku v tumorogenezi	38
1.8.1. Role Hsp90 v tumorogenezi	38
1.8.2. Role Hsp70 a hsp27 v tumorogenezi	39
1.8.3. Hsp exprese v nádorových buňkách	41
1.8.4. Využití Hsp v diagnostice a prognóze nádorových onemocnění	44
1.9. Závěr	45

2. Cíle práce	46
2.1. Studium povrchové a genové exprese konkrétních Hsp u konkrétních nádorových linií odvozených od různých typů akutní myeloidní leukémie	46
2.1.1. Kultivace nádorových linií	46
2.1.2. Měření povrchové exprese pomocí průtokové cytometrie	49
2.1.3. Izolace RNA	52
2.1.4. RT-PCR v reálném čase („Real - Time quantitative RT-PCR“)	53
3. Metodika	55
3.1. Charakteristika zkoumaného souboru	55
3.2. Metodika zpracování výsledků	55
4. Výsledky	56
4.1. Výsledky izolace RNA	56
4.2. Výsledky RT-PCR	59
4.3. Výsledky průtokové cytometrie	76
5. Diskuse	78
6. Závěr	82
7. Seznam použité literatury	83
8. Klíčová slova	101
8.1. Klíčová slova v českém jazyce	101
8.2. Klíčová slova v anglickém jazyce	101
9. Přílohy	
9.1. Seznam použitých zkratk	

ÚVOD

Tématem mé diplomové práce je „Role proteinů tepelného šoku v patogenezi leukémie“. Úvodem bych chtěla předeslat, že problematika leukémie je velice rozsáhlá a neexistují konkrétní postupy v diagnostice a léčbě, které by bylo možno použít univerzálně u všech typů leukémií. Ve své práci jsem se zabývala konkrétně akutní myeloidní leukémií. Další výzkum těchto onemocnění přináší další závažná odhalení zejména v patogenezi, a umožňuje tak tvorbu nových operačních postupů v diagnostice a léčbě leukémií, které jsou mnohem specifitější a mohou být přímo cílené na konkrétního pacienta.

Hsp proteiny vykonávají velké množství funkcí v buňkách. Mezi jejich nejvýznamnější fyziologické funkce patří: sbalování proteinů („folding“), cytoprotektivní, anti-apoptotické a imunologické funkce. Jelikož tyto proteiny jsou známy již od roku 1962, bylo odhaleno velké množství jejich funkcí a možných patologických vlivů zejména při tumorogenezi a autoimunitních chorobách. Mají nepopíratelný vliv na tumorogenezi. Zároveň je lze využít jako markery pro sledování progresu konkrétních nádorů, pro určení prognózy onemocnění, případně jimi lze sledovat velice časný relaps. I když nepatří k doporučovaným diagnostickým markerům, jejich přínos je i tak velice významný.

V této práci jsem shrnula problematiku diagnostiky akutní myeloidní leukémie, především v podmínkách klinické praxe a klinických laboratořích. Zároveň jsem se snažila zachytit i další možnosti diagnostiky, které jsou zatím dostupné pouze ve výzkumných laboratořích a nejsou rutinně prováděny v klinických laboratořích. Pokusila jsem se o teoretický přehled současných poznatků o akutních myeloidních leukémiích a Hsp proteinů včetně jejich vlivu na patogenezi nádorů.

Výzkumná část je zaměřena na zjištění povrchové a genové exprese konkrétních Hsp a jejich případné korelace. Tento výzkum byl proveden na konkrétních typech nádorových linií odvozených od akutních myeloidních leukémií.

1. Současný stav dané problematiky

1.1 Definice a klasifikace akutních myeloidních leukemií (AML)

AML představuje různorodou skupinu maligních onemocnění krvetvorby, pro něž je charakteristická proliferace a akumulace nezralých hematopoetických buněk v kostní dřeni a jejich následné vyplavování do periferní krve. AML je definována jako klonální expanze nezralých buněk krvetvorby (myeloblastů), které tvoří > 20% jaderných buněk v kostní dřeni (Adam et al. 2008). V roce 1990 a 2003 skupina expertů publikovala doporučení pro standardizaci odpovídajících kritérií pro diagnostiku a léčbu AML a stanovila standardy pro klinické studie AML. Tato doporučení byla obecně přijata v rámci lékařské praxe i v rámci klinických studií. V posledních letech bylo dosaženo značného pokroku v rozluštění molekulárně genetické a epigenetické podstaty AML a byly definovány a diagnostikovány nové prognostické a diagnostické markery. Rostoucí počet opakujících se genetických změn byl uznán v nové klasifikaci „World Health Organization“ WHO (Döhner et al. 2010). WHO klasifikace akutních myeloidních leukemií vychází z klasických cytochemických a imunofenotypických znaků a je doplněna o znaky cytogenetické a molekulárně biologické. WHO klasifikaci předcházela „French- American- British classification“ FAB klasifikace (Adam et al. 2008). FAB klasifikace je vytvořena na základě morfologického, cytochemického a imunofenotypového vyšetření, díky kterému lze v současné době vymežit 8 subtypů AML (M0-M7), které se liší podle diferenciací a stupně maturace leukemických buněk (Pecka M. 2006). FAB klasifikace viz Tabulka č.1, WHO klasifikace viz Tabulka č.2.

Klasifikace (8 subtypů AML):

1. AML M0 s minimálními známkami myeloidní diferenciací tzv. časná myeloidní leukemie

Tato podskupina leukemií byla definována při revizi FAB klasifikace v roce 1990. Vyznačuje se diferenciací do myeloidní řady leukemií. Morfologicky mají blasty jemný až lehce hrubší jaderný chromatin, 2-3 výrazná jádérka, kulatá či oválná jádra, cytoplazma je světlá až lehce bazofilní, neobsahuje granula (blasty I. typu) ani Auerovy tyče (Mayer et al. 2002). Leukemické blasty nelze klasifikovat pouze morfologicky a cytochemicky, ale myeloidní původ blastických buněk musí být prokázán imunologicky nebo ultrastrukturální cytochemií, tzn. průkazem myeloperoxidázové aktivity elektronovým

mikroskopem. Imunofenotypově více než 20% blastů exprimuje jeden nebo více myeloidních antigenů: CD34 v koexpresi a CD13 nebo méně s CD33, cytochemickou reakci na myeloperoxidázu nelze v blastech prokázat, je ale možné prokázat myeloperoxidázu pomocí protilátky (Pecka M. 2006). Cytogeneticky lze prokázat translokace t (3; 21) (q26; q22). Tvoří 0,5 – 5% všech leukemií (Adam et al. 2008).

2. AML M1 myeloblastická bez vyzrání

V kostní dřeni je naprostá převaha myeloblastů více než 90% elementů, chybí granulopoéza, většinou jsou minimálně zastoupeny i ostatní vývojové řady (Adam et al. 2008). Některé případy jsou charakterizovány homogenní populací blastických elementů bez granulace, které spíše připomínají akutní lymfoblastickou leukémií ALL, pro kterou je charakteristický velký poměr jádra k cytoplazmě „nukleo/cytoplazmatický poměr“. Morfologicky myeloblasty obsahují malé množství bazofilní cytoplazmy, velmi jemný chromatin, jádra jsou kulatá a/nebo oválná. V některých případech mohou být v kostní dřeni i v periferní krvi přítomny typické myeloblasty I. a II. Typu včetně Auerových tyčiček. Imunofenotypově myeloblasty exprimují antigeny CD13, CD33, CD34, HLA-DR, výjimečně CD11 a CD15 (Mayer et al. 2002). Cytochemicky lze prokázat pozitivitu na myeloperoxidázu většinou u více než 3% blastů kostní dřene a/nebo periferní krve (Pecka M. 2006).

3. AML M2 myeloblastická s částečným vyzráním

Od M1 se odlišuje přítomností vyzrávající granulopoézy. Myeloblasty jsou obvykle více vyzrálé než u M1, obsahují více azurofilních granul a Auerových tyčiček. Avšak poměr myeloblastů I. a II. typu většinou kolísá případ od případu (Mayer et al. 2002). Část leukemické populace vyzrává do promyelocytů, často abnormálně. Mohou se vyskytovat i menší množství myelocytů, metamyelocytů, tyčiček a segmentů (Pecka M. 2006). Morfologicky lze pozorovat odlišnosti mezi typy AML M2, kromě běžného typu viz výše lze pozorovat i varianty M2, které jsou provázeny translokacemi t (8;21) nebo t (6;9). Tyto chromosomální aberace mají vliv na morfologii blastů (Mayer et al. 2002). Typ AML M2 s t (8;21) (q22;q22) je charakterizován přítomností velkých blastických elementů s bohatou cytoplazmou a s velmi četnými azurofilními granulami (blasty III. typu), často se vyskytují Auerovy tyčičky, kromě těchto blastů jsou přítomny i malé

blastické elementy s téměř agranulární cytoplazmou (Mayer et al. 2002). U některých případů může být zřetelnější zmnožení eozinofilů až ve 30%, nevykazují však morfologické a cytochemické atypie jako eozinofily M4Eo varianty (Adam et al. 2008). Tato translokace se vyskytuje asi u 40% případů, pacienti v tomto případě mají poměrně dobrou prognózu, na rozdíl od nemocných s trizomií 8. chromosomu nebo s delecí 7. chromosomu, kteří mají velmi špatnou prognózu (Pecka M., 2006). AML M2 Baso je AML s bazofilními prekursori, je provázená chromosomální aberací t (6;9) (q21;q26). Ve světelném mikroskopu lze odlišit blasty s málo početnými, ale zřetelně odlišitelnými bazofilními granuly v cytoplazmě. Je zde zvýšený počet vyzrálých bazofilů a nález myelodysplázie (Mayer et al. 2002). Cytochemický průkaz myeloperoxidázy u AML M2 je silně pozitivní.

4. AML M3 promyelocytární

Tento typ AML (APL) se vyskytuje ve dvou odlišných morfologických obrazech, které jsou označovány jako hypergranulární promyelocytární leukémie a variantní mikrogranulární leukémie (Mayer et al. 2002). Některé publikace uvádějí ještě třetí typ této AML tzv. Standardní typ (Pecka M. 2006).

Hypergranulární promyelocytární leukémie

Morfologicky lze nalézt typické myeloblasty, kterých bývá méně než 30%, atypické promyelocyty (velké elementy, jejichž cytoplazma je naplněna tmavě růžovými, červenými či purpurovými granuly), Auerovy tyče uspořádány do snopců tzv. „fagot cells“, cytoplazma těchto buněk je bledá a mohou být přítomna i další azurofilní granula. Cytochemicky lze prokázat silnou pozitivitu myeloperoxidázy (Mayer et al. 2002).

Variantní mikrogranulární leukémie

Morfologicky jsou přítomné nádorové elementy s hluboce rozštěpeným jádrem, nebo dokonce s dvoulaločnatými elementy. Každý z laloků obsahuje jádérko a oba laloky jsou spojeny úzkým jaderným můstkem. Cytoplazma je jemně až středně bazofilní, v některých případech zcela agranulární. Některé nádorové elementy obsahují snopce Auerových tyčí (Mayer et al. 2002).

Zvláštní postavení akutní promyelocytární leukémie (APL) vyplývá z její etiologie, klinického obrazu, způsobu léčby a její úspěšnosti. Patologická je u APL chromosomální translokace t (15q22; 17q21), která se vyskytuje téměř

u 100% pacientů, raritně se však mohou vyskytnout i jiné partnerské geny RAR α např. PLZF (11q23), NuMA (11q13), NPM (5q35) a STAT5b (17q21). V důsledku vzniku fúzního genu se tvoří protein PML/RAR α , což u APL vede k charakteristické blokáde diferenciacie granulocytární řady na úrovni promyelocytu. Druhým znakem APL a hlavní příčinou časté mortality je těžká koagulopatie. Pro APL je vysoce specifický imunofenotyp: CD9+, CD11b-, CD13+, CD15-, CD33+, CD34-, HLA-DR-. Diagnózu APL potvrdí stanovení fúzního genu PML/RAR α v krvi či kostní dřeni pomocí PCR (Adam et al. 2008).

5. AML M4 myelomonoblastická

Myelomonoblastická leukémie je charakterizována vyzríváním nádorových buněk jak do granulocytární, tak do monocytární řady. Morfologicky jsou blastické elementy ve dřeni heterogenní, kromě obvyklých myeloblastů s kulatým či oválným jádrem (I. i II. typu včetně nálezu Auerových tyčí) jsou přítomny blastické buňky s laločnatými, nebo rozštěpenými jádry, obvykle jen s jemnou granulací (Mayer et al. 2002). Velice často se tento typ leukémie manifestuje extramedulárně (Adam et al. 2008). Cytochemicky lze prokázat variabilní myeloperoxidázovou pozitivitu nejméně ve 3% blastických buněk (Mayer et al. 2002).

AML M4 Eo je varianta myelomonoblastická leukémie s eozinofilii

Tato varianta AML M4 je popisována od poloviny 60.let, do FAB klasifikace byla zařazena až v roce 1985. Typická je asociace morfologického obrazu s chromosomálními odchylkami, jedná se o translokaci/inverzi, popřípadě delecii 16. chromosomu t/inv. (16) (p13; q22) (Adam et al. 2008). Tato AML je charakteristická přítomností atypických eozinofilů, které tvoří více než 5% elementů z nonerytroidních buněk. Tyto eozinofily navíc jeví morfologické odchylky, postihující zvláště nezralá vývojová stádia : jsou větší, kromě eozinofilních granulí obsahují tmavě fialová velká bazofilní granula, mají nesegmentované jádro. Abnormální eozinofily se odlišují i v cytochemickém obraze (Mayer et al. 2002).

6. AML M5 monoblastická

U tohoto typu AML je převažující leukemickou linií řada monocytární. Podle zastoupení nezralých prekurzorů ji lze rozdělit na AML M5a monoblastickou s více než 80% monoblastů a na AML M5b s méně než 80% monoblastů,

v tomto případě buňky vyžívají do promonocytů. Promonocyty mají nepravidelná, či laločnatá jádra, cytoplazma je jemně bazofilní s azurofilní granulací, která je nápadnější než u monoblastů. Monoblasty jsou velké elementy s bohatou středně bazofilní cytoplazmou, která často obsahuje vakuoly a jemný poprašek azurozilní granulace (Mayer et al. 2002). V některých případech AML M5 je nápadným morfoloickým znakem markantní erytrofagocytóza, tyto případy bývají spojeny s nálezem translokací t (9;11) t (8;16). U těchto pacientů můžeme pozorovat hyperplázii dásní, postižení centrální nervové soustavy CNS a koagulopatie (DIC-diseminovaná intravaskulární koagulopatie) (Adam et al. 2008).

7. AML M6 erytroblastová leukémie

Podle návrhu WHO klasifikace je erytroblastová leukémie rozdělena na podtypy AML M6a tzv. „Di Guglielmův syndrom“ a na AML M6b tzv. „Di Guglielмова choroba“. U obou typů leukémií nacházíme zmnoženou erythropoézu s dysplastickými změnami, jako jsou megaloblastické rysy, mnohjaderné formy, jaderná fragmentace, vakuolizované proerytroblasty, zaškrcená jádra (tvaru trojlístku) a bazofilní tečkování. Dysplázie je přítomna i v myeloidní řadě – abnormální myeloblasty, Auerovy tyče, plazmojaderná asynchronie (Mayer et al. 2002). U erytroleukemií lze prokázat více než 50% erytroblastů v kostní dřeni, zároveň myeloblasty jsou pozitivní na myeloperoxidázu, glykoforin A a CD71, což je transferinový receptor (Adam et al. 2008).

8. AML M7 megakaryoblastická

Patří sem typy AML charakteristické především proliferací megakaryoblastů v kostní dřeni, může být zvýšen také počet proerytroblastů a myeloblastů. Megakaryoblasty je obtížné až nemožné přesně identifikovat světelnou mikroskopií. Cytochemicky je myeloperoxidáza konstantně negativní. Cytochemický a morfoloický nález nestačí pro diagnózu AML M7 (Mayer et al. 2002). Imunocytologicky lze prokázat faktor VIII, CD41, CD61 a trombocytární peroxidázy (Adam et al. 2008).

Megakaryoblasty proliferující v kostní dřeni produkují tzv. destičkový růstový faktor (Platelet derived grow factor - PDGF), který obvykle vyvolává proliferaci

fibroblastů v kostní dřeni s její následnou fibrózou, proto většinou dochází k punctio sicca při aspirační biopsii kostní dřeně (Pecka M. 2006).

Existují i vzácné typy akutních myeloidních leukémií, které nejsou zahrnuty v FAB klasifikaci AML M0-M7. Tvoří samostatné jednotky. Jedná se o velice vzácné typy- např. akutní leukémie s eozinofilními blasty nebo akutní leukémie s bazofilními blasty. Vzhledem k jejich ojedinělému výskytu se nebudu zabývat jejich podrobnou charakterizací.

Tabulka č.1

Charakteristika akutních myeloidních leukémií podle FAB klasifikace

Zdroj: Adam et al. 2008, Döhner et al. 2010

Typ akutní leukemie	FAB subtyp	Četnost	Speciální příznaky	Charakteristické nálezy
AML s minimální diferenciací	AML M0	< 5 %		Blasty nedávají cytochemickou reakci na myeloperoxidázu, lze ji však v nich prokázat ptolítčkou proti myeloperoxidáze, nejsou přítomny Auerovy tyčky, je pozitivita CD34 v koexpresi s CD13 nebo méně CD33
AML myeloblastová bez vyzrávání	AML M1	15%	Spolu s M2 nejčastější typ v dospělosti	Pozitivita CD34, HLA-DR, CD13, CD33 vyjimečně CD11 a CD15, blasty >90%
AML myeloblastová s vyzráváním	AML M2	30%	Pacienti s t(8;21) mají často splenomegalii a CR u 60%, inv(3) je asociovaná s trombocytosou, t(6;9) je asociovaná s bazofilní diferenciací	Translokace (8;21) u 20% případů, inverze (3), translokace (6;9), počet blastů 20-89%, Auerovy tyčky u > 70% případů, ve 30% případů bazofílie
AML promyelocytární	AML M3 AML M3v	5%	Závažná koagulopatie, M3v promyelocyty nemají výrazná granula "mikrogranulární forma"	Translokace (15;17) vyjimečně translokace (11;17) a (5;17), HLA-DR neg., počet blastů > 20%, Auerovy tyčky u > 50% případů, silná pozitivita CD33
AML myelomonoblastická	AML M4 AML M4 Eo	celkem 20% AML M4 Eo 3%	Časná extramedulární manifestace	Myeloidní a monocytární komponenta, M4Eo eozinofilie > 5% při inverzi (16), abnormální granulace eozinofilů
Monoblastová leukémie	AML M5a AML M5b	30%	Hyperplázie dásní, kožní infiltráty, postižení CNS, koagulopatie (DIC), chlorózy	Výrazná pozitivita nespecifické esterázy, aberace obvykle t(9;11) a t(8,16), markantní erytrofagocytosa, M5a monoblasty > 80% mononukleárních buněk M5b < 80% mononukleárních buněk
Erytroblastová leukémie	AML M6	< 5%	Častěji sekundární leukémie z Myelodysplastického syndromu, často má delší prodromální fáze	Erytroblasty >50% jaderných buněk v kostní dřeni, pozitivita glykoforinu A a CD71 (transferinový receptor), erytroblasty dávají pozitivní PAS reakci, není to ale patognomická vlastnost M6
Megakaryoblastická	AML M7	< 1%	Není vysoký počet blastů, nepříznivá prognóza, vysoká laktát dehydrogenáza, obvykle punktio sicca při fibróze kostní dřene, časté u Downova syndromu	Blasty obvykle nad 20-30%, průkaz faktoru VIII, CD41, CD61 a trombocytární peroxidázy, vyzrálé formy dávají také pozitivitu PAS reakce

Tabulka č.2

Klasifikace akutních myeloidních leukémií podle WHO

Zdroj: Adam et al. 2008, Döhner et al. 2010

1. Akutní myeloidní leukémie s přítomnými genetickými abnormalitami
<p>Akutní myeloidní leukémie a t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</p> <p>Akutní myeloidní leukémie s abnormálními eosinofily kostní dřeně inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11</p> <p>Akutní promyelocytární leukémie t(15;17)(q22;q12); PML-RARα a varianty</p> <p>Akutní myeloidní leukémie s t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL</p> <p>Akutní myeloidní leukémie s t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</p> <p>Akutní myeloidní leukémie s inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1</p> <p>Akutní myeloidní leukémie (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1</p> <p><i>Prozatímní : Akutní myeloidní leukémie s mutací NPM1</i></p> <p><i>Prozatímní : Akutní myeloidní leukémie s mutací CEBPA</i></p>
2. Akutní myeloidní leukémie s myelodysplázií více buněčných linií
<p>Následující myelodysplastický syndrom, nebo myelodysplastický/ myeloproliferativní syndrom</p> <p>Bez předchozího myelodysplastického syndromu</p>
3. Akutní myeloidní leukémie a myelodysplastický syndrom související s předchozí léčbou
<p>Související s léčbou alkylačními cytostatiky</p> <p>Související s léčbou inhibitory topoizomerázy II, některé mohou být lymfoidní</p> <p>Jiné typy</p>
4. Akutní leukémie jinak kategorizované (NOS)
<p>Akutní myeloidní leukémie s minimální diferenciací</p> <p>Akutní myeloidní leukémie bez maturace</p> <p>Akutní myeloidní leukémie s maturací</p> <p>Akutní myelomonocytární leukémie</p> <p>Akutní monoblastická a monocytická leukémie</p> <p>Akutní erytroidní leukémie</p> <p>Úplná erytroidní leukémie</p> <p>Erytroleukémie a erytromyeloidní leukémie</p> <p>Akutní megakaryoblastická leukémie</p> <p>Akutní bazofilní leukémie</p> <p>Akutní panmyelosis s myelofibrózou</p>
5. Myeloidní sarkom
<p>Extramedulární myeloidní tumor</p> <p>Granulocytický sarkom</p>
6. Myeloidní proliferace spojená s Downovým syndromem
<p>Přechodná abnormální myelopoéza</p> <p>Myeloidní leukémie asociovaná s Downovým syndromem</p>
7. Blastická plazmacytoidní neoplázie dendritických buněk
8. Akutní leukémie nediferencovaných linií (acute leukemias of ambiguous lineage)
<p>Nediferencovaná akutní leukémie</p> <p>Akutní leukémie smíšeného fenotypu s t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1</p> <p>Akutní leukémie smíšeného fenotypu s t(v;11q23); MLL rearranged</p> <p>Akutní leukémie smíšeného fenotypu, B/myeloid, NOS</p> <p>Akutní leukémie smíšeného fenotypu, T/myeloid, NOS</p> <p><i>Prozatímní : lymfoblastická leukémie/ lymfom Natural killer (NK) cell</i></p>

1.2. Patogeneze a etiologie akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie je rychle progredující, heterogenní klonální onemocnění hematopoetických progenitorových buněk (Doepfner et al. 2007). Zvýšená proliferace, rezistence vůči apoptóze, stejně jako i inhibice diferenciaci jsou projevem tohoto onemocnění (Steffen, et al. 2005). Etiologie AML ještě není zcela objasněna, ve vlastní patologii vzniku akutní myeloidní leukémie mají zásadní význam genetické změny, především některé chromosomální přestavby. U řady nemocných jsou prokazatelné translokace, v jejichž důsledku vznikají v oblasti zlomů fúzní geny, jejichž součástí jsou často geny pro transkripční faktory. Důsledkem takto změněných transkripčních faktorů je deregulace vývoje kmenové krvetvorné buňky a vznik leukémie (Adam et al. 2008). Dva hlavní typy genetických událostí, které vedou k leukemické transformaci jsou: změny v činnosti transkripčních faktorů, které ovlivňují hematopoetickou diferenciaci, a aktivace signálních drah přes tyrozine kinázový receptor (Doepfner et al. 2007). Opakující se chromosomální translokace jsou charakteristickým znakem lidské leukémie (Kelly et al. 2002). Chromosomální aberace se vyskytují asi u poloviny všech případů AML (Hiddemann et al. 2005). Velké úsilí bylo věnováno pochopení molekulární patogeneze AML (Doepfner et al. 2007). Objasnění struktury a funkce leukogenních genů, jakož i analýza jejich výskytu u AML, vedly ke vzniku „two-hit“ modelu patogeneze AML. Podle tohoto modelu se AML vyvíjí v důsledku souběžného vzniku dvou typů genetických změn (mutace genu nebo přestavba) (Doepfner et al. 2007, Steffen et al. 2005,). Somatické mutace jsou většinou náhodné chromosomální změny, nejčastěji se u AML vyskytují chromosomální balancované translokace, jejichž výsledkem je formování chimérických proteinů. Tyto mutace ale nejsou dostatečnou příčinou pro vznik AML. Zatímco mutace I. třídy umožňují proliferaci a/nebo přežívání hematopoetických progenitorů, mutace II. třídy vedou k poškození hematopoetické diferenciaci (Doepfner et al. 2007, Steffen et al. 2005,). Zvýšená proliferace a přežití leukemických blastů (mutace I. třídy) může být příčinou změny v RTK signalizačních cestách. V této souvislosti bylo prokázáno, že mutace v FMS – like thyrosin kinase 3 (Flt3), c-Kit a Ras jsou u AML velice časté (Doepfner et al. 2007, Hiddemann et. al. 2005). Předpokládá se, že k poruše diferenciaci blastů u AML dochází prostřednictvím změny v transkripčních faktorech (mutace II. třídy), které jsou nezbytné pro myeloidní diferenciaci. Tyto transkripční faktory se u AML stávají často terčem translokace, která vede ke vzniku fúzních

proteinů, jako jsou např. AML1/ETO, CBF/SMMHC, PML-RAR nebo MLL fúzní proteiny (Doepfner et al. 2007, Hiddemann et al. 2005, Tenen D. 2003). Je zajímavé, že v klonálních hematologických onemocněních u dětí s Downovým syndromem můžeme běžně nalézt mutace v kódujícím transkripčním faktoru GATA-1 (Doepfner et al. 2007). GATA-1 je rozhodující transkripční faktor pro normální vývoj erytroidních a megakaryocytárních linií, absence GATA-1 podporuje akumulaci nezralých megakaryocytů, tzn. vznik AML M7 (Magalhaes et al. 2006). GATA-1 mutace se vyskytuje téměř u všech případů Downova syndromu s myeloproliferativním onemocněním. Toto zjištění naznačuje, že deregulace GATA-1 je základním krokem k vývoji AML u pacientů s Downovým syndromem. Přímá souvislost mezi trizomií 21. chromozomu a X-vázaným transkripčním faktorem GATA-1 nebyla dosud nalezena (Gurbuxani et al. 2004).

Role proteinů tepelného šoku v patogenezi leukémie je popsána v kapitole 1.8.

1.3. Incidence akutní myeloidní leukémie

V České republice narůstala incidence leukémií od roku 1977 až do roku 2004, od tohoto roku incidence nerostla. Nejvyšší incidence byla v letech 2003 až 2004, kdy na 100 000 obyvatel připadalo 12 pacientů trpících leukémií. V letech 2004 až 2007 došlo k mírnému poklesu incidence, a až do roku 2007 se výskyt onemocnění nezvýšil. Mortalita rostla od roku 1977 až do roku 2000. Nejvyšší mortalita byla v roce 2000, kdy na 100 000 osob připadalo 8 případů úmrtí na leukémie. Mortalita až do roku 2007 měla setrvalý stav a pohybovala se okolo 6 až 8 úmrtí na 100 000 osob ročně. Globálně je incidence i mortalita častější u mužů než u žen, musíme ale vzít v potaz typ leukémie, věk a pohlaví pacienta. Výskyt i mortalita se zvyšuje od 45. roku. Vrchol incidence a mortality je okolo 75. až 79. roku, kdy se toto onemocnění vyskytuje až u 14% osob a úmrtnost je až 16% (Dušek et al. 2007). AML tvoří 80% všech akutních leukémií dospělých, akutní lymfatické leukémie tvoří zbytek 20%. Incidence AML v Evropě je 2-4 případy na 100 000 obyvatel. Incidence se zvyšuje se stoupajícím věkem, ve skupině nad 65 let je incidence 15 až 17 osob na 100 000 obyvatel (Adam et al. 2008).

1.4. Rizikové faktory vzniku akutní myeloidní leukémie

Etiologie akutních myeloidních leukémií je multifaktoriální. Přesná příčina vzniku leukémií zůstává u převážné většiny pacientů nezodpovězenou otázkou. Výzkumné práce odhalily některé faktory, které se spolupodílejí na vzniku jednotlivých typů leukémií. Zvýšené riziko vzniku AML je spojeno s některými hereditárními chorobami, jejichž projevem je vyšší fragilita chromatinu. Jedná se o Fanconiho anémii, Kosmanův syndrom, Wiskottův–Aldrichův syndrom nebo ataxia teleangiectasia, která je spojena především se vznikem akutní lymfocytární leukémie. (ALL). Také Downův syndrom (trizomie 21. chromozomu) je spojen s vyšší incidencí akutní myeloidní leukémie, ovšem v tomto případě neplatí, že se incidence zvyšuje s věkem, ale nejvyšší riziko vzniku AML je do 30. roku života, potom incidence klesá na úroveň rizika v ostatní populaci. Ve vlastní patofyziologii vzniku AML mají zásadní význam genetické změny, především některé chromosomální přestavby. U řady nemocných jsou prokazatelné translokace. V důsledku translokací vznikají v oblasti zlomů fúzní geny, jejichž součástí jsou často geny pro transkripční faktory. Důsledkem takto změněných transkripčních faktorů je deregulace vývoje kmenové krvetvorné buňky. Vznik AML může indukovat také ionizující záření. Je pravděpodobně nejznámějším rizikovým faktorem pro vznik AML. Iatrogenní expozice myelotoxickým chemoterapeutickým agens jako jsou např., cyklofosfamidy, chlorambucil, melfalan, treosulfan, a zejména alkylačním činidlem zvyšuje relativní riziko vzniku AML s latencí 4-8 let od podání. Blokátory topoizomerázy II mají potenciál indukovat akutní myeloidní leukémii v kratším intervalu 1-3 roky od jejich podání (Adam et al. 2008, Smith et al. 2004, Stewart et al. 2003, Mayer et al. 2002).

1.5. Diagnostika akutních myeloidních leukémií

Diagnózu AML lze stanovit pouze na základě souboru vyšetření, kam musíme zahrnout: klinický nález, histologické a cytologické vyšetření kostní dřeně cytochemickými metodami. Pro stanovení konkrétního typu AML musí být použity specifické imunologické a molekulárně – genetické metody (Adam et al. 2008, Mayer et al. 2002).

1.5.1. Klinický obraz

Klinické příznaky jsou převážně způsobeny nedostatkem funkčních krvinek v cirkulaci. Symptomy přítomné při AML jsou typicky výsledkem zvýšení počtu

leukemických buněk, jejich efektem na funkci kostní dřeně a jejich infiltrací dalších tkání (Smith et al. 2004). Stav nemocného se velmi rychle zhoršuje. Příznaky nemoci lze charakterizovat následovně:

1. Malátnost, únava, pocit vyčerpání, bledost sliznic, dlaní, nehtových lůžek i celé kůže, (anémie), u řady starších nemocných se anemický syndrom manifestuje typickými ischemickými bolestmi na hrudi.
2. Zvýšená četnost infekcí, velice často bakteriálního nebo plísňového původu, které mívají často velmi agresivní průběh, typické jsou záněty v oblasti horních cest dýchacích, stomatitidy a závažné angíny, které nedostatečně reagují na antibiotika, neboť je defektní nespecifická imunita.
3. Někdy mohou být přítomné horečky nebo zvýšené teploty bez prokazatelné infekce. Horečky se vyskytují u 15-20% pacientů.
4. Projevy hemoragické diatézy (trombocytopenie), epistaxe, krvácení z dásní, metroragie, petechie, ekchymózy.
5. Hyperplazie dásní, kožní infiltráty a příznaky z poškození CNS, které vycházejí z monocytární řady.
6. Projevy leukostázy. Asi 10% pacientů s AML má v době stanovení diagnózy počet leukocytů nad $100 \times 10^9/l$, tito pacienti jsou ve zvýšené míře ohroženi postižením CNS (až 15% dospělých), leukostázou a následným tumor lysis syndromem po zahájení léčby. Leukemická infiltrace CNS se nejčastěji manifestuje jako leptomeningeální choroba s bolestmi hlavy. Leukostáza se může projevit dušností, bolestmi na hrudníku, bolestmi hlavy, alteracemi mentálního stavu, parézami kraniálních nervů a priapizmem. Leukostáza a tumor lysis syndrom patří mezi onkologické akutní situace vyžadující intenzivní léčbu.
7. Méně často AML provází lymfadenopatie, organomegalie. Výjimečně může být zjevná hyperplazie gingiv. Splenomegalie je typická pro chronickou leukémii, může být ale přítomna i u akutní myelomonocytární leukémie (AML M2 někdy i u AML M4 a M5) (Adam et al. 2008, et al. 2004),

Kromě všech těchto uvedených znaků nemusí být v objektivním nálezu žádná další patologie. Podezření vyplývající z výše uvedeného klinického obrazu je možné potvrdit laboratorním vyšetřením periferního krevního obrazu s mikroskopicky hodnoceným diferenciálním krevním rozpočtem. Podezření na AML se zvýší pokud je snížený počet nejen erytrocytů, ale i dalších krvinek.. Pokud je suspektní anamnéza a diagnóza AML

není zřejmá z periferního krevního obrazu, definitivní diagnózu nemoci i její prognózu zjistíme cytologickým vyšetřením kostní dřeně, kde při AML nalezneme > 20% blastů v kostní dřeni (Adam et al. 2008).

1.5.2. Cytologické, cytochemické a histologické vyšetření kostní dřeně

Tyto metody jsou postupně překonávány mnohem sofistikovanějšími metodami, jako jsou metody molekulárně – genetické a imunologické. Nicméně v běžné laboratorní praxi se tyto metody používají vzhledem k minimální náročnosti na čas a finanční zatížení laboratoří. Vyšetření, které přinese podezření nebo odhalení akutní myeloidní leukémie, je většinou mikroskopické vyšetření diferenciálního krevního obrazu periferní krve. Proto jsou tato vyšetření nezbytnou součástí laboratoří klinické hematologie. K pozdější specifikaci dané leukémie se používají právě metody molekulárně – genetické a imunologické.

Cytologické hodnocení myelogramu (aspirátu kostní dřeně) patří k běžným diagnostickým metodám u pacienta s podezřením na AML (Döhner et al. 2010). Nátěry kostní dřeně stejně jako nátěry periferní krve se zhotovují na podložní sklíčko a po zaschnutí se fixují metanolem (případně jiným alkoholem), následně jsou obarveny podle standardního operačního postupu dané laboratoře nejčastěji barvami May – Grünwald a Giemsa – Romanowski, ale lze použít i Wright-Giemsa, ke správnému zhodnocení myelogramu je potřeba alespoň 5 zdařilých nátěrů kostní dřeně. V současných doporučeních se uvádí, že by se mělo počítat nejméně 200 leukocytů v periferním krevním obraze při náznaku přítomnosti blastů a pro správné zhodnocení myelogramu by se mělo počítat nejméně 500 buněk. Pro splnění diagnózy by mělo být v kostní dřeni nad 20% blastů (Döhner et al. 2010, Adam et al. 2008, Haferlach et al. 2005). Cytochemické metody jsou postupně nahrazovány mnohem specifitější mutiparametrální průtokovou cytometrií. Mezi cytochemické metody patří pozitivní průkaz myeloperoxidázy, pozitivita barvení na lipidy Sudanovou černí a průkaz nespecifické esterázy. U akutní erytroidní leukémie můžeme detekovat vysokou pozitivitu PAS („periodik acid Schiff“) reakce (Döhner et al. 2010, Haferlach et al. 2005, Mayer et al. 2002, Burnett et al. 1998).

Histologické vyšetření vzorku získaného trepanační biopsií dřeně na rozdíl od cytologického vyšetření umožňuje posouzení prostorových vztahů a jejich změn u hematologických onemocnění. Pro diagnostiku některých typů leukémií není provedení tohoto typu vyšetření nezbytné. Má ale velký význam v klinicky

definovaných situacích. Především pokud aspirační biopsie sterna je neúspěšná v důsledku „punctio sicca“. Trepanobiopsie je prováděna podobně jako sternální punkce. Provádí se z lopaty kosti kyčelní (Döhner et al. 2010, Mayer et al. 2002).

1.5.3. Imunofenotypizace AML

Imunofenotypizace AML se provádí pomocí multiparametrální průtokové cytometrie. Je založena na detekci konkrétních kombinací antigenů u blastické buňky (Döhner et al. 2010, Swerdlow et al. 2008, Craig et al. 2008). Nejdůležitějšími antigeny, které jsou typické pro myeloidní blasty, jsou CD13, CD33, CD117, a myeloperoxidáza (MPO), další antigeny jako CD11b a CD16 jsou méně užitečné, protože jejich exprese se může velmi lišit u jednotlivých AML, mohou se objevovat a mizet v relapsu, proto nejsou vhodnými markery pro sledování postupu nemoci (Nguyen et al. 2007). Neexistuje obecný konsensus pro „cut off“ hodnotu markerů u AML. U většiny markerů je kritériem pro diagnózu AML více než 20% leukemických blastů, které exprimují konkrétní marker, ale u vybraných markerů např. CD3, CD34, CD117, MPO je „cut off“ hodnota 10% buněk exprimujících konkrétní marker (Döhner et al. 2010). Imunofenotypizace by ale neměla být používána jako náhrada morfologického hodnocení. Doporučuje se kombinace obou metod. Imunofenotypizace blastů v kombinaci s cytologickým vyšetřením umožňuje velice přesnou diagnostiku konkrétního typu akutní myeloidní leukémie (Nguyen et al. 2007). Konkrétní imunofenotypy jednotlivých AML jsou popsány v Tabulce č.1.

1.5.4. Cytogenetika

Konvenční cytogenetická analýza je povinná součástí vyhodnocení diagnózy pacienta s podezřením na AML. Chromosomální abnormality jsou zjištěny přibližně u 55% dospělých s onemocněním AML (Mrózek et al. 2004, Grimwade et al. 2001). Do WHO klasifikace jsou zahrnuty AML s přítomnými genetickými translokacemi, některé z těchto genetických abnormalit jsou dostatečné pro diagnostiku AML, pokud je splněna podmínka, že v periferní krvi nebo v kostní dřeni je přítomno > 20% leukemických blastů. Pokud není dostatečná cytogenetická analýza, je možné provést molekulárně-cytogenetickou metodu FISH, kterou je možné detekovat přestavbu („rearrangement“) genů, vznik fúzních genů nebo ztráty chromosomů (Döhner et al. 2010). WHO klasifikaci chromosomálních abnormalit u AML můžete najít v Tabulce č.2.

1.5.5. Molekulární genetika

Do metod molekulární genetiky patří PCR, PCR v reálném čase, sekvenování nebo zjištění profilu genové exprese pomocí mikroRNA analýzy. Tyto metody nejsou rutinně prováděny v klinických laboratořích vzhledem k jejich časové náročnosti a velkým finančním nákladům. Patří k vyšetřením, která jsou prováděna za účelem charakterizace AML, včasného zjištění relapsu a minimální reziduální choroby a samozřejmě mají velké uplatnění ve výzkumných laboratořích (Haferlach et al. 2005). Pro tyto metody se používá izolovaná DNA nebo RNA a odebrané životaschopné buňky se uchovávají zamražené v tekutém dusíku. Jestliže je množství materiálu omezené, je prioritou extrakce RNA, protože RNA je vhodná pro molekulární „screening“ fúzních genů a mutací spojených s leukémií (Döhner et al. 2010).

1.5.6 Ostatní metody

Chtěla bych ještě zmínit pár metod, které jsou především výzkumného charakteru. Mají ale velký význam v odhalování mechanismů vzniku AML, nebo umožňují detailnější a specifitější diagnostiku a sledování progresu AML. Nejedná se o metody běžně používané, nicméně jejich přínos pro hematologickou onkologii je obrovský.

„Genome-wide studies“

Nedávný pokrok v rozvoji genomických technologií vedl k identifikaci nových genetických abnormalit a umožňuje vytvořit systematickou charakterizaci reálného genomu karcinomů. Zavedení „genom-wide studies“ u jednonukleotidového polymorfismu vedlo i k identifikaci nového mechanismu, který se podílí na vzniku AML (Döhner et al. 2010).

„Biobanking“

V rámci klinických studií se doporučuje skladování vzorků pacientů. Jedná se o vzorky kostní dřeně a krve nejdříve před léčbou pacienta, později v průběhu léčby podle časového plánu, dále v období po léčbě (období kompletní remise a případně v relapsu), a dokonce je zde zahrnuta i analýza zárodečné DNA. Tyto vzorky by měly umožnit spektrum souběžných laboratorních studií (Döhner et al. 2010).

1.6. Léčba akutních myeloidní leukémií

Léčba zhoubných nádorů je zpravidla komplexní. Zahrnuje chirurgické metody, radioterapii, protinádorovou chemoterapii, imunoterapii a hormonální léčbu. Je řada maligních nádorů, u nichž je chemoterapie dominantní léčebnou metodou, protože jsou vysoce chemosenzitivní. Tyto nádory pak lze chemoterapií téměř úplně odstranit. Mezi tyto typy nádorů patří i leukémie (Mayer et al.2002).

Léčba AML je velice náročná. Neexistuje naprosto jednotný postup léčby u všech nemocných. Při léčbě se přihlíží samozřejmě k prognostickým ukazatelům, k věku pacienta a jeho fyzickému stavu a typu AML, kterou pacient trpí.

1.6.1. Kurativní léčba AML u nemocných od 18 do 60 let

Jakmile je stanovena diagnóza, je nutno rozhodnout o způsobu léčby, a to zda léčby s kurativním cílem, či jen s paliativním záměrem. Kurativní léčba AML má 2 fáze, a to indukční a postremisní fázi (Adam et al.2008). Indukční léčba má za cíl navodit kompletní remisi onemocnění a léčba postremisní má poté relapsu zabránit. Postremisní terapie může obnášet tzv. konsolidaci remise, tzn. konvenční chemoterapii v běžných, nebo vysokých dávkách, nebo vysokodávkovou terapii s následným podáním krvetvorných buněk. Tím je léčba nemocného ukončena. Součástí postremisní terapie může být i déle trvající cytostatická udržovací terapie, zpravidla nízkými dávkami (Mayer et al. 2002). Cílem indukční fáze léčby je navodit kompletní remisi nemoci, to znamená zmenšit leukemickou populaci až pod hranici morfologického stanovení a dosáhnout regenerace fyziologické krvetvorby a normalizace krevního obrazu (Adam et al. 2008). Indukční terapie dospělých od 18 do 60 let věku zahrnuje 3 dny podávání atracyklinů, množství je určeno podle druhu preparátu, a 7 dní se podává cytarabin. To je současné standardní dávkování v indukční fázi léčby. S touto léčbou lze dosáhnout kompletní remise u 60 až 80% nemocných ve věku 18 až 60 let (Döhner et al. 2010, Estey et al. 2006, Löwenberg et al. 2003). U pacientů mladších 60 let se podávají 1-2 cykly indukční terapie. V postremisní fázi dochází ke zničení zbytkové nemoci (Adam et al. 2008). Intenzivní postremisní chemoterapie dává větší šanci na déletrvající remisi. Tato závislost ale bohužel platí přesvědčivě jen pro mladší nemocné. Intenzivní chemoterapie ale není jedinou možností, jak provést intenzivní konsolidaci, další možností je vysokodávková chemoterapie s následnou transplantací hemopoetických kmenových buněk ať už autologní, nebo alogenní transplantací (Mayer et al. 2002).

1.6.2. Transplantace krvetvorných kmenových buněk jako součást postremisní terapie

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk jako postremisní strategie je spojena s nejnižší mírou recidivy nemoci. Tato výhoda je důsledkem vysokodávkové chemoterapie a silným efektem reakce štěpu proti leukémii („graft versus leukemia“ GvL). Avšak výhody alogenní transplantace jsou omezeny úmrtností, která je vyvolána náročnou léčbou tzv. „treatment – related mortality“(TRM). Pro jednotlivé klinické případy je doporučeno vzít v úvahu jak rizika onemocnění, která musí být co nejlépe zhodnocena podle cytogenetického a molekulárně – genetického vyšetření pacienta, tak je třeba vzít v potaz riziko spojené s transplantací, jako je TRM (Döhner et al. 2010). Alogenní transplantace se přednostně používá u mladších nemocných. Alogenní transplantace je potenciálně možný postup u pacientů, kteří jsou rezistentní vůči chemoterapii nebo při opakovaných hematologických malignitách (Shapira, et al. 2007). Autologní transplantace krvetvorných kmenových buněk je považována za alternativní možnost postremisní terapie u pacientů s příznivými až se středně rizikovými výsledky cytogenetických vyšetření. Výsledek po autologní transplantaci je přinejmenším stejně dobrý jako po použití postremisní chemoterapie, ale zatím nedošlo k prokázání lepšího efektu ve srovnání s dalšími možnostmi léčby. Autologní transplantace ovšem může mít výhody u konkrétních typů AML (Whitman et al. 2007). Alogenní transplantace skýtá nepochybně větší protinádorový efekt než transplantace autologní, ale je také zatížena nezanedbatelným procesem komplikací, navíc jen malá část nemocných má vhodného HLA identického dárce. Komplikací po alogenní transplantaci bývá obecně více (Mayer et al. 2002). Nejčasnější komplikace po transplantaci je akutní reakce štěpu proti hostiteli („graft versus host disease“ GvHD). Na této reakci se podílí velké množství faktorů, mezi které patří: HLA neslučitelnost mezi dárce a příjemcem, inkompatibilita v ABO systému. Tyto dva faktory jsou v současnosti částečně odbourány pečlivým výběrem dárce, u autologní transplantace tento problém odpadá. Mezi další příčiny, které mohou přispět ke vzniku GvHD, patří věk dárce a příjemce, svoji roli hraje i pohlaví, vysoké dávky celotělního ozáření, splenektomie, podání imunoglobulinů, expozice herpes virům, úplné vyhubení střevní mikroflóry a potransplantační transfúze (Hahn et al. 2008). GvHD reakce je způsobena imunologickou reakcí transplantátu proti příjemcovu organismu. Manifestace akutní GvHD je různá, např. postižení kůže od erytému až po exantém vedoucí k deskvamacím kůže, postižení jater, které se projevuje hyperbilirubinemií nebo elevací enzymů,

postižení zažívacího traktu, které se projevuje nechutenstvím, zvracením až velice těžkými průjmy. Chronická GvHD má projevy podobné autoimunitním chorobám. Obecně mohou být komplikace způsobené GvHD velice mírné, nevyžadující žádnou terapii, ale mohou být i velice závažné rezistentní vůči terapii ohrožující život nemocného. GvHD reakce bývá často spjata s GvL reakcí, což má u alogenní transplantace za následek méně relapsů leukémií než po transplantacích autologních. Odstranění lymfocytů z transplantátu tzv. deplece T-lymfocytů má za následek sice eliminaci GvHD, ale také zvyšuje riziko selhání nebo rejekce štěpu a repalsu AML. Dalším potransplantačním komplikacím může přispívat i sama povaha vysokodávkové chemoterapie, podání dávek na hranici netolerovatelné hematologické toxicity, odráží, že komplikace budou časté a mnohdy velice závažné. Než dojde k obnově krvetvorby po transplantaci, uplynou cca 2 až 3 týdny. Po tuto dobu je nemocný ohrožen závažnými infekcemi při leukopénii a krvácením při trombocytopénii. Urychlení restituce leukocytů lze dosáhnout podáním růstových leukocytárních faktorů. Vysokodávková chemoterapie postihuje všechny rychle se dělící buňky, nejen buňky nádorové. Nezanedbatelné je i riziko vzniku sekundárních malignit a trvalé poruchy reprodukčních schopností (Mayer J et al. 2002).

1.6.3. Kurativní léčba AML u nemocných nad 60 let

Léčba AML ve vyšším věku u pacientů starších 65 let má velmi neuspokojivé výsledky, za tímto neúspěchem stojí dvě možné příčiny. Příčinou ze strany vlastního onemocnění jsou specifické vlastnosti leukemických buněk starších nemocných. Tyto buňky vykazují větší lékovou rezistenci a odpovídá tomu i nepříznivý cytogenetický nález. Příčinou ze strany nemocných je pak snížená hematologická rezerva buněk kostní dřeně a polymorbidita (Adam et al. 2008). Prognóza AML se pravděpodobně zhoršuje každým rokem s rostoucím věkem nemocného. Vysoký věk pacientů by přesto neměl být důvodem odepření intenzivní terapie. Studie naznačují, že remise onemocnění způsobená indukční terapií umožní těmto nemocným zlepšení kvality života a delší přežití než pouze podpůrná péče (Döhner et al. 2010). Nicméně u těchto nemocných je důležité pečlivě analyzovat veškeré prognostické údaje, které reflektují pravděpodobnost dosažení léčebné odpovědi a pravděpodobnost úmrtí nemocného na nežádoucí účinky léčby. Při nepříznivé prognóze je doporučena pouze léčba paliativní (Adam et al. 2008).

Součástí jakékoli léčby AML je i podpůrná léčba, jejím účelem je zabránění vzniku infekčních onemocnění v období, kdy má pacient neutropénii. Komplikace vzniklé následnou infekcí mohou mít pro nemocného katastrofální důsledky. Mohou způsobit rejekci transplantátu, nebo až úmrtí pacienta v důsledku banální infekční choroby (Döhner et al. 2010, Adam et al. 2008, Mayer et al. 2002).

1.7. Definice a charakteristika proteinů tepelného šoku neboli „heat shock proteins“ (Hsp)

Proteiny tepelného šoku (nebo také stresové proteiny) byly poprvé objeveny ve slinných žlázách *Drosophily Melanogaster* v roce 1962 jako velice konzervované proteiny, jejichž exprese je indukována různými druhy stresu (Ritossa, 1962; Jaattela, 1995; Garrido, 1998). Hsp jsou přítomny u eukaryotní i prokaryotních organismů a hrají základní úlohu jako molekulární chaperony tím, že napomáhají správnému sbalení („folding“) vznikajících nebo stresem akumulovaných rozbalených („misfolded“) proteinů a zabraňují tak jejich agregaci. Hsp mají dvojí funkci závislou na jejich lokalizaci, která může být buď intracelulární, nebo extracelulární. Intracelulární Hsp mají hlavně cytoprotektivní funkci. Membránově vázané Hsp zprostředkovávají imunitní funkce. (Schmitt, 2007). Savčí Hsp byly klasifikovány do pěti rodin, na základě jejich molekulární velikosti: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a malé Hsp (Jaattela, 1995; Ciocca et al. 2005).

1.7.1. Klasifikace proteinů tepelného šoku (Hsp)

Hsp110 superrodina

Rodina Hsp110 se vyskytuje výhradně u eukaryotních organismů a evolučně souvisí s Hsp70 superrodinou (Easton et al., 2000). Hsp110 rodina je nejlépe charakterizovaná u savců (myši, křečků a lidí) (Yagita et al. 1999, Nonoguchi et al. 1999). Tyto proteiny se nachází jak v jádře, tak v cytoplazmě buněk. Jsou koregulovány stejně jako další významné skupiny Hsp proteinů souborem specifických podmínek, které zahrnují stres, hypertermii, ethanol, oxidační radikály, zánět a návrat z anoxie (např. reperfuční zranění) (Black et al. 1991). U eukaryotních organismů musí Hsp110 vykonávat životně důležité funkce, a to nezávisle na Hsp70. Tento závěr byl učiněn na základě „knock out“ studie Hsp110 u kvasinek a u *Drosophilly Melanogaster*, u obou druhů byl „knock out“ letální (Trott et al. 2005). Jako jeden z nejhojnějších Hsp proteinů v savčích buněčných liniích a tkání je Hsp110 snadno detekovatelný, přestože

jeho exprese je velice signifikantní. Konstitutivní exprese je nejnižší v srdečním svalu a v kosterních svalech, jeho nejvyšší exprese je v játrech a mozku. Konkrétně u savců mozeček exprimuje málo Hsp110, zatímco exprese v jiných částech mozku je velmi vysoká (Hylander et al. 2000, Calderwood and Atassi et al. 2007).

Hsp90 superrodina

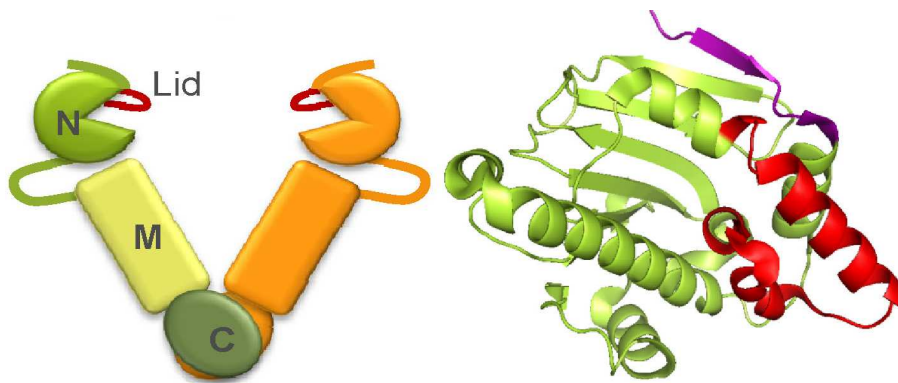
Prokaryotní buňky mají jen jeden neesenciální Hsp90 protein, a to HtpG, na rozdíl od eukaryotních buněk, které mají více Hsp90 proteinů. Prominentní členové HSP90 superrodiny jsou Hsp90 α a Hsp90 β , jedná se o cytosolické izoformy Hsp90, tyto dvě izoformy jsou nezbytné pro životaschopnost eukaryotických buněk (Sreedhar, 2004), (Schmitt, 2007). Hsp90 je evolučně konzervovaný molekulární chaperon, který se podílí na skládání, stabilizaci, aktivaci a montáži konkrétních proteinů: tzv. klientských proteinů („client proteins“) (Pearl, 2008; Pratt, 2008). Mezi tyto tzv. klientské proteiny patří např. kinázy, transkripční faktory, více než 200 signálních molekul a mnoho dalších proteinů, které jsou zapojeny do široké škály biologických procesů za normálních i stresových podmínek v buňce (McClellan 2007; Maloney 2007; Pratt, 2003). Hsp90 se také podílí na vzniku a progresi patologických stavů, kam lze zahrnout: ischemie a reperfúze, infekční, neurodegenerativní, a hlavně nádorová onemocnění (Whitesell, 2005; Yeati, 2008). Hsp90 se v tomto případě chová jako skládající kondenzátor pro nestabilní genetické varianty, onkoproteiny a nadměrně exprimované proteiny (Whitesell, 2005; Cowen, 2005). Hsp90 je zvýšeně exprimovaný v lidských leukemických buňkách. Díky vysoké expresi dochází k inhibici apoptózy, která je indukována staurosporiny, dochází tak k zabránění aktivaci kaspáz v cytosolu, a tím k dlouhodobému přežívání leukemických buněk. Je uváděno, že Hsp90 inhibice apoptózy je výsledkem negativního efektu na funkci Apaf-1, protože Hsp90 váže přímo Apaf-1, a tím znemožňuje jeho oligomerizaci a následnou aktivaci prokaspáz-9 (Pandey, 2000). HSP90 umožňuje inhibici apoptózy i dalšími způsoby. Bylo prokázáno, že p53 je silně reprimován po ozáření buněk ultrafialovým světlem, jehož důsledkem je pravděpodobně vysoká genová exprese Hsp90 α (Zhang 2004). Cytoprotektivní funkce Hsp90 ale nemusí být vždy fyziologická, zvýšená exprese provází různá nádorová onemocnění a nádorové buňky díky vysoké expresi Hsp90 odolávají apoptotickým mechanismům a ve zvýšené míře přežívají. Hsp90 stejně jako Hsp60 a Hsp70 podléhá konformační změně po navázání ATP, tato konformační změna je nezbytná pro opětovné sbalení („refolding“) proteinů (Schmitt, 2007). Molekulární konzervovaná

struktura Hsp90 se skládá z: N-terminální ATP-vazebné domény, střední domény, která obsahuje amfipatickou smyčku, která je implikována v doméně vázající klientský protein a poslední částí je C-terminální doména, která je konstitutivně dimerizována (Csermely, 1998; Pearl, 2006). Struktura Hsp90 s konkrétním znázorněním N-terminální vazebné domény ve dvou konformačních stavech je znázorněna na Obrázku č.1 a č.2.

Obrázek č.1

Struktura Hsp90 – otevřená konformace bez navázaného ATP, vpravo je detailní struktura N - terminální koncové domény bez navázaného ATP.

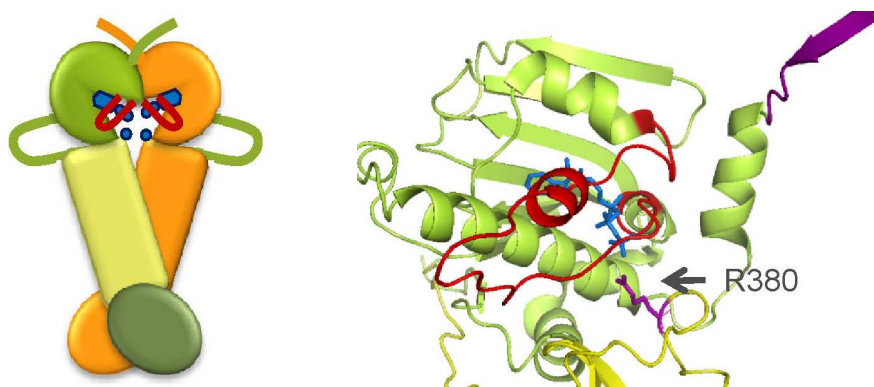
Zdroj: Hessling et al. 2009; Ji-Sook Hahn, 2009



Obrázek č.2

Dimerní struktura Hsp90 – uzavřená konformace s navázaným ATP, vpravo je detailní struktura N - terminální koncové domény s navázaným ATP a s katalyticky důležitým zbytkem R380

Zdroj: Hessling et al. 2009; Ji-Sook Hahn, 2009



Hsp70 superrodina

Hsp70 superrodina je nejlépe prostudovanou a nejvíce konzervovanou skupinou Hsp. Lidské buňky obsahují několik členů Hsp70 superrodiny. V současnosti existuje 8 homologních chaperonových proteinů, které můžeme rozdělit na stresem indukované Hsp70, na konstantně exprimované Hsp70, mitochondriální Hsp75 a na Grp78 proteiny, které jsou lokalizované v endoplazmatickém retikulu (Daugaard et al., 2005; Volloch, 1999; Jaattela, 1999). Za normálních podmínek mají Hsp70 proteiny funkci jako ATP–dependentní molekulární chaperony, které asistují skládání nově syntetizovaných polypeptidů, vzniku multiproteinových komplexů a transportu proteinů přes buněčnou membránu. Paleta různých stimulů včetně protinádorové léčby spouští syntézu stresem indukovaných Hsp70, což zvyšuje schopnost buněk přežít podmínky, které by mohly být pro buňku smrtelné (Schmitt, 2003). Hsp70 proteiny jsou nejsilnější anti-apoptické proteiny, blokují apoptózu na různých úrovních: snižují nebo blokují aktivaci kaspáz, potlačují mitochondriální poškození a fragmentaci jádra (Buzzard, 1998). Hsp70 je prokázaný negativní regulátor mitochondriální cesty aktivující apoptózu, blokuje apoptózu několika mechanismy: v premitochondriální fázi je inhibice způsobena stresem indukovanou signalizací, v mitochondriální fázi brání Hsp70 permeabilizaci mitochondriální membrány, a to blokádou Bax translokace. Na postmitochondriální úrovni Hsp70 interaguje s AIF a Apaf-1 (Schmitt, 2007). V normálních netransformovaných buňkách je exprese intracelulárních Hsp70 velice nízká. Avšak ukázalo se, že Hsp70 hrají aktivní roli v onkogenní transformaci a jsou hojně vyjádřeny ve většině nádorových buněk (Volloch, 1999). Všechny Hsp70 proteiny sdílejí stejnou celkovou molekulární strukturu. Jsou složeny z N-terminální ATPázové oblasti o 45 kDa, substrát-vazebné domény (SBD) o hmotnosti 15 kDa a C-terminální domény přibližně o hmotnosti 10 kDa, která se podílí na vazbě kochaperonů a pravděpodobně má i další funkce (Mayer et al.1998).

Hsp 60 superrodina tzv. chaperoniny

Hsp60 rodina chaperonů, známých též jako tzv. chaperoniny („chaperonins“) (cnp60), má jedinečnou schopnost skládat některé proteiny, které nelze složit pomocí jednoduššího systému chaperonů. Dokáží formovat oligomerní proteinové komplexy prstencového tvaru s velkou centrální dutinou, v níž se nemohou vázat nativní bílkoviny (Bukau et al. 1998). Hsp60 se vyskytují ve dvou podskupinách, které mají podobnou strukturu. Podskupinu č.I, známou jako Hsp60, můžeme najít pouze u bakterií nebo

v organelách endosymbiotického původu, jako jsou mitochondrie nebo chloroplasty. Podskupina č.II existuje u organismů Archea a v cytosolu eukaryotických buněk. Obě skupiny mají podobnou základní strukturu, která se skládá ze tří domén: ekvatoriální ATP - vazebné domény, apikální domény a centrální domény, která umožňuje komunikaci mezi ekvatoriální a apikální doménou (Kim et al. 1994).

Rodina malých Hsp „small Hsp“

Tzv. „malé proteiny tepelného šoku“ je různorodá skupina stresem indukovaných proteinů, charakteristická minimální molekulovou hmotností 15 – 30 kDa a vysoce konzervovanou oblastí přibližně o 90 aminokyselinových zbytcích v C – terminální doméně (Jong et al. 1993). Do této skupiny patří dva Hsp proteiny Hsp27 a Hsp30, které byly poprvé charakterizovány v organismu *Poeciliopsis Lucida* (Norris et al. 1997). Hsp30 přesto, že má stejnou homologní sekvenci s Hsp27, díky své nedostatečné fosforylaci nemá schopnosti molekulárního chaperonu na rozdíl od hsp27. Je možné, že v *Poeciliopsis Lucida* mají tyto dva Hsp komplementární role, vzhledem k multifunkční roli Hsp27 u savců, u kterých se Hsp30 nenachází (Calderwood and Atassi, et al. 2007). Hsp27 má kromě shodné homologní sekvence s Hsp30 odlišné biochemické vlastnosti, jako je oligomerizace a fosforylace. Hsp27 může vytvářet oligomery až o hmotnosti 1000 kDa. Oligomerizace je dynamický proces závislý na fosforylačním stavu proteinů, které jsou vystaveny stresu (Schmitt et al.2007, Garrido et al. 2002). Hsp27 fosforylace je reverzibilní proces katalyzovaný MAPKAP 2 a 3 kinázou jako odpověď na různá agens: mitogeny, zánětlivé cytokiny např. TNF α , IL-1 β , některá protinádorová agens, peroxid vodíku a další oxidanty (Casado et al. 2007, Vertii 2006, Dorion et al. 2002). Hsp27 je ATP – independentní chaperon, jeho hlavní funkce spočívá v ochraně buněk před agregací proteinů (Ehrnsperger et al., 1997). Zvýšená exprese Hsp27 chrání buňku před apoptotickou buněčnou smrtí, která může být vyvolána různými podněty, jako je: hypertermie, oxidační stres, Staurosporin, ligace Fas/Apo1/CD95 receptoru smrti a cytotoxické látky (Schmitt et al.2007, Mehlen et al. 1996).

Funkce Hsp proteinů ovlivňují jejich kochaperony („Co-chaperons“). Kochaperony mají různé funkce. Mají vliv na výměnu nukleotidů (tzn. fungují jako „nukleotide exchange factors“) a mohou usnadňovat, nebo naopak znemožňovat vazbu ATP a hydrolýzu. Patří sem kochaperony: GrpE, BAG-1, HspBP1. Další funkcí kochaperonů je, že umožňují

interakce mezi molekulárními chaperony a jinými proteiny tj. kochaperony Hop, CHIP. Umožňují interakci substrátu s primárním chaperonem: kochaperon Hsp40 (Calderwood and Atassi et al. 2007).

1.7.2 Extracelulárně lokalizované proteiny tepelného šoku (Hsp)

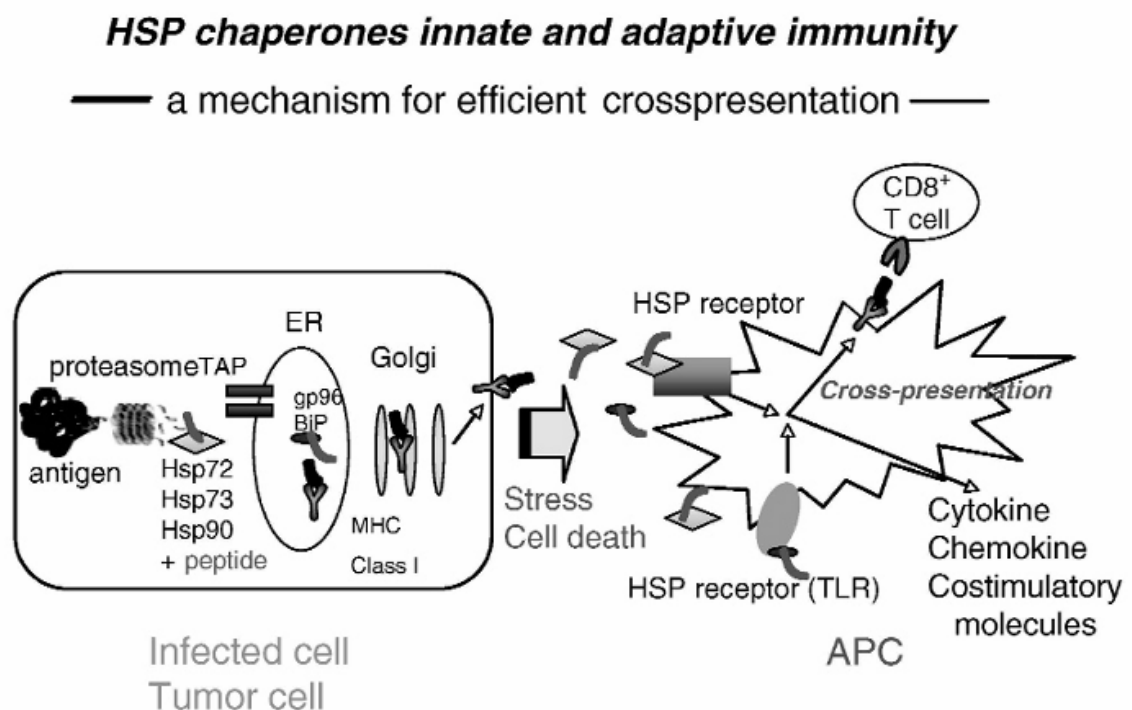
Bylo zjištěno, že Hsp mohou být uvolněny do extracelulárního prostředí. Toto zjištění vyvrátilo tvrzení, že Hsp jsou výlučně intracelulárně lokalizované proteiny. Z toho vyplývá, že kromě intracelulárně lokalizovaných Hsp proteinů, viz výše, existují ještě membránově vázané a extracelulární Hsp proteiny uvolněné z buňky. Kromě ochranných rolí v cytosolu mají Hsp proteiny klíčovou roli ve stimulaci imunitního systému, pokud jsou tedy lokalizovány v extracelulárním prostoru nebo na cytoplazmatické membráně. U člověka přítomnost Hsp proteinů v séru souvisí se stresovými podmínkami, do kterých můžeme zahrnout i zánět bakteriálního nebo virového původu (Barreto et al. 2003). Ačkoli imunologická role extracelulárních a membránově vázaných Hsp proteinů je zřejmá, mechanismus transportu Hsp na cytoplazmatickou membránu, jejich membránové ukotvení a export do extracelulárního prostoru zůstává neobjasněný. Jedním z mechanismů exportu Hsp do média je nekróza (Saito et al. 2005). Cytosolové Hsp neobsahují konkrétní peptidy umožňující membránovou lokalizaci, nicméně jejich hlavním úkolem je transport jiných proteinů přes cytoplazmatickou membránu (Arispe et al. 2004). Přítomnost extracelulárních Hsp v séru byla odhalena v různých výzkumných pracích nezávisle na sobě. V *in vitro* kulturách antigen prezentujících buněk (APC) byli v médiu detekováni členové Hsp70 a Hsp90 rodin (Barreto et al. 2003). Imunologické role Hsp proteinů zahrnují schopnost nosiče peptidových funkcí, dále konkrétní Hsp proteiny mají tzv. cytokin indukující efekt a konečně Hsp stimulují imunitní funkci NK buněk (Schmitt et al. 2007). Hsp70 a Hsp90 byly identifikovány jako klíčové regulátory hostitelského imunitního systému. Bylo prokázáno, že hrají velmi významnou roli v procesu „cross-presentation“ nádorově odvozených nebo jiných antigenních peptidů (Binder et al. 2004, Habich et al. 2002). Extracelulární Hsp v komplexu s peptidy rozpoznává imunitní systém jako tzv. signály nebezpečí. Hsp - antigen komplexy jsou sekundárně vznikající struktury, rozpoznávané APC a jsou skříženě prezentovány („cross presenting“) buňkám adaptivního imunitního systému cytotoxickým T-lymfocytům. Hsp – antigen komplexy se mohou vázat na Toll - like receptory (TLR) a mohou tak indukovat vyžrávání dendritických buněk (profesionální APC). Je ale také potřeba zmínit, že Hsp – antigen

komplexy se mohou vázat na Hsp receptory, jako jsou receptory: CD91, LOX-1, SR-A na dendritických buňkách, poté následuje endocytóza. Hsp – antigen komplexy jsou prezentovány na molekulách MHC I. třídy cytotoxickým T-lymfocytům CD8⁺. Hsp – antigen komplexy jsou schopné vyvolat jak vrozené, tak adaptivní imunitní mechanismy. Tento proces je znázorněn na Obrázku č. 3.(Calderwood and Sherman et al. 2007).

Obrázek č.3

Hsp a vrozené a adaptivní imunitní mechanismy

Zdroj: Yasuaki et al., editors Calderwood and Sherman et al. 2007



Hsp uvolněné do extracelulárního prostoru

Současné studie vyvrátily původní model, že Hsp jsou výhradně intracelulární proteiny a jejich přestup do intracelulárního prostoru se děje pouze na základě rozsáhlého poškození buňky. Nyní je známo, že Hsp proteiny (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110), Grp proteiny a calretikulín (hlavní chaperon v endoplazmatickém retikulu) mohou být uvolněny z různých buněčných typů, ačkoli tyto buňky jsou zcela životaschopné. Za různých podmínek mohou interagovat s okolními buňkami a v některých případech mohou přestoupit do krevního řečiště (Calderwood and Atassi. et al. 2007, Hightower at al. 1989). Bylo prokázáno, že pacienti s onemocněním ledvin, hypertenzí a aterosklerózou mají trvale zvýšené bazální hodnoty extracelulárních

stresem indukovaných Hsp70 v porovnání se zdravým člověkem. Nicméně i v nepřítomnosti klinického onemocnění se může zvýšit koncentrace extracelulárního stresem indukovaného Hsp70 v krvi, a to po expozici akutní fyzické a/nebo psychické zátěže. (Bausero et al., 2005).

Hsp membránově vázané

Mnoho receptorů na cytoplazmatické membráně má vlastnosti Hsp. Hsp receptory lze rozdělit do čtyř rodin viz Tabulka č. 3.

Tabulka č. 3

Hsp receptory (membránově vázané Hsp) a jejich non-Hsp a Hsp ligandy

Zdroj: Multhoff et al. 1996, editor: Gaestel et al. 2006

Typ Receptoru	Non-Hsp ligandy	Hsp ligandy	Funkce
<i>Toll like</i>			
TLR-2 (APC)	HMGB-1, LPS	Hsp60, Hsp70, gp96	endocytóza
TLR-4 (APC)	LPS		chaperon
CD14 (APC)	LPS		signalizace
<i>TNF rodina</i>			
CD40		mykobakteriální Hsp70	signalizace
		Hsp70	endocytóza
<i>Scavenger</i>			
CD91 (APC)	α 2-makroglobulin	Hsp70, gp96, calretikulin	endocytóza
LOX-1 (APC)	LDL	Hsp70	endocytóza
CD36 (APC)	kolagen	gp96	signalizace
SR-A (EC)	trombospodin, fucoidin, LPS	gp96, calretikulin	tvorba vazby
<i>C-type lectin</i>			
CD94/NKG2C/A (NK)	HLA-E/HLA-A, B, C, peptidy		Aktivace / inhibice
CD94/NKG2A (NK)	HLA E/ HSP60, peptidy		vychytávání, aktivace

1.8. Role proteinů tepelného šoku v tumorogenezi

Hsp se podílí na mnoha událostech spojených se vznikem nádorů, a to od samého začátku karcinogeneze (Calderwood and Atassi et al. 2007). Exprese Hsp je zvýšená u velkého množství karcinomů různé morfologie, tato vysoká koncentrace Hsp má signifikantní roli při vzniku nádorových buněk (Nylandsted et al. 2000, Veer et al. 2002, Ciocca et al. 2005, Rohde et al. 2005). Na mechanismus působení Hsp v onkogenezi mají vliv některé etiologické faktory včetně onkogenních virů, hereditárních a non-hereditárních alterací v nádorových supresech nebo onkoproteinech, hypermethylace, radiačního ozáření a karcinogenních látek. Vliv etiologických agens ukazuje Tabulka č. 4. Všechny faktory mohou být příčinou změny funkcí Hsp, jejichž důsledky se projeví v buněčné proliferaci a diferenciaci, ve vzniku zánětu, apoptóze, opravě DNA, angiogenezi, v metastatickém procesu, lékové rezistenci nádorů a v imunitní odpovědi hostitelského organismu (Calderwood and Sherman et al. 2007). Kromě role molekulárních chaperonů jsou Hsp klíčové proteiny v regulaci buněčného metabolismu. Tuto buněčnou regulaci zprostředkovávají hlavně Hsp70 a Hsp90 molekulární chaperony, z nichž každý se může stabilně vázat na několik regulačních molekul. Hsp90 má hlavní roli v mitogenezi a v progresi buněčného cyklu. Hsp70 je těsně spjat s ochranou buňky před programovanou buněčnou smrtí (Pratt et al. 2003).

1.8.1. Role Hsp90 v tumorogenezi

Hsp90 je nezbytný pro stabilizaci křehkých struktur mnoha receptorů, proteinkináz a transkripčních faktorů, které se podílejí na signalizaci, která vede k růstu normální zdravé buňky (Neckers et al. 2003). Hsp90 tvoří s těmito molekulami komplexy a funguje jako jejich regulátor (Ciocca et al. 2005). Hsp90 je nutný pro udržení signálních molekul v aktivní konformaci, která je velice rychle vyvolána růstovým faktorem (Pratt et al. 2003; Neckers et al. 2003). V důsledku toho můžeme na Hsp90 nahlížet jako na zprostředkovatele rychlé a plynulé odpovědi na extracelulární signály, které jsou vyžadovány zejména při rozvoji a obnově buněk (Neckers et al. 2003; Pratt et al., 2004). Buněčná transformace vzniká na podkladě vysoké exprese nebo mutace Hsp90 dependentních signálních molekul, které zprostředkovávají autonomní růst karcinomu a Hsp90 je nezbytný pro udržení těchto proteinů v aktivním stavu (konformaci) (Neckers et al. 2003). Hsp90 stabilizuje konformace mutovaných proteinů, které vznikají v průběhu transformace, jako jsou v -Src, BCL-Abl a p53

(Kamal et al. 2003, Nimmapalli et al. 2001). Hsp90 je zvýšeně exprimován u nádorů prsu, karcinomu plic, leukémie a Hodgkinovy choroby. U karcinomu prsu vysoká exprese Hsp90 stejně jako Hsp70 koreluje s velice špatnou prognózou onemocnění (Ghobrial et al.2005, Yano et al. 1996).

1.8.2. Role Hsp70 a Hsp27 v tumorogenezi

Narozdíl od Hsp90 proteiny Hsp70 a Hsp27 nejsou mediátory proliferace. Nicméně jsou zvýšené u různých typů lidských nádorů a zprostředkovávají tumorogenezi alternativními mechanismy, kam patří inhibice programované buněčné smrti a senescence (což jsou dva základní rysy nádorových buněk). Hsp jsou silné inhibitory stresem indukované buněčné smrti a navozují zcela rezistentní stav buňky vůči buněčné smrti (Gerner et al. 1975). Hsp proteiny mají klíčový význam pro přežití velké části lidských nádorových buněk. Inaktivace Hsp27 a zejména Hsp70 proteinů, vede ke spontánní aktivaci programované buněčné smrti, která není pozorována ve tkáních normálního původu. Existují přesvědčivé důkazy, že zvýšená exprese Hsp27 a Hsp70 vede k inhibici apoptózy dependentní na kaspázách. Důležité cíle Hsp27 a Hsp70 proteinů v inhibici této cesty jsou c-Jun kinázy, Apaf-1 and Kaspáza 8 (Beere, 2001). Chce-li buňka uniknout senescenci a mít schopnost neomezeného dělení, musí projít „krizovým okamžikem“, kdy se telomery chromozomu zkrátí natolik, aby bylo zabráněno dalšímu buněčnému dělení. Tento krizový bod se nazývá „Hayflickova mez“, buňka má pouze omezený počet dělení a při dosažení této meze přechází do senescence. Expese enzymu telomerázy, kterou vnímá p53, je dostatečná pro přechod krizovým bodem nádorových buněk a umožnění jejich dalšího neomezeného růstu (Campisi, 2005). Hsp proteiny a hlavně Hsp90 jsou zásadní pro telomerázovou stabilitu (Workman, 2004). Jeden z dalších mechanismů ochrany nádorových buněk pomocí Hsp se děje na úrovni jádra. Ve vzorcích pacientů, kteří byli léčeni chemoterapií, některé přežívající buňky vykazovaly vysokou translokaci Hsp27 a hlavně Hsp70 do jádra (Vargas-Roig et al. 1998). Imunoprecipitační a „co-lokalization studies“ prokázaly, že Hsp27 a Hsp70 se podílejí na DNA reparačních funkcích hMLH1 a hMSH2 v lymfocytech periferní krve u pacientů s nádorovým onemocněním i u zdravých kontrol (Calderwood and Atassi et al. 2007, Bases, 2005). Hsp70 a Hsp27 jsou vysoce univerzální cytoprotektivní proteiny, které pravděpodobně mají zásadní význam při vzniku nádorových buněk, jimž umožňují, aby se vyhnuly jak rychlé programované buněčné smrti, tak pomalé buněčné inaktivaci na základě senescence.

Tabulka č. 4

Schématická prezentace vztahu mezi onkogenním agens a Hsp odpovědí

Zdroj: Ciocca et al editors: Calderwood and Sherman et al. 2007

Etiologické agens	NORMÁLNÍ BUŇKA	TRANSFORMOVANÁ BUŇKA
Viry, Helicobacter pylori	Modulace Hsp odpovědi	Změny: v cytoskeletu, v buněčné adhezi, diferenciaci, iNOS expresi, usnadnění tvorby virových proteinů a virového transportu, aktivace zánětlivé signalizace a lepší buněčné přežívání
Změny v antionkoproteinech a onkoproteinech	HSF1/Hsp modulace Hsp vazba	Stabilizace mutovaných a poškozených proteinů a jejich následný "downstream" proteinů důležitých pro proliferaci, potlačení kontrolních bodů v buněčném cyklu, vznik aneuploidie, lepší buněčné přežívání, modulace imunitního systému
Hypermetylace	Umlčení Hsp47 ("silencing")	Změna regulace kolagenu, lepší formování krevních cév a metastazování
Radiační ozáření, další karcinogenní látky	DNA poškození a Hsp aktivace	Rychlejší DNA reparace, ochrana mutovaných/poškozených proteinů, lepší signalizace pro buněčnou proliferaci, zvýšené přežívání buněk, rozsáhlé metastazování, modulace imunitního systému

1.8.3. Hsp exprese v nádorových buňkách

Za normálních podmínek mají buňky konstitutivní expresi (hladiny) Hsp, zatímco během karcinogeneze začínou transformované buňky exprimovat zvýšené hladiny Hsp, v některých případech tato indukce pokračuje i v průběhu progresu tumoru (Ciocca et al. 1986). Hsp expresi u konkrétních nádorů přehledně popisuje Tabulka č. 5. Rozdílná exprese Hsp u nádorů umožňuje jejich využití v prognóze onemocnění, případně u AML umožňují Hsp včasnou diagnostiku relapsu onemocnění.

Molekulární mechanismy, které vedou ke zvýšené transkripci genů Hsp u nádorů, jsou rozdílné, jelikož existuje více onkogenních cest, které jsou v tumorigenezi uplatňovány. Hsp promotory obsahují mnoho odpovědných elementů včetně HSE, který váže aktivovaný HSF1 trimer a CCAAT element. CCAAT element váže komplex mezi trimerním faktorem NF- γ a HSP-CBF (Wu, 1995, Imbriano et al. 2001). Primární mechanismus regulace Hsp v normálních buňkách zahrnuje antionkogen p53 a s ním spojený p63. Tyto proteiny potlačují transkripci Hsp prostřednictvím vazebných míst pro transkripční faktor NF- γ , který je přítomný pod jejich promotorem (Taira et al. 1999, Chae et al. 2005, Wu et al. 2005). V průběhu transformace, kdy mutace p53 je spojena s více než 45% všech karcinomů v různých orgánových lokalizacích, dojde ke ztrátě represe Hsp promotoru a dojde ke zvýšení transkripce Hsp, což je velice časté u Hsp70. Exprese Hsp70 u karcinomů je úzce spojena se změnami v p63, dochází k tvorbě izoformy Δ Np63 α , která funguje jako dominantní negativní inhibitor p63 a umožňuje tak zvýšení hladiny Hsp70 a Hsp40 u karcinomů hlavy a krku (Wu et al., 2005). Bylo prokázáno, že tumorogenní faktor Heregulin- β 1 se váže na povrch buněk karcinomu prsu, což má za následek zvýšení exprese Hsp, díky tomu dochází ve zvýšené míře k přežívání transformovaných buněk (Khaleque et al. 2005). Heregulin- β 1 aktivuje HSF1 díky signální dráze, a to přes aktivaci HER2 a PI-3kinázu, jejichž aktivace vede k expresi Hsp genů. PI-3 kináza je klíčový enzym v maligní progresi, a to zejména díky aktivaci mutované PTEN fosfatázy a indukci c-Myc, což může být důležitým mechanismem ve zvýšení hladiny Hsp v nádorové buňce. (Khaleque et al. 2005, Bader et al. 2005). HSF-1 má také řadu dalších rolí v maligním fenotypu transformovaných buněk, včetně potlačení kontrolních bodů buněčného cyklu, které v důsledku vede k aneuploidii nádorové buňky, HSF-1 také podporuje vznik metastatického procesu nezávislého na expresi Hsp (Hoang et al. 2000, Wang et al. 2004). Na závěr můžeme říci, že zvýšená exprese Hsp nastane v důsledku represe p53,

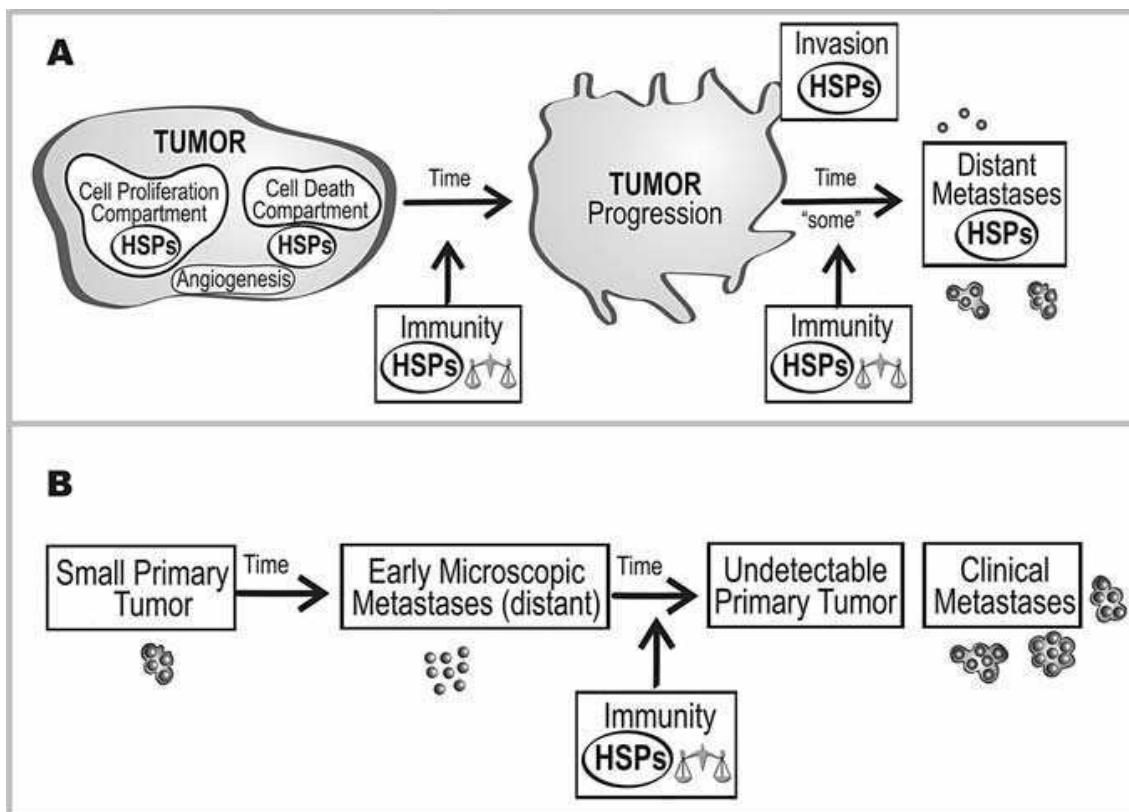
který je inaktivován u mnoha druhů karcinomů, a to přes aktivaci onkogenních cest, které vedou až k Hsp promotorům (Calderwood and Sherman et al. 2007).

Během progresu nádorů dochází u každého nádoru ke vzniku unikátního vzoru molekulárních změn. Tyto změny zahrnují i změny v expresi Hsp proteinů. Nejběžnější formu progresu solidního nádorů zobrazuje Obrázek č.4. Primární nádor postupuje v důsledku nerovnováhy mezi buněčnou proliferací, která vede k angiogenezi, a buněčnou smrtí. Hsp proteiny se podílejí na těchto procesech. Časem díky nedostatku adekvátních imunitních mechanismů proti nádorové buňce dochází k invadování nádoru krevními nebo lymfatickými cestami do vzdálených částí těla, kde vznikají metastázy (i na tomto procesu se podílí Hsp proteiny). U nízkého procenta pacientů dochází ke zmizení primárního tumoru, nebo tumor zůstává, ale je nezjistitelný. Nicméně tumorogeneze přetrvává a dá se detekovat na klinické úrovni ve formě metastáz (Calderwood and Atassi et al. 2007).

Obrázek č. 4

Schéma nejběžnější formy nádorové progresu solidního nádoru

Zdroj: Calderwood and Atassi et al. 2007



Tabulka č. 5

Hsp nalezené ve zvýšené expresi u konkrétních nádorů

Zdroj: Calderwood and Atassi et al. 2007

Tumor	Proteiny tepelného šoku (Hsp)	Reference
Karcinom prsu	Hsp27, Hsp70, Hsp90, Grp78	Ciocca et al.1993 Fernandez et al.2000
Karcinom endometria	Hsp27, Hsp70, Hsp90	Ciocca et al.1989 Nambu et al.1996
Karcinom ovarií	Hsp27, Hsp72, Hsp90	Mileo et al.1990 Langdon et al.1995;
Karcinom děložního čípku	Hsp10, Hsp27, Hsp60, Hsp70	Kaur et al.1995 Cappello et al.2003
Orální karcinom	Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90	Ito et al.1998 Kumamoto et al.2002
Tumor gastrointestinálního traktu	Hsp10, Hsp27, Hsp47	Chuma et al.2004 Cappello et al.2003 Hwang et al.2003
Karcinom jater	Hsp60, Hsp70,	Heike et al.2000 Maitra et al.2002
Karcinom pankreatu	Hsp90, Hsp110, gp96	Ogata et al.2000 Liu et al.1999
Karcinom plic	Ubiquitin, Hsp27, Hsp63, Hsp70,Hsp90, gp94	Malusecka et al.2001 Wang et al.2002
Tumor močových cest	Hsp27, Hsp60, Hsp70,Hsp90	Takashi et al.1998 Cardillo et al.2000
Karcinom prostaty	HSF1, Hsp10, Hsp27,Hsp60, Hsp70	Cappello et al. 2002, 2003
Leukémie	Hsp27, Hsp60, Hsp70,	Chant et al.1995 Xiao et al.1996
Lymfom	Hsp90	Hsu, 1998
Nádor mozku	Hsp27, Hsp70, Hsp90	Assimakopoulou et al.1997, 2000
Karcinom kůže	Hsp27, Hsp70, Hsp90	Kanitakis et al.1989; Bayerl et al.1999
Melanom	gp96	Lazaris et al.1995 Missotten et al.2003
Sarkom	Hsp27, Hsp47, Hsp60,Hsp72, Hsp90	Uozaki et al.2000 Triebet al.2000

1.8.4. Využití Hsp v diagnostice a prognóze nádorových onemocnění

Hsp exprese byla analyzována ve vztahu k histopatologickému charakteru nádorové tkáně se současnou expresí dalších molekul a s konkrétními parametry pacientů, jako byl věk a pohlaví. Z této analýzy byly učiněny závěry, že Hsp proteiny jsou zvýšeně exprimovány v široké škále maligních buněk a tkání, proto detekce Hsp proteinů není vhodná v diagnostice. Existují jiné specifitější molekulární markery k identifikaci původu nádorových tkání: zda se jedná o karcinom, sarkom nebo lymfom. Nicméně tato diagnostika by mohla být využita např. k detekci Hsp27 a Hsp90 pro identifikaci buněk Reed-Sternbergové. Úroveň exprese Hsp může odhalit přítomnost abnormálních změn v průběhu procesu karcinogeneze. V tomto případě lze Hsp proteiny použít jako substituční biomarkery u některých karcinomů. Dále Hsp exprese koreluje se stupněm diferenciaci v některých nádorových tkáních. Hsp exprese je např. spojena s lepším rozlišením endometriálního karcinomu, kde jsou přítomné Hsp27 a Hsp70, a dlaždicového karcinomu, kde je pouze Hsp27. Obecně platí, že některé Hsp proteiny jsou koexprimovány u některých typů nádorů, zároveň některé Hsp mohou být signifikantně spojeny s expresí jiných molekul (Ciocca et al.2005).

Hsp27 exprese koreluje se špatnou prognózou u karcinomu prsu, endometria, vaječnicků, žaludku, jater, prostaty a osteosarkomu. Hsp27 byla asociována s dobrou prognózou u endometriálního adenokarcinomu, esofageálního karcinomu. Hsp27 nemá žádnou prognostickou hodnotu u nádorů v oblasti hlavy a krku, spinocelulárního karcinomu močového měchýře, nádorů ledvin a leukémie.

Hsp70 koreluje se špatnou prognózou u karcinomu prsu, endometria, karcinomu děložního hrdla a karcinomu přechodného epitelu močového měchýře. Vysoká exprese Hsp70 koreluje s dobrou prognózou u esofageálního karcinomu, karcinomu pankreatu, karcinomu ledvin a melanomu. Hsp exprese nekoreluje s prognózou u karcinomu vaječnicků, karcinomu dutiny ústní, karcinomu prostaty. Vysoká exprese Hsp70 byla prokázána v blastech u akutní myeloidní leukémie. Vysoká exprese Hsp70 byla prokázána u pacientů se středním až nepříznivým karyotypem, toto zjištění odpovídalo špatné prognóze onemocnění (Thomas et al.2005).

Hsp90 exprese v nádorových tkáních a přítomnost protilátek proti Hsp90 koreluje s velice špatnou prognózou karcinomu prsu. Naopak vysoká exprese Hsp90 je spojena s dobrou prognózou u karcinomu endometria. Exprese Hsp90 nemá žádný vliv na prognózu karcinomu ovarií a orálního karcinomu (Ciocca et al.2005).

1.9. Závěr

Ačkoliv jsou funkce a vlastnosti Hsp proteinů poměrně intenzivně studovány, stále ještě zůstává velké množství nezodpovězených otázek ohledně jejich vlivu na tumorogenezi. Jak bylo zjištěno, Hsp proteiny jsou zvýšeně exprimovány v nádorových buňkách. I u normálních buněk ale může dojít k vysoké expresi Hsp, a to za podmínek, které jsou pro buňku stresové. Nicméně tato exprese po odeznění stresových podmínek vymizí. Narozdíl od buněk nádorově transformovaných, kde je vysoká exprese Hsp konstitutivní. Vysoká exprese konkrétních Hsp má za následek blokování apoptózy, nebo senescence v nádorových buňkách. Díky blokování programované buněčné smrti a senescence je nádorově transformovaná buňka téměř nesmrtelná. Vysoká exprese některých Hsp (viz výše) snižuje rychlost buněčného cyklu a tím navozuje u nádorových buněk rezistenci vůči chemoterapeutikům. Vysoká exprese konkrétních Hsp proteinů zvyšuje metastatický potenciál buňky. Bylo zjištěno, že Hsp jsou exprimovány v široké škále maligních buněk a tkání, proto detekce Hsp není vhodná pro stanovení diagnózy. Hsp proteiny lze ale využít jako substituční biomarkery u některých karcinomů, pro které je jejich zvýšená exprese charakteristická. Je možné je využít jako prognostické ukazatele u konkrétního onemocnění.

2. Cíl práce

Cíl práce:

2.1. Studium povrchové a genové exprese konkrétních Hsp u konkrétních nádorových linií odvozených od různých typů akutní myeloidní leukémie

2.1.1. Kultivace nádorových/leukemických linií

Povrchová i genová exprese Hsp byla měřena na leukemických liniích HU-3, THP-1, Uoc-M1, HL-60, TF-1, OCI/AML3. Tyto buňky byly kultivovány v CO₂ inkubátoru při 37°C a 5% atmosféře CO₂. Výměna kultivačního média probíhala čtyřikrát týdně, prováděla se v laminárním boxu za přísně aseptických podmínek. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích nebo v kultivačních destičkách. Konkrétní nároky na kultivační médium a jiná specifika jsou popsány u konkrétních linií. Popis linií je přehledně zpracován v Tabulce č. 6.

HU-3

HU-3/ TPO - dependentní je megakaryocytární linie odvozená od AML M7. Buňky mají erytroidní a megakaryocytární diferenciační potenciál a jsou velice obtížně kultivovatelné. Linie byla odvozena od buněk kostní dřeně 69leté ženy s diagnózou AML M7, a to při diagnostikování onemocnění v roce 1991.

Kompletní kultivační médium pro tuto linii obsahuje: 90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutaminu, 1% Streptomycin/Penicilin, 5ng/ml GM-CSF. Optimální je kultivovat $0,8 \times 10^6$ buněk na 1 ml média (Drexler, G. H., 2005).

THP-1

THP-1 je monocytární linie odvozená od AML M5. Byla odvozena z periferní krve ročního chlapce při relapsu onemocnění roku 1978.

Buňky THP-1 linie jsou kulaté, většinou samostatně v suspenzi, v některých případech se mohou shlukovat. Kompletní médium pro tuto linii obsahuje: 90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutaminu, 1% Streptomycin/Penicilin. Optimální je kultivovat 1×10^6 buněk na 1 ml média (Drexler, G. H., 2005).

Uoc-M1

Uoc-M1 je linie odvozená od AML M1 z kostní dřeně 68letého muže při diagnóze onemocnění v roce 1992. Tato linie slabě exprimuje megakaryocytární markery.

Kompletní médium pro tuto linii obsahuje: 90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutaminu, 1% Streptomycin/Penicilin. Optimální je kultivovat $0,5 \times 10^6$ buněk na 1 ml média (Drexler, G. H., 2005).

HL-60

HL-60 je linie odvozená od AML M2, původně diagnostikovaná jako AML M3. Byla odvozena z periferní krve u 35leté ženy s diagnózou AML M3, která byla později specifikována jako AML M2 roku 1976.

Buňky této linie jsou kulaté a v suspenzi netvoří shluky. Kompletní médium pro tuto linii obsahuje: 90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutaminu, 1% Streptomycin/Penicilin. Optimální je kultivovat 0,5 až 1×10^6 buněk na 1 ml média (Drexler, G. H., 2005).

TF-1

TF-1 je linie odvozená od AML M6 z kostní dřeně 35letého muže při diagnóze onemocnění v roce 1987.

Buňky této linie TF-1 jsou velké a kulaté a jejich cytoplazma obsahuje velké množství částic. Je to obtížně kultivovatelná linie. Kompletní kultivační médium pro tuto linii obsahuje: 90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutaminu, 1% Streptomycin/Penicilin, 5 ng/ml GM - CSF. Optimální je kultivovat 0,5 až 1×10^6 buněk na 1 ml média. Buňky lépe rostou v kondiciovaném médiu. Kondiciované médium je složeno: z jednoho dílu čerstvého média a jednoho dílu média, ve kterém byly buňky již kultivovány. Toto médium se používá, protože buňky této kultury si mohou produkovat autokrinně působící látky, které stimulují jejich růst a přežívání (Drexler, G. H., 2005).

OCI/AML3

OCI/AML3 je linie odvozená od AML M4 z periferní krve 57leté ženy při diagnóze onemocnění v roce 1987.

Jedná se o jednotlivé většinou kulaté buňky rostoucí v suspenzi. Kompletní kultivační médium pro tuto linii obsahuje: 80% α -MEM, 20% FCS, 1% Glutaminu, 1% Streptomycin/Penicilin. Optimální je kultivovat 0,5 až 2×10^6 buněk na 1 ml média. Buňky lépe rostou v kondiciovaném médiu (Drexler, G. H., 2005).

Tabulka č. 6

Přehled kultivovaných nádorových linií a jejich charakteristika

Zdroj: Drexler, G. H., 2005

Název linie	Typ AML	Izolace	Kompletní kultivační médium	K.destička/ K. láhve
HU-3	AML M7	Odvozena z kostní dřeně 69leté ženy při diagnóze roce 1991	90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Streptomycin/Penicilin 5ng/ml CSF-GM	Kultivační lahev
THP-1	AML M5	Odvozena z periferní krve ročního chlapce při relapsu v roce 1978	90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Streptomycin/Penicilin	Kultivační láhev
Uoc-M1	AML M1	Odvozena z kostní dřeně 68letého muže při diagnóze v roce 1991	90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Streptomycin/Penicilin	Kultivační láhev
HL-60	AML M2	Odvozena z periferní krve 35leté ženy při diagnóze onemocnění v roce 1976	90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Streptomycin/Penicilin	Kultivační láhev
TF-1	AML M6	Odvozena z kostní dřeně 35letého muže při diagnóze onemocnění v roce 1987	90% RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Streptomycin/Penicilin 5ng/ml CSF-GM	Kultivační destička
OCI/AML3	AML M4	Odvozena z periferní krve 57leté ženy při diagnóze onemocnění v roce 1987	80% α -MEM, 20% FCS, 1% Glutamin, 1% Streptomycin/Penicilin	Kultivační destička

Protokol č.1 Výměna kultivačního média

1. Obsah kultivační láhve přepipetovat do 15 ml zkumavky.
2. 15 ml zkumavku centrifugovat 300×g, 5 minut při teplotě 23° - 25° C.
3. Slít supernatant, odměřit zbytek ve zkumavce pipetou a doplnit do objemu 1000µl kompletním médiem podle typu linie a promíchat.
4. Trypanová modř – standardní objem trypanové modře 160µl napipetujeme do 1,5ml ependorfky, přidáme 10µl supernatantu s buněčnou kulturou, po promíchání přeneseme 10µl do Bürkerovy komůrky. Pokud předpokládáme velký počet buněk, dáme větší množství trypanové modře.
5. Buňky se počítají pod optickým mikroskopem, a to nejméně ve 3 velkých čtvercích.
6. Buňky, které budou dále kultivovány, přeneseme do kultivační láhve, nebo kultivační destičky s kultivačním médiem, jehož množství odpovídá počtu buněk. Použijeme kultivační médium, které je doporučeno pro kultivovanou linii.

Při výměně média byly dvakrát týdně odebrány buňky na izolaci RNA v den, kdy probíhala i FACS analýza. Na izolaci RNA se odebíralo standardně 1×10^6 buněk.

7. Konkrétní množství buněk přepipetovat do dvou 1,5ml ependorfeček.
8. Centrifugovat při pokojové teplotě 2000rpm 2 minuty.
9. Odsát supernatant a přidat 350µl RLT pufru a důkladně promíchat. (RLT pufr = 10µl β-merkaptoethanol + 990µl RLT). RLT je součástí kitu pro izolaci RNA, obsahuje guanidin thiokyanát.
10. Vzorky zamrazit na - 80° C až do provedení izolace RNA.

2.1.2. Měření povrchové exprese pomocí průtokové cytometrie

Na měření průtokovým cytometrem bylo odebíráno na jednu zkumavku $0,5 \times 10^6$ buněk z buněčné kultury. Laboratoř molekulární biologie a patologie buňky nemá k dispozici průtokový cytometr, měření proto probíhalo v laboratoři Klinické hematologie ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Příprava buněk na měření průtokovým cytometrem byla prováděna v laminárním boxu. Barvení bylo provedeno pomocí monoklonálních protilátek značených fluorescein isothiokyanátem (FITC) a phycoerythrinem (PE). Pro detekci mrtvých buněk byl použit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD). Přehled protilátek je zpracován v Tabulce č.8.

Protokol č. 2 Povrchové barvení buněk – protokol Rrgensburg

1. K suspenzi buněk přidat PBS Dubelco/10% FCS médium podle počtu zkumavek.
2. Suspenzi rozdělit do 1,5 ml ependorfek po 1 ml.
3. Centrifugovat 300 × g, 5 minut při teplotě 4° C.
4. Odsát supernatant opatrně až po peletu.
5. Napipetovat po 1ml PBS Dubelco/10% FCS média do každé ependorfky.
6. Centrifugovat 300 × g, 5 minut při teplotě 4° C.
7. Odsát supernatant opatrně až po buněčnou peletu.
8. Napipetovat protilátky přímo na buněčnou peletu podle konkrétního rozpisu, lehce vortex (Použité panely protilátek viz Tabulka č. 7).
9. Inkubovat na ledu 30 minut
10. Po inkubaci napipetovat do každé zkumavky 1ml PBS Dubelco/10% FCS média.
11. Centrifugovat 300 × g, 5 minut při teplotě 4° C.
12. Odsát supernatant opatrně až po buněčnou peletu.
13. Napipetovat do každé ependorfky 500μl 1ml PBS Dubelco/10% FCS médium.
14. 15 až 20 minut před vlastním měřením přidat do všech zkumavek 10μl 7-AAD, který je naředěný v poměru 1:9. Používá se pro detekci mrtvých buněk.

Tabulka č.7

Použité panely protilátek pro povrchové barvení buněk nádorových linií

Použité panely protilátek	Linie u kterých bylo použito toto barvení
IgG1-FITC/ anti-CD45-PE/ 7-AAD	HU-3, THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-CD13-PE/ 7-AAD	HU-3, THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-CD33-PE/ 7-AAD	HU-3, THP-1, Uoc-M1, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-CD45-PE/ 7-AAD	HU-3, THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-CD4-PE/ 7-AAD	OCI/AML
anti-Hsp70-FITC/ anti-HLA-E-PE/ 7-AAD	THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-MICA-PE/ 7-AAD	THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-MICA-B-PE/ 7-AAD	THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60
anti-Hsp70-FITC/ anti-ULBP-2-PE/ 7-AAD	THP-1, Uoc-M1, OCI/AML, TF-1, HL-60

Tabulka č.8

Přehled protilátek

Zdroj: Informační příloha dodávaná spolu s protilátkou

Protilátka	Původ	Typ protilátky	Výrobce	Množství ab na 1 zkumavku
IgG1-FITC	Myš	monoklonální protilátka	BD Pharmigen™	5µl
anti-human Hsp70-FITC	Myš	monoklonální protilátka	Multimmune GmbH	2-5µl
anti-human CD4-PE	Myš	monoklonální protilátka	BD Pharmigen™	5µl
anti-human CD13-PE	Myš	monoklonální protilátka	BD Pharmigen™	5µl
anti-human CD33-PE	Myš	monoklonální protilátka	BD Pharmigen™	5µl
anti-human CD45-PE	Myš	monoklonální protilátka	BD Pharmigen™	5µl
anti-human MICA-PE	Myš	monoklonální protilátka	R&D systems	10µl
anti-human MICA/B-PE	Myš	monoklonální protilátka	R&D systems	10µl
anti-human ULBP-2-PE	Myš	monoklonální protilátka	R&D systems	10µl
anti-human HLA-E-PE	Myš	monoklonální protilátka	eBioscience	5µl

7-AAD je fluorescenční interkalační barvivo s vysokou afinitou k DNA. Výhodou je možnost jeho použití při současném využití monoklonálních protilátek značených FITC a PE, a to protože dochází k minimálnímu emisnímu překryvu mezi 7-AAD a PE, FITC. 7-AAD je detekována v infračervené oblasti spektra (647-650nm), zatímco FITC emituje záření v rozmezí 495-521nm a PE v rozmezí 545-572nm.

2.1.3. Izolace RNA

Izolace RNA se prováděla pomocí komerčně dodávaných kitů: QIAamp RNA Blood Mini Kits (výrobce: QIAGEN). Při výměně kultivačního média nádorovým liniím se prováděl odběr buněk pro izolaci RNA. Izolace se provádí pouze z $0,5 \times 10^6$ buněk, 2/2 buněk se ponechává jako rezervní vzorek pro případnou kontrolu.

Protokol č.3 Izolace RNA

1. Rozmrazit vzorky při teplotě 37° C 10 minut v termobloku.
2. Přepipetovat vzorek do fialové kolonky. Centrifugovat při pokojové teplotě 14 500 rpm 3minuty.
3. Vyhodit fialovou kolonku a k lyzátu přidat 350, nebo 600μl 70% ethanolu (ethanol se ředí RNA vodou, která je rovněž součástí kitu). 350μl na $0,5 \times 10^6$ buněk, při větším množství buněk přidáme 600μl ethanolu.
4. Přepipetovat do bílé kolonky. Centrifugovat při pokojové teplotě 14 500 rpm 30s. Vyhodit sběrnou zkumavku, dát novou sběrnou zkumavku.
5. Napipetovat na kolonku 700μl RW-1 pufru. Centrifugovat při pokojové teplotě 14 500 rpm 30 s. Vyhodit sběrnou zkumavku, dát novou sběrnou zkumavku.
6. Na kolonku napipetovat 500μl RPE pufru. Centrifugovat při pokojové teplotě 14 500 rpm 30 s. Vyhodit sběrnou zkumavku, dát novou sběrnou zkumavku.
7. Na kolonku napipetovat 500μl RPE pufru. Centrifugovat při pokojové teplotě 20 000 ×g 4 minuty. Vyhodit sběrnou zkumavku, dát novou sběrnou zkumavku.
8. Centrifugovat při pokojové teplotě 20 000 ×g 2 minuty. Vyhodit sběrnou zkumavku, dát kolonku do RNA 1,5 ependorfky a napipetovat 50μl RNase free water přímo na kolonku.
9. Centrifugovat při pokojové teplotě 14 500 rpm 90 s. Vyhodit bílou kolonku.
10. Ošetření DNasou: 5μl DNasy a 5μl MgCl₂ na 50μl vzorku. Krátce vortexovat, nebo lehce centrifugovat.
11. Inkubace při 37°C 30 minut v termobloku.
12. Přidat 5μl EDTA. Krátce vortex, nebo lehce centrifugovat.
13. Inkubace při 65°C 10 minut v termobloku.
14. Po inkubaci: krátce vortex, nebo lehce centrifugovat. Odpipetovat 3μl vzorku a změřit vzorek na spektrofotometru (měření na NanoDropu-1000). Změříme koncentraci vyizolované RNA a čistotu vzorku.
15. Vyizolovanou RNA uchovávat při teplotě – 20°C.

2.1.4. RT-PCR v reálném čase („Real - Time quantitative RT-PCR“)

Analýza relativní genové exprese byla provedena metodou RT-PCR v reálném čase (konkrétně metodou „Real-Time quantitative Reverse – Transcriptase Polymerase Chain Reaction). Materiálem pro RT-PCR byla vyizolovaná RNA z nádorových linií. Sondy a primery byly vyrobeny na zakázku od firem Applied Biosystems (systém aktinu) a TIB MOLBIOL (Hsp70, HspBP1, Hsp60, Hsp90, Hsp27). Sekvence primerů a sond jsou v Tabulce č. 9A a 9B. Byl použit Master Mix: TaqMan[®] One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit od firmy Applied Biosystems. Analýzy probíhaly na analyzátoru: PRISM ABI 7500 Sequence Detection Systém od firmy Applied Biosystems. Vlastní analýza trvá 2 hodiny 30 minut.

Protokol č.4 RT-PCR v reálném čase

1. Rozmrazit vzorky RNA, primery a sondy při pokojové teplotě.
2. Po rozmražení primery, sondy, vzorky, Master Mix (uchovávan při 8°C v lednici) zvortexovat a následně lehce centrifugovat.
3. Vzorky naředit na správnou koncentraci, naředění DEPC – treated water.
 - Pro měření Hsp70 byly vzorky naředěny na koncentraci 2ng/μl
 - Pro měření HspBP1 byly vzorky naředěny na koncentraci 0,2ng/μl
 - Pro měření Hsp27 byly vzorky naředěny na koncentraci 0,2ng/μl
 - Pro měření Hsp60 byly vzorky naředěny na koncentraci 0,2ng/μl
 - Pro měření Hsp90 byly vzorky naředěny na koncentraci 0,2ng/μl
4. Pro jednotlivé Hsp systémy byly určeny kontroly, jejich koncentrace odpovídala koncentraci vzorku.
5. Připravit Master Mix podle konkrétního rozpisu (rozpis je spočítán podle určených koncentrací primerů a sond od výrobce). Hotový Master Mix dostatečně promíchat, vortexovat a lehce centrifugovat.
6. Napipetovat Master Mix do jamek jednotlivých stripů standardně 20μl + 5μl vzorku, nebo kontroly, nebo DEPC – treated water (napipetování včetně NAC kontroly Master Mix bez reverzní transkriptázy).
7. Napipetováním DEPC – treated water se kontroluje sterilita práce a preciznost provedení (tzv. NAC).
8. Na závěr stripy zavřít víčkem a centrifugovat.
9. Umístit do PCR přístroje.

Tabulka č.9A

Sekvence primerů

Gen	Informace o genu - NCBI, Entrez Gene	Sekvence primerů	Koncentrace v reakci
β-Aktin	ACTB, ID genu 60	5' - CCTGGCACCCAGCACAAT - 3'	300 nM primery
		5' - GCCGATCCACACGGAGTACT - 3'	
Hsp27	HSPB1, ID genu 3315	5' - TCCCTGGATGTCAACCACTTC - 3'	900 nM primery
		5' - TCTCCACCACGCCATCCT - 3'	
Hsp60	HSPD1, ID genu 3329	5' - GATGTTGATGGAGAAGCTCTAAGTACA - 3'	500 nM primery
		5' - TGCCACAACCTGAAGACCAA - 3'	
Hsp70	HSPA1A, ID genu 3303	5' - ACCAAGCAGACGCAGATCTTC - 3'	200 nM primery
		5' - GCCCTCGTACACCTGGATCA - 3'	
Hsp90α	HSP90AA1, ID genu 3320	5' - TCGGGTCACTTAGCCAAGATG - 3'	300 nM primery
		5' - GAAAGGCGAACGTCTCAACCT - 3'	
HspBP1	HSPBP1, ID genu 23640	5' - TGGCCGACCTGTGTGAGA - 3'	900 nM primery
		5' - GCAGGTGCATGCCAGACA - 3'	

Tabulka č.9B

Sekvence sond

Gen	Sekvence sond	Koncentrace v reakci
β-Aktin	5' - (VIC) ATCAAGATCAATGCTCCTCCTGAGCGC (TAMRA) - 3' Délka amplikonu 70bp	200 nM VIC - značená sonda
Hsp27	5' - (FAM) CCCC GGACGAGCTGACGGTC (TAMRA) - 3' Délka amplikonu 67bp	300 nM FAM - značená sonda
Hsp60	5' - (FAM) TCGTCTTGAATAGGCTAAAG (MGB) - 3' Délka amplikonu 69bp	300 nM FAM - značená sonda
Hsp70	5' - (FAM) CCTACTCCGACAACCAACCCGGG (TAMRA) - 3' Délka amplikonu 87bp	100 nM FAM - značená sonda
Hsp90α	5' - (FAM) CCCAGACCCAAGACCAACCGATGG (TAMRA) - 3' Délka amplikonu 85bp	200 nM FAM - značená sonda
HspBP1	5' - (FAM) CATGGACAATGCCG (MGB) - 3' Délka amplikonu 66bp	200 nM FAM - značená sonda

3. Metodika

3.1. Charakteristika zkoumaného souboru

Pro izolaci RNA byly použity všechny vzorky buněk, které byly odebrány z kultivovaných linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60, TF-1 při přípravě na měření povrchové exprese Hsp70 průtokovým cytometrem. Z vyizolované RNA byly vybrány vzorky pro studium genové exprese metodou RT-PCR v reálné čase (vybrané vzorky viz kapitola 4.1.). U těchto vzorků pak byla měřena genová exprese Hsp70, HspBP1, Hsp60, Hsp27, Hsp90 a byl vypočítán poměr HspBP1/Hsp70. Na průtokovém cytometru byla měřena povrchová exprese Hsp70 u nádorových linií.

3.2. Metodika zpracování výsledků

Pro interpretaci dat získaných metodou RT-PCR v reálném čase byla použita komparativní Ct metoda (Livak and Schmittgen, 2001). Podle této metody je nejdříve vypočítáno ΔCt . Hodnota ΔCt byla vypočítána rozdílem průměrné hodnoty Hsp a průměrné hodnoty aktinu (hodnoty získané RT-PCR analýzou). Tato hodnota eliminuje rušivou variabilitu uvnitř dané reakce, jako je pipetování a různé podmínky analýzy. Dále byla vypočítána hodnota $\Delta\Delta Ct$. Tato hodnota vztahuje všechny vzorky vůči jednomu standardnímu vzorku. Z této hodnoty je pak vypočítána hodnota $2^{\Delta\Delta Ct}$, která převádí $\Delta\Delta Ct$ do absolutní hodnoty. Jako kontrolní (srovnávací) soubor pro analýzu bylo vybráno 21 vzorků vyizolované RNA z periferní krve náhodně vybraných jedinců (21 zdravých kontrol – 18 žen, 3 muži, rozsah věku – 22 až 53 let, medián věku 29 let). Byly provedeny i NAC a NTC kontroly. NTC kontrola – do kompletního Master Mixu s reverzní transkriptázou byla napipetována místo vzorku voda (DEPC – treated water). NAC kontrola – do kompletního Master Mixu bez reverzní transkriptázy byly napipetovány vzorky použité v analýze, a to z důvodu zjištění negativní přítomnosti DNA.

Veškeré údaje z analýz byly vyhodnocovány programem Excel (Microsoft Windows Office Excel 2003) a KyPlot statistickým softwarem verze 2.0 β 15. Absolutní hodnoty Hsp exprese kultivovaných linií, získané komparativní Ct metodou, byly porovnány s absolutními hodnotami Hsp exprese kontrolního souboru Mann – Whitney srovnávacím testem. Hladina významnosti byla stanovena na hodnotu pravděpodobnosti („probability“) $P < 0,001$.

„Cut off“ hodnota pro Hsp70 povrchovou expresi byla 10% pozitivních buněk se znakem Hsp70. Průtokovou cytometrií jsme zjistili procentuální zastoupení Hsp70 na povrchu všech kultivovaných linií. Toto měření probíhalo v průběhu celé kultivace každé linie, a to z důvodu zaznamenání případné změny v expresi Hsp70.

4. Výsledky

4.1. Výsledky izolace RNA

Byla vyizolována RNA ze všech kultivovaných nádorových linií: THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a TF-1. U linie THP-1 bylo vyizolováno 22 vzorků RNA ze dnů kultivace D+12 až D+92 (D+12 – jedná se o označení dnů kultivace po rozmražení nádorové linie). U linie Uoc-M1 bylo vyizolováno 22 vzorků RNA ze dnů kultivace D+5 až D+92. U linie OCI/AML3 bylo vyizolováno 15 vzorků RNA ze dnů kultivace D+8 až D+57. U linie HL-60 bylo vyizolováno 16 vzorků RNA ze dnů kultivace D+4 až D+57. U linie TF-1 bylo vyizolováno 15 vzorků RNA ze dnů kultivace D+3 až D+55. Koncentrace a čistota vzorků byly stanoveny spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 1000, čistota byla stanovena poměry absorbancí při vlnových délkách 260/280 a 260/230. Poměr 260/280 pro čistý vzorek by se měl pohybovat v rozmezí 1,8-2,0 a poměr pro 260/230, tzv. poměr pro měření sekundární čistoty RNA by se měl pohybovat v rozmezí 1,8-2,2 pro absolutně čistý vzorek. Koncentrace a čistota vyizolované RNA nádorových linií jsou v Tabulkách č 10A a 10B.

Z vyizolovaných vzorků RNA byly vybrány vzorky pro RT-PCR analýzu. U linie THP-1 byly vybrány vzorky: D+12, 15, 20, 26, 29, 33, 39, 43, 47, 50, 54, 57, 61, 64, 68, 71, 75. U linie Uoc-M1 byly vybrány vzorky: D+5, 8, 12, 15, 19, 22, 29, 39, 61, 75, 85, 92. U linie OCI/AML3 byly vybrány vzorky: D+8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 36, 46, 57. U linie HL-60 byly vybrány vzorky : D+4, 8, 11, 15, 25, 32, 43, 53, 57. U linie TF-1 byly vybrány vzorky: D+3, 7, 10, 14, 17, 20, 23, 34, 44, 55. Přehled vzorků vybraných pro analýzu RT-PCR je v Tabulce č.10C.

Kultivaci nádorových linií jsme prováděla pod vedením MUDr. R. Volchenkova stejně jako přípravu buněk na měření průtokovým cytometrem. Izolaci RNA jsem provedla ve spolupráci s Mudr. Volchenkovem a Ing. Lucií Sedláčkovou. RT-PCR analýza byla má samostatná práce.

Tabulka č. 10A

Koncentrace vyizolované RNA (z jednotlivých dnů kultivace linií) a její čistota

Zdroj: Vlastní výzkum

Buněčná linie THP-1 (AML M5)

Buněčná linie Uoc-M1 (AML M1)

datum izolace	D+	c = ng/μl	260/280	260/230	datum izolace	D+	c = ng/μl	260/280	260/230
	12	58,1				5	70,7		
	15	72,2				8	57,4		
	20	48				12	66,2		
5.2.2009	29	83,4	2	1,9		15	57,3		
12.2.2009	26	56,1	2	1,66		19	54,3		
12.2.2009	33	33,9	2,1	0,2		22	60,2		
12.2.2009	39	160,7	2	2	5.2.2009	29	52,6	2	1,3
12.2.2009	43	66,4	2,07	0,86	18.2.2009	26	56,2	2,7	1,2
12.2.2009	47	50,1	2,12	0,78	18.2.2009	33	33,1	1,92	0,8
12.2.2009	50	26,2	2,1	0,1	18.2.2009	39	67,3	2	1,62
12.2.2009	54	58,8	2	0,2	19.2.2009	43	15,7	1,96	0,6
12.2.2009	57	79,5	2	1,65	19.2.2009	47	9,2	1,96	1
12.2.2009	61	94,4	2	0,7	19.2.2009	61	66,1	2,05	0,5
12.2.2009	64	96,3	2,1	1,66	19.2.2009	64	51,5	1,94	1
18.2.2009	68	69,4	2	1,36	19.2.2009	68	28,1	2,02	0,2
18.2.2009	71	101,4	2,05	1,3	19.2.2009	71	20,6	1,94	0,35
18.2.2009	75	19,2	2,08	0,4	19.2.2009	75	25,4	2	0,3
18.2.2009	78	84,4	2,09	1,3	19.2.2009	78	38,3	2	0,5
18.2.2009	82	97,8	2,03	1,9	19.2.2009	82	30,8	2	0,62
18.2.2009	85	91,3	2,04	0,98	19.2.2009	85	44,2	2	0,9
18.2.2009	89	70,2	2,07	0,6	23.2.2009	89	91,8	2,1	0,4
23.2.2009	92	66,3	2,01	0,5	23.2.2009	92	101,7	2	0,5

Buněčná linie OCI/AML (AML M4)

Buněčná linie HL-60 (AML-M2)

datum izolace	D+	c = ng/μl	260/280	260/230	datum izolace	D+	c = ng/μl	260/280	260/230
23.2.2009	8	60,9	2,1	0,4	23.2.2009	4	193,6	2,1	1,3
23.2.2009	11	119,6	2,1	0,9	23.2.2009	8	289,7	2,1	0,6
16.3.2009	15	70,8	2	0,7	23.2.2009	11	99,7	2	0,8
16.3.2009	18	142,8	2	0,6	16.3.2009	15	135,7	2	0,5
16.3.2009	22	57,1	1,9	0,8	16.3.2009	18	143,3	2	1,6
16.3.2009	25	42	1,9	0,6	16.3.2009	22	159,9	2	1,1
16.3.2009	29	72,7	1,97	1,1	16.3.2009	25	151,4	2	1,4
16.3.2009	32	66,2	2	1,3	25.3.2009	29	120,4	2	1
25.3.2009	36	93,9	2,1	0,4	1.4.2009	32	213	2	1,7
1.4.2009	39	30,7	1,9	0,9	1.4.2009	36	146,8	2	1,6
1.4.2009	43	104,6	2	1,4	1.4.2009	39	117,3	2	1,8
8.4.2009	46	97,9	2	1,7	1.4.2009	43	134,4	2	1,68
8.4.2009	50	80,2	2,1	0,3	1.4.2009	46	96,8	2	1,1
15.4.2009	53	90,4	2	0,6	1.4.2009	50	113,9	2	1,5
15.4.2009	57	191,1	2,1	1,2	8.4.2009	53	62,4	2	1,5
					15.4.2009	57	130,3	2	0,98

Tabulka č.10B

Koncentrace vyizolované RNA (z jednotlivých dnů kultivace linie) a její čistota

Zdroj: Vlastní výzkum

Buněčná linie TF-1 (AML-M6)				
datum izolace	Den po rozmražení	ng/μl	260/280	260/230
18.3.2009	3	111,4	1,99	1,26
18.3.2009	7	100,9	2	1,21
18.3.2009	10	110,3	2,04	0,92
18.3.2009	14	87,6	2,06	1,83
25.3.2009	17	197,6	2	1,1
25.3.2009	20	86,4	2,1	1,55
1.4.2009	23	103,9	2	0,9
1.4.2009	27	65,5	2	1,7
1.4.2009	30	52,6	2	1,5
1.4.2009	34	230,7	2	1,6
1.4.2009	37	263,5	2	2
1.4.2009	44	154,5	2	1,9
1.4.2009	48	33,2	1,9	0,7
8.4.2009	51	46	1,97	0,8
15.4.2009	55	159,9	2,2	0,25

Tabulka č. 10C

Dny kultivace (označené jako den po rozmražení linie) vybrané pro RT-PCR analýzu

Zdroj: Vlastní výzkum

THP-1 (AML-M5) linie, den po rozmražení	Uoc-M1 (AML-M1) linie, den po rozmražení	OCI/AML3 (AML-M4) linie, den po rozmražení	HL-60 (AML-M2) linie, den po rozmražení	TF-1 (AML-M6) linie, den po rozmražení
D+12	D+5	D+8	D+4	D+3
D+15	D+8	D+11	D+8	D+7
D+20	D+12	D+15	D+11	D+10
D+26	D+15	D+18	D+15	D+14
D+29	D+19	D+22	D+18	D+17
D+33	D+22	D+25	D+25	D+20
D+39	D+29	D+29	D+32	D+23
D+43	D+39	D+36	D+43	D+34
D+47	D+61	D+46	D+53	D+44
D+50	D+75	D+57	D+57	D+55
D+54	D+85			
D+57	D+92			
D+61				
D+64				
D+68				
D+71				
D+75				

4.2. Výsledky RT-PCR

Tabulka č. 11A

Genová exprese Hsp70 u nádorových linií ve srovnání s referenčním vzorkem a genová exprese kontrolního souboru vybraného pro tuto studii

Zdroj: Vlastní výzkum

Genová exprese Hsp70 u nádorových linií a u kontrolního souboru					
THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní soubor
0,13	0,43	0,27	0,05	0,60	1,74
0,16	0,56	0,14	0,07	0,86	1,02
0,15	0,85	0,68	0,06	0,62	0,91
0,24	1,13	0,43	0,08	0,83	1,35
0,13	0,60	0,21	0,06	1,22	0,75
0,11	0,81	1,01	0,11	0,68	1,46
0,32	0,91	0,37	0,03	0,64	1,53
0,27	2,23	0,42	0,17	2,01	2,27
0,17	0,64	0,21	0,03	0,75	1,44
0,24	0,43	0,17	0,11	1,08	1,64
0,13	0,47				1,7
0,18	0,69				1,56
0,07					1,43
0,11					1,61
0,12					1,58
0,06					1,17
0,24					2,64
					1,85
					1,12
					1,87
					1,62

Medián	0,15	0,67	0,32	0,06	0,79	1,56
Průměr	0,17	0,81	0,39	0,08	0,93	1,54
Rozsah	0,06 - 0,32	0,43 - 2,23	0,14 - 1,01	0,03 - 0,17	0,60 - 2,01	0,75 - 2,64

Tabulka č.11B Mann-Whitney test Hsp70

Zdroj: Vlastní výzkum

Statistika	Mann-Whitney test
------------	-------------------

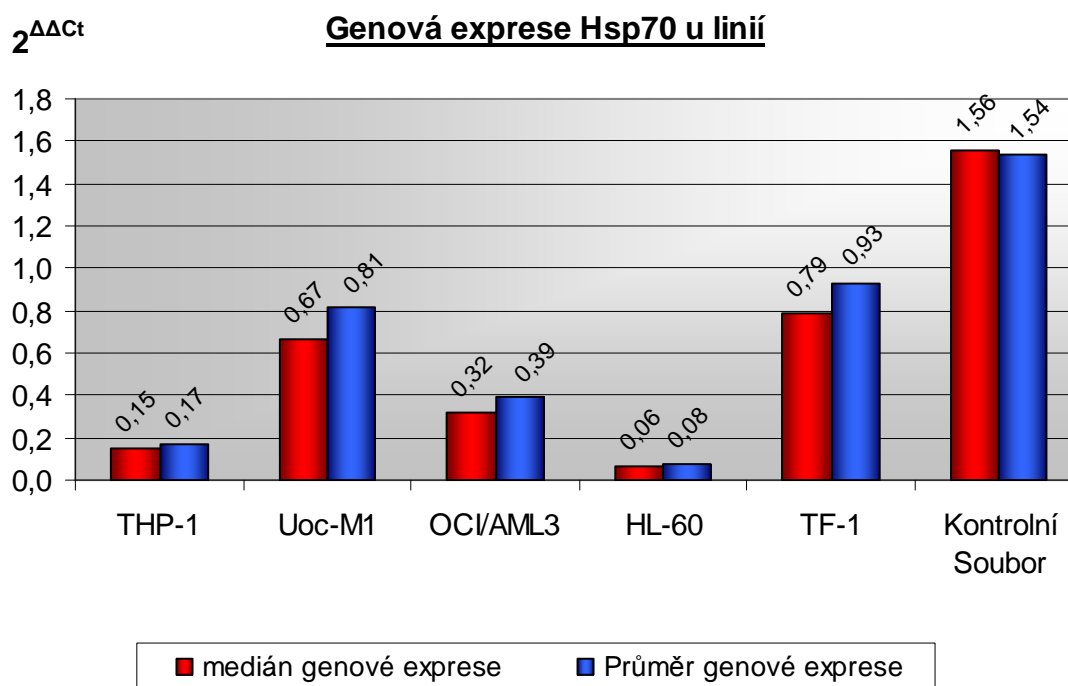
Linie	Pravděpodobnost (P)	
THP-1	1,71E-07	< 0,001
Uoc-M1	0,000211	< 0,001
OCI/AML3	1,48E-05	< 0,001
HL-60	1,00E-05	< 0,001
TF-1	0,001526	0,0015

Tabulka č. 11A ukazuje hodnoty genové exprese Hsp70 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, HL-60, TF-1 a OCI/AML3 ve srovnání s referenčním vzorkem a hodnoty naměřené u kontrolního souboru. Z naměřených hodnot byl vypočítán medián, průměr a rozsah.

Tabulka č.11B ukazuje výsledek Mann-Whitney testu, díky kterému mohou říci, že rozdíl absolutních hodnot ($2^{\Delta\Delta Ct}$) genové exprese mezi kontrolním souborem a nádorovými liniemi je statisticky významný, jelikož hodnota P je menší než 0,001 u linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a hodnota P je rovna 0,0015 u linie TF-1.

Graf č. 1

Zdroj: Vlastní výzkum



Hsp70	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní S.
Medián	0,15	0,67	0,32	0,06	0,79	1,56
Průměr	0,17	0,81	0,39	0,08	0,93	1,54

Graf č. 1 ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese Hsp70 srovnané k referenčnímu vzorku u všech kultivovaných nádorových linií, dále ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese Hsp70 u kontrolního souboru. Z dat vyplývá, že genová exprese Hsp70 u nádorových linií byla nižší než exprese u kontrolního souboru. Avšak povrchová exprese Hsp70 byla vysoká u všech linií, což ukazují data z průtokové cytometrie. Z tohoto zjištění můžeme vyvodit, že genová exprese Hsp70 nemusí korespondovat s povrchovou expresí Hsp70.

Tabulka č. 12A

Genová exprese HspBP1 u nádorových linií ve srovnání s referenčním vzorkem a genová exprese u kontrolního souboru vybraného pro tuto studii

Zdroj: Vlastní výzkum

Genová exprese HspBP1 u nádorových linií a u kontrolního souboru					
THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní soubor
5,53	9,57	4,21	11,43	35,24	1,47
8,13	11,58	3,18	10,84	28,15	1,89
5,40	10,24	2,77	12,49	38,57	2,78
9,13	13,87	6,07	20,92	30,94	1,68
5,28	9,18	1,92	17,20	26,62	2,30
4,71	10,72	5,67	10,35	31,39	1,92
4,56	11,12	5,71	13,72	30,68	1,32
3,75	7,77	4,67	22,36	22,43	1,57
3,28	9,10	2,43	17,12	23,43	1,23
3,31	5,40	5,77	22,07	51,92	1,09
3,82	4,75				1,73
3,36	7,45				1,75
2,46					1,13
2,63					1,56
3,43					3,66
1,48					2,01
7,72					0,87
					1,57
					2,60
					1,99
					1,96

Medián	3,82	9,37	4,44	15,42	30,81	1,73
Průměr	4,59	9,23	4,24	15,85	31,94	1,81
Rozsah	1,48 - 9,13	4,75 - 13,87	1,92 - 6,07	10,35 - 22,36	22,43 - 51,92	1,09 - 3,66

Tabulka č. 12B Mann-Whitney test HspBP1

Zdroj: Vlastní výzkum

Statistika	Mann-Whitney test
------------	-------------------

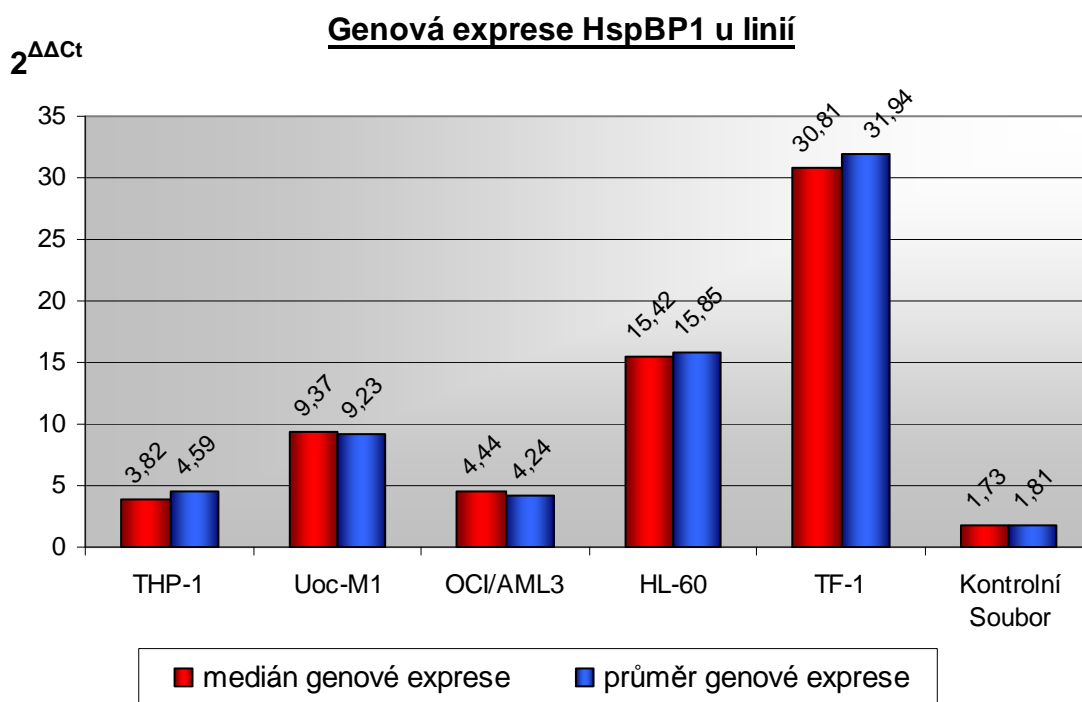
Linie	Pravděpodobnost (P)	
THP-1	6,14E-06	< 0,001
Uoc-M1	2,64E-06	< 0,001
OCI/AML3	1,20E-04	< 0,001
HL-60	1,00E-05	< 0,001
TF-1	1,00E-05	< 0,001

Tabulka č. 12A ukazuje hodnoty genové exprese HspBP1 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, HL-60, TF-1 a OCI/AML3 ve srovnání s referenčním vzorkem a hodnoty naměřené u kontrolního souboru. Z naměřených hodnot byl vypočítán medián, průměr (viz Graf č.2) a rozsah.

Tabulka č.12B ukazuje výsledek Mann-Whitney testu, díky kterému mohou říci, že rozdíl absolutních hodnot ($2^{\Delta\Delta Ct}$) genové exprese mezi kontrolním souborem a nádorovými liniemi je statisticky významný, jelikož hodnota P je menší než 0,001 u linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a TF-1.

Graf č. 2

Zdroj: Vlastní výzkum



HspBP1	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní S.
Medián	3,82	9,37	4,44	15,42	30,81	1,73
Průměr	4,59	9,23	4,24	15,85	31,94	1,81

Graf č. 2 ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese HspBP1 (kochaperonu Hsp70) srovnané k referenčnímu vzorku u všech kultivovaných nádorových linií, dále ukazuje průměrnou hodnotu genové exprese u kontrolního souboru. Z dat vyplývá, že genová exprese HspBP1 u nádorových linií je vyšší než genová exprese u kontrolního souboru. Nejvyšší exprese byla u nádorové linie TF-1 a dále u linie HL-60. Nejnižší genovou expresi z nádorových linií měla linie THP-1.

Tabulka č. 13A

Poměr mezi HspBP1/Hsp70 vypočítaný z genové exprese Hsp70 a HspBP1 (viz výše) a poměr HspBP1/Hsp70 vypočítaný z hodnot Hsp70 a HspBP1 změřených u kontrolního souboru

Zdroj: Vlastní výzkum

Poměr HspBP1/Hsp70 u nádorových linií a u kontrolního souboru

THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní soubor
42,02	22,07	15,35	224,25	58,97	0,84
50,50	20,74	22,31	155,35	32,74	1,85
35,65	12,01	4,10	220,99	61,74	3,05
38,77	12,30	14,05	256,31	37,22	1,24
41,69	15,41	9,27	296,00	21,88	3,07
44,42	13,24	5,62	93,37	45,93	1,32
14,29	12,22	15,35	437,48	47,79	0,86
13,75	3,48	11,12	129,50	11,18	0,69
18,89	14,24	11,49	536,88	31,44	0,85
13,78	12,57	33,05	197,31	48,15	0,66
28,48	10,14				1,02
18,51	10,75				1,12
34,98					0,79
24,56					0,97
27,82					2,32
24,74					1,72
31,69					0,33
					0,85
					2,32
					1,06
					1,21

Medián	28,48	12,44	12,77	222,62	41,58	1,06
Průměr	29,68	13,27	14,17	254,74	39,70	1,34
Rozsah	13,21 – 50,81	3,49 – 22,26	4,07 – 33,93	94,07 – 570,52	11,16 – 62,21	0,33 – 3,07

Tabulka č.13B Mann-Whitney test HspBP1/Hsp70

Zdroj: Vlastní výzkum

Statistika Mann-Whitney test

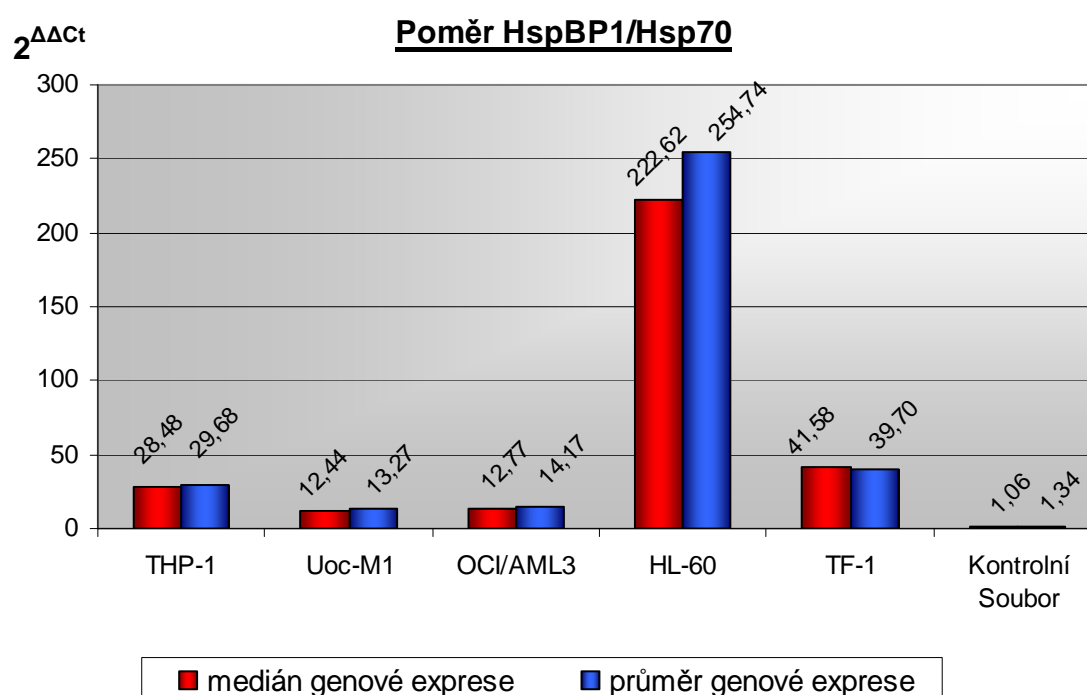
Linie	Pravděpodobnost (P)	
THP-1	1,73E-07	< 0,001
Uoc-M1	2,63E-06	< 0,001
OCI/AML3	1,00E-05	< 0,001
HL-60	1,00E-05	< 0,001
TF-1	1,00E-05	< 0,001

Tabulka č.13A ukazuje poměr HspBP1/Hsp70 vypočítaný z genové exprese Hsp70 a HspBP1. Z těchto hodnot byl vypočítán medián, průměr (viz Graf č.3) a rozsah.

Tabulka č.13B ukazuje výsledek Mann-Whitney testu, díky kterému mohou říci, že rozdíl absolutních hodnot ($2^{\Delta\Delta Ct}$) genové exprese mezi kontrolním souborem a nádorovými liniemi je statisticky významný, jelikož hodnota P je menší než 0,001 u linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a TF-1.

Graf č. 3

Zdroj: Vlastní výzkum



HspBP1/Hsp70	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML	HL-60	TF-1	Kontrolní S.
Medián	28,48	12,44	12,77	222,62	41,58	1,06
Průměr	29,68	13,27	14,17	254,74	39,70	1,34

Graf č.3 ukazuje poměr HspBP1/Hsp70, který byl vypočítán z genové exprese Hsp70 a HspBP1. Kontrolní soubor má ekvivalentní poměr HspBP1/Hsp70. U nádorových linií je tento poměr vyšší než u kontrolního souboru. Nejvyšší hodnota poměru HspBP1/Hsp70 je u linie HL-60 a dále u linie TF-1. Nejnižší hodnotu z nádorových linií má linie Uoc-M1.

Tabulka č. 14A

Genová exprese Hsp27 u nádorových linií ve srovnání s referenčním vzorkem a genová exprese u kontrolního souboru vybraného pro tuto studii

Zdroj: Vlastní výzkum

Genová exprese Hsp27 u nádorových linií a u kontrolního souboru					
THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní soubor
196,45	9,48	34,77	13,42	8,50	0,40
258,20	12,64	21,64	14,03	12,79	1,06
288,20	8,64	32,66	11,86	27,64	1,17
347,84	10,04	–	7,63	26,31	0,82
442,41	14,42	14,63	5,38	55,15	2,45
332,34	26,11	22,78	18,48	28,45	0,24
319,14	16,88	18,18	15,05	29,47	1,49
314,33	–	36,63	18,62	83,14	2,37
264,82	29,91	16,96	14,91	28,50	2,09
295,69	43,90	47,59	23,78	2,21	0,68
317,00	35,09				2,29
216,37	35,75				0,31
247,45					1,10
322,57					1,75
292,84					1,18
231,87					0,82
316,31					0,58
					0,69
					0,81
					1,59
					1,00

Medián	295,69	16,88	22,78	14,47	28,04	1,06
Průměr	294,34	22,08	27,32	14,32	30,21	1,19
Rozsah	196,45 - 442,4	8,64 - 43,9	14,6 - 47,6	5,38 - 23,78	2,2 - 83,14	0,24 - 2,45

Tabulka č 14B Mann-Whitney test Hsp27

Zdroj: Vlastní výzkum

Statistika	Mann-Whitney test
------------	-------------------

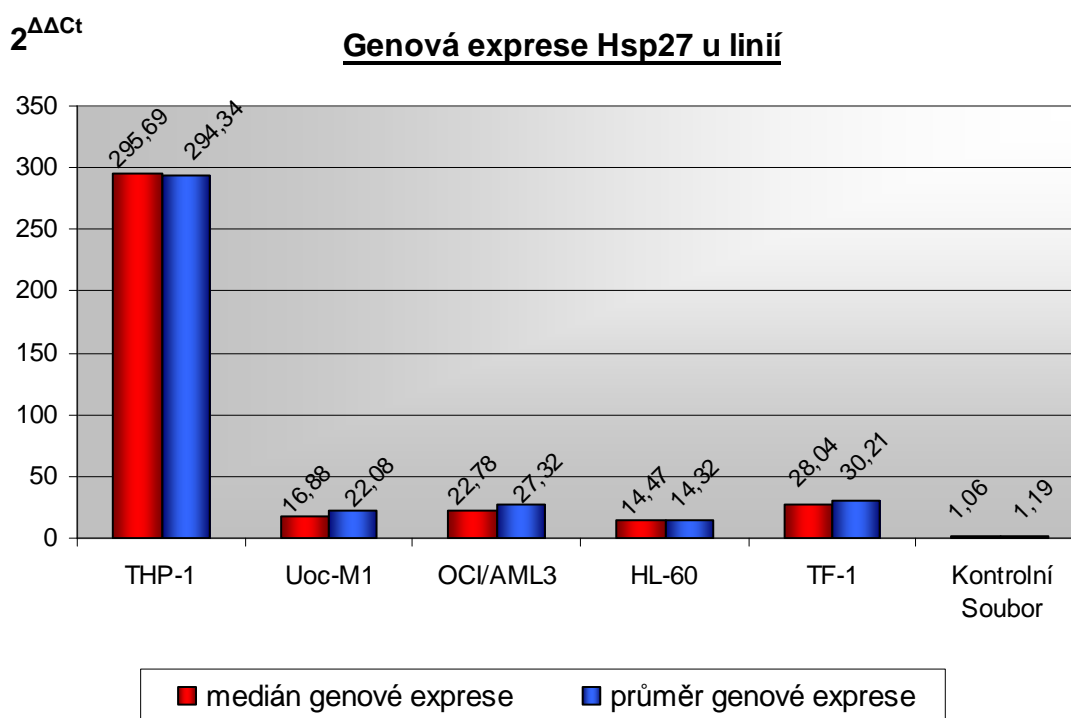
Linie	Pravděpodobnost (P)	
THP-1	1,73E-07	< 0,001
Uoc-M1	5,04E-06	< 0,001
OCI/AML3	2,09E-05	< 0,001
HL-60	1,00E-05	< 0,001
TF-1	1,79E-05	< 0,001

Tabulka č. 14A ukazuje hodnoty genové exprese Hsp27 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, HL-60, TF-1 a OCI/AML3 ve srovnání s referenčním vzorkem a hodnoty naměřené u kontrolního souboru. Z naměřených hodnot byl vypočítán medián, průměr (viz Graf č.4) a rozsah

Tabulka č. 14B ukazuje výsledek Mann-Whitney testu, díky kterému mohou říci, že rozdíl absolutních hodnot ($2^{\Delta\Delta Ct}$) genové exprese mezi kontrolním souborem a nádorovými liniemi je statisticky významný, jelikož hodnota P je menší než 0,001 u linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a TF-1.

Graf č. 4

Zdroj: Vlastní výzkum



Hsp27	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní S.
Medián	295,69	16,88	22,78	14,47	28,04	1,06
Průměr	294,34	22,08	27,32	14,32	30,21	1,19

Graf č. 4 ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese Hsp27 srovnané k referenčnímu vzorku u všech kultivovaných nádorových linií, dále ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese u kontrolního souboru. Z dat vyplývá, že u všech linií je genová exprese zvýšená oproti kontrolnímu souboru. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u linie THP-1. Ostatní linie mají podobnou expresi Hsp27. Nejnižší exprese byla zjištěna u linie HL-60.

Tabulka č. 15A Genová exprese Hsp60 u nádorových linií ve srovnání s referenčním vzorkem a genová exprese kontrolního souboru vybraného pro tuto studii

Zdroj: Vlastní výzkum

Genová exprese Hsp60 u nádorových linií a u kontrolního souboru							
THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	HL-60 (2)	TF-1	TF-1 (2)	Kontrolní soubor
16,29	32,10	25,45	43,31	52,57	25,97	34,84	1,25
25,65	36,18	24,81	59,05	52,53	42,71	35,60	0,52
35,34	30,85	20,53	51,79	56,62	30,41	27,47	0,83
35,20	37,30	20,38	37,71	38,59	32,78	27,44	0,36
30,15	35,62	16,47	68,99	61,37	39,87	25,43	2,00
32,74	36,16	17,09	40,47	48,66	32,33	31,31	0,52
11,73	40,96	14,02	60,95	50,71	34,72	30,99	0,87
13,43	18,72	22,42	50,08	49,01	48,53	29,41	1,90
13,30	29,87	12,08	44,57	39,06	38,35	43,26	1,40
24,43	26,04	23,72	60,57	53,81	60,10	66,63	0,55
22,60	33,03						0,83
28,49	32,40						0,57
17,48							1,04
28,54							0,70
24,84							1,44
22,75							0,74
38,13							1,07
							0,84
							1,39
							1,46
							0,83

Medián	24,84	32,72	20,45	50,94	51,62	36,53	31,15	0,84
Průměr	24,77	32,44	19,69	51,75	50,29	38,58	35,24	1,01
Rozsah	11,73 – 38,13	18,72 – 40,96	12,08 – 25,45	37,71 – 68,99	38,59 – 61,37	25,97– 60,10	25,43 – 66,63	0,36 – 2

Tabulka č. 15B Mann-Whitney test Hsp60

Zdroj: vlastní výzkum

Statistika	Mann-Whitney test
------------	-------------------

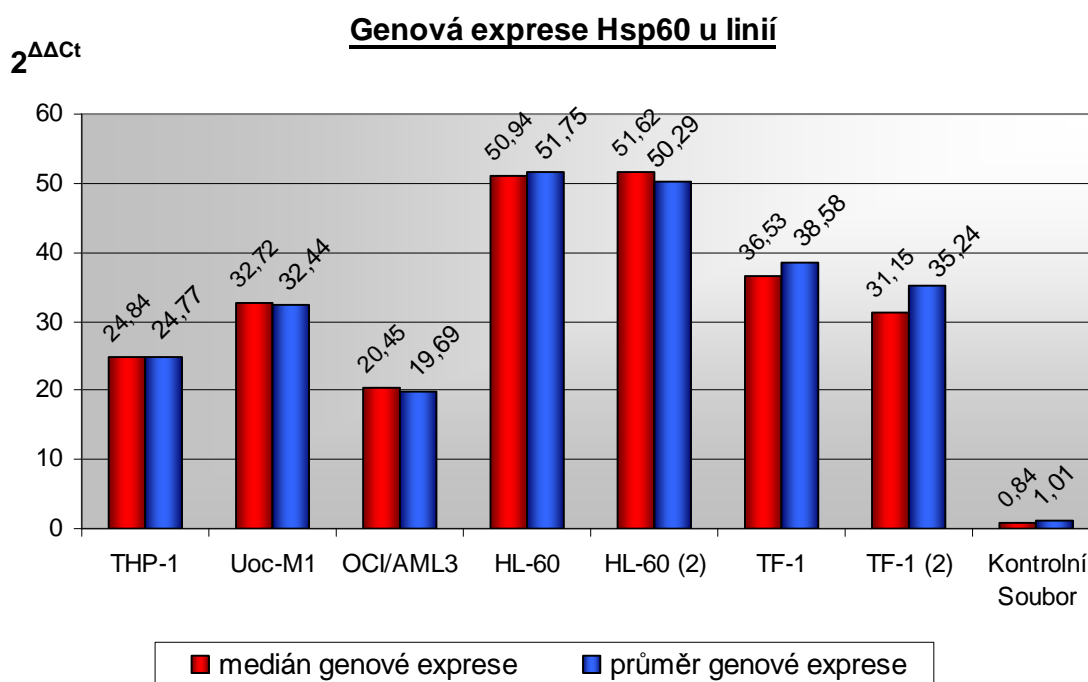
Linie	Pravděpodobnost (P)	
THP-1	1,72E-07	< 0,001
Uoc-M1	2,62E-06	< 0,001
OCI/AML3	9,95E-06	< 0,001
HL-60	9,95E-06	< 0,001
HL-60 (2)	9,95E-06	< 0,001
TF-1	9,95E-06	< 0,001
TF-1 (2)	9,95E-06	< 0,001

Tabulka č.15A ukazuje hodnoty genové exprese Hsp60 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, HL-60, TF-1 a OCI/AML3 ve srovnání s referenčním vzorkem a hodnoty naměřené u kontrolního souboru. Z naměřených hodnot byl vypočítán medián, průměr (viz Graf č.5) a rozsah

Tabulka č.15B ukazuje výsledek Mann-Whitney testu, díky kterému mohou říci, že rozdíl absolutních hodnot ($2^{\Delta\Delta Ct}$) genové exprese mezi kontrolním souborem a nádorovými liniemi je statisticky významný, jelikož hodnota P je menší než 0,001 u linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a TF-1.

Graf č. 5

Zdroj: Vlastní výzkum



Hsp60	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	HL-60 (2)	TF-1	TF-1 (2)	Kontrolní S.
Medián	24,84	32,72	20,45	50,94	51,62	36,53	31,15	0,84
Průměr	24,77	32,44	19,69	51,75	50,29	38,58	35,24	1,01

Graf č. 5 ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese Hsp60 srovnané k referenčnímu vzorku u všech kultivovaných nádorových linií a medián a průměrnou hodnotu genové exprese negativních kontrol. Z dat vyplývá, že u všech linií je genová exprese zvýšená oproti kontrolnímu souboru. Nejvyšší exprese byla naměřena u linie HL-60 a dále u linie TF-1 (tyto linie byly měřeny dvakrát, a to z důvodu kontroly správnosti provedení měření). Nejnížší hodnoty byly zjištěny u nádorové linie OCI/AML3.

Tabulka č. 16A

Genová exprese Hsp90 u nádorových linií ve srovnání s referenčním vzorkem a genová exprese kontrolního souboru vybraného pro tuto studii

Zdroj: Vlastní výzkum

Genová exprese Hsp90 u nádorových linií a u kontrolního souboru					
THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	kontrola Hsp90
3,22	7,50	8,55	7,62	8,40	0,59
4,09	9,52	4,63	8,31	12,01	0,35
5,96	8,00	3,74	13,30	9,17	0,71
5,98	10,53	6,67	6,57	4,80	0,34
5,43	10,77	3,07	3,89	8,26	1,28
5,03	10,48	3,24	6,20	12,71	0,67
2,01	11,71	4,99	6,05	11,00	0,81
1,60	7,02	6,19	14,18	15,13	0,84
2,27	7,63	3,66	5,74	10,09	0,89
4,17	9,25	6,79	7,87	18,42	0,62
3,70	8,68				1,01
6,06	11,52				0,87
3,13					1,06
5,58					0,63
4,24					1,42
3,78					0,92
5,10					0,84
					1,23
					1,42
					0,98
					0,96

Medián	4,17	9,39	4,81	7,09	10,54	0,87
Průměr	4,20	9,39	5,15	7,97	11,00	0,88
Rozsah	1,60 - 6,06	7,02 - 11,71	3,07 - 8,55	3,89 - 14,18	4,80 - 18,42	0,35 - 1,42

Tabulka č.16B Mann-Whitney test Hsp90

Zdroj: Vlastní výzkum

Statistika Mann-Whitney test

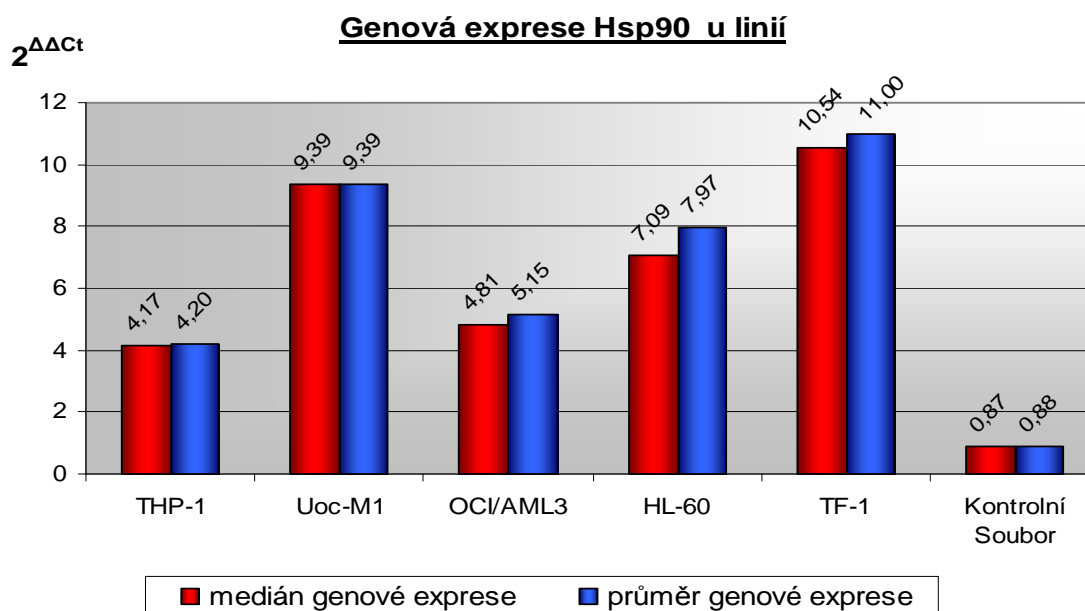
Linie	Pravděpodobnost (P)	
THP-1	1,73E-07	< 0,001
Uoc-M1	2,63E-06	< 0,001
OCI/AML3	1,00E-05	< 0,001
HL-60	1,00E-05	< 0,001
TF-1	1,00E-05	< 0,001

Tabulka č. 16A ukazuje hodnoty genové exprese Hsp90 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, HL-60, TF-1 a OCI/AML3 ve srovnání s referenčním vzorkem a hodnoty naměřené u kontrolního souboru. Z naměřených hodnot byl vypočítán medián, průměr (viz Graf č.6) a rozsah.

Tabulka č.16B ukazuje výsledek Mann-Whitney testu, díky kterému mohou říci, že rozdíl absolutních hodnot ($2^{\Delta\Delta Ct}$) genové exprese mezi kontrolním souborem a nádorovými liniemi je statisticky významný, jelikož hodnota P je menší než 0,001 u linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60 a TF-1.

Graf č. 6

Zdroj: Vlastní výzkum

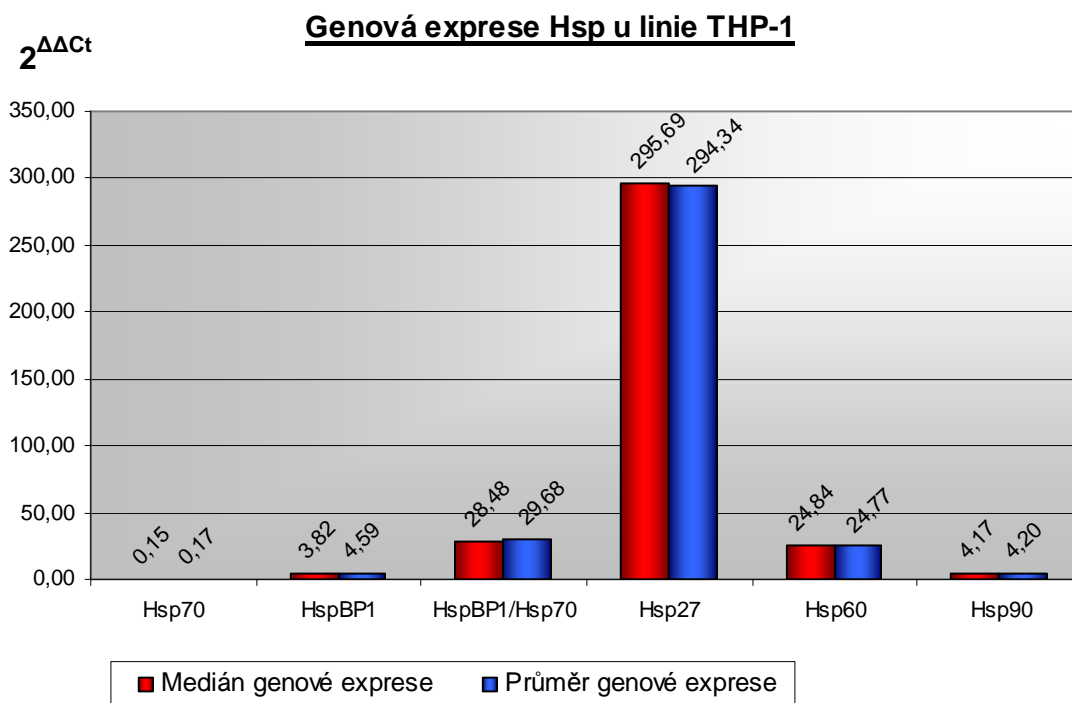


Hsp90	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1	Kontrolní S.
Medián	4,17	9,39	4,81	7,09	10,54	0,87
Průměr	4,20	9,39	5,15	7,97	11,00	0,88

Graf č. 6 ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese Hsp90 srovnané k referenčnímu vzorku u všech kultivovaných nádorových linií, dále ukazuje medián a průměrnou hodnotu genové exprese u kontrolního souboru. Z dat vyplývá, že u všech linií je zvýšená genová exprese Hsp90 oproti kontrolnímu souboru. Nejsou zde výrazné rozdíly v expresi mezi jednotlivými nádorovými liniemi. Hodnoty Hsp90 byly nejméně zvýšené oproti genové expresi ostatních Hsp. Nejvyšší hodnoty Hsp90 byly naměřeny u linie TF-1 a dále u linie Uoc-M1. Nejnižší hodnoty byly zjištěny u nádorové linie THP-1.

Graf č.7 Genová exprese Hsp70, HspBP1, HspBP1/Hsp70, Hsp60, Hsp27 a Hsp90 u nádorové linie THP-1

Zdroj: Vlastní výzkum



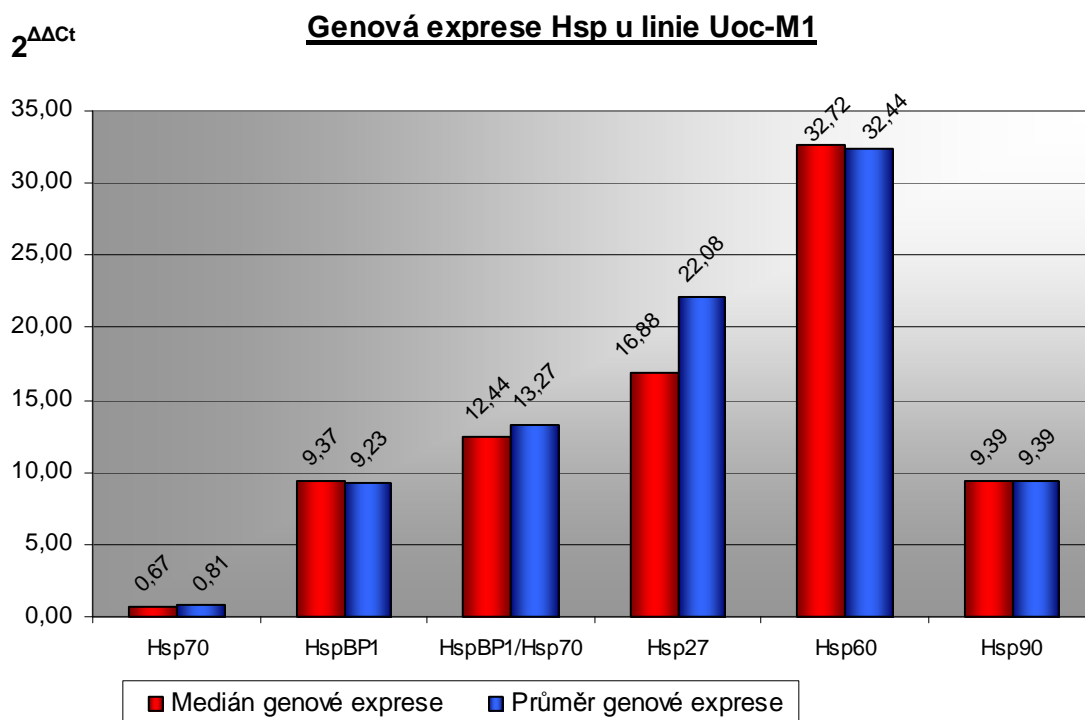
THP-1	Hsp70	HspBP1	HspBP1/Hsp70	Hsp27	Hsp60	Hsp90
Medián	0,15	3,82	28,48	295,69	24,84	4,17
Průměr	0,17	4,59	29,68	294,34	24,77	4,20

Graf č.7 ukazuje genovou expresi Hsp u THP-1 linie. THP-1 je linie odvozená do AML M5 - tzv. monoblastické leukémie. U této linie je markantně zvýšená genová exprese Hsp27 oproti expresi Hsp60, Hsp90, HspBP1 a poměru HspBP1/Hsp70. Hsp70 genová exprese je u této linie negativní. Pokud by genová exprese Hsp27 korelovala s proteinovou expresí Hsp27, mohli bychom nepřímo posuzovat prognózu onemocnění. Některé studie prokázaly, že zvýšená proteinová exprese Hsp27 u nádorových linií vede k odolnosti těchto buněk vůči tepelnému šoku, cis-platině, staurosporinu a peroxidu vodíku (Lee et al. 2006). Kromě toho nádorové linie se zvýšenou expresí Hsp27 mají zpomalený buněčný cyklus, což v důsledku může vést k chemorezistenci těchto buněk (Lee et al. 2006, Vargas Raig et al. 1997). Některé studie dokonce poukazují na schopnost Hsp27 zvyšovat metastatický potenciál u buněk tzv. nahých myší, a zvyšují tak jejich rezistenci vůči terapii (Blackburn et al. 1997, Katoh et al. 2000). U lidského karcinomu prsu bylo prokázáno, že Hsp27 podporuje migraci nádorových buněk (Ki Deok et al. 2005).

Graf č.8

Genová exprese Hsp70, HspBP1, HspBP1/Hsp70, Hsp60, Hsp27 a Hsp90 u nádorové linie Uoc-M1

Zdroj: Vlastní výzkum



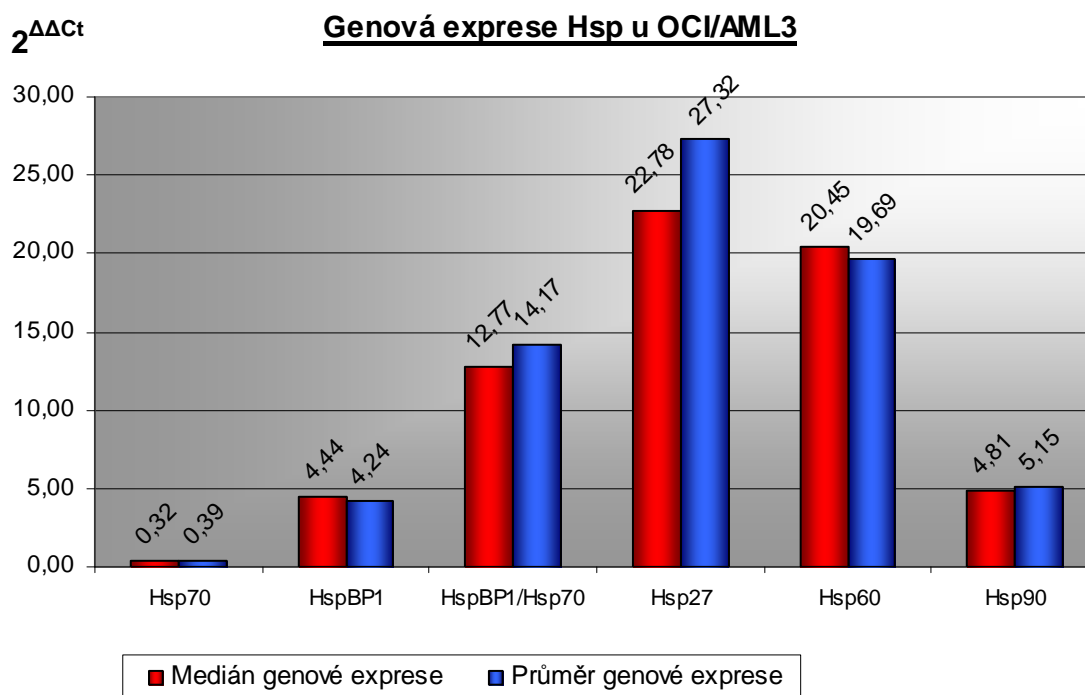
Uoc-M1	Hsp70	HspBP1	HspBP1/Hsp70	Hsp27	Hsp60	Hsp90
Medián	0,67	9,37	12,44	16,88	32,72	9,39
Průměr	0,81	9,23	13,27	22,08	32,44	9,39

Graf č. 8 ukazuje genovou expresi Hsp u Uoc-M1 linie. Uoc-M1 je linie odvozená do AML M1 - tzv. myeloblastické leukémie bez vyžívání. U této linie je nejvíce zvýšená genová exprese Hsp60 oproti genové expresi Hsp27, Hsp90, HspBP1 a poměru HspBP1/Hsp70. Hsp70 genová exprese je u této linie negativní. Pokud by genová exprese Hsp60 korelovala s proteinovou expresí Hsp60, mohli bychom nepřímo posuzovat prognózu onemocnění. U Hsp60 bylo prokázáno, že podporuje apoptózu a to regulací Kaspázy 3 (Samali et al. 1999). Hsp60 exprese má rovněž vliv na monocyty, makrofágy a dendritické buňky a u lidských buněk Hsp60 indukuje sekreci IL-6 z makrofágů (Kol et al. 2000). Endogenní Hsp60 umožňuje také rychlé uvolnění TNF- α a NO z makrofágů (Chen et al. 1999). Zároveň byl prokázán pozitivní vztah mezi hladinou endogenního Hsp60 a nepříznivou prognózou u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Emura et al. 2000).

Graf č.9

Genová exprese Hsp70, HspBP1, HspBP1/Hsp70, Hsp60, Hsp27 a Hsp90 u nádorové linie OCI/AML3

Zdroj: Vlastní výzkum



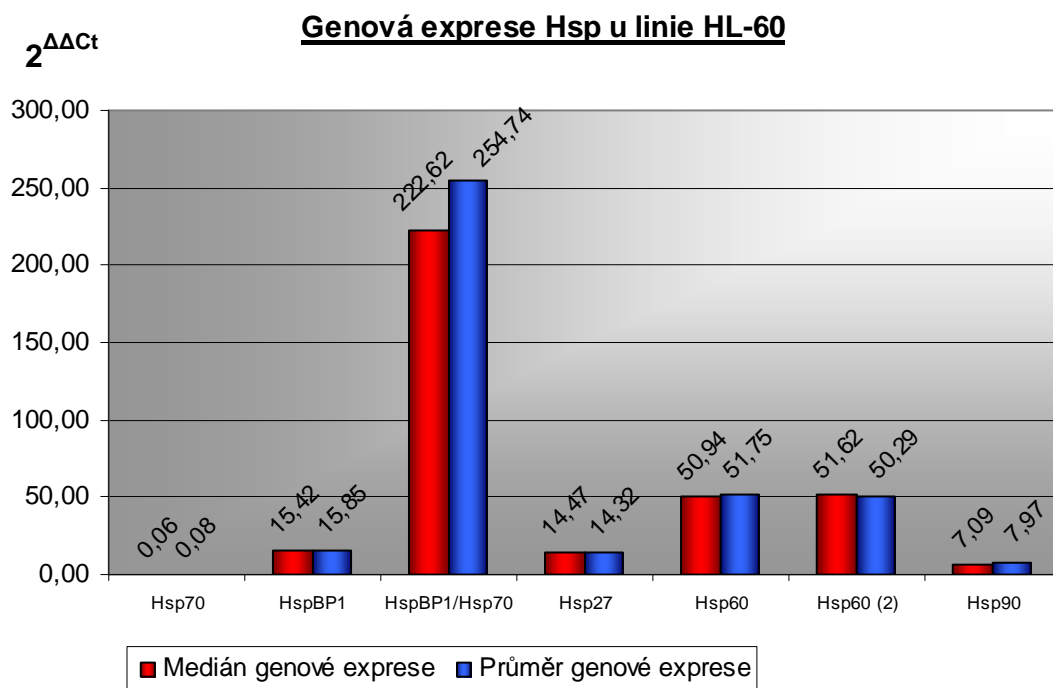
OCI/AML3	Hsp70	HspBP1	HspBP1/Hsp70	Hsp27	Hsp60	Hsp90
Medián	0,32	4,44	12,77	22,78	20,45	4,81
Průměr	0,39	4,24	14,17	27,32	19,69	5,15

Graf č. 9 ukazuje genovou expresi Hsp u OCI/AML3 linie. OCI/AML3 je linie odvozená do AML M4 tzv. myelomonoblastická leukémie. U této linie je nejvíce zvýšená genová exprese Hsp27 a dále Hsp60 oproti expresi HspBP1, Hsp90 a poměru HspBP1/Hsp70. Hsp70 genová exprese je u této linie negativní. Pokud by genová exprese Hsp27 a Hsp60 korelovala s proteinovou expresí Hsp27 a Hsp60, mohli bychom nepřímo posuzovat prognózu onemocnění (viz výše).

Graf č. 10

Genová exprese Hsp70, HspBP1, HspBP1/Hsp70, Hsp60, Hsp27 a Hsp90 u nádorové linie HL-60

Zdroj: Vlastní výzkum

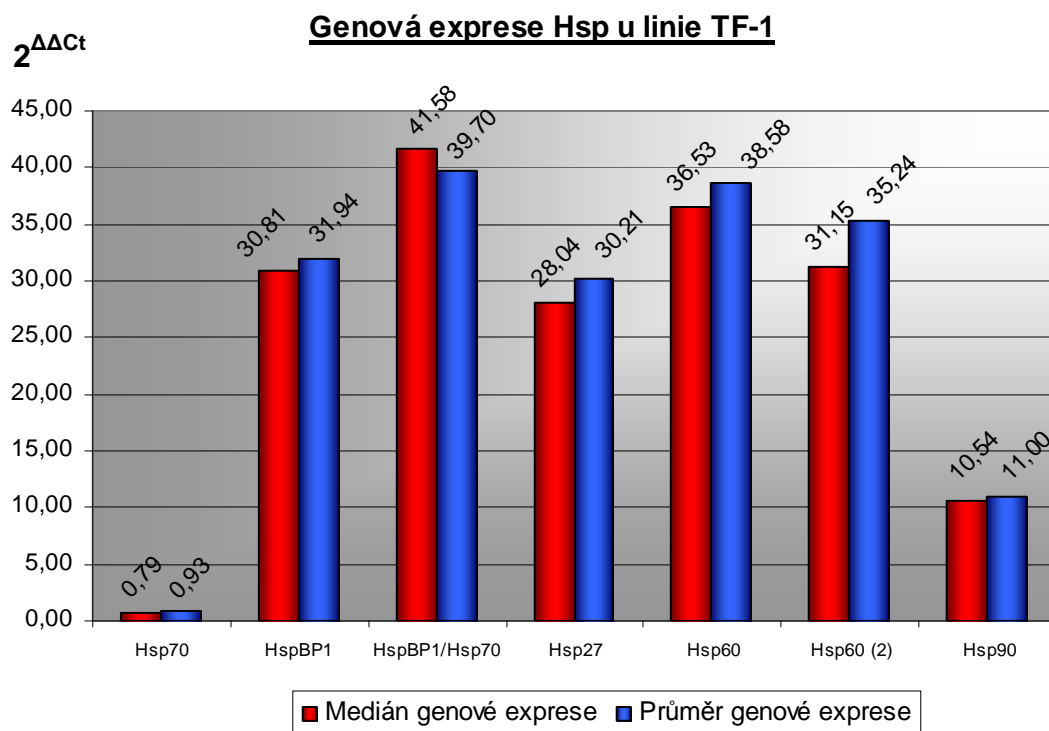


HL-60	Hsp70	HspBP1	HspBP1/Hsp70	Hsp27	Hsp60	Hsp60 (2)	Hsp90
Medián	0,06	15,42	222,62	14,47	50,94	51,62	7,09
Průměr	0,08	15,85	254,74	14,32	51,75	50,29	7,97

Graf č. 10 ukazuje genovou expresi Hsp u HL-60 linie. HL-60 je linie odvozená do AML M2 - tzv. myeloblastické leukémie s částečným vyzráváním. U této linie je nejvíce zvýšený poměr HspBP1/Hsp70 a genová exprese Hsp60 oproti genové expresi HspBP1 Hsp27, Hsp90. Hsp70 genová exprese je u této linie negativní. Pokud by genová exprese Hsp60 korelovala s proteinovou expresí Hsp60, mohli bychom nepřímo posuzovat prognózu onemocnění (viz výše). Posuzovat prognózu onemocnění bychom mohli i v případě, pokud by poměr HspBP1/Hsp70, který byl vypočítán z genové exprese Hsp70 a HspBP1, odpovídal proteinovému poměru HspBP1/Hsp70. Nádorové buňky s vysokým molárním poměrem HspBP1/Hsp70 intracelulárních Hsp byly více citlivé na chemoterapeutickou léčbu než ty, které měly tento poměr nízký (Tanimura et al. 2007). Bylo zjištěno, že protinádorové léky zvyšující expresi HspBP1, které pak specificky váží proteiny Hsp70, tak znemožňují schopnost Hsp70 inhibovat apoptózu asociovanou s permeabilizací lysozomů (Tanimura et al. 2007).

Graf č. 11 Genová exprese Hsp70, HspBP1, HspBP1/Hsp70, Hsp60, Hsp27 a Hsp90 u nádorové linie TF-1

Zdroj: Vlastní výzkum



TF-1	Hsp70	HspBP1	Hsp70/HspBP1	Hsp27	Hsp60	Hsp60 (2)	Hsp90
Medián	0,79	30,81	41,58	28,04	36,53	31,15	10,54
Průměr	0,93	31,94	39,70	30,21	38,58	35,24	11,00

Graf č. 11 ukazuje genovou expresi Hsp u TF-1 linie. TF-1 je linie odvozená do AML M6 - tzv.erytroblastové leukémie. U této linie jsou hodnoty genové exprese HspBP1, Hsp27, Hsp60 a poměr HspBP1 vyrovnané. Nejnižší je genová exprese Hsp90. Genová exprese Hsp90 je u linie TF-1 nejvyšší ze všech kultivovaných linií. Hsp70 genová exprese je u této linie negativní. Pokud by genová exprese Hsp90 korelovala s proteinovou expresí Hsp90, mohli bychom nepřímo posuzovat prognózu onemocnění. Bylo zjištěno, že vysoká exprese Hsp90 koreluje se špatnou prognózou onemocnění. Vysoká exprese intracelulárního Hsp90 byla pozorována u buněk AML se špatnou prognózou onemocnění. Toto zjištění naznačuje, že Hsp90 má roli v přežívání nádorových buněk a v jejich rezistenci vůči chemoterapii (Flandrin et al. 2008).

Grafy č. 7, 8, 9, 10 a 11 také poukazují na skutečnost, že kultivované nádorové linie mají velice heterogenní expresi Hsp.

4.3. Výsledky průtokové cytometrie

Pro měření povrchové exprese průtokovou cytometrií byly vybrány následující vzorky: z linie Uoc-M1 to bylo 15 vzorků D+5 až D+68, z linie HL-60 to bylo 16 vzorků D+4 až D+57, z linie OCI/AML3 to bylo 15 vzorků D+8 až D+57, z linie THP-1 to bylo 15 vzorků D+12 až D+68 a z linie TF-1 to bylo 15 vzorků D+3 až D+55.

Průtokovou cytometrií bylo zjištěno procentuální zastoupení znaku Hsp70 na povrchu buněk nádorových linií. „Cut off“ hodnota (hodnota pro pozitivitu měření) byla 10% Hsp70 znaku na povrchu nádorové linie. V naší studii bylo prokázáno, že všechny linie tuho hodnotu několikanásobně překročily. Procentuální zastoupení Hsp70 na povrchu nádorových linií je v Tabulce č.17

Tabulka č. 17

Povrchová exprese Hsp70 u nádorových linií Uoc-M1, HL-60, OCI/AML3, THP-1 a TF-1 v konkrétních dnech kultivace linií

Zdroj: Vlastní výzkum

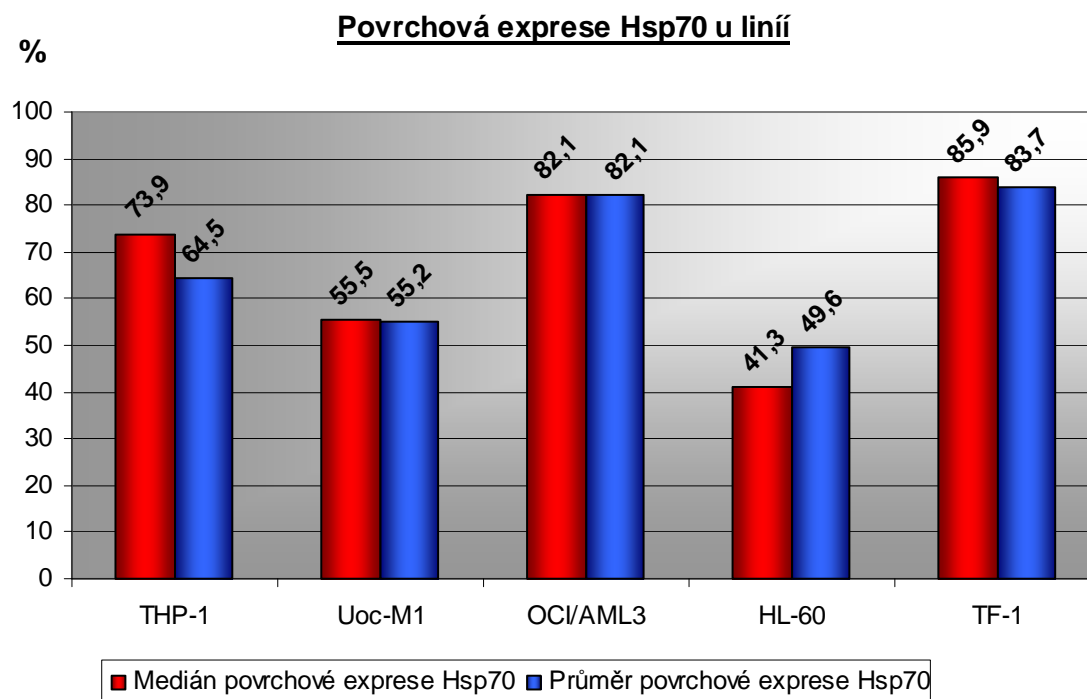
UoC-M1		HL - 60		OCI/AML3		THP-1		TF-1	
Den kultivace	Hsp70 exprese (%)	Den kultivace	Hsp70 exprese (%)	Den kultivace	Hsp70 exprese (%)	Den kultivace	Hsp70 exprese (%)	Den kultivace	Hsp70 exprese (%)
5	44,5	4	71,9	8	99,6	12	87,4	3	87,7
8	78,1	8	31	11	80,3	15	80	7	99,7
12	31,6	11	38,8	15	75	20	94,1	10	93,9
15	62,8	15	35,6	18	88,1	26	85,6	14	77,7
19	87,9	18	33,1	22	70,5	29	91,2	17	74,2
22	55,2	22	19,7	25	73,1	33	84,7	20	86,7
26	77,5	25	82,8	29	87	39	69,7	23	79,5
29	55,5	29	80,3	32	82,1	43	75,4	27	70,8
33	32,3	32	77,8	36	83,3	47	31,1	30	72,7
39	38,3	36	39	39	69	50	51,6	34	77,5
43	61,2	39	54,5	43	98,5	54	56,4	37	94,9
47	22,9	43	63,5	46	65,9	57	73,9	44	68,7
61	34,4	46	22,4	50	80,7	61	36,3	48	85,9
64	56,5	50	36,7	53	82,4	64	13,6	51	87,9
68	88,7	53	43,5	57	95,5	68	37,2	55	97,8
		57	62,4						

Medián	55,5	Medián	41,3	Medián	82,1	Medián	73,9	Medián	85,9
Průměr	55,2	Průměr	49,6	Průměr	82,1	Průměr	64,5	Průměr	83,7

Graf č.12

Povrchová exprese Hsp70 u nádorových linií

Zdroj: Vlastní výzkum



	THP-1	Uoc-M1	OCI/AML3	HL-60	TF-1
Median %	73,9	55,5	82,1	41,3	85,9
Průměr %	64,5	55,2	82,1	49,6	83,7

Graf č. 12 ukazuje medián a průměrnou hodnotu povrchové exprese (%) Hsp70 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60, TF-1. Nejvyšší hodnota povrchové exprese byla naměřena u linie TF-1 a dále u linie OCI/AML3. Nicméně u všech nádorových linií byla zjištěna vysoká povrchová exprese Hsp70. Povrchová exprese Hsp70 byla měřena u všech nádorových linií v průběhu celé kultivace. U nádorových linií docházelo k poklesu i vzestupu povrchové exprese Hsp70, vždy ale byly naměřeny signifikantní hodnoty s více než 10% pozitivních buněk. Bylo rovněž zjištěno, že povrchová exprese Hsp70 u nádorových linií nekoreluje s genovou expresí, která byla negativní, což bylo prokázáno metodou RT-PCR (viz výše).

5. Diskuse

Proteiny tepelného šoku se podílejí na patogenezi některých maligních nádorů, nicméně nemají vliv na tumorogenezi všech karcinomů. Není pravidlem, že všechny molekulární chaperony jsou vysoce exprimovány v průběhu vývoje a formování nádoru. Tato skutečnost naznačuje, že existují specifické molekulární změny, které vedou ke zvýšení, nebo naopak snížení exprese proteinů tepelného šoku (Calderwood and Sherman et al. 2007). Některé studie prokázaly vysokou expresi Hsp v širokém spektru lidských solidních nádorů. Proteiny tepelného šoku se podílejí na tumorogenezi prostřednictvím specifických změn ve své expresi (ve většině případů je to zvýšení exprese), zvýšená exprese Hsp pak vede k odolnosti nádorů vůči nepříznivým podmínkám, mimo jiné i k odolnosti vůči protinádorové terapii (Calderwood and Sherman et al. 2007)

Hsp60 akceleruje aktivaci prokaspázy 3 cytochromem C, tak urychluje aktivaci kaspázové kaskády, čímž přispívá k rychlé a snadné aktivaci apoptózy (Xanthoudakis et al. 1999).

Byla vyslovena hypotéza, že genetická nestabilita nádorové buňky jí umožňuje získat 6 důležitých vlastností, které jsou charakteristické pro většinu karcinomů, jsou to: vlastní signalizace pro růst buňky (1), necitlivost k signalizaci potlačující buněčný růst (2), schopnost vyhnout se apoptóze (3), trvalá angiogeneze (4), neomezený replikační potenciál (5), schopnost invazivity a metastazování (6) (Hanahan and Weinberg 2000). Hsp90 je důležitý pro získání a udržení všech těchto schopností nádorové buňky (Bagatell and Whitesell, 2004). Hsp90 rovněž může povolit vznik genetické nestability, na které závisí vznik každého ze 6 znaků nádorových buněk (Chiosis et al. 2004, Goets et al. 2003, Isaacs et al. 2003, Workman, 2004, Zhang and Burrows 2004). Hlavní funkce Hsp90 v tumorogenezi je, že umožňuje vznik mutovaného fenotypu nádorové buňky, a to cestou přes inaktivaci DNA opravných proteinů hMSH2 (Fishel et al. 1993, Fishel and Kolodner, 1995).

Na rozdíl od Hsp90, Hsp70 a Hsp27 nejsou přímé mediátory proliferace, ale zprostředkovávají vznik lidských karcinomů alternativními mechanismy, které zahrnují inhibici programované buněčné smrti a senescence, což je jeden z charakteristických rysů maligních nádorů (Gerner a Schneider, 1975). Byly podány přesvědčivé důkazy, že vysoká exprese Hsp27 a Hsp70 inhibuje na kaspázách - dependentní aktivaci apoptózy

(Beere, 2001). Molekulární cíle Hsp27 a Hsp90 v inhibici této dráhy jsou: c-jun kináza, apaf-1 a kaspáza 3 (Beere, 2001).

Toto je první práce, která se zabývala zjištěním genové exprese Hsp27. Nejsou známé žádné studie, které by poskytovaly data týkající se genové exprese Hsp27. Extrémní hodnoty genové exprese Hsp27 byly naměřeny u linie THP-1, zvýšené hodnoty oproti hodnotám kontrolního souboru byly naměřeny u linií Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60, TF-1 tyto linie vykazovaly podobné hodnoty genové exprese. U žádné kultivované linie nebyly hodnoty Hsp27 negativní. Přestože genová exprese nemusí korelovat s proteinovou expresí, Scheppers et al. (Scheppers et al. 2005) uvádí ve své studii vysokou proteinovou expresi Hsp27 u linie THP-1 a lehce zvýšenou expresi u linie TF-1 a negativní expresi u HL-60, což by odpovídalo mým výsledkům genové exprese Hsp27, která byla u linie HL-60 nejnižší oproti ostatním leukemickým liniím. Studie Lee et al. 2007 prokázala, že zvýšená proteinová exprese Hsp27 u nádorových linií vede k odolnosti těchto buněk vůči tepelnému šoku, cis-platině, staurosporinu a peroxidu vodíku (Lee et al. 2007). Kromě toho nádorové linie se zvýšenou expresí Hsp27 mají zpomalený buněčný cyklus, což v důsledku může vést k chemorezistenci těchto buněk (Lee et al. 2006, Vargas Raig et al. 1997). Z těchto zjištění vyplývá, že pokud je v leukemických buňkách extrémně zvýšena proteinová exprese Hsp27, prognóza onemocnění je závažná.

Toto je první práce, která se zabývala zjištěním genové exprese Hsp60. Nejsou známé žádné studie, které by poskytovaly data týkající se genové exprese Hsp60. U všech kultivovaných linií byly hodnoty genové exprese zvýšené oproti hodnotám kontrolního souboru. Nejvíce byla zvýšena exprese u linie HL-60. Ostatní linie THP-1, OCI/AML3, Uoc-M1, TF-1 měly podobné hodnoty genové exprese. Rozdíl mezi HL-60 a ostatními liniemi nebyl tak markantní jako u genové exprese Hsp27. U Hsp60 bylo prokázáno, že podporuje apoptózu, a to regulací kaspázy 3 (Samali et al. 1999). Hsp60 exprese má rovněž vliv na monocyty, makrofágy a dendritické buňky a u lidských buněk Hsp60 indukuje sekreci IL-6 z makrofágů (Kol et al. 2000). Endogenní Hsp60 umožňuje také rychlé uvolnění TNF- α a NO z makrofágů (Chen et al. 1999). Zároveň byl prokázán pozitivní vztah mezi hladinou endogenního Hsp60 a nepříznivou prognózou u pacientů s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (Emura et al. 2000). Z těchto zjištění vyplývá, že Hsp60 by mohl mít prediktivní hodnotu v prognóze nově diagnostikované akutní myeloidní leukémie.

Zjistili jsme vysokou proteinovou expresi Hsp70 na povrchu kultivovaných nádorových linií. Toto zjištění je v souladu s daty publikovanými v práci Hromadníková and Sedláčková 2008; Hromadníková et al. 2010 (viz str. 94). Avšak tato pozitivní proteinová exprese nekorelovala s genovou expresí. Již dříve byl popsán stav, kdy v jedné buňce byla zjištěna jak pozitivní povrchové exprese Hsp70, tak negativní genové exprese Hsp70, a to v různých typech leukemických linií. Z tohoto zjištění vyplývá, že zde musí být přítomen mechanismus „negativní zpětné vazby“, který tímto způsobem reguluje produkci Hsp70, aby nedocházelo k nadměrné produkci proteinu (Hromadnikova and Sedlackova 2008). Experimentální studie prokázaly, že Hsp70 hraje významnou roli v ochraně buňky před cytotoxickými účinky hypertermie a nádorové terapie (Barnes et al. 2001; Ciocca et al. 2003). Velké množství klinických studií prokázalo pozitivní korelaci mezi zvýšenou expresí Hsp70 a Hsp27 a invazivitou nádoru / metastatickou schopností nádorů (Ciocca and Calderwood, 2005). Z toho můžeme vyvodit závěr, že vysoká exprese Hsp70 u leukemických buněk má prediktivní hodnotu pro špatnou prognózu onemocnění.

Toto je první práce, která se zabývala zjištěním genové exprese HspBP1 (co-chaperon Hsp70). Nejsou známy žádné studie, které by poskytovaly data týkající se genové exprese HspBP1. U všech kultivovaných leukemických linií byla signifikantně zvýšená genová exprese HspBP1. Nejvyšší genová exprese byla naměřena u TF-1, dále u HL-60 linie a ostatní linie měly podobnou genovou expresi HspBP1. Bylo zároveň prokázáno, že genová exprese HspBP1 je vyšší než hodnoty genové exprese Hsp70. HspBP1 byl původně identifikován jako protein interagující s Hsp70, který inhibuje navázání ATP do ATP vazebné domény Hsp70 (Raynes and Guerriero 1998). Později bylo prokázáno, že HspBP1 je tzv. „nucleotid exchange factor“, který můžeme najít v cytosolu savčích buněk (Kabani, 2002). Biologicky HspBP1 podporuje degradaci proteinů a blokuje anti-apoptotickou funkci stresem indukovaného Hsp70 (Tanimura et al. 2007, Alberti et al. 2004). Kromě toho bylo zjištěno, že buňky s vysokým poměrem HspBP1/Hsp70 jsou senzitivní k chemoterapeutické léčbě (Tanimura et al. 2007)

Z genové exprese HspBP1 a Hsp70 byl rovněž spočítán poměr HspBP1/Hsp70. Extrémně vysoká hodnota poměru HspBP1/Hsp70 byla vypočtena u linie HL-60, u ostatních linií měl tento poměr podobné hodnoty, ale vždy se jednalo o hodnoty vyšší než u kontrolního souboru. Kontrolní soubor měl ekvivalentní poměr HspBP1/Hsp70. Proteinový poměr HspBP1/Hsp70 odráží prognózu onemocnění. Pokud by genový poměr HspBP1/Hsp70 korespondoval s proteinovým poměrem, mohli bychom nepřímo

posuzovat prognózu onemocnění. Vysoká Hsp70 proteinová exprese koreluje se špatnou prognózou onemocnění (anti-apoptická funkce Hsp70). Vysoká exprese HspBP1 koreluje s dobrou prognózou onemocnění (blokuje anti-apoptické funkce Hsp70). Čím je tento poměr HspBP1/Hsp70 vyšší, tím je prognóza onemocnění lepší, alespoň ve smyslu neschopnosti nádorových/leukemických buněk neomezeného přežívání a jejich citlivosti k protinádorové terapii.

Genová exprese Hsp90 byla zvýšená u všech kultivovaných leukemických linií. Tento Hsp90 byl nejméně zvýšený ze všech ostatních sledovaných Hsp. Nejvyšší genová exprese Hsp90 byla zjištěna u leukemické linie TF-1 a dále u linie Uoc-M1, genová exprese u ostatních kultivovaných linií byla podobná, ale vždy byla vyšší než negativní kontrola. Bylo zjištěno, že vysoká proteinová exprese Hsp90 koreluje se špatnou prognózou onemocnění. Vysoká exprese intracelulárního Hsp90 proteinu byla pozorována u buněk AML se špatnou prognózou onemocnění. Toto zjištění naznačuje, že Hsp90 má roli v přežívání nádorových buněk a v jejich rezistenci vůči chemoterapii (Flandrin et al. 2008). Pokud by genová exprese Hsp90 korelovala s povrchovou expresí Hsp90, pak bychom mohli nepřímo posuzovat prognózu onemocnění. Hodnoty genové exprese by v tomto případě měly prediktivní hodnotu pro dobrou prognózu onemocnění.

Na závěr bylo prokázáno, že Hsp genová exprese u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60, TF-1 je velice heterogenní oproti normálním (nádorově netransformovaným) buňkám. Heterogenita vyjádření genové exprese jednotlivých Hsp je patrná i mezi jednotlivými nádorovými liniemi, u každé linie byla genová exprese jednotlivých Hsp odlišná.

6.Závěr

Cílem mé práce bylo studium povrchové a genové exprese konkrétních Hsp u konkrétních nádorových linií odvozených od různých typů akutní myeloidní leukémie. Má práce prokázala, že povrchová exprese Hsp70 nekoreluje s genovou expresí Hsp70 u nádorových linií THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60, TF-1. Bylo zjištěno, že u těchto linií je vysoká povrchová exprese Hsp70, ale genová exprese Hsp70 byla nižší než genová exprese naměřená u kontrolního souboru. Dále jsem prokázala, že nádorové linie THP-1, Uoc-M1, OCI/AML3, HL-60, TF-1 mají velice heterogenní genovou expresi Hsp27, Hsp70, HspBP1, Hsp60 a Hsp90. U každé linie byl naměřen velice individuální profil Hsp27, Hsp70, HspBP1, Hsp60 a Hsp90 genové exprese. Zjištěná genová exprese Hsp27, HspBP1, Hsp60 a Hsp90 by měla být porovnána s povrchovou expresí. Povrchová exprese Hsp27, HspBP1, Hsp60 a Hsp90 je předmětem dalšího studia, které provádí výzkumná skupina v Laboratoři molekulární biologie a patologie buňky na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

7. Seznam citované literatury

ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLLÍČEK, J., et al. Hematologie – Přehled maligních hematologických nemocí, 2.doplněné a zcela přepracované vyd. Praha: Grada Publishing, 2008, 392 s. + 12 s. příloh
ISBN 978-80-247-2502-4

ALBERTI, S., BÓHSE, K., ARNDT, V. et al. The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulátor. *Molecular Biology of the Cell*. United States: 2004, vol. 15, č. 9, s. 4003–4010
ISSN 1059-1524

ARISPE, N., DOH, M., SIMAKOVA, O. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *The FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. United States: 2004, vol. 18, č. 14, s. 1636–1645.
ISSN 0892-6638

BAGATELL, R., WHITESELL, L. Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Molecular cancer therapeutics*. United States: 2004, vol. 3, č. 8, s. 1021–1030.
ISSN 1535-7163

BARNES, J. A., DIX, D. J., COLLINS, B. W. et al. Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia. *Cell Stress & Chaperones*. Netherlands : 2001, vol. 6, č. 4, s. 316–325.
ISSN 1355-8145

BARRETO, A., GONZALES, J. M., KABITHU, E. Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cellular Immunology*. United States: 2003, vol. 222, č. 2, s. 97-104.
ISSN 0008-8749

BASES, R. Clonogenicity of human leukemic cells protected from cell-lethal agents by heat shock protein 70. *Cell Stress & Chaperones*. Netherlands: 2005, vol. 10, č. 1, s. 37–45.
ISSN 1355-8145

BAUSERO, M. A., GASTPAR, R., MULTHOFF, G., et al. Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumour recognition: active release of heat shock protein 72. *Journal of Immunology*. United States: 2005, vol. 175, č. 5, s. 2900-2912.

ISSN 0022-1767

BEERE, H. M. Stressed to death: Regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*. United States: 2001, vol. 91:RE1.

ISSN 1525-8882

BINDER, R. J., VATNER, R., SRIVASTAVA, P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*. Denmark: 2004, vol. 64, č. 4, s. 442–451. ISSN 0001-2815

BLACK A. R. and SUBJECK, J. R. The biology and physiology of the heat shock and glucose-regulated stress protein systems. *Methods Achievements and Experimental in Pathology*. Switzerland: 1991, vol. 15, s. 126-166.

ISSN 0076-681X

BLACKBURN, R. V., GALOFORO, S. S., BERNIS, C. M. et al. Comparison of tumor growth between hsp25- and hsp27-transfected murine L929 cells in nude mice *International Journal of Cancer (Journal International du Cancer)*. United States: 1997, vol. 72, č. 4, s. 871–877.

ISSN 0020-7136

BUKAU, B., HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. United States: 1998, vol. 92, č. 3 s. 351-366.

ISSN 0092-8674

BURNETT, A. K., GOLDSTONE, A. H., STEVENS, R. M. F., et al. Randomized comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *Lancet*. England:1998, vol. 35, č. 9104, s. 700-708.

ISSN 0140-6736

BUZZARD, K. A., GIACCIA, A. J., KILLENDER, M., et al. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. United States: 1998, vol. 273, č.27, s. 17147–17153.

ISSN 0021-9258

CALDERWOOD, K. S., ATASSI, M. Z. editors. Proteins reviews. 7. vyd. Springer Science + Business Media, LCC. New York: 2007. 450 s.

ISBN 978-0-387-39714-6

CALDERWOOD, K. S., SHERMAN, Y. M., CIOCCA, R. D. editors. Heat shock proteins in cancer. 2. vyd. Springer Science + Business Media, LCC. New York: 2007. 396 s.

ISBN 978-1-4020-6400-5

CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. United States: 2005, vol. 120, č. 4, s. 513–522.

ISSN 0092-8674

CASADO, P., ZUAZUA-VILLAR, P., VALLE, E. D., et al. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Letters*. Ireland: 2007. vol. 247, č. 2, s. 273–282.

ISSN 0304-3835

CIOCCA, D. R., CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment applications. *Cell Stress & Chaperones*. Netherlands: 2005, vol. 10, č. 2, s. 86–103.

ISSN 1355-8145

CIOCCA, D. R., PLUY, L. A., FASOLI, L. C. Study of estrogen receptor, progesterone receptor, and the estrogen-regulated Mr 24,000 protein in patients with carcinomas of the endometrium and cervix. *Cancer Research*. United States: 2005, vol. 49, č. 15, s. 4298–4304.

ISSN 0008-5472

CIOCCA, D. R., ROZADOS, V. R., CUELLO CARRION, F. D., et al. Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell stress & chaperones*. Netherlands: 2003, vol. 8, č. 1, s. 26–36.

ISSN 1355-8145

COWEN, L. E., LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*. United States: 2005, vol. 309, č. 5744, s. 2185–2189.

ISSN 0193-4511

CRAIG, F. E., FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. United States: 2008, vol. 111, č. 8, s. 3941-3967.

ISSN 0006-4971

CSERMELY, P., SCHNAIDER, T., SOTI, C. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. *A comprehensive review. Pharmacology & Therapeutics*. England: 1998, vol. 79, č. 2, s. 129-168.

ISSN 0163-7258

DAUGAARD M, JÄÄTTELÄ, M., ROHDE, M. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle*. United States: 2005, vol. 4, č. 7, s. 877-880.

ISSN 1538-4101

DE JONG, W. W., LEUNISSEN, J. A. M., et al. Evolution of the α -crystallin/small heatshock protein family. *Molecular biology and Evolution*. United States: 1993, vol. 10, č. 1, s. 103-126.

ISSN 0737-4038

DÓHNER, H., ESTEY, H. E., AMADORI, S., et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. by The American Society of Hematology. 2010. vol. 115, č. 3, s. 453-474.

ISSN 0006-4971

DORION, S., LANDRY, J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress & Chaperones*. Netherlands: 2002. vol. 7, č. 2, s. 200–206.

ISSN 1355-8145

DORPFNER, T. K., BOLLER, D., ARCARO, A. Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2007, vol. 63, č.3, s. 215-230.

ISSN 1040-8228

DREXLER, G. H., Guide to Leukemia – Lymphoma Cell Lines. eBook on CD. Germany: Braunschweig, 2005, 680 s.

DUŠEK Ladislav, MUŽÍK Jan, KUBÁSEK Miroslav, KOPTÍKOVÁ Jana, ŽALOUDEK Jan, VYZULA Rostislav. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2010-4-01]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007].

ISSN 1802 – 8861.

EASTON, D. P., KANEKO, Y., SUBJECK, J. R., The Hsp110 a Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell stress & chaperones*. Netherlands: 2000, vol.5, č.4, s.276-290.

ISSN 1355-8145

EHRNSPERGER, M., GRABER, S., GAESTEL, M. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal*. England: 1997, vol. 16, č. 2, s. 221–229.

ISSN 0261-4189

EMURA, I., CHOU, T., IMAI, Y., et al. Overexpression of heat shock protein 60 and the survival of blast in acute myeloid leukemia after induction therapy. *Leukemia*. England: 2000, vol. 14, č. 8, s. 1529-1530.

ISSN 088-6924

ESTEY, E., DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. England:2006, vol. 368, č. 9550, s. 1894-1907.

ISSN 0140-6736

FISHEL, R., LESCOE, M. K., RAO, M. R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. United States: 1993, vol. 75, č. 5, s. 1027–1038.

ISSN 0092-8674

FISHEL, R. and KOLODNER, R. D. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. England: 1995, vol. 5, č. 3, s. 382–395.

ISSN 0959-437X

FLANDRIN, P., GUYOTAT, D., DUVAL, A. et al. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. *Cell Stress & Chaperones*. Netherlands : 2008, vol. 13, č. 3, s. 357-64.

ISSN 1355-8145

GAESTEL, M. (editor). Molecular Chaperons in Health and Disease (Handbook of experimental pharmacology). Vol. 172. Springer Science + Business Media. Verlag Berlin Heidelberg: 2006. 442 s.

ISSN 978-3-540-25875-9

GARRIDO, C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death and Differentiation*. England: 2002, vol. 9, č. 5, s. 483–485.

ISSN 1350-9047

GARRIDO, C., FROMENTIN, A., BONNOTTE, B., et al. Heat shock protein 27enhances the tumorigenicity of imunogenic rat colon cell clons. *Cancer Research*. United States: 1998, vol. 58, č. 23, s. 5495-5499.

ISSN 0008-5472

GERNER, E. W., SCHNEIDER, M. J. Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature*. England: 1975, vol. 256, č. 5517, s. 500–502.

ISSN 0028-0336

GHOBRAL, I. M., MCCORMICK, D. J., KAUFMANN, H. Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray. *Blood*. United States: 2005, vol. 105, č. 9, s. 3722–3730.

ISSN 0006-4971

GODWIN, E. J., SMITH, E. S., Actute myeloid leukemia in older pacient. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2003, vol. 48 (supple), č. s. S17-26.

ISSN 1040-8428

GOETZ, M. P., TOFT, D. O., AMES, M. M. et al. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Annals of Oncology* : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. England: 2003, vol. 14, č. 8, s. 1169–1176.

ISSN 0923-7534

GRIMWADE, D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. Netherlands: 2001, vol.14, č. 3, s. 497- 529.

ISSN 1521-6926

GURBUXANI, S., VYAS, P., CRISPINO, J. D. Recent insights into the mechanism of myeloid leukemogenesis in Down syndrom. *Blood*. United States: 2004, vol. 103, č. 2, s. 399-406.

ISSN 0006-4971

HABICH, C., BAUMGART, K., KOLB, H. et al. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *Journal of Immunology*. United States: 2004, vol. 168, č. 2, s. 569–576.

ISSN 0022-1767

HAFERLACH, T., KERN, W., SCHNITTGER, S. et al. Modern diagnostic in acute myeloid leukemias. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2005, vol. 56, č. 2, s. 223-234.

ISSN 1040-8428

HAHN, J., The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB reports*. Korea: 2009, vol. 42, č. 10, s. 623-630.

ISSN 1976-6695

HAHN, T., MCCARTHY, L. P., ZHANG, J. M., Risk factor for acute Graft-versus-Host Disease after human leukocyte antigen – identical sibling transplantans for adult with leukémia. *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology. United States: 2008, vol. 26, č. 35, s. 5728-5734.

ISSN 0732-183X

HANAHAN, D. and WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. United States: 2000, vol. 100, č. 1, s. 57–70.

ISSN 0092-8674

HESSLING, M., RICHTER, K., BUCHNER, J. Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nature Structural & Molecular Biology*. United States: 2009, vol. 16, č. 3, s. 287-293.

ISSN 1545-9993

HIDDEMANN, W., SPIEKERMAN, K., BUSKE, C. et al. Towards a pathogenesis-oriented therapy of acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2005, vol. 56, č. 2, s. 235-245.

ISSN 1040-8428

HIGHTOWER, L. E., GUIDON, P. T. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *Journal of Cellular Physiology*. United States: 1989, vol. 138, č. 2, s. 257–266.

ISSN 0021-9541

HOANG, A. T., HUANG, J., RUDRA-GANGULY, N. et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*. United States: 2000, vol. 156, č. 3, s. 857– 864.

ISSN 0002-9440

HROMADNIKOVA I., SEDLACKOVA, L. Analysis of cell surface and relative gene expression of heat shock protein 70 in human leukemia cell lines. *Leukemia & Lymphoma*. England: 2008, vol. 49, č. 3, s. 570-576.

ISSN 1042-8194

HROMADNIKOVA I., VOLCHENKOV, R., SEDLACKOVA, L. et al. Expression of heat shock protein 70 and NKG2D ligands in acute myeloid leukemia cell lines. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*. England: 2010 (in press).

HYLANDER, B. L., CHEN, X., GRAF, P. C. et al. The distribution and localization of hsp110 in brain. *Brain Research*. Netherlands: 2000, vol. 869, č. (1-2) s. 49–55.

ISSN 0006-8993

CHAE, H. D., YUN, J., SHI, D. Y. Transcription repression of a CCAAT-binding transcription factor CBF/HSP70 by p53. *The Journal of Biological Chemistry*. United States: 2005, vol. 37, č. 34, s. 488–491.

ISSN 0021-9258

CHEN, W., SYLDATH, U., BELLMANN, K. et al. Human 60-kDa heatshock protein: A danger signal to the innate immune system. *The Journal of Biological Chemistry*. United States: 1999, vol. 162, č. 6, s. 3212–3219.

ISSN 0021-9258

CHIOSIS, G., VILENCHIK, M., KIM, J. et al. Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discovery Today*. England : 2004, vol. 9, č. 20, s. 881–888

ISSN 1359-6446

IMBRIANO, C., BOLOGNESE, F., GURTNER, A. et al. HSP-CBF is an NF-Y-dependent coactivator of the heat shock promoters CCAAT boxes. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 276, č. 28, s. 26332–26339.

ISSN 0021-9258

ISAACS, J. S., XU, W., NECKERS, L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*. United States: 2003, vol. 3, č. 3, s. 213–217.

ISSN 1535-6108

JÄÄTTELÄ, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine*.

England: 1991, vol. 31, č. 4, s. 261–271.

ISSN 0785-3890

JÄÄTTELÄ, M., Over-expression of Hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *International Journal of Cancer*. United states: 1995, vol. 60, č. 5, s. 689-693.

ISSN 0020-7136

KABANI, M., McLELLAN, C., RAYNES, D.A. et al. HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS letters*.

Netherlands: 2002, vol. 531, č. 2, s. 339-342.

ISSN 0014-5793

KAMAL, A., THAO, L., SENSINTAFFAR, J. et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. England: 2003, vol. 425, č. 6956, s. 407–410.

ISSN 0028-0836

KATOH, M., KONINKCX, J., SCHUMACHER, U. Heat shock protein expression in human tumors grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Letters*.

Ireland: 2000, vol. 161, č. 1, s. 113–120.

ISSN 0304-3835

KELLY, L. M., GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. United States: 2002. vol. 3, s. 179-198.

ISSN 1527-8204

KHALEQUE, M. A., BHARTI, A., SAWYER, D. et al. Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene*. England: 2005, vol. 24, č. 43, s. 6564–6573.

ISSN 0950- 9232

KI DEOK, S., MI - YOUNG, L., DAE-SEOP, S. et al. Blocking tumor cell migration and invasion with Biphenyl Isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. United States: 2005, vol. 280, č. 50, s. 41439–41448.

ISSN 0021-9258

KIM, S., WILLISON, K.R., HORWICH, A.L. Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends in Biochemical Sciences*. England: 1994, vol. 19 ,č. 12, s. 543-548.

ISSN: 0968-0004

KOL, A., LICHTMAN, A. H., FINBERG, R.W. et al. Heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *Journal of Immunology*. United States: 2000, vol. 164, č. 1, s. 13–17.

ISSN 0022-1767

LEE, J. H., SUN, D., CHO, K. J. et al. Overexpression of human 27 kDa heat shock protein in laryngeal cancer cells confers chemoresistance associated with cell growth delay. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Germany: 2007, vol. 133, č. 1, s. 37-46.

ISSN 0171-5216

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. United States: 2001, vol. 25, č. 4, s. 402-408.

ISSN 1046-2023

LÖWENBERG, B., GRIFFIN, J. D., TALLMAN, M. S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. United States: 2003, s. 82-101.*

ISSN 1520-4391

MAGALHAES, I. Q., SPLENDORE, A., EMERENCIANO, M. et al. GATA-1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrom. *Cancer Genetics and Cytogenetics. United States: 2006, vol. 166, č.2, s. 112-116.*

ISSN 0165-4608

MALONEY, A., CLARKE, P. A., NAABY-HANSEN, S., Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Research. United States: 2007, vol. 6, č.7, s. 3239-3253.*

ISSN 0008-5472

MAYER, J., STARÝ, J., et al. Leukémie, Praha: Grada Publishing, 2002, 392 s.

ISBN 80-7169-991-8

MAYER, M. P., BUKAU, B. Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biological Chemistry. Germany: 1998, vol. 379, č. 3, s. 261-268.*

ISSN 1431-6730

MCCLLEAN, A. J., XIA, Y., DEUTSCHBAUER, A. M. et al. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell. United States: 2007, vol. 131, č.1, s.121-135.*

ISSN 0092-8674

MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K., ARRIGO, A. P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry. United States: 1996, vol. 271, č. 28, s. 16510–16514.*

ISSN 0021-9258

MOSMMAN, T. R., CHERWISKI, H., BOND, M. W. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *Journal of Immunology*. United States: 2005, vol. 175, č. 1, s. 5-14.
ISSN 0022-1767

MRÓZEK, K., HEEREMA, N. A., BLOOMFIELD, C.D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*. England: 2004. vol. 18, č. 2, s. 115-136.
ISSN 0268-960X

NECKERS, L., IVY, S. P. Heat shock protein 90. *Current Opinion in Oncology*. United States: 2003. vol. 15, č. 6, s. 419–424.
ISSN 1040-8746

NGUYEN, D., DIAMOND, W. L., BRYALAN, C. R. Flow Cytometry in Hematopathology: A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation. 2. vyd. Humana, Totowa, New Jersey: 2007. 340 s.
ISBN 978-1-59745-162-8

NIMMANAPALLI, R., O'BRYAN, E., BHALLA, K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Research*. United States: 2001, vol. 61, č.5, s. 1799–1804.
ISSN 0008-5472

NONOGUCHI, K., ITOH, K., XUE, J. H., et al. Cloning of human cDNAs for Apg-1 and Apg-2, members of the Hsp110 family, and chromosomal assignment of their genes. *Gene*. Netherlands: 1999, vol. 237, č.1, s. 21-28.
ISSN 0378-1119

NORRIS, C. E., BROWN, M. A., et al. Low-molecular-weight heat shock proteins in a desert fish (*Poeciliopsis lucida*): homologs of human Hsp27 and *Xenopus* Hsp30. *Molecular Biology and Evolution*. United States: 1997, vol. 14, č. 10, s.1050–1061.
ISSN 0737-4038

NYLANDSTED, J., BRAND, K., JÄÄTTELÄ, M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. United States: 2000, vol. 926, s. 122–125.
ISSN 0077-8923

PANDEY, P., SALEH, A., NAKAZAWA, A. et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO Journal*. England: 2000, vol.19, č. 16, s. 4310–4322.

ISSN 0261-4189

PEARL, L. H., PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual Review of Biochemistry*. United States: 2006, vol. 75, s. 271-294.

ISSN 0066-4154

PEARL, L. H., PRODROMOU, C., WORKMAN, P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *The Biochemical Journal*. England: 2008, vol. 3, s. 439-453.

ISSN 0264-8728

PECKA, M., *Laboratorní hematologie v přehledu díl II.*, Český Těšín: Finidr, 2006, 304 s.

ISBN 80-86682-02-1

PRATT, W. B., MORISHIMA, Y., Osawa, Y. The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *The Journal of Biological Chemistry*. United States: 2008 vol. 283, č. 34, s. 22885-22889.

ISSN 0021-9258

PRATT, W. B., GALIGNIANA, M. D., HARRELL, J. M., et al. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cellular Signalling*. England: 2004, vol. 16, č. 8, s. 857–872.

ISSN 0898-6568

PRATT, W. B., TOFT, D. O., Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine*. England: 2003, vol. 228, č. 2, s. 111-133.

ISSN 1535-3702

RAYNES, D., GUERRIERO, V. Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. United States : 1998, vol. 273, č. 49, s. 32883-32888.

ISSN 0021-9258

RITOSSA, F., New puffing pattern induced by temperature shock DNP in *Drosophila*. *Experimental*. 1962; vol. 18, s. 571-573.

ISSN 0014-4754

ROHDE, M., DAUGARRD, M., JENSEN, M. H., et al. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & Development*. United States: 2005, vol. 19, č. 5, s. 570–82.

ISSN 0890-9369

SAITO, K., DAI, Y., OHTSUKA K. Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Experimental Cell Research*. United States: 2005, vol. 310, č. 1, s. 229–236.

ISSN 0014-4827

SAMALI, A., CAI, J., ZHIVOTOVSKI, B. et al. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *The EMBO Journal*. England: 1999, vol. 18, č. 8, s. 2040-2048.

ISSN 0261-4189

SHAPIRA, Y. M., TSIRIGOTIS, P., RESNICK, B. I. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in elderly. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2007, vol. 64, č. 1, s.49-63.

ISSN 1040-8428

SCHEPERS, H., GEUGIEN, M., Van der TOORN, M. et al. HSP27 protects AML cells against VP-16-induced apoptosis through modulation of p38 and c-Jun. *Experimental Hematology*. Netherlands: 2005 vol. 33, č. 6, s. 660-670.

ISSN 0301-472X

SCHMITT, E., GEHRMANN, M., GARRIDO, C., Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*. United States: 2007, vol.81, č.1, s. 15-27.

ISSN 0741-5400

SCHMITT, E., PARCELLIER, A., GURBUXANI, S. Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Research*. United States: 2003, vol. 63, č. 23, s. 8233– 8240.

ISSN 0008-5472

SMITH, M., BARNETT, M., BASSAN, R. et al. Adult acute myeloid leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2004, vol. 50, č. 3, s. 197-222. ISSN 1040-8428

STEFFEN, B., MÜLLER-TIDOW, C., SCHWÄBLE, J., et al. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Netherlands: 2005. vol. 56, č. 2, s. 195-221. ISSN 1040-8428

STEWART, W. B., KLEIHUS, P., editors. World Cancer Report. IARC (International Agency for Research of Cancer). Lyon, France: 2003. 351 s. ISBN 92-832-0411-5

SWERDLOW S. H., CAMPO E., HARRIS N. L. et al. editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC (International Agency for Research of Cancer). Lyon, France: 2008. ISBN 97-892-8320-4237

TAIRA, T., SAWAI, M., IKEDA, M. et al. Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *The Journal of Biological Chemistry*. United States: 1999, vol. 274, č. 34, s.24270–24279. ISSN 0021-9258

TANIMURA, S., HIRANO, A. I., HASHIZUME, J. et al. Anticancer drugs up-regulate HspBP1 and thereby antagonize the prosurvival function of Hsp70 in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*. United State: 2007, vol. 282, č. 49, s.35430-35439. ISSN 0021-9258

TENEN, D. G. Disruption of differentiation in human cancer: AML show the way. *Nature Reviews Cancer*. England: 2003, vol. 3, č.2, s.89-101. ISSN 1474-175X

THOMAS, E. D., STORB, R., CLIFT, R.A. et al. Bone marrow transplantation. *The New England Journal of Medicine*. United States:1975, vol. 292, č. 17, s. 832-843. ISSN 0028-4793

THOMAS, X., CAMPOS, L., MOUNIER, C. et al. Expression of heatshock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. England: 2005, vol. 29, č. 9, s. 1049-1058.

ISSN 0145-1172

TROTT, A., SHANER, L., MORANO, K. A. The molecular chaperone Sse1 and the growth control protein kinase Sch9 collaborate to regulate protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. United States: 2005, vol. 170, č.3, s. 1009-1021.

ISSN 0016-6731

ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. United States: 1990, vol. 61, č. 2., s. 203-212.

ISSN 0092-8674

VAN 'T VEER, L. J., DAI, H., VAN de VIJVER, M. J., et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. England: 2002, vol. 415, č. 6871, s. 530–536.

ISSN 0028-0836

VARGAS ROIG, L. M., FANELLI, M. A., LOPEZ, L. A. et al. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detection and Prevention*. England: 1997, vol. 21, č. 5, s. 441–451.

ISSN 0361-090X

VERTIL, A., HAKIM, C., KOTLYAROV, A. Analysis of properties of small heat shock protein Hsp25 in MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)-deficient cells: MK2-dependent insolubilization of Hsp25 oligomers correlates with susceptibility to stress. *The Journal of Biological Chemistry*. United States: 2006, vol. 281, č. 37, s. 26966–26975.

ISSN 0021-9258

VOLLOCH, V. Z., SHERMAN, M. Y. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene*. England: 1999, vol. 18, č.24, s. 3648–3651.

ISSN 0950-9232

WANG, Y., THERIAULT, J. R., HE, H. et al. Expression of a dominant negative heat shock factor-1 construct inhibits aneuploidy in prostate carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 279, č. 31, s. 32651–32659.

ISSN 0021-9258

WHITESELL, L., LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*. England: 2005, vol. 5, č. 10, s. 761-772.

ISSN 1474-1768

WHITHMAN, S. P., RUPPERT, A. S., MARCUCCI, G., et al. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. United States 2007, vol. 109, č. 12, s.5164-5167.

ISSN 0006-4971

WORKMAN, P. Altered states: Selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends in Molecular Medicine*. England: 2004, vol. 10, č. 2, s. 47–51.

ISSN 1471-4914

WORKMAN, P. Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Letters*. Ireland: 2004, vol. 206, č. 2, s. 149–157.

ISSN 0304-3835

WU, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. United States: 1995, vol. 11, s. 441–469.

ISSN 1018-0706

WU, G., OSADA, M., GUO, Z. et al. DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Research*. United States: 2005, vol. 65, č. 3, s. 758–766.

ISSN 0008-5472

XANTHOUDAKIS, S., ROY, S., RASPER, D. et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *The EMBO Journal*. England:1999, vol. 18, č. 8, s. 2049–2056.

ISSN 0261-4189

XIAO, K., LIU, W., QU, S. et al. Study of heat shock protein HSP90alpha, HSP70, HSP27 mRNA expression in human acute leukemia cells. *Journal of Tongji Medical University = Tong ji yi ke da xue xue bao*. China: 1996, vol. 16, č. 4, s.212–216.

ISSN 0257-716X

YAGITA, Y., KITAGAWA K., TAGUCHI A., et al. Molecular cloning of a novel member of the HSP110 family of genes, ischemia-responsive protein 94 kDa (irp94), expressed in rat brain after transient forebrain ischemia. *Journal of Neurochemistry*.

England: 1999: vol. 72, č. 4, 1544-1551.

ISSN 0022-3042

YANO, M., NAITO, Z., TANAKA, S., ASANO, G. Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann*. Japan: 1996, vol. 87, č. 9, s. 908–915.

ISSN 0910-5050

ZHANG, H., BURROWS, F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of Molecular Medicine*. Germany: 2004, vol. 82, č. 8, s. 488–499

ISSN 0946-2716

ZHANG, Y., WANG, J. S., CHEN, L. L. Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells. *The Journal of Biological Chemistry*.

United States: 2004, vol. 279, č. 41, s.42545–42551.

ISSN 0021-9258

8. Klíčová slova

8.1. Klíčová slova v českém jazyce

Proteiny tepelného šoku

Hsp27

Hsp70

Hsp90

HspBP1

Hsp60

Akutní myeloidní leukémie

THP-1

Uoc-M1

OCI/AML3

HL-60

TF-1

Tumorogeneze

8.2. Klíčová slova v anglickém jazyce

Heat shock proteins

Hsp27

Hsp70

Hsp90

HspBP1

Hsp60

Acute myeloid leukaemia

THP-1

Uoc-M1

OCI/AML3

HL-60

TF-1

Tumorigenesis

9. Přílohy

9.1. Seznam použitých zkratek

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALL	Akutní Lymfoidní Leukémie
AML	Akutní Myeloidní Leukémie
AML M0	Akutní Myeloidní Leukémie typu M0
AML M1	Akutní Myeloidní Leukémie typu M1
AML M2	Akutní Myeloidní Leukémie typu M2
AML M3	Akutní Myeloidní Leukémie typu M3
AML M4	Akutní Myeloidní Leukémie typu M4
AML M5	Akutní Myeloidní Leukémie typu M5
AML M6	Akutní Myeloidní Leukémie typu M6
AML M7	Akutní Myeloidní Leukémie typu M7
Apaf-1	Apoptoti peptidase factor 1
APC	Antigen Presenting Cell
APL	Akutní promyelocytární leukémie
CD	Cluster of Designation
CNS	Centrální Nervová Soustava
CSF-GM	Colony Stimulating Factor - Granulocyte and monocyte
DNA	Deoxyribonucleic Acid
FAB	French – American – British clasificatio
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FITC	Fluorescein isothiokyanát
Flt3	FMS - like tyrosine kinase 3

GATA-1	Globin Transcription Factor 1
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukaemia
IL-1 β	Interleukin 1 β
INF γ	Interferon γ
MEM- α	Minimum Essential Medium - α
MHC I	Major Histocompatibility Complex I
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
NK	Natural Killers
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Moore) - médium
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
TLR	Toll - Like Receptors
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TPO	Trombopoetin
TRM	Treatment Related Mortality
WHO	World Health Organization