

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno 2007

Ludmila Ročňová

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta

Ústav biochemie



**TESTOVÁNÍ REZISTENCE B-CLL BUNĚK
S MUTANTNÍ A WILD-TYPE KONFORMACÍ
PROTEINU p53 NA CHEMOTERAPII A JEJICH
SENZITIVIZACE MONOKLONÁLNÍ
PROTILÁTKOU RITUXIMAB**

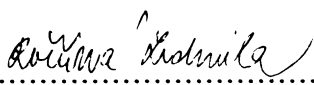
Vypracovala: Ludmila Ročňová

Vedoucí práce: Mgr. Martin Trbušek, Dr.

Brno 2007

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Brno, květen 2007


.....

podpis

Svoji diplomovou práci jsem vypracovala v Centru molekulární biologie a genové terapie při Interní hematologické klinice Fakultní nemocnice Brno.

Chtěla bych tímto poděkovat Dr. Martinu Trbuškovi, svému školiteli, za odborné vedení a čas, který mi při tvorbě diplomové práce věnoval, Mgr. Soně Čejkové za dobré rady, pomoc a trpělivost při práci, Mgr. Peteru Šebejovi za zpracování obrázků western blotů a Mgr. Davidu Potěšilovi za pomoc se statistickým zpracováním dat. Děkuji také ostatním pracovníkům CMBGT, díky nimž jsem se naučila spoustu užitečných odborných věcí.

Nakonec bych chtěla poděkovat svým rodičům, bez jejichž podpory a pomoci by se moje studium nemohlo uskutečnit.

Seznam použitých zkratk

ADCC	na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ATM, ATM	gen (protein) ataxia telangiectasia mutated
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulfate)
Bax	bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma leukemia-2 protein
B-CLL	B-buněčná chronická lymfocytární leukémie
BCR	B-buněčný receptor (B cell antigen receptor)
BSA	bovinní (hovězí) sérový albumin (bovine serum albumin)
CLB	chlorambucil
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
D ₂ O	těžká voda, ² H ₂ O
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
EBV	herpes virus Epsteinova a Barrova
EC	electron coupling reagent
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FASAY	funkční analýza separovaných alel v kvasinkách
FBS	fetální bovinní (hovězí) sérum (fetal bovine serum)
FLU	fludarabin
FS	frame shift (posun čtecího rámce)
G-CSF	kolonie stimulující faktor pro granulocyty (granulocyte colony stimulating factor)
GM-CSF	kolonie stimulující faktor pro granulocyty a makrofágy (granulocyte macrophage colony stimulating factor)
HIV	lidský virus imunodeficiency (human immunodeficiency virus)
HTLV	lidský T-lymfotropní virus (human T-cell leukemia virus)

I-FISH	interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
IgVH	gen pro variabilní oblast těžkého imunoglobulinového řetězce (immunoglobulin heavy chain variable gene)
MAC	membránu atakující komplex (membrane attack complex)
<i>mdm2</i> , MDM2	gen (protein) mouse double minute
miRNA	microRNA
MTT	3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium
NK buňky	„přirození zabíječi“ (natural killer cells)
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PCNA	proliferální buněčný jaderný antigen (proliferating cell nuclear antigen)
RAM	rabbit anti mouse (králík proti myši)
RS	mitochondriální sukcinát-tetrazolium reduktasový systém (mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system)
RTX	rituximab
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulphate)
SWAR	swine anti mouse (prase proti myši)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
WST-1	4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3- benzen disulfonát
wt	wild-type

Abstrakt

Aberace dvou kooperujících genů, *p53* a *ATM*, významně zhoršují prognózu a možnosti léčby u B-CLL pacientů. Monoklonální protilátka rituximab (anti CD20) je u B-CLL využívána spíše v kombinovaných terapeutických režimech, často obsahujících fludarabin. Existuje velmi málo *in vitro* dat, která sledují efekt tohoto obvyklého treatmentu B-CLL buněk s aberantním *p53* a/nebo *ATM*. Data, která by ukazovala efekt kombinace rituximabu a chlorambucilu, také chybí.

Cílem mé práce bylo určit *in vitro* efekt výše zmiňovaných kombinací látek na B-CLL buňky s různým *p53/ATM* statutem. Pro monitorování vlivu použitých látek na buněčnou viabilitu byl použit WST-1 assay. Testování probíhalo v *in vitro* systému neobsahujícím aktivní lidskou plazmu, takže byla vyloučena lyze komplementem jako mechanismus účinku rituximabu. Po předošetření buněk rituximabem (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 72 hod) byla přidána chemoterapeutika ve čtyřech koncentracích (F: 25 – 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; CLB: 50 – 6,25 μM) a buňky byly kultivovány dalších 48 hod. Pro určení významnosti účinku pretreatmentu rituximabem byla použita multivariační analýza MANOVA.

Kombinace rituximab/fludarabin byla testována na 46 vzorcích (procento B-CLL lymfocytů bylo přes 90 %) s následujícími charakteristikami: 14 vzorků bylo wild-type, 14 mělo delecí *ATM* (průměr deletovaných buněk byl 83 %) a 18 vzorků obsahovalo různé defekty *p53*. Senzitivita k fludarabinu byla stanovena pro koncentraci 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, která poskytovala významné rozdíly mezi testovanými vzorky. Vzorky byly rozčleněny následovně: rezistentní – viabilita testovaných buněk byla vyšší než 60 %; středně citlivé – viabilita buněk byla v rozmezí 60 – 40 %; citlivé – viabilita buněk byla nižší než 40 %.

Vzorky s defekty v *p53* byly většinou rezistentní (72 %) a žádný nebyl citlivý. Ze 14 vzorků s delecí *ATM* bylo 35,5 % vzorků na fludarabin citlivých, což bylo mnohem více než u wild-type vzorků (14 %). Když byla viabilita buněk treatovaných fludarabinem a buněk treatovaných rituximabem a fludarabinem vztažena na netreatovanou kontrolu, byl na hladině významnosti $P = 0,05$ zaznamenám pozitivní senzitivizační efekt rituximabu u 33 % vzorků s aberacemi *p53*, 36 % vzorků s delecí *ATM* a 57 % wild-type vzorků.

U testování kombinace rituximab/chlorambucil, které bylo prováděno jako pilotní studie stejným způsobem u 16 vzorků, byl také zaznamenám pozitivní

senzitivizační efekt pretreatmentu rituximabem u některých vzorků ve všech třech skupinách.

Získané výsledky ukazují, že *p53/ATM* status je determinující pro senzitivitu B-CLL buněk k fludarabinu. Senzitivizace rituximabem pro fludarabin je nezávislá na aberacích *p53* a *ATM*. Pilotní data testování kombinace rituximab/chlorambucil toto tvrzení podporují.

Abstract

Aberrations of two co-operating genes, the *p53* and *ATM*, significantly deteriorate prognosis and treatment options for B-CLL patients. Monoclonal antibody rituximab (anti-CD20) is preferably used in combination regimens in B-CLL, often in those containing fludarabine. Very few *in vitro* data exist, however, showing an effect of such common treatment on B-CLL cells with aberrant *p53* and/or *ATM*. In this respect, the data are also missing for a potential application of rituximab with chlorambucil.

The aims were to assess the *in vitro* effect of the above mentioned combinations of drugs on B-CLL cells with various *p53/ATM* status. A metabolic WST-1 assay monitored the drugs effect on cell viability. An *in vitro* system lacking active human plasma was used, thus omitting the CDC pathway. After rituximab pre-treatment ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 72 h) the chemotherapeutics were applied in four concentrations for additional 48 h (F: 25 - $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; CLB: 50 - $6,25 \mu\text{M}$). Two-way analysis of variance (MANOVA) was used for determination of rituximab pre-treatment significance.

For the rituximab/fludarabine combination we tested 46 samples having a median 90 % of B-CLL lymphocytes, with the following characteristics: 14 were wild-type, 14 harbored *ATM* deletion (median 83 % of deleted cells) and 18 exhibited *p53* defects of various complexity. The sensitivity to fludarabine was determined for the concentration $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, which provided significant differences among the samples. The sensitivity was assessed as follows: resistant - viability is over 60 %; medium - viability is between 60 % and 40 %; sensitive - viability is lower 40 %.

The *p53*-affected samples were mostly resistant (72 %) and none were sensitive. Among *ATM* deleted samples, on the contrary, 35,5 % were sensitive, what was more than in wild-type subgroup (14 %). When the viability of fludarabine-trethead and rituximab/fludarabine-treated samples was assessed in relation to fully untreated control, the positive sensitization effect of rituximab pre-treatment ($P = 0,05$) was noted as follows: within the *p53*-affected as well as *ATM*-deleted subgroups in 33 % (36 %) of samples and within the wild-type subgroup in 57 % of samples.

For the rituximab/chlorambucil testing, which was performed as a pilot study in the same manner in sixteen samples, the positive effect of antibody pre-treatment was also noted in some samples of all the three subgroups.

Our results indicate that the *p53/ATM* status is critical for the sensitivity of B-CLL cells to fludarabine. Regardless of the *p53* and *ATM* aberrations, some samples are available for the rituximab-mediated sensitization to this agent. Our pilot data also support a warranty of testing a combined regimen containing rituximab and chlorambucil.

Obsah

OBSAH	1
1 TEORETICKÁ ČÁST	3
1.1 Leukémie	3
1.1.1 B – buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL)	3
1.1.1.1 Subtypy B-CLL.....	4
1.1.1.2 Cytogenetické aberace	5
1.2 Klíčové geny (proteiny) regulující apoptózu a buněčný cyklus v B-CLL lymfocytech	8
1.2.1 p53	8
1.2.1.1 Struktura proteinu p53	8
1.2.1.2 Stabilizace a degradace proteinu p53.....	9
1.2.1.3 Inaktivace proteinu p53	10
1.2.2 ATM.....	10
1.2.3 Bax, Bcl-2	11
1.2.4 Kaspasa-3.....	11
1.3 Nejčastěji používané látky při terapii B-CLL.....	11
1.3.1 Alkylační látky.....	12
1.3.1.1 Chlorambucil (Leukeran).....	12
1.3.2 Adenosinová analoga.....	13
1.3.2.1 Fludarabin (Fludara)	14
1.3.3 Monoklonální protilátky	15
1.3.3.1 Rituximab (Mabthera).....	17
1.4 In vitro testy hodnotící poškození buněk	19
1.4.1 Neklonovací metody	20
1.4.1.1 MTT (tetrazoliové) testy	20
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	22
3 MATERIÁL A METODY	23
3.1 Metody	23
3.1.1 Separace lymfocytů.....	23
3.1.2 Tkáňové kultury	23
3.1.3 Zamrazování buněk.....	23
3.1.4 Příprava buněčných proteinových lyzátů.....	24

3.1.5	Reakce podle Bradfordové – určení koncentrace proteinů	24
3.1.6	SDS-PAGE (elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným)	25
3.1.7	Western blotting (westernový přenos).....	26
3.1.8	Barvení membrány inkoustem	28
3.1.9	Rozmrazování buněk	28
3.1.10	Testování viability buněk.....	28
3.1.11	<i>In vitro</i> testování účinku monoklonálních protilátek a cytostatik.....	28
3.1.12	Statistické vyhodnocení dat	30
3.2	Materiál.....	30
3.2.1	Použité chemikálie.....	30
3.2.2	Použité přístroje	31
4	VÝSLEDKY	32
4.1	Soubor pacientů	32
4.2	Status proteinu p53	32
4.3	Testování kombinace rituximab/fludarabin	36
4.3.1	Citlivost vzorků na fludarabin	36
4.4	Testování kombinace rituximab/chlorambucil	38
4.5	Senzitivizace buněk rituximabem pro fludarabin	39
4.6	Expres proteinu Bax a rezistence na fludarabin.....	44
4.7	Expres proteinu Bcl-2 a rezistence na fludarabin	44
4.8	Expres prokaspasy-3 a kaspasy-3	45
4.9	Expres proteinu p53 po ovlivnění buněk rituximabem a fludarabinem.....	46
5	DISKUSE	48
5.1	Viabilita B-CLL buněk v tkáňové kultuře	48
5.2	Komplexní analýza statutu p53.....	48
5.3	Rezistence B-CLL buněk a léčba.....	50
5.4	Testování viability po aplikaci léčebných látek.....	50
5.5	Expres klíčových proteinů regulujících apoptózu.....	52
6	SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ	54
7	LITERATURA	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
	SEZNAM TABULEK	66
	SEZNAM GRAFŮ	66

1 Teoretická část

1.1 Leukémie

Termín leukémie zahrnuje řadu maligních onemocnění, které postihují hematopoetický systém. Faktorů, ovlivňujících vznik leukémií, je mnoho. Patří sem účinky ionizujícího i neionizujícího záření, působení cytostatik, kouření, účinky různých chemických látek (např. benzen, styren, toluen, ethylen), expozice mykotoxinům a spórám některých běžných plísní a působení tří virů (herpes viru Epsteinova a Barrové – EBV, lidského T-lymfotropního viru – HTLV a lidského viru imunodeficiency – HIV) (Mayer, Starý a kol., 2002).

Základní dělení leukémií je na akutní a chronické. Akutní leukémie se dále dělí na akutní myeloidní leukémie (AML) a akutní lymfoblastickou leukémie (ALL). Chronické leukémie se rozdělují na chronickou myeloidní leukémii (CML) a skupinu chronických lymfocytárních leukémií (CLL) (Mayer, Starý a kol., 2002).

1.1.1 B – buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL)

B-CLL je nejčastější leukémie dospělých v západním světě. V Evropě je její incidence 3 : 100 000 a tvoří zhruba 30 % všech leukémií. Výrazně častěji postihuje osoby starší 50 let, přibližně dvakrát více muže než ženy. U lidí mladších se objevuje velmi zřídka. Děti nepostihuje. Familiární výskyt této choroby je vzácný, přímí příbuzní však mají třikrát vyšší pravděpodobnost získat toto nebo jiné lymfoproliferativní onemocnění (Adam, Vorlíček a kol., 2001).

Choroba se projevuje proliferací a postupnou akumulací klonálních, maligně transformovaných vyvrážděných B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině (Rozman a Montserrat, 1995). Následkem je deregulace krvetvorby a imunitního systému, doprovázená orgánovým selháním, často končící smrtí. Léčba této leukémie běžnými postupy má pouze paliativní charakter, jedinou terapeutickou možností je transplantace krvetvorné tkáně. I ta je však spojena se spoustou rizik.

Po velmi dlouhou dobu (několik desetiletí) byl všeobecně akceptován názor, že B-CLL není primárně poruchou buněčného cyklu, ale apoptózy (Kitada a kol., 1998). Toto tvrzení bylo podpořeno faktem, že B-CLL buňky izolované z periferní krve pacientů jsou zastaveny v G₀/G₁ fázi buněčného cyklu, nerostou v tkáňové kultuře a

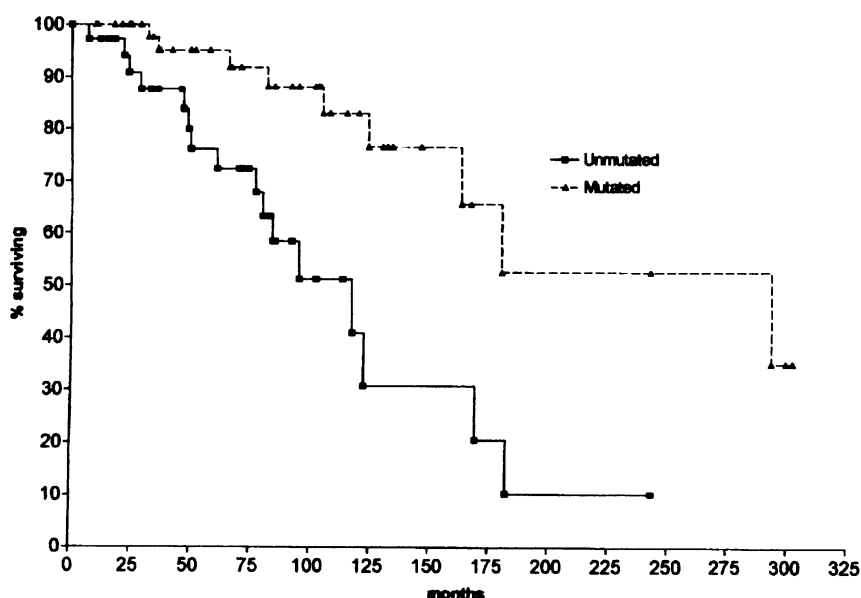
léky působící na proliferující buňky jsou u těchto pacientů často neúčinné. V posledních několika letech však bylo prokázáno, že B-CLL buňky proliferují v tzv. proliferačních centrech, tedy v kostní dřeni a zejména v lymfatických uzlinách. Masivní proliferace (obměna až několika procent B-CLL buněk za týden) byla rovněž potvrzena neobvyklým experimentem *in vivo*, při kterém byla pacientům podávána těžká voda (D₂O) schopná inkorporace do DNA (Messmer a kol., 2005).

1.1.1.1 Subtypy B-CLL

Fyziologické B-lymfocyty vyžívají v kostní dřeni a v rámci tohoto děje přestavují genové segmenty kódující podobu variabilní oblasti imunoglobulinů, které slouží jako B-buněčný receptor (BCR) pro antigeny (Papajík a kol., 2006).

Jedním z nejvýznamnějších objevů na poli výzkumu B-CLL bylo zjištění, že existují dva základní subtypy B-CLL vzniklé z různého stadia vývoje B-lymfocytů. Subtyp s nepřítomností somatických hypermutací v těžkém imunoglobulinovém řetězci (*IgVH*), kde lymfocyty zřejmě ještě neprošly germinálním centrem lymfoidního folikulu, má výrazně špatnou prognózu. Střední doba přežití těchto pacientů je cca 8 let. Subtyp s mutovaným *IgVH* lokusem (lymfocyty již prošly germinálním centrem lymfoidního folikulu) má mnohem lepší prognózu se střední dobou přežití přibližně 25 let (Obr. 1) (Hamblin a kol., 1999).

V posledních letech se také podařilo částečně vysvětlit důvody této odlišné prognózy. Na základě studia sekvenční homologie B-buněčného receptoru (imunoglobulinu) u jednotlivých subtypů B-CLL se ukazuje, že nemutovaný subtyp produkuje polyreaktivní protilátky cílené proti mikrobiálním antigenům nebo autoantigenům, zatímco u mutovaného subtypu se tato polyreaktivita ztrácí (Chiorazzi, Hatzi a Albesiano, 2005; Hervé a kol., 2005). Buňky s mutovaným *IgVH* jsou pak stimulovány k proliferaci mnohem méně.



Obr. 1: Křivky přežití B-CLL pacientů s mutovaným a nemutovaným *IgVH* lokusem (medián přežití pacientů s mutovaným *IgVH*: 293 měsíců; s nemutovaným *IgVH*: 117 měsíců) (z Hamblin a kol., 1999, str. 1852)

1.1.1.2 Cytogenetické aberace

Již zmíněná masivní proliferace B-CLL buněk, velmi pravděpodobně stimulovaná nějakým antigenem nebo autoantigenem, pak umožňuje postupné hromadění cytogenetických abnormalit a vytváření stále agresivnějších klonálních variant. Z nich jsou zdaleka nejčastější tři delece a jedna trisomie (Tabulka 1).

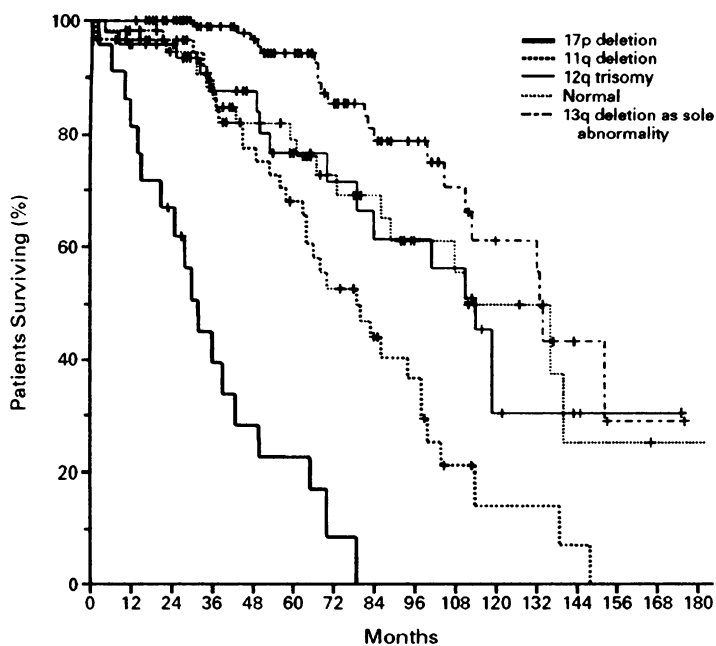
Nejčastěji detekovanou aberací je delece části chromosomu 13 v oblasti q14 (četnost až 50 % všech případů B-CLL). Jsou zde pravděpodobně deletovány důležité miRNA (Calin a kol., 2002). Tato delece je však překvapivě spojena s lepší prognózou, než mají B-CLL buňky bez jakékoli aberace (Obr. 2) (Döhner a kol., 2000).

S četností okolo 20 % se vyskytuje trisomie chromosomu 12. Důsledky tohoto jevu nejsou dosud objasněny. Jeden z genů, který by teoreticky mohl zodpovídat za špatnou prognózu související s touto aberací (Obr. 2) (Juliussen a kol., 1990), je gen *mdm2* (lokalizovaný v oblasti 12q12-15). Protein MDM2 je totiž negativním regulátorem nádorového supresoru p53 a zajišťuje jeho degradaci. Při nadbytečné expresi by tato degradace mohla být patologická.

Heterozygotní delece části chromosomu 11 v oblasti q22-23, vyskytující se s četností 15 – 20 %, má za následek inaktivaci jedné alely nádorového supresoru *ATM*.

Tím je negativně ovlivněna schopnost buňky reagovat na poškození DNA, protože kinasa ATM má klíčovou roli při odpovědi buňky na dvouřetězcové (a zřejmě i jednořetězcové) zlomy v DNA. Tato aberace má velmi špatnou prognózu (Obr. 2) (Döhner a kol., 1999) a je asociována s rezistencí na léčbu, která je právě na poškození DNA a následné indukci apoptózy založena.

Heterozygotní delecce části chromosomu 17 v oblasti p13.1, vyskytující se u B-CLL s četností 10 – 15 %, má za následek delecí jedné alely genu *p53*, přičemž druhá alela bývá v těchto případech velmi často mutovaná (Gaidano a kol., 1991). Tato aberace vykazuje vůbec nejhorší prognózu (Stilgenbauer a kol., 2002) (Obr. 2), protože jsou závažně narušeny dráhy regulující apoptózu, a to jak spontánní, tak i indukovanou léky. Pacienti s aberacemi genu *p53* obzvláště špatně reagují na léčbu (el Rouby a kol., 1993; Döhner a kol., 1995).

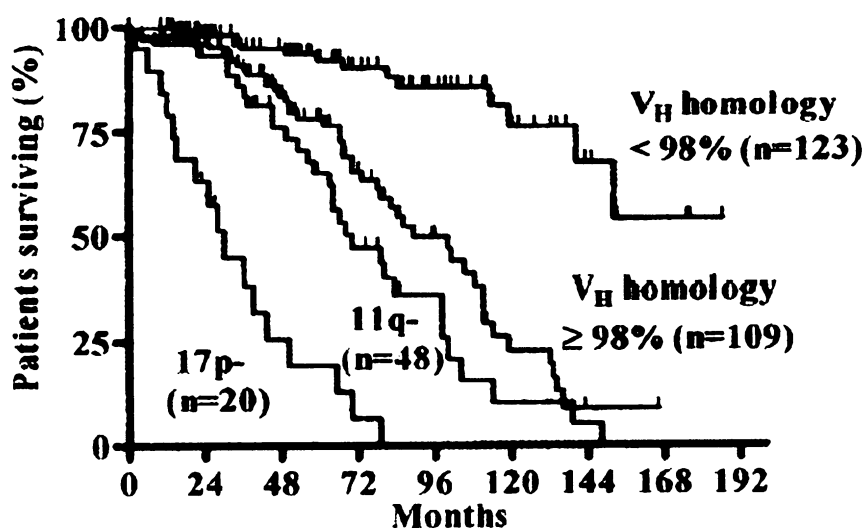


Obr. 2: Pravděpodobnost přežití od data diagnózy onemocnění u pacientů v pěti genetických kategoriích (medián přežití pacientů s delecí 17p: 32 měsíců, s delecí 11q: 79 měsíců, s trisomií chromosomu 12: 114 měsíců, s normálním karyotypem: 111 měsíců, pouze s delecí 13q: 133 měsíců) (z *Döhner a kol., 2000, str. 1913*)

Tabulka 1: Nejčastější chromosomové aberace u B-CLL, jejich frekvence a prognóza

Aberace	Frekvence	Prognóza
delece 13q14	až 50 %	dobrá
trisomie chromosomu 12	cca 20 %	špatná
delece 11q22-23 (delece <i>ATM</i>)	15 – 20 %	špatná, rezistence na léčbu
delece 17p13.1 (delece <i>p53</i>)	10 – 15 %	špatná, rezistence na léčbu

Mutovaný *IgVH* lokus je spojen s vyšším výskytem delece 13q14 (Oscier a kol., 2002). Nemutovaný *IgVH* lokus u B-CLL je spojen s přítomností nepříznivých genomických aberací (Kröber a kol., 2002; Trbušek a kol., 2006) jako je delece 11q (s ní je asociován velmi silně), delece 17p a trisomie chromosomu 12. Výskyt těchto aberací ještě zhoršuje již tak špatnou prognózu pacientů s nemutovaným *IgVH* lokusem (Kröber a kol., 2002).



Obr. 3: Křivky přežití 300 pacientů s delecí 17p a 11q (bez ohledu na mutační status *IgVH*), s mutovaným a nemutovaným *IgVH* lokusem (bez delece 17p nebo 11q) (medián přežití pacientů s delecí 17p: 30 měsíců, 11q: 70 měsíců, nemutovaným *IgVH*: 89 měsíců, mutovaným *IgVH*: nedosažen za 152 měsíců – přežití 54 %) (z Byrd a kol., 2004, str. 167)

1.2 Klíčové geny (proteiny) regulující apoptózu a buněčný cyklus v B-CLL lymfocytech

Na patogenezi B-CLL se podílejí jak poruchy v genech regulujících apoptózu, tak v genech regulujících buněčný cyklus (Trbušek a Mayer, 2004). Mnohé z genů navíc prokazatelně hrají roli v obou těchto procesech. Z těchto poznatků vyplývá, že možnosti terapie B-CLL nejsou jen na poli indukce apoptózy, ale lze uvažovat např. o vyvedení B-CLL buněk na dráhu proliferace s následným využitím látek účinných na dělící se buňky (Goodman a kol., 1996).

1.2.1 p53

Protein p53 je neznámější nádorový supresor, exprimovaný ve všech tkáních. Často bývá nazýván „strážcem genomu“. Byl objeven v roce 1979 Lanem a Crawfordem. Jedná se o jaderný protein obsahující 393 aminokyselin. Gen pro tento protein je lokalizován na krátkém raménku chromosomu 17. Přítomnost mutace v genu pro protein p53 se vyskytuje u více než 50 % lidských nádorů (Hollstein a kol., 1991; Lane, 1994; Hainaut a Hollstein, 2000).

Protein p53 zajišťuje přiměřenou odpověď na buněčný stres – zastavuje buněčný cyklus v G₁ nebo G₂ fázi a iniciuje opravu poškozené DNA nebo indukuje apoptózu (v případě neopravitelného poškození DNA). Je to transkripční faktor – působí většinou jako aktivátor transkripce cílových genů (v některých případech i jako represor transkripce), biologicky aktivní je ve formě tetrameru. Dosud bylo popsáno více než 60 cílových genů, prostřednictvím jejichž aktivace p53 navozuje např. blok buněčného cyklu s opravou DNA, apoptózu nebo inhibici angiogeneze (Vogelstein a kol., 2000). Díky tomuto rozsáhlému spektru aktivit je inaktivace p53 považována téměř za univerzální krok ve vývoji většiny nádorů.

1.2.1.1 Struktura proteinu p53

Protein p53 obsahuje čtyři funkční a regulační domény – N-koncovou, centrální, oligomerizační a C-koncovou (Hupp, Lane a Ball, 2000) (Obr. 4).

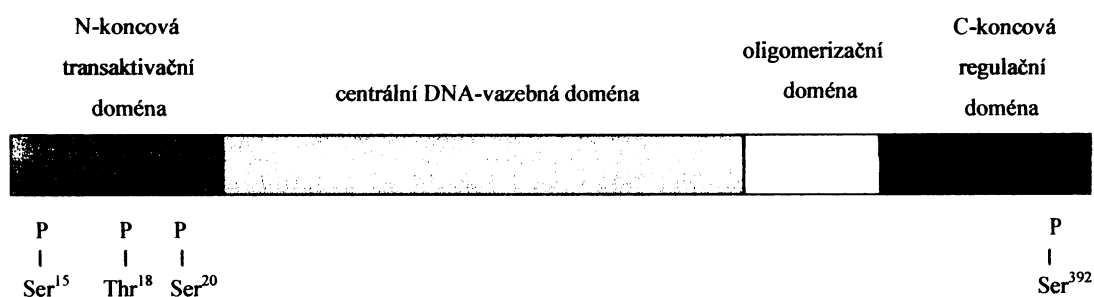
Centrální, sekvenčně specifická DNA-vazebná doména (aminokyseliny 90 – 295) je evolučně konzervována u obratlovců. Je uspořádána do β -skládaného listu,

který tvoří lešení pro LSH (loop-sheet-helix) motiv, a dvou smyček, které jsou koordinačně vázány zinkovým iontem (Hupp, Lane a Ball, 2000).

Oligomerizační doména (aminokyseliny 320 – 356) je evolučně konzervována stejně jako centrální doména. Je tvořena dimerem antiparalelního β -skládaného listu a antiparalelním uspořádáním helix/helix. Tyto dimery spolu reagují hydrofobními konci tak, že čtyřhelixové uspořádání tvoří tetramer (Hupp, Lane a Ball, 2000).

N-koncová doména je transaktivační doména, díky které p53 interaguje se součástmi transkripční mašinerie. V této doméně se vyskytují aminokyseliny Ser¹⁵, Thr¹⁸ a Ser²⁰, což jsou cílová místa pro fosforylaci, která mají důležitou funkci při stabilizaci p53 (fosforylace ATM nebo jinou protein kinasou) (Hupp, Lane a Ball, 2000).

C-koncová regulační doména hraje důležitou roli v posttranslačních modifikacích p53. Jednou z jejích funkcí je udržovat protein v latentním stavu (v transkripčně inaktivní formě). Vyskytuje se zde další cílové místo pro fosforylaci – Ser³⁹² (je fosforylován kasein kinasou 2 nebo double-strand-RNA-dependentní protein kinasou) (Hupp, Lane a Ball, 2000).



Obr. 4: Struktura proteinu p53 včetně znázornění důležitých fosforylačních míst v jednotlivých doménách (podle Hupp, Lane a Ball, 2000, str. 3)

1.2.1.2 Stabilizace a degradace proteinu p53

Za normálního stavu je hladina proteinu p53 v buňkách nízká a většinou nedetekovatelná. Po poškození DNA se však protein stabilizuje a rychleji se přesunuje do jádra, kde indukuje transkripci genů zastavujících buněčný cyklus nebo spouští geny regulující apoptózu. Pro indukci proteinu p53 je důležitá jeho fosforylace na Ser¹⁵, která

blokuje vazbu proteinu MDM2, a tím zabraňuje degradaci p53 (Prives, 1998). Tuto fosforylaci provádí kinasa ATM po poškození DNA ionizujícím zářením nebo chemickými látkami (Banin a kol., 1998).

Protein p53 je před degradací označován ubiquitinem pomocí proteinu MDM2 (se kterým tvoří zpětnovazebnou smyčku, kde p53 funguje jako transkripční faktor pro gen *mdm2*) a následně je degradován v proteasomu (Shieh a kol., 1997). Protein MDM2 tedy působí jako negativní regulátor funkce proteinu p53. To také vysvětluje, proč u pacientů s mutovaným proteinem p53 dochází k hromadění tohoto proteinu v buňkách – mutovaný p53 nemůže vyvolat transkripci svého negativního regulátoru MDM2 (Blagosklonny, 1997). Je však důležité si uvědomit, že toto platí jen v případě delece druhé alely genu *p53*, protože pokud je jen jedna alela mutovaná, avšak druhá přítomná a funkční, ke zvýšené (abnormální) expresi proteinu p53 nedochází – tetramer složený ze zdravé alely stále indukuje gen *MDM2* (Blagosklonny, 2000). Monitorování hladiny proteinu p53 (prováděné nejčastěji imunohistochemicky nebo pomocí western blottingu) je tak důležitým ukazatelem funkčnosti tohoto nádorového supresoru.

1.2.1.3 Inaktivace proteinu p53

K inaktivaci proteinu p53 dochází interakcí s virovými nebo buněčnými onkoproteiny, jadernou exkluzí a (nejčastěji) delecí a/nebo mutací. Převážná většina mutací (87,2 %) jsou mutace záměnové (bodové mutace vedoucí k záměně jedné aminokyseliny), vyskytující se hlavně v centrální DNA-vazebné doméně (Hainaut a Hollstein, 2000; Šmardová a kol., 2004). U B-CLL je mutace jedné alely často spojena s delecí alely druhé (Gaidano a kol., 1991). Účinek mutace může být také dominantně – negativní, tzn. že produkt mutované alely genu *p53* inaktivované bodovou mutací může tvořit s produktem standardní alely komplex, který je částečně aktivní nebo inaktivní (de Vries a kol., 2002).

1.2.2 ATM

ATM je gen, který je mutovaný u pacientů se syndromem *ataxia telangiectasia* (ATM = ataxia telangiectasia mutated). Tito pacienti trpí nahromaděnými poškozeními v DNA, která nejsou opravována, a rovněž se u nich ve zvýšené míře vyskytují hematologické malignity – leukémie a lymfomy (Taylor a kol., 1996).

Hlavní funkcí proteinu ATM je odpověď buňky na dvouřetězcové zlomy v DNA, které nastávají v průběhu normálního vývoje nebo jsou vyvolány vnějšími vlivy, např. působením ionizujícího záření. Odpovědí buňky může být oprava poškozené DNA, zastavení buněčného cyklu nebo indukce apoptózy (Stankovic a kol., 2002).

Gen *ATM* je u pacientů s B-CLL často (až 30 % případů) mutován nebo deletován (Stankovic a kol., 2002). Výskyt ojedinělých B-CLL pacientů se společnou inaktivací genů *p53* a *ATM* svědčí o tom, že selekční tlak v leukemických buňkách působí proti nějaké společné aktivitě těchto dvou proteinů (Pettitt a kol., 2001).

1.2.3 Bax, Bcl-2

Dva proteiny, které spolu tvoří heterodimer. Na jejich vzájemném poměru závisí, zda u buňky proběhne či neproběhne apoptóza.

Protein Bax je hlavní proapoptotický protein, v buňce může být indukován ionizujícím zářením. Protein Bcl-2 působí antiapoptoticky – blokuje „mitochondriální“ dráhu vedoucí k apoptóze (Rosypal, 2002).

Zvýšená exprese proteinu Bcl-2 byla zaznamenána asi u 80 % B-CLL pacientů (Hanada a kol., 1993). Faderl a kol. (2002) uvádí ve své práci vysokou hladinu proteinu Bcl-2 jako významný negativní faktor z hlediska přežití pacientů a také rezistence na léčbu fludarabinem. Samotná zvýšená exprese tohoto proteinu však není schopna navodit maligní transformaci buňky.

1.2.4 Kaspasa-3

Je to klíčová kaspasa (cysteinová proteasa), která indukuje apoptózu B-CLL lymfocytů, spontánní i indukovanou léky (Stoetzer a kol., 1999). U studovaných pacientů s B-CLL je prokázána exprese prokaspasy-3, ale nedochází k její aktivaci na funkční kaspasu-3 (King a kol., 1998).

1.3 Nejčastěji používané látky při terapii B-CLL

Nejčastěji používanými látkami při terapii B-CLL jsou stále chemoterapeutika. Klasickými, běžně používanými léky, jsou chlorambucil (alkylační látka) a fludarabin

(adenosinové analogum). Dále se používají kortikosteroidy a různé polychemoterapeutické režimy (kombinace různých cytostatik). V poslední době se však v praxi stále více uplatňují monoklonální protilátky (rituximab, alemtuzumab) či jejich kombinace s některými chemoterapeutiky.

1.3.1 Alkylační látky

Alkylační látky mají různorodou chemickou strukturu, obsahují však reaktivní alkylové skupiny s relativním deficitem elektronů (tzv. elektrofilní skupiny). Tyto skupiny atakují nukleofilní části molekul (atomy dusíku, fosforu, kyslíku) za tvorby kovalentní vazby. Alkylační cytostatika se rozdělují podle způsobu alkylace na jednofunkční a bifunkční.

Alkylační látky se váží nejen na nukleofilní skupiny nukleových kyselin, ale také na proteiny a menší molekuly. Alkylace DNA způsobuje mnoho poškození (odloučení purinové báze, jednořetězcové i dvouřetězcové zlomy, vnitřní vazby uvnitř řetězce nebo mezi řetězci). Tím je poškozena genetická informace buňky a pokud není poškození včas opraveno, buňka zaniká. Zvýšení oprav poškození DNA je jedním z mechanismů rezistence nádorových buněk na chemoterapeutika.

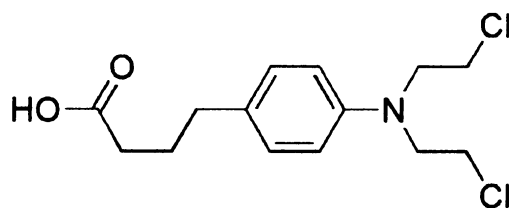
Alkylační cytostatika reagují s nukleovými kyselinami v buňce nezávisle na fázi buněčného cyklu, z čehož vyplývají i jejich nežádoucí účinky – působí totiž stejně na nádorové i normální buňky a způsobují tak dlouhodobé poruchy krvetvorby, neplodnost, působí mutageně a karcinogeně na kmenové hematopoetické buňky, což může vést až ke vzniku sekundární akutní leukémie (Vorlíček, Vyzula, Adam a kol., 2000).

1.3.1.1 Chlorambucil (Leukeran)

Chlorambucil jako aktivní látku pro léčbu B-CLL identifikoval v 60. letech 20. století Galton (Galton, 1961). Je to bifunkční alkylační látka (Obr. 5) odvozená od dusíkatého yperitu (nitrogen mustardu). Alkyluje nukleofilní skupiny DNA a má afinitu ke thiolovým skupinám proteinů. Do buněk se dostává prostou difúzí. Jedním z jeho metabolitů je kyselina fenyloctová, která má stejné účinky jako chlorambucil, ostatní metabolity jsou již neúčinné. Používá se hlavně v perorální formě (Vorlíček, Vyzula, Adam a kol., 2000).

Alterace v genu *p53*, který kontroluje vstup buňky do apoptózy, jsou jedna z možností rezistence B-CLL pacientů na chlorambucil (Panasci a kol., 2001). Mutace nebo delece tohoto genu silně koreluje se špatnou klinickou odpovědí na chlorambucil (Begleiter a kol., 1996; Silber a kol., 1994, el Rouby a kol., 1993). Dle Sturma a kol. (2003) je terapie chlorambucilem spojena se vznikem mutací v genu *p53* a následnou rezistencí nejen na alkylační látky ale i další cytostatika (fludarabin) a γ -záření.

Pacienti s mutacemi v genu *ATM* také vykazují rezistenci na léčbu chlorambucilem (Austen a kol., 2005).



Obr. 5: Chemická struktura chlorambucilu

1.3.2 Adenosinová analoga

Adenosinová analoga patří do skupiny antimetabolitů. Antimetabolity působí na nádorové buňky tak, že svojí podobností s fyziologickými metabolity „ošálí“ enzym. Činnost enzymu je pak tímto antimetabolitem kompetitivně inhibována nebo je antimetabolit zainkorporován do syntetizovaného produktu. Funkce takto modifikovaného produktu je však porušena.

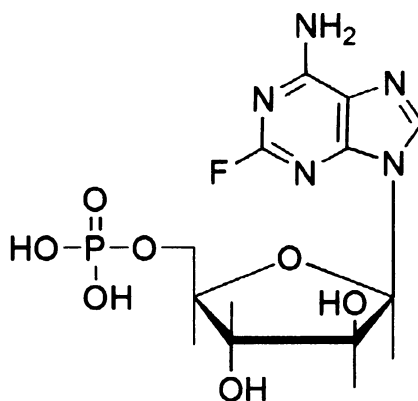
Většina antimetabolitů zasahuje do syntézy nukleových kyselin, nemá však výrazný vliv na funkci nukleových kyselin hotových. Z toho vyplývá, že antimetabolity působí především na proliferující buňky.

Adenosinová analoga se začala ve větší míře používat v posledních 15 letech (Cheson, 1992). Jejich použití je omezeno na maligní lymfoproliferativní onemocnění. Mezi nežádoucí účinky patří útlum krvetvorby, neurotoxicita a dlouhodobá imunosuprese (Vorlíček, Vyzula, Adam a kol., 2000).

1.3.2.1 Fludarabin (Fludara)

Fludarabin, arabinosyl-2-fluoroadenosin monofosfát (Obr. 6), je po aplikaci v organismu extracelulárně rychle defosforylován. Po průniku do buňky je postupně enzymaticky pomocí deoxycytidinkinasy opět fosforylován na trifosfát, což je vlastní účinná látka. Tento trifosfát blokuje metabolismus purinů a nukleových kyselin na několika úrovních (inhibice ribonukleotidreduktasy, DNA-polymerasy α , DNA-primasy a DNA-ligasy). Netvoří se tedy deoxyribonukleotidy, které jsou potřebné pro syntézu a opravy DNA, z čehož je jasné, že fludarabin působí především na dělící se buňky (Vorlíček, Vyzula, Adam a kol., 2000). Toxický vliv má ale i na buňky klidové, mechanismy účinku však nejsou zatím zcela jasné. Předpokládá se, že v nich indukuje fragmentaci nukleových kyselin, tedy apoptózu (Robertson a kol., 1993).

Účinek fludarabinu je cílený na lymfoidní tkáň, maligně změněnou i normální, na ostatní nádory nemá vliv. Je to způsobeno intenzivnějším transmembránovým transportem a rychlejší intracelulární fosforylací na aktivní metabolit v lymfoidních buňkách. Aplikuje se nitrožilně (Plunkett, Huang a Gandhi, 1990).

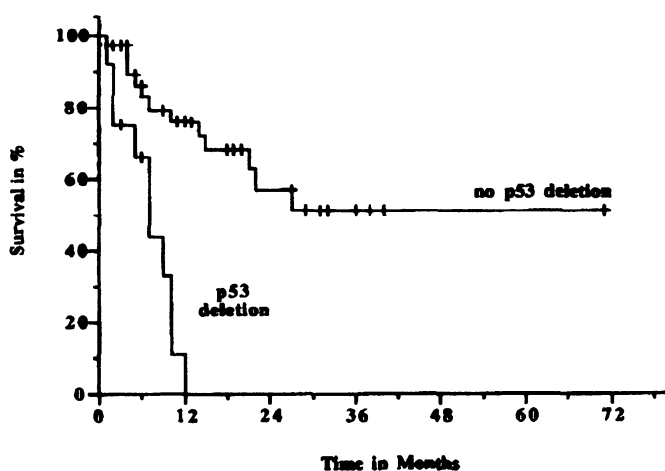


Obr. 6: Chemická struktura fludarabinu

Podle prvních studií (Grever a kol., 1988; Keating a kol., 1989; Keating a kol., 1991) měl fludarabin jednoznačnou a rychlou antileukemickou aktivitu i u pacientů s pokročilou chorobou a u pacientů rezistentních na terapii alkylačními cytostatiky. Montserrat a kol. (1996) ve své práci udávají, že citlivost na fludarabin korelovala se senzitivitou choroby k předchozí léčbě, a Sorensen a kol. (1997) uvádějí, že nízká odpověď pacientů s pokročilou chorobou na fludarabin může být dána právě pokročilostí choroby, lymfadenopatiemi, organomegaliemi a/nebo předchozí léčbou.

Později byla sledována rezistence na fludarabin v souvislosti s přítomností mutace či delece genu *p53*. Bylo zjištěno, že pokud se u pacienta vyskytuje delece *p53*, má většinou zvýšenou rezistenci i na terapii fludarabinem (Obr. 7), kratší dobu přežití a intervaly bez léčby (Döhner a kol., 1995; Stilgenbauer, Lichter a Döhner, 2000). Odpověď na terapii fludarabinem u pacientů s mutacemi v *p53* byla také velmi slabá (el Rouby a kol., 1993; Wattel a kol., 1994; Sturm a kol., 2003).

Nízké hladiny proteinu ATM v B-CLL buňkách byly spojeny s nízkou indukcí apoptózy fludarabinem (Kojima a kol., 2006). Ve studii, kterou publikovali Austen a kol. (2005), vykazovali pacienti s mutovaným *ATM* na léčbu fludarabinem také špatnou odpověď.



Obr. 7: Pravděpodobnost přežití od začátku terapie fludarabinem u 50 B-CLL pacientů s (12 pacientů) a bez (38 pacientů) delece *p53* (medián přežití pacientů s delecí *p53*: pouze 7 měsíců, bez delece *p53*: nebyl dosažen) (podle Döhner a kol., 1995, str. 1586)

1.3.3 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (rituximab, alemtuzumab) se v hematologii uplatňují stále více. Ve srovnání s klasickými cytostatiky totiž mají řadu výhod – působí selektivněji na nádorové buňky (vážou se pouze na buňky, na nichž se vyskytuje příslušný antigen) a mají menší spektrum nežádoucích účinků. Jejich použití pro léčbu je však velmi nákladné.

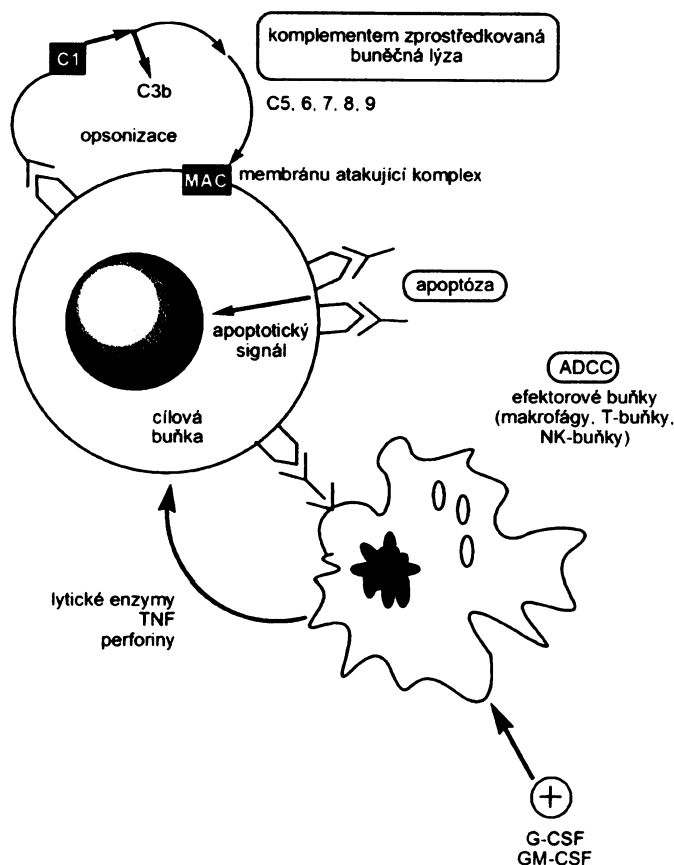
Účinnost monoklonální protilátky závisí na homogenitě antigenu a míře exprese (hustotě) antigenu na povrchu maligní buňky. Účinnost může být také negativně ovlivněna přítomností volných antigenů v extracelulární tekutině, špatným krevním zásobením tumoru a jeho velikostí.

Monoklonální protilátky proti buněčnému antigenu po navázání na cílovou buňku působí třemi různými mechanismy: aktivují komplement, způsobují cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC) s následnou fagocytózu buňky a blokádu cytokinů a růstových receptorů mohou indukovat apoptózu. Jako hlavní mechanismus účinku *in vivo* se předpokládá protilátkami zprostředkovaná cytotoxicita (Obr. 8) (Vorlíček, Vyzula, Adam a kol., 2000).

U prvního mechanismu účinku – při lýze buňky komplementem dochází ke vzniku aktivního komplexu atakujícího membránu. Soustava komplementu se skládá z cca 30 sérových a membránových proteinů, které kooperují jak mezi sebou, tak s dalšími imunitními mechanismy. Aktivace komplementové kaskády je kontrolována plazmatickými i membránovými inhibitory (Hořejší a Bartůňková, 2001).

Druhou možností působení monoklonálních protilátek je ADCC, která je zprostředkována efektorovými buňkami, mezi něž patří NK buňky a fagocytující buňky (makrofágy, eosinofilní a neutrofilní granulocyty), nesoucími receptor pro Fc konec imunoglobulinů. Efektorové buňky likvidují protilátkou označené patologické buňky prostřednictvím perforinů, granzymů a TNF- α . Mohou také indukovat apoptózu prostřednictvím systému Fas – Fas ligand (Mayer, 2004). ADCC může též aktivovat systém kaspas, který vede k apoptóze buňky (Doubek, Ráčil a Mayer, 2006).

Třetím mechanismem působení je apoptóza. Jedná se o alternativní proces k nekrotické buněčné smrti. Poprvé byla popsána Kerrem a kol. v roce 1972. Je to zcela fyziologický děj, při kterém dochází postupně k redukci velikosti buňky, ztrátě mezibuněčného kontaktu, kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a změnám mitochondriálního potenciálu. Celý proces je řízen signální transdukcí a končí fagocytózou dané buňky makrofágy nebo histiocyty. Existují dvě základní dráhy apoptózy, vnější „receptorová“ dráha a vnitřní „mitochondriální“ dráha. Tyto dvě dráhy jsou navzájem propojeny prostřednictvím několika proteinů. Obě zmiňované protilátky již pouhou vazbou na buněčnou membránu *in vitro* inhibují buněčnou proliferaci a indukují apoptózu (Mayer, 2004; Doubek, Ráčil a Mayer, 2006).

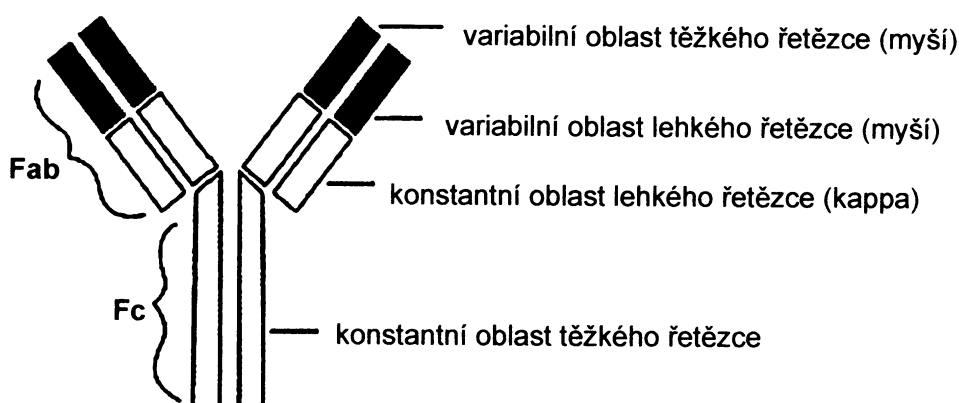


Obr. 8: Mechanismy působení monoklonálních protilátek (podle Mayer a Adam, 2004, str. 221)

1.3.3.1 Rituximab (Mabthera)

Rituximab je chimérická monoklonální protilátka (Obr. 9), složená z variabilní části těžkého a lehkého řetězce myší protilátky proti CD20 a konstantní části lidského IgG₁ a konstantní části lidského řetězce kappa. Těžké řetězce jsou složeny z 451 aminokyselin a lehké z 213 aminokyselin. Je vyráběna v kultuře ovariálních buněk čínských křečků. Je to první monoklonální protilátka, která získala v roce 1997 povolení k léčbě onkologických chorob (Mayer, 2004).

CD20 je antigenní struktura, která charakterizuje B-lymfocyty. Na jiných buňkách se nevyskytuje. Jedná se o integrální transmembránový neglykosylovaný hydrofobní fosfoprotein, který prochází čtyřikrát buněčnou membránou. Obsahuje 297 aminokyselin (Mayer, 2004).



Obr. 9: Schematické znázornění struktury rituximabu

Rituximab se selektivně váže na CD20 pozitivní buňky. Jedná se o buňky řady lymfoproliferací, ale také o normální B-lymfocyty. Struktura CD20 je po navázání protilátky na membráně stabilní, neuvolňuje se. Mechanismus účinku je mnohostranný (viz kapitola 1.3.3) a v některých směrech zásadně odlišný od působení cytostatik. Dominantním mechanismem je však protilátkami zprostředkovaná cytotoxická reakce. Podává se nitrožilně (Mayer, 2004).

Rituximab, použitý samostatně, má pouze omezenou aktivitu, a to z důvodu snížené exprese CD20 antigenu na povrchu B-CLL buněk. Ta je mnohem nižší než u jiných lymfoproliferací B-řady (Maloney, Smith a Rose, 2002). Standardní dávky rituximabu vedou k vyšší míře odpovědi u zatím neléčených pacientů než u pacientů s relapsy (Liu a O'Brien, 2004). Ukazuje se, vyšší dávky rituximabu jsou spojeny s vyšším výskytem léčebné odpovědi (Mavromatis a Cheson, 2003; Lin a kol., 2004).

Podle Byrda a kol. (2003) se dá podle přítomné cytogenetické abnormality u B-CLL předpovědět, jaká bude odpověď pacienta na léčbu rituximabem. Nejnižší terapeutická odpověď byla u pacientů s delecí *p53* – žádný z pacientů s touto delecí na léčbu nezareagoval ($n = 5$). Pacienti s delecí *ATM* a delecí 13q14 byli na léčbu rituximabem citliví. Jako možnost pro léčbu pacientů s delecí *p53*, kteří jsou rezistentní na rituximab, se jeví použití alemtuzumabu, protože pacienti s touto delecí na léčbu alemtuzumabem reagovali (Stilgenbauer a Döhner, 2002; Lozanski a kol., 2004).

Z řady experimentálních studií vyplývá, že rituximab senzitivizuje nádorové buňky k různým cytostatikům. Kombinace rituximabu např. s fludarabinem vykazuje vyšší odpověď pacientů na léčbu, vyšší počet celkových remisí, a to i u pacientů rezistentních na fludarabin samotný (Nabhan, Gartenhaus a Tallman, 2004; Lin a kol.,

2004). Lepších výsledků se dosahuje u pacientů, kteří ještě neprodělali žádnou léčbu, než u již léčených pacientů (Kay, Rai a O'Brien, 2006; Wendtner, Eichhorst a Hallek, 2004).

Vhodné se jeví použití rituximabu v kombinaci s další monoklonální protilátkou – alemtuzumabem. Smolewski a kol. (2005) totiž zjistili, že kombinace těchto dvou monoklonálních protilátek zvyšuje proapoptotickou aktivitu B-CLL buněk *in vitro*, a to i v případě, že pacienti byli na samotný alemtuzumab rezistentní. Také Faderl a kol. (2003) ve své klinické studii uvádějí, že kombinace rituximabu s alemtuzumabem byla přínosná, obzvláště u pacientů s rezistentní chorobou a špatnou prognózou.

Rituximab je také účinný v léčbě komplikací B-CLL jako je čistá aplázie červené řady, autoimunitní trombocytopenie a autoimunitní hemolytická anémie (Liu a O'Brien, 2004).

1.4 *In vitro* testy hodnotící poškození buněk

In vitro testování má nezastupitelné místo v testování nových, potenciálně léčebných látek, tvorbě nových léčebných protokolů a v některých případech i při volbě individuální terapie. Testování účinnosti nových chemoterapeutik na tkáňových kulturách a primokulturách je prvním krokem v určení účinnosti nových léčiv a sledování mechanismu účinku těchto látek. Metody testování *in vitro* jsou založeny na dvou odlišných principech (klonovací a neklonovací přístup), které hodnotí různě stupeň poškození nádorových buněk.

Klonovací metody nedokážou určit buněčné poškození u buněk v G_0 fázi, ale dokážou rozlišit nádorové buňky od buněk normálních. Metabolické testy (neklonovací metoda) hodnotí vitalitu buněk ve všech fázích buněčného cyklu, ale hodnotí jak nádorovou, tak nenádorovou populaci. Kromě toho všechny tyto testy hodnotí pouze stupeň poškození, ale ne příčinu. Dalším krokem proto je hodnocení buněčného cyklu na flow-cytometru, sledování apoptotických markerů a sledování některých signálních drah. Na základě těchto testů jsou vytipované buněčné linie a kombinace cytostatik hodnoceny čipovou analýzou a je hodnocena genová exprese (Chumchalová a Kovařík, 2000).

1.4.1 Neklonovací metody

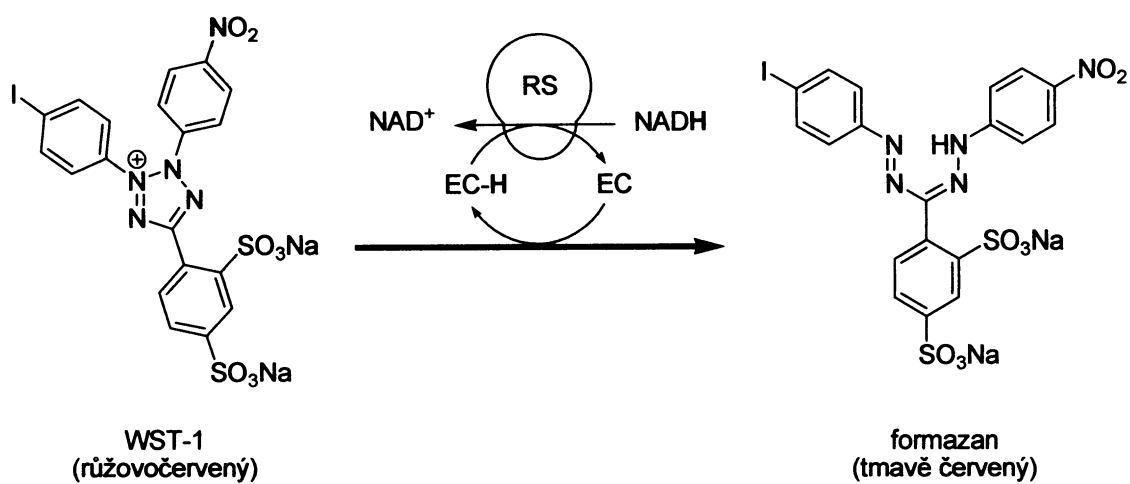
Neklonovací metody využívají k detekci živých buněk jejich metabolickou aktivitu nebo změny v membránové integritě, které jsou reakcí na buněčné poškození. Na provedení testu je třeba poměrně málo buněk (cca 10 – 80 000 buněk/jamka), doba provedení testu je krátká (řádově dny) a úspěšnost provedení je téměř 100 %. Tyto testy postihnou i buňky v G₀ fázi a může se provést testování většího počtu látek. Problémem je to, že testy nerozlišují maligní buňky od nemaligních (Chumchalová a Kovařík, 2000).

1.4.1.1 MTT (tetrazoliové) testy

Patří do skupiny neklonovacích metod, konkrétně mezi testy využívající metabolickou aktivitu buněk (redukční testy). Je to nejrozšířenější metoda pro *in vitro* testování chemosenzitivity či chemorezistence nádorových buněk.

Tento test byl popsán Mosmannem v roce 1983. Rozlišení živých a mrtvých buněk je založeno na schopnosti živých buněk redukovat svými mitochondriálními enzymy (sukcinátdehydrogenasou) tetrazoliové soli na formazany. Výsledkem je jinak barevný produkt reakce. Intenzita zbarvení produktu je měřena pomocí spektrofotometru.

WST-1 assay slouží k neradioaktivní spektrofotometrické kvantifikaci buněčné proliferace, růstu, viability a chemosenzitivity. Dochází zde ke štěpení tetrazoliové soli WST-1 (4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonátu) na formazan a změně zbarvení z růžovočervené na tmavě červenou (Obr. 10). Intenzita zbarvení je měřena pomocí spektrofotometru (ELISA reader) při 450 nm.



Obr. 10: Štěpení tetrazoliové soli WST-1 (4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonátu) na formazan (EC = elektron coupling reagent, RS = mitochondriální sukcinát-tetrazolium reduktasový systém)

2 Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo *in vitro* testování citlivosti buněk s poruchami genů *ATM* a/nebo *p53* na cytostatika a monoklonální protilátku rituximab a zjišťování, zda vzorky mohou být monoklonální protilátkou rituximab senzitivizovány. Dále pak sledování exprese některých klíčových proteinů v závislosti na rezistenci/citlivosti vzorku na daná chemoterapeutika. V rámci toho bylo cílem zvládnout následující vybrané metodiky a postupy:

1. Zvládnout metodiku zpracování vzorků krve od pacientů s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií pro western blotting a testy viability buněk po aplikaci monoklonální protilátky a cytostatik.
2. Zvládnout metodiku western blottingu pro proteiny p53, PCNA, Bax, Bcl-2 a kaspasu-3.
3. Zvládnout metodiku testování viability (metabolické aktivity) B-CLL buněk po aplikaci vybraných chemoterapeutik (fludarabin, chlorambucil) a monoklonální protilátky rituximab.
4. Interpretovat výsledky svých experimentů ve vztahu k dalším datům produkovaným na pracovišti diplomové práce.

3 Materiál a metody

3.1 Metody

3.1.1 Separace lymfocytů

5 ml krve bylo odebráno do 300 μ l 0,5 M EDTA (pH = 8,0). Ke krvi byl přidán roztok PBS v poměru 1 : 1. 5 ml této směsi bylo navrstveno na 4 ml roztoku Histopaque 1077 a stočeno 1 200 ot./min, 20 min. Pomocí plastické pasteuovy pipety byl odsát koláč mononukleárních buněk (z nichž tvořily dominantní část lymfocyty) a bylo k nim přidáno 5 ml PBS. Tato směs byla centrifugována 5 min, 1 200 ot./min. Sediment byl dle potřeby rozsuspendován v médiu RPMI-1640 s 10% fetálním bovinním sérem (FBS), nebo byly buňky lyzovány pro izolaci proteinů či byla část buněk zamražena.

PBS (phosphate-buffered saline) 1 l: 8 g NaCl

0,2 g KCl

2,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0,24 g KH_2PO_4

doplněno do 1 l destilovanou vodou, autoklávováno
(20 min, 120 °C)

3.1.2 Tkáňové kultury

Buňky izolované výše popsaným způsobem byly kultivovány za standardních podmínek v médiu RPMI-1640 s 10% fetálním bovinním sérem, antibiotiky (penicilin: 100 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$, streptomycin: 0,1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 2 mM L-glutaminem při 37 °C v 5% CO_2 po dobu zhruba 24 hod.

3.1.3 Zamrazování buněk

Při větším množství separovaných buněk byla část zamrazena. Po promytí lymfocytů PBS byl pelet resuspendován dle velikosti v zamrazovací směsi

(FBS : DMSO = 9 : 1) a po 1 ml rozpipetován do zamrazovacích ampulí. Ampule byly okamžitě umístěny na – 80 °C a druhý den uloženy do tekutého dusíku.

3.1.4 Příprava buněčných proteinových lyzátů

Použity byly lymfocyty izolované z krve pacientů.

Buněčná kultura byla centrifugována ve sterilní 10 ml zkumavce 1 200 ot./min, 5 min. Pelet byl rozsuspendován v 5 ml roztoku PBS a opět centrifugován (1 200 ot./min, 5 min). Po odsátí PBS byl pelet resuspendován dle velikosti ve 100 – 400 µl kompletního lyzačního pufru. Lyzát byl přenesen do předchlazené 1,5 ml zkumavky a 30 min inkubován na ledu. Poté byl centrifugován (13 000 ot./min) 30 min při 4 °C. Supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky a uchován při – 80 °C.

Lyzační pufr pro proteiny: 150 mM NaCl
1% NP-40
50 mM Tris (pH = 8,0)
50 mM NaF
5 mM EDTA (pH = 8,0)

Kompletní lyzační pufr byl připraven těsně před použitím přidáním inhibitoru proteas (Sigma) a inhibitoru fosfatas (Sigma) v poměru 1 : 100.

3.1.5 Reakce podle Bradfordové – určení koncentrace proteinů

V mikrozkušavce bylo smícháno 800 µl destilované vody (Milli Q), 200 µl roztoku Bio-Rad Protein Assay a 1 µl proteinového lyzátu. Pak byla směs promíchána. Po 5 min bylo 100 µl směsi přeneseno do UV-kyvety. Absorbance vzorku byla měřena na spektrofotometru Bio Photometer (Eppendorf).

Výpočet koncentrace proteinů v lyzátu: $c = \frac{A - 0,01187}{0,07295}$ (vzorec pro výpočet

koncentrace odvozen dle kalibrace bovinním sérovým albuminem – BSA).

Výpočet objemu odpovídajícímu 30 μg proteinů: $\frac{30}{c/2}$ (je nutné počítat

s poloviční koncentrací, protože při nanášení na gel je proteinový lyzát ředěn nanášecím pufrem v poměru 1 : 1).

3.1.6 SDS-PAGE (elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným)

Anionický detergent SDS se váže na bílkoviny a udílí jim uniformní záporný náboj. Proteiny potom putují k anodě a jejich mobilita je závislá pouze na velikosti molekuly. Separace probíhá v gelu o rozměrech 9 × 7 cm. Koncentrace akrylamidu byla u rozdělovacího gelu 10 % (v případě detekce proteinu p53 a PCNA) a 12 % (v případě detekce proteinu Bcl-2, Bax a kaspasy-3), u zaostřovacího gelu byla koncentrace ve všech případech 5 %.

Příprava gelu:

rozdělovací gel 10%: 4,8 ml destilované vody

2,5 ml roztoku 40% akrylamidu s bisakrylamidem

2,5 ml 1,5 M Tris pufru (pH = 8,8)

100 μl 10% SDS

100 μl 10% APS

4 μl TEMED

rozdělovací gel 12%: 4,3 ml destilované vody

3,0 ml roztoku 40% akrylamidu s bisakrylamidem

2,5 ml 1,5 M Tris pufru (pH = 8,8)

100 μl 10% SDS

100 μl 10% APS

4 μl TEMED

zaostřovací gel: 1,48 ml destilované vody
250 μ l roztoku 40% akrylamidu s bisakrylamidem
250 μ l 1 M Tris pufru (pH = 6,8)
20 μ l 10% SDS
20 μ l 10% APS
2 μ l TEMED

Proteinové lyzáty se nechaly rozpouštět na ledu, následně byly smíchány s nanášecím SDS pufrům v poměru 1 : 1 a poté byly denaturovány 3 min při 98 °C. Na gel byl nanášen objem odpovídající 30 μ g proteinu. Jako velikostní standard (marker) byl použit Prestained Protein marker Broad Range (BioLabs). Elektroforéza probíhala v 1 \times tris-glycinovém pufru pod napětím 60 V pro zaostřovací gel a 120 V pro rozdělovací gel. Celkový čas cca 2 – 2,5 hod.

Tris-glycinový elektroforetický pufr – 1 \times : 5 mM Tris
50 mM glycin
0,1% SDS

Nanášecí SDS pufr – 1 \times : 50 mM Tris (pH = 6,8)
2% SDS
0,1% bromfenolová modř
10% glycerol
těsně před použitím byl přidán dithiothreitol (DTT)
do výsledné koncentrace 100 mM

3.1.7 Western blotting (westernový přenos)

Proteiny byly přenášeny z gelu na nitrocelulózovou membránu (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 μ m, BIO-RAD) s využitím polosuchého přenosu (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, BIO-RAD) a následně detekovány pomocí specifických protilátek.

Gel byl položen na membránu, vložen mezi dva silné filtrační papíry (BIO-RAD) namočené v blotovacím pufru a umístěn mezi kovové elektrody přístroje.

Přenos probíhal 1,5 hod při 250 mA v blotovacím pufru. Po skončení byla membrána uchována v PBS při 4 °C.

Před imunodetekcí byla vyblokována vazebná místa pro imunoglobuliny třepáním v blokovacím roztoku 2 hod. Po blokování byla membrána opláchnuta v PBS. Protilátky byly ředěny v roztoku 1% sušeného mléka s 0,1% Tween® 20 v PBS. Membrána byla převrstvena 4 ml roztoku primární protilátky (anti p53 DO-1, ředění 1 : 50; anti PCNA, ředění 1 : 7 000; anti Bcl-2, ředění 1 : 2 000; anti Bax, ředění 1 : 2 000; anti kaspasa-3, ředění 1 : 100). Navazování protilátky probíhalo po dobu 2 hod v plastové vaničce potažené parafilmem. Poté byla membrána promyta 5 min v PBS, třikrát 5 min v blokovacím roztoku a opět 5 min v PBS.

Sekundární protilátka (RAM, ředění 1 : 1 000; SWAR, ředění 1 : 1 000) byla nanášena stejným způsobem, její navazování probíhalo 1 hod. Odmytí nenavázané protilátky bylo provedeno stejně jako u primární protilátky, jen místo blokovacího roztoku byl použit 0,1% Tween® 20 v PBS. Opláchnutá membrána byla umístěna na sklo a byla jemně osušena buničitou vatou. Pro vizualizaci sekundární protilátky značené peroxidásoou byl použit substrát Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche). Na membránu byly nanášeny 3 ml směsi roztoku 1 a 2 (poměr 1 : 1), substrát se nechal působit 5 min. Potom byla membrána osušena buničitou vatou a potažena potravinářskou fólií. Expozice probíhala na film určený pro chemiluminiscenční detekci (BIO-RAD), délka expozice byla přizpůsobena intenzitě reakce (obvykle 30 – 120 s). Film byl vyvolán 2 min ve vývojce, opláchnut vodou a 2 min v ustalovači.

Blotovací pufr: 25 mM Tris

192 mM glycin

20% methanol

Blokovací roztok: 5% odstředěné sušené mléko

0,1% Tween® 20 (polyethylenglykolsorbitan dodekanoát)

rozpuštěno v PBS

3.1.8 Barvení membrány inkoustem

Barvení membrány inkoustem bylo používáno jako kontrola, zda správně proběhl přenos z gelu na membránu a zda si navzájem odpovídají množství proteinu nanesená na gel.

Membrána byla barvena ve směsi černého inkoustu a PBS, v poměru 1 : 50, po dobu 10 min za stálého třepání. Poté byla membrána odbarvována dvakrát 5 min v PBS při pokojové teplotě.

3.1.9 Rozmrazování buněk

Ampule se zamrazenou buněčnou suspenzí byla vyjmuta z tekutého dusíku a její obsah byl opatrně rozpouštěn pod proudem studené vody. Po rozpuštění posledních krystalků byl obsah ampule přenesen plastikovou pasturovou pipetou do sterilní 10 ml zkumavky a pomalu po kapkách přidáno 5 ml čistého studeného média RPMI-1640. Tato směs byla centrifugována 5 min, 1200 ot./min. Pelet byl rozsuspendován v 5 ml média RPMI-1640 s 10% FBS. Buněčná suspenze byla přenesena do kultivační lahvičky a byla kultivována za standardních podmínek při 37 °C v 5% CO₂ po dobu zhruba 24 hod.

3.1.10 Testování viability buněk

Po 24 hod kultivaci byl alikvot buněk smíchán v poměru 1 : 1 s 0,5% roztokem trypanové modři a poměr živých a mrtvých buněk byl stanoven optickým pozorováním (počítáním) ve světelném mikroskopu v Bürkerově komůrce.

Trypanová modř prostupuje přes narušenou plazmatickou membránu mrtvých buněk do intracelulárního prostoru a barví je modře, zatímco živé buňky zůstávají neobarvené, protože trypanová modř do nich neproniká.

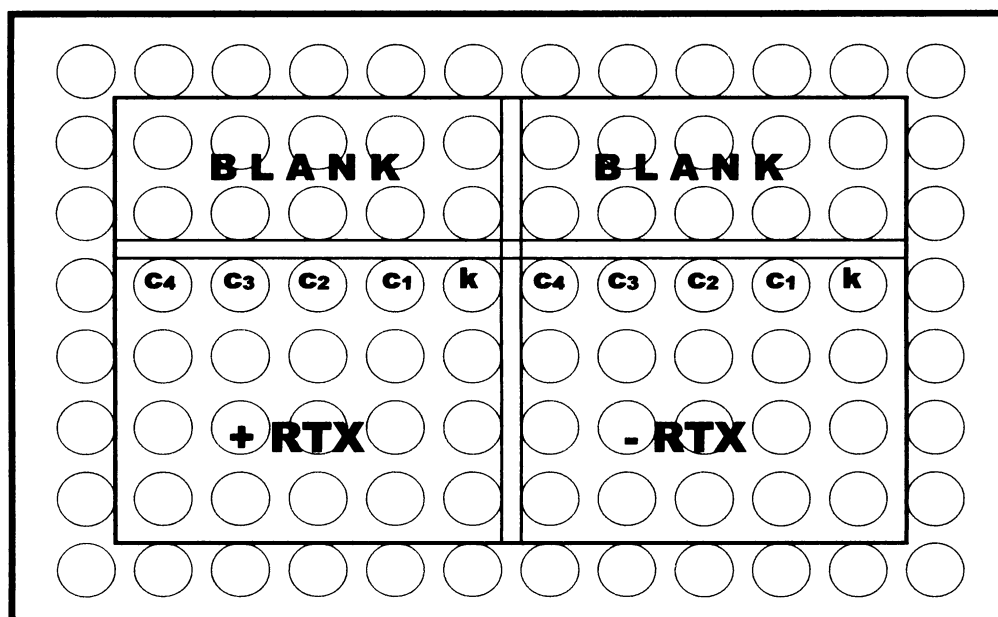
3.1.11 *In vitro* testování účinku monoklonálních protilátek a cytostatik

Po 24 hod kultivaci byly buňky spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Do 96-jamkové desky bylo nasazeno vždy 500 000 buněk/jamka v 200 µl média RPMI-1640 s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a to tak, že polovina buněk byla

před nasazením ošetřena rituximabem (RTX, koncentrace $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jako blank bylo použito médium RPMI-1640 s 10% fetálním bovinním sérem (Obr. 11). Po 72 hod kultivaci bylo přidáno příslušné cytostatikum ve čtyřech různých koncentracích (Tabulka 2). Po kultivaci dalších 48 hod bylo do každé jamky přidáno 10 μl roztoku WST-1 a po 4 hod kultivaci byla měřena absorbance při 450 nm na přístroji ELISA reader (SLT.SPECTRA).

Tabulka 2: Koncentrace používaných cytostatik (koncentrace pro FLU v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro CLB v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

cytostatikum	koncentrace				
	k	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄
fludarabin (FLU)	0	0,39	1,56	6,25	25
chlorambucil (CLB)	0	6,25	12,5	25	50



Obr. 11: Schéma nasazení 96-jamkové desky

3.1.12 Statistické vyhodnocení dat

Pro možnost následného statistického vyhodnocení byly všechny hodnoty měřeny minimálně čtyřikrát. Ze získaných dat byly počítány mediány a intervaly spolehlivosti pro hladinu významnosti 0,05 (Eckschlager, Horsák a Kodejš, 1980). Senzitivizace vzorku byla posuzována pomocí multivariační analýzy MANOVA (Meloun a Militký, 2006). Hladina významnosti 0,05 byla zvolena jako signifikantní.

3.2 Materiál

3.2.1 Použité chemikálie

antibiotika: penicilin (5 000 U.ml⁻¹), streptomycin (5 mg.ml⁻¹); Sigma

fetální bovinní sérum; PAN

L-glutamin (200 mM); Sigma

protilátky primární:

anti p53 (DO-1), myší monoklonální supernatant, ředění 1 : 50; Masarykův onkologický ústav, Brno

anti PCNA, myší polyklonální, ředění 1 : 7 000; Chemicon

anti Bcl-2, myší monoklonální, ředění 1 : 2 000; Sigma

anti Bax, myší polyklonální, ředění 1 : 2 000; Chemicon

anti kaspasa-3, králičí monoklonální, ředění 1 : 100; Novocastra

protilátky sekundární:

SWAR (swine anti rabbit), 0,34 g.l⁻¹, ředění 1 : 1 000, DakoCytomation

RAM (rabbit anti mouse), 1,3 g.l⁻¹, ředění 1 : 1 000, DakoCytomation

Lumi-Light Western Blotting Substrate; Roche

RPMI médium 1640; Sigma

Histopaque 1077; Sigma

inhibitor proteas, fosfatas; Sigma

akrylamid; Sigma

Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad

DMSO; Sigma

Tween[®] 20, for electrophoresis; Sigma

rituximab (Mabthera); Roche

fludarabin; Schering

chlorambucil; GlaxoSmithKline

velikostní standard proteinový – marker; BioLabs

trypanová modř; Sigma

běžné chemikálie pocházely od firem Lachema, Serva, Sigma

3.2.2 Použité přístroje

elektroforetická aparatura pro SDS-PAGE: Mini-Protean II Cell, BIO-RAD

laminární boxy pro tkáňové kultury: Function line, Heraeus, Germany

spektrofotometr: Bio Photometer, Eppendorf

westernový přenos: Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, BIO-RAD

chlazená centrifuga: Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen

ELISA reader: SLT.SPECTRA

mikroskop: FLUOVERT, Leitz

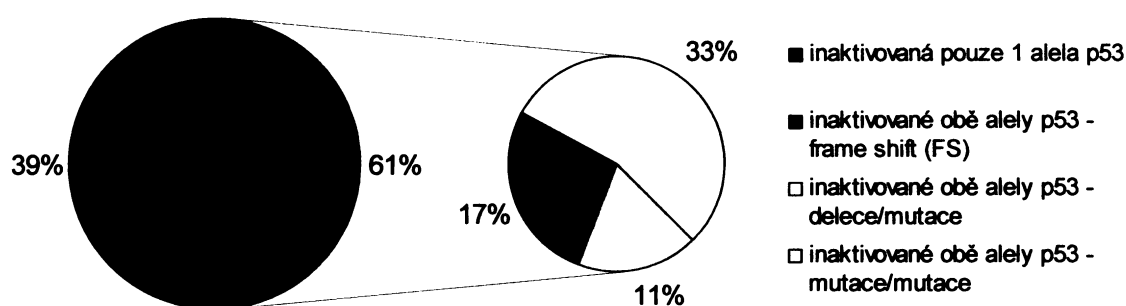
termostat: IG150, Jouan

4 Výsledky

4.1 Soubor pacientů

Ve studovaném souboru pacientů bylo 46 osob, z toho 26 mužů a 20 žen. Většina z nich byla starší 50 let, pouze tři pacienti byli mladší. Pacienti byli vybíráni tak, aby v každé ze tří posuzovaných skupin (wild-type, aberace v *p53*, delece *ATM*) byl přibližně stejný počet pacientů. Dalším kritériem pro výběr bylo procento B-CLL lymfocytů vyšší než 90 % a viabilita buněk po rozmražení (stanovena barvením trypanovou modří) vyšší než 85 %. V souboru se vyskytovali léčeni i neléčení pacienti.

18 pacientů mělo nějakou aberaci v genu *p53* (Graf 1) a tím inaktivovanou jednu nebo obě alely tohoto genu. 14 pacientů mělo deleci *ATM* a 14 pacientů mělo obě alely pro geny *p53* i *ATM* nepoškozené (wild-type, wt).



Graf 1: Rozložení aberací v genu *p53* u testovaných pacientů

4.2 Status proteinu p53

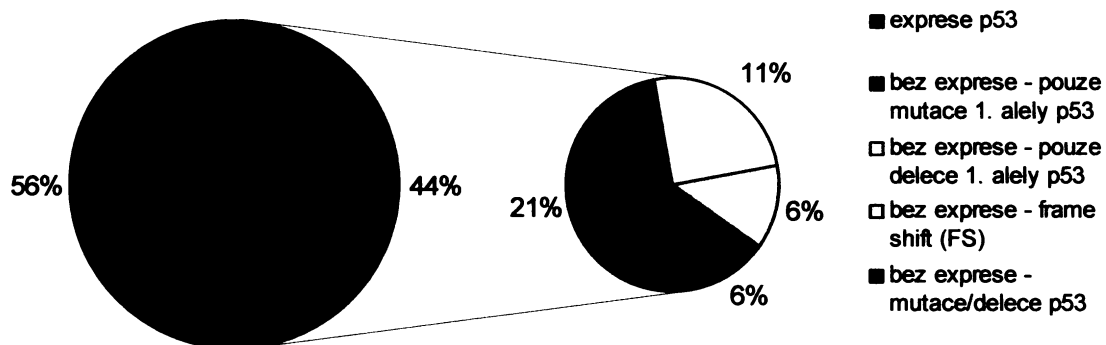
Jak bylo uvedeno v kapitole 1.2.1.2, je fyziologická hladina proteinu p53 v buňce velmi nízká až nedetekovatelná a akumulace tohoto proteinu většinou dobře koreluje s výskytem mutace v jedné alele genu *p53* a delecí alely druhé. Mutovaný/deletovaný gen *p53* lze tedy velmi dobře rozeznat na základě detekce zvýšené hladiny proteinu p53 na western blotech (Obr. 12 a 13).

Pro western blotting jsem použila proteinové lyzáty získané z mononukleárních buněk izolovaných z krve pacientů lyzovaných ihned po odběru krve. Jako pozitivní kontrolu jsem používala buněčnou linii STA-ET 7.2 (buňky

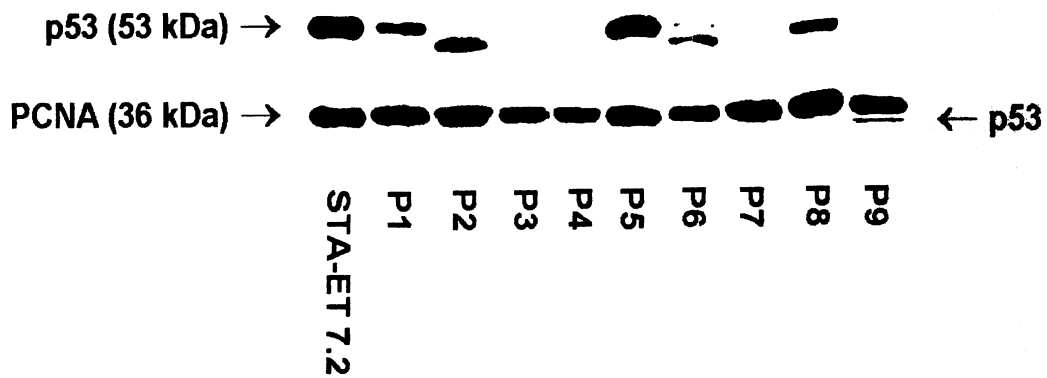
Ewingova sarkomu, mutantní pro protein p53 v kodonu 273). Pro funkci interního standardu jsem použila protein PCNA (proliferální buněčný jaderný antigen – součást DNA polymerázy) (Obr. 12 a 13).

Metodou western blottingu jsem studovala expresi proteinu p53 u všech 46 pacientů. Souběžně byl stanovován funkční status proteinu p53 pomocí metody FASAY (funkční analýza separovaných alel v kvasinkách) na Ústavu patologie FN Brno. Delece v oblasti 17p13.1 (zde je lokalizován gen *p53*) byly detekovány pomocí interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) na Oddělení lékařské genetiky FN Brno jako součást rutinního vyšetření. Přesné určení mutace bylo prováděno na našem pracovišti metodou sekvenace DNA v oblasti centrální domény genu *p53* na templátech z FASAY, nebylo však náplní mé diplomové práce (Tabulka 3).

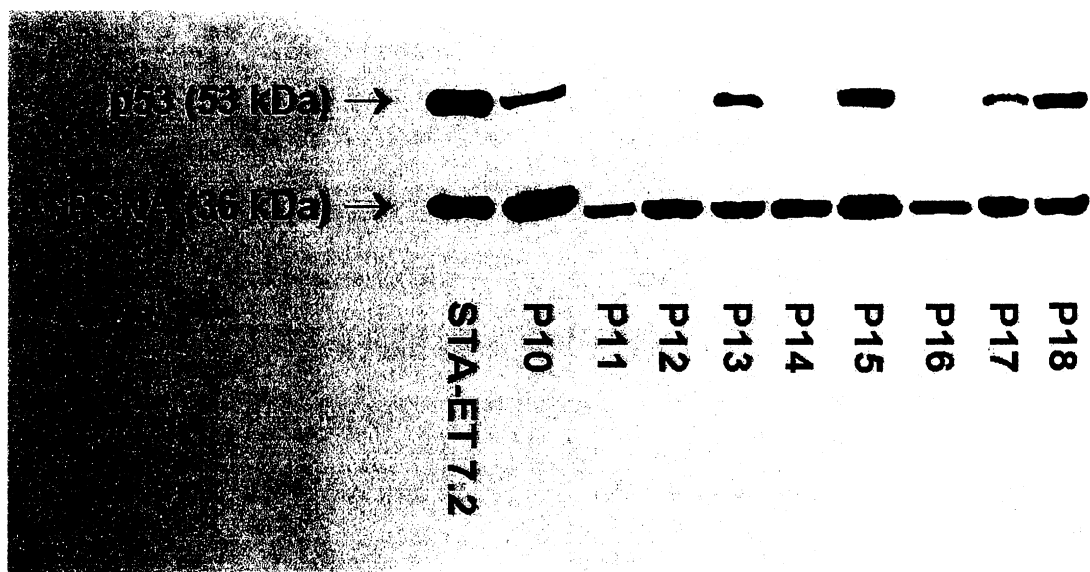
Pomocí western blottingu jsem u 11 pacientů identifikovala zvýšenou hladinu proteinu p53 a tento výsledek jsem zkorelovala s ostatními metodikami monitorování p53 (Graf 2). Všichni pacienti s vysokou hladinou proteinu p53 měli inaktivovány obě alely genu *p53*. Tito pacienti byli v různých stádiích nemoci. U pěti pacientů došlo k inaktivaci *p53* ještě před léčbou, šest pacientů již bylo léčeno.



Graf 2: Exprese proteinu p53 u pacientů s aberacemi v genu *p53*



Obr. 12: Western blotting pacientů P1 – P9 (obrázek je výsledkem dvojexpozice: nejprve byl detekován protein p53 a po odmytí membrány byla tato reprobována pro protein PCNA; doba expozice pro protein p53 2 min, pro PCNA 1 min)



Obr. 13: Western blotting pacientů P10 – P18 (obrázek je výsledkem dvojexpozice: nejprve byl detekován protein p53 a po odmytí membrány byla tato reprobována pro protein PCNA; doba expozice pro protein p53 2 min, pro PCNA 1 min)

Tabulka 3: Pacienti s aberacemi v genu *p53* a hladina proteinu p53 (počet + značí hladinu proteinu p53)

Pacient	Inaktivace <i>p53</i>	Typ mutace	Hladina p53
P1	del 96 % / mut 73 %	inzerce T v exonu 10 stop kodon na AK 346	++
P2	del 95 % / mut 48 %	frame shift na AK 314 zkrácený protein 331 AK	++
P3	mut 66 %	234 Tyr → Cys	-
P4	del 39 % / mut 42 %	181 Arg → Cys	-
P5	del 34 % / mut 49 %	281 Asp → Glu	+++
P6	mut 75 %	zatím nezjištěn	++
P7	del 95 %	-	-
P8	mut 82 %	254 Ile → Asn 281 Asp → Asn	+++
P9	del 90 % / mut 24 %	del CT na 227 stop kodon na AK 227	+
P10	del 85 % / mut 77 %	zatím nezjištěn	+++
P11	mut 66 %	132 Lys → Arg	-
P12	mut 53 %	176 Cys → Trp	-
P13	del 83 % / mut 79 %	234 Tyr → Cys	++
P14	del 57 %	-	-
P15	del 95 % / mut 94 %	220 Tyr → Cys	+++
P16	mut 21 %	236 Tyr → Asp	-
P17	mut 48 %	mnoho mutací	+
P18	del 85 % / mut 96 %	249 Arg → Gly	+++

U pacientky P9, která nese posunovou mutaci na aminokyselinové pozici 227 s následným stop-kodonem, docházelo jen k velmi slabé expresi zkráceného proteinu. Naopak další dva pacienti (P1, P2), kteří vykazují posunovou mutaci vedoucí k předčasnému stop-kodonu až v koncové, C-terminální oblasti p53, exprimovali zkrácený protein silně, na úrovni standardní mutace. U pacientky P4, která má také inaktivovány obě alely genu *p53*, byla detekována bodová mutace v kodonu 181, jež vedla k záměnové mutaci, nikoli však ke zvýšené hladině proteinu p53. Tento výsledek indikuje, že protein p53 je zřejmě přinejmenším z části funkční (Obr. 12).

U pacientů, kteří měli pouze delecí nebo mutaci jedné alely genu *p53*, a druhá alela tohoto genu byla nepoškozená, ke zvýšené expresi proteinu p53 nedocházelo. U pacientů s oběma alelami genu *p53* funkčními nebo s delecí genu *ATM* nebyla také zvýšená exprese proteinu p53 detekována, což odpovídá údajům v literatuře.

4.3 Testování kombinace rituximab/fludarabin

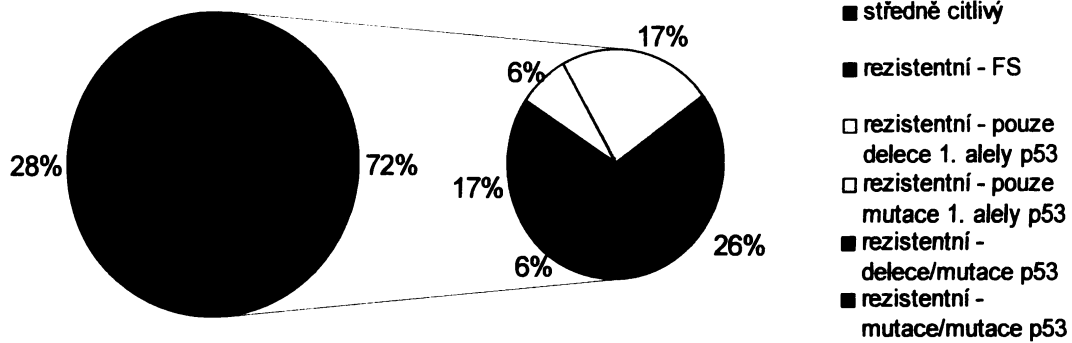
Pro testování byly vybrány vzorky, které měly v průměru 90 % B-CLL lymfocytů. Soubor vzorků byl následující: 14 vzorků bylo wild-type, 14 vzorků mělo delecí *ATM* (průměr deletovaných buněk byl 83 %) a 18 vzorků mělo abnormalitu v *p53* – inaktivované obě alely (delecí a mutací nebo více mutacemi) nebo inaktivovány pouze jednu alelu (delecí nebo mutací).

4.3.1 Citlivost vzorků na fludarabin

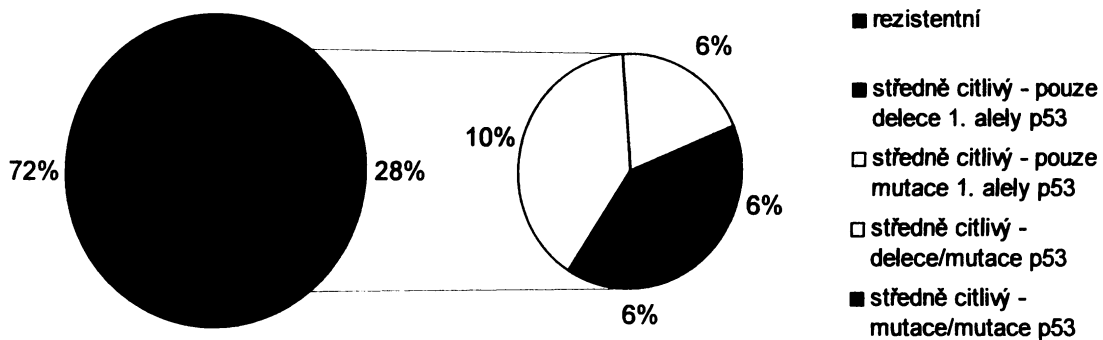
Senzitivita k fludarabinu byla stanovena pro koncentraci 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, která poskytovala významné rozdíly mezi testovanými vzorky. Vzorky byly rozčleněny následovně: rezistentní – viabilita testovaných buněk byla vyšší než 60 %; středně citlivé – viabilita buněk byla v rozmezí 60 – 40 %; citlivé – viabilita buněk byla nižší než 40 %. Stanovení viability testovaných buněk jsem prováděla pomocí látky WST-1 (viz kapitola 1.4.1.1) měřením intenzity zbarvení po 4 hod kultivací pomocí spektrofotometru (ELISA reader) při 450 nm.

Vzorky s aberacemi v *p53* byly na fludarabin převážně rezistentní (72 %) a žádný nebyl citlivý (Graf 3a, 3b). Všechny vzorky (P1, P2, P9) se zkrácenou (a tedy nefunkční) formou proteinu p53 byly na fludarabin rezistentní. U vzorků s delecí jedné a mutací druhé alely genu *p53* bylo pět vzorků na fludarabin rezistentních (P4, P10,

P13, P15 a P18) a jeden středně citlivý (P5). Z pěti vzorků s mutací pouze jedné alely *p53* byly tři rezistentní (P3, P11, P17) a dva středně citlivé (P12, P16). Jeden vzorek, kde se vyskytovala pouze delece jedné alely *p53*, byl na fludarabin rezistentní (P14) a jeden byl středně citlivý (P7). Jeden vzorek, který měl obě alely *p53* inaktivované mutacemi (P6), byl na fludarabin rezistentní a jeden vzorek (P8) byl středně citlivý.

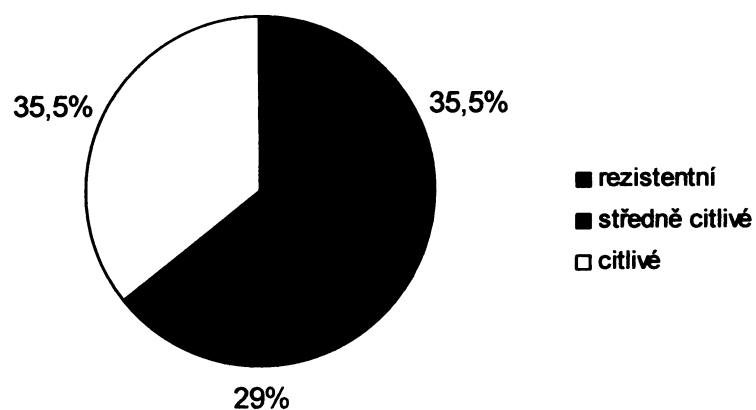


Graf 3a: Rezistence/citlivost vzorků s aberacemi v *p53* na fludarabin



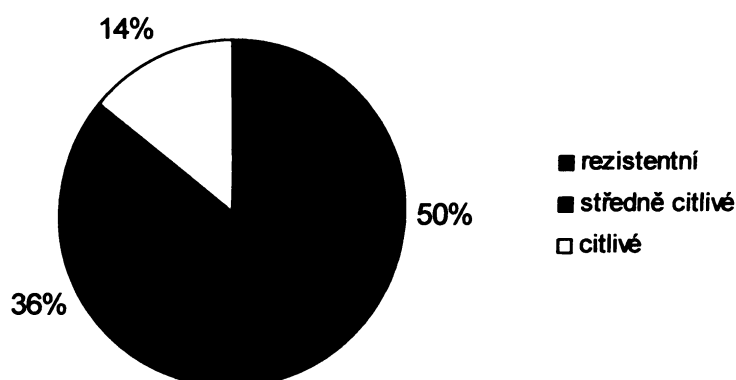
Graf 3b: Rezistence/citlivost vzorků s aberacemi v *p53* na fludarabin

Ze 14 vzorků s delecí *ATM* bylo pět vzorků (35,5 %) na fludarabin rezistentních, čtyři (29 %) středně citlivé a pět vzorků (35,5 %) bylo na fludarabin citlivých (Graf 4).



Graf 4: Rezistence/citlivost na fludarabin u vzorků s delecí *ATM*

U 14 wt vzorků bylo sedm vzorků (50 %) na fludarabin rezistentních, pět (36 %) středně citlivých a dva vzorky (14 %) byly na fludarabin citlivé (Graf 5).



Graf 5: Rezistence/citlivost na fludarabin u wt vzorků

4.4 Testování kombinace rituximab/chlorambucil

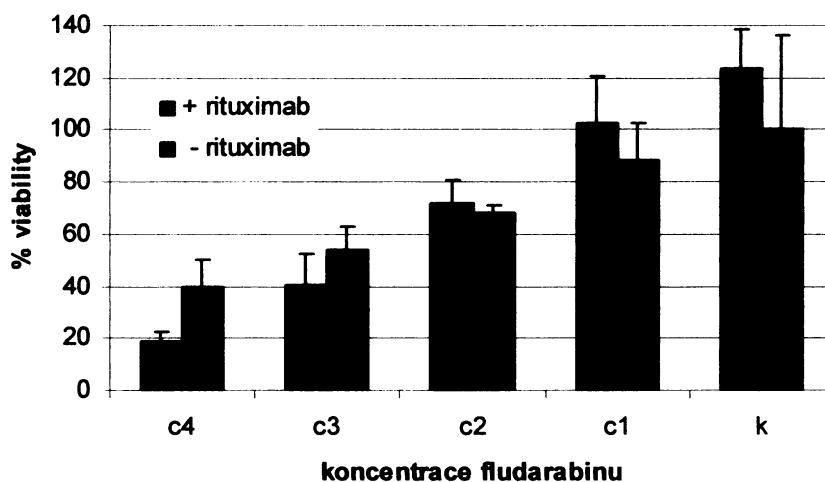
Tato kombinace byla testována jen na omezeném počtu vzorků (celkem 16 vzorků) jako pilotní studie. Kritéria počtu B-CLL lymfocytů a viability buněk byla stejná jako u kombinace rituximab/fludarabin. Soubor vzorků byl následující: 4 vzorky byly wild-type, 4 vzorky měly delecí *ATM* (průměr deletovaných buněk byl 93 %) a 8 vzorků vykazovalo aberaci v *p53*.

Senzitivita k chlorambucilu byla stanovena pro koncentraci 12,5 μM , která poskytovala významné rozdíly ve skupině testovaných vzorků, a to pomocí stejných kritérií, jako byly použity pro fludarabin.

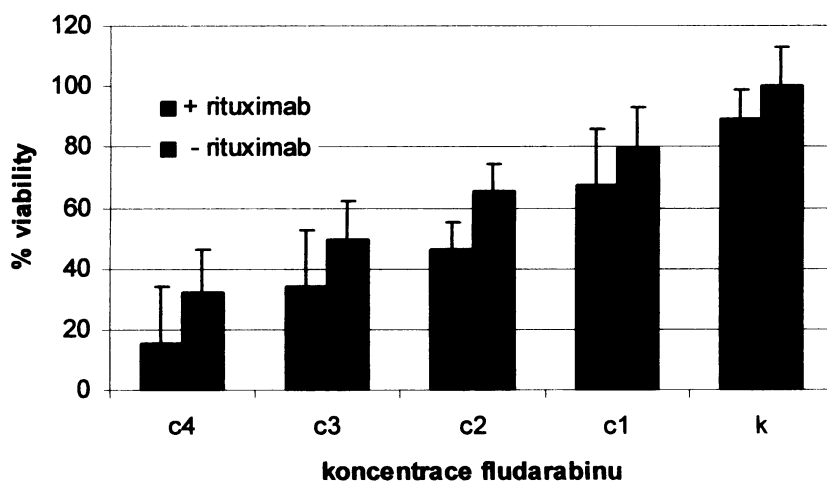
Vzorky s aberacemi v *p53* byly na chlorambucil převážně rezistentní (75 %), ostatní poskytovaly heterogenní výsledky. Ze čtyř vzorků s delecí *ATM* byl jeden vzorek (25 %) na chlorambucil rezistentní, dva vzorky (50 %) středně citlivé a jeden vzorek (25 %) byl citlivý. U čtyř wild-type vzorků byl jeden vzorek (25 %) na chlorambucil rezistentní, dva vzorky (50 %) byly středně citlivé a jeden vzorek (25 %) byl citlivý.

4.5 Senzitivizace buněk rituximabem pro fludarabin

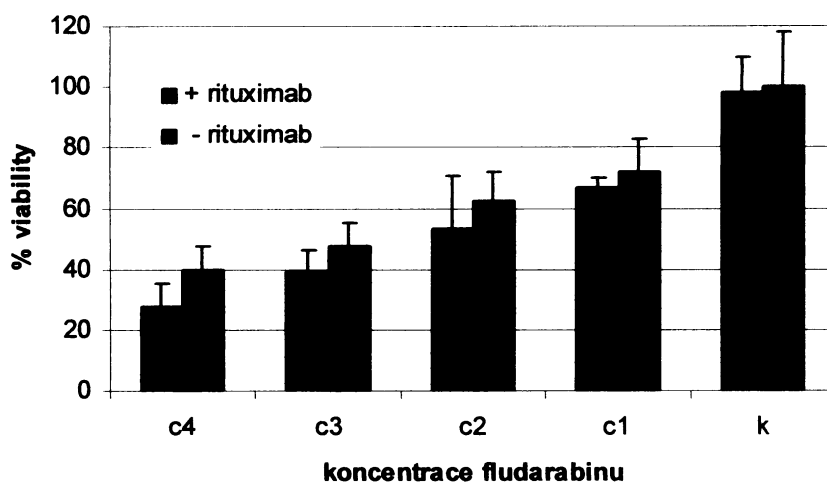
Testování bylo prováděno způsobem popsáním v kapitole 3.1.11. Pro každý vzorek byl sestaven samostatný graf, monitorující účinek koncentrační řady fludarabinu na buňky předošetřené rituximabem (72 hod) a buňky kontrolní. Pokud se z grafu dalo usuzovat, že by vzorek mohl být senzitivizován, byl tento efekt posouzen pomocí multivariační analýzy MANOVA na hladině významnosti $P = 0,05$. Grafy 6, 7 a 8 ukazují vzorek senzitivizovaný rituximabem, graf 9, 10 a 11 vzorek bez senzitivizace.



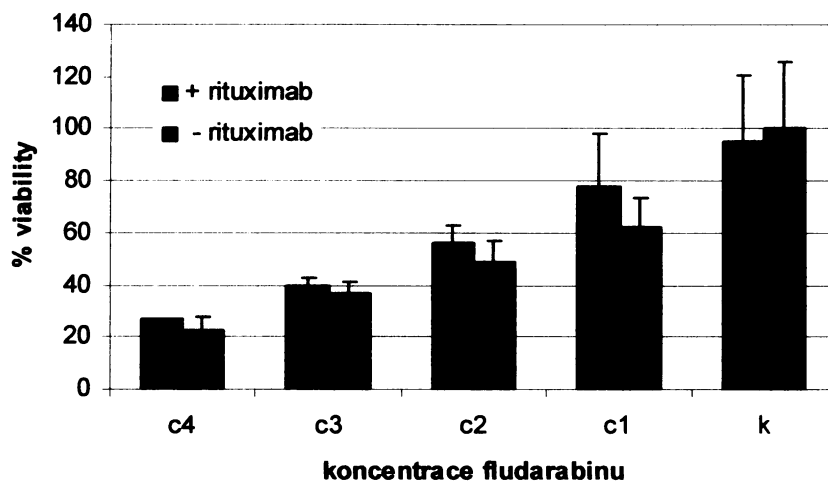
Graf 6: Ukázka vzorku s aberací v *p53* (P10) senzitivizovaného rituximabem (chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti na hladině významnosti 0,05)



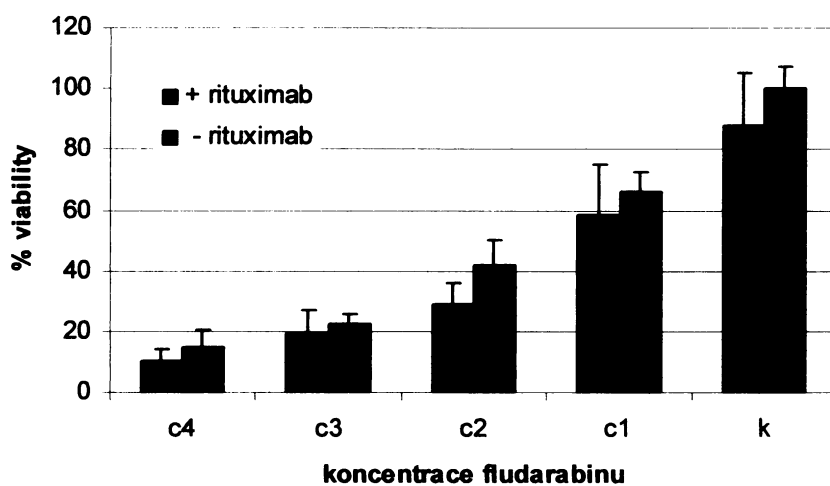
Graf 7: Ukázka vzorku s delecí *ATM* senzitivizovaného rituximabem (chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti na hladině významnosti 0,05)



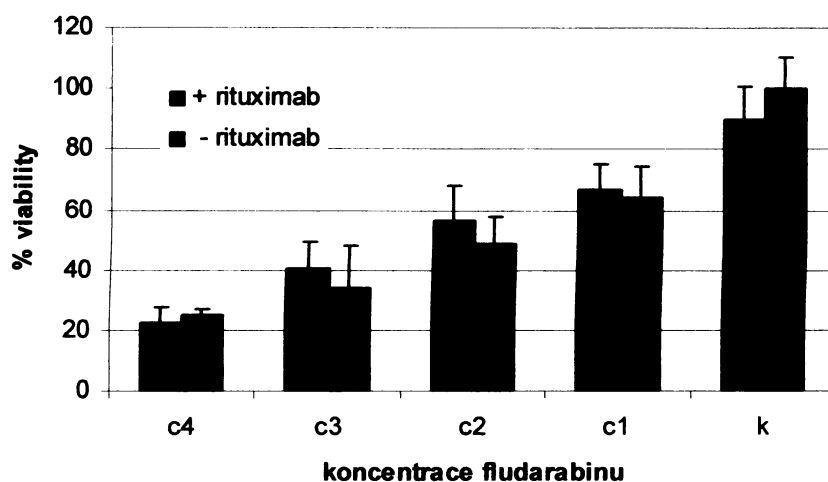
Graf 8: Ukázka wt vzorku senzitivizovaného rituximabem (chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti na hladině významnosti 0,05)



Graf 9: Ukázka vzorku s aberací *p53* (P16) bez senzitivizace rituximabem (chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti na hladině významnosti 0,05)



Graf 10: Ukázka vzorku s delecí *ATM* bez senzitivizace rituximabem (chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti na hladině významnosti 0,05)



Graf 11: Ukázka wt vzorku bez senzitivizace rituximabem (chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti na hladině významnosti 0,05)

Tabulka 4 shrnuje senzitivizaci vzorků v jednotlivých skupinách. Tabulka 5 shrnuje senzitivizaci u vzorků s aberacemi *p53*.

Tabulka 4: Srovnání senzitivizace vzorků rituximabem v jednotlivých skupinách pacientů

Skupina pacientů	Citlivost na fludarabin	Senzitivizace rituximabem
aberrace <i>p53</i> (18 vzorků)	0 (0 %)	6 (33 %)
delece <i>ATM</i> (14 vzorků)	5 (36 %)	5 (36 %)
wild-type (14 vzorků)	2 (14 %)	8 (57 %)

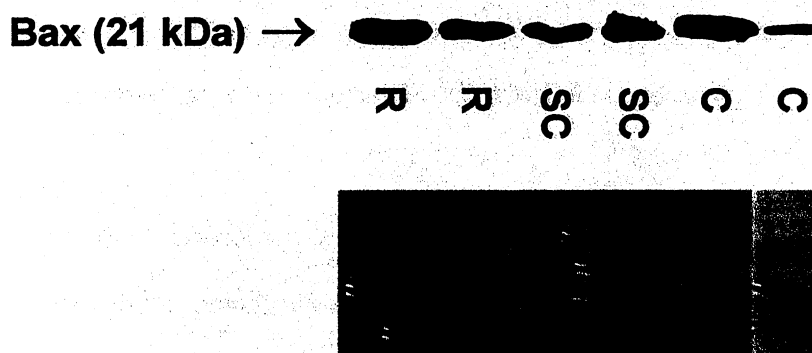
Tabulka 5: Senzitivizace vzorků s aberacemi *p53* rituximabem

Pacient	Citlivost na fludarabin	Senzitivizace rituximabem
inaktiv. obě alely – delece/mutace	0	3
P1	rezistentní	ne
P2	rezistentní	ne
P4	rezistentní	ne
P5	středně citlivý	ne
P9	rezistentní	ano
P10	rezistentní	ano
P13	rezistentní	ano
P15	rezistentní	ne
P18	rezistentní	ne
inaktiv. obě alely – mutace/mutace	0	1
P6	rezistentní	ne
P8	středně citlivý	ano
inaktivovaná 1 alela – mutace	0	2
P3	rezistentní	ano
P11	rezistentní	ne
P12	středně citlivý	ne
P16	středně citlivý	ne
P17	rezistentní	ano
inaktivovaná 1 alela – delece	0	0
P7	středně citlivý	ne
P14	rezistentní	ne

4.6 *Expresa proteinu Bax a rezistence na fludarabin*

Expresa proteinu Bax je podle některých studií (Pepper a kol., 1999) důležitým faktorem determinujícím rezistenci B-CLL buněk na fludarabin. Rezistenci by měla indikovat nízká exprese tohoto proteinu. Jiné práce však tuto souvislost neprokázaly (Bosanquet a kol., 2002).

Z obrázku 14 je patrné, že u testovaných vzorků nebylo možné vysledovat žádné souvislosti mezi nízkou expresí proteinu Bax a rezistencí na fludarabin. Stejně tomu bylo i u ostatních testovaných vzorků.

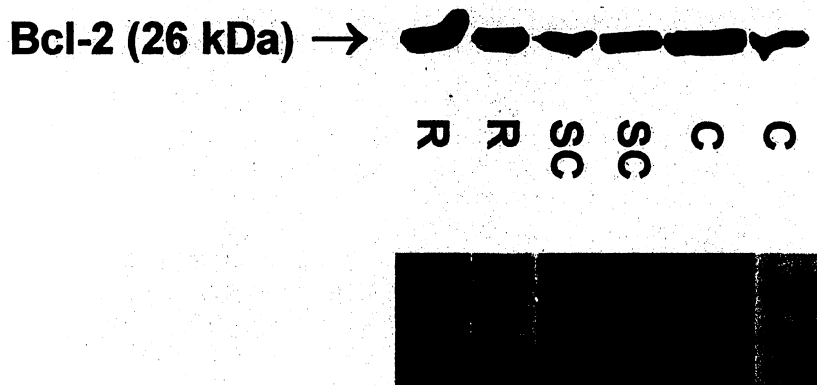


Obr. 14: Expresa proteinu Bax u pacientů rezistentních (R), středně citlivých (SC) a citlivých (C) na fludarabin (doba expozice 2 min; přiložená membrána ukazuje, že koncentrace proteinů v jednotlivých dráhách si odpovídají)

4.7 *Expresa proteinu Bcl-2 a rezistence na fludarabin*

Protein Bcl-2 je jedním z nejdůležitějších blokátorů apoptózy v buňkách. Již dříve bylo prokázáno (Pepper a kol., 2001), že jeho exprese determinuje citlivost B-CLL buněk na fludarabin.

Z obrázku 15 je však patrné, že se jeho exprese u vzorků citlivých, středně citlivých a rezistentních na fludarabin v podstatě nelišila. Stejného výsledku bylo dosaženo i u ostatních testovaných vzorků.

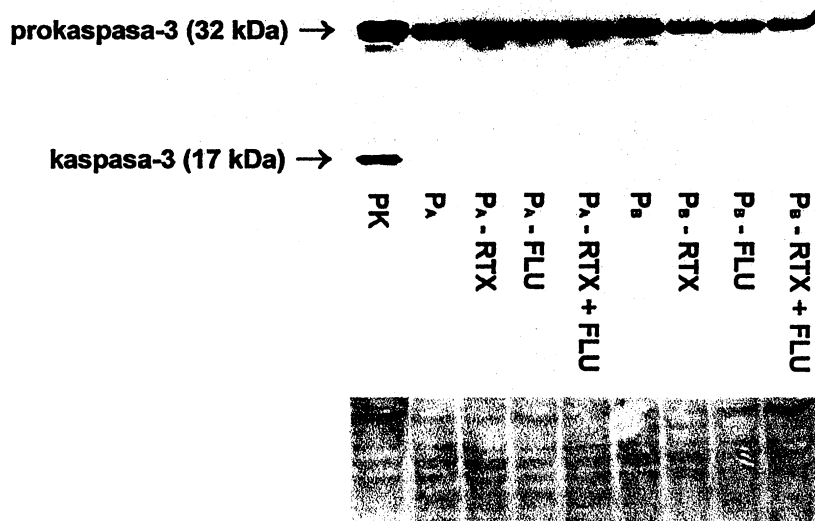


Obr. 15: Exprese proteinu Bcl-2 u pacientů rezistentních (R), středně citlivých (SC) a citlivých (C) na fludarabin (doba expozice 30 s; přiložená membrána ukazuje, že koncentrace proteinů v jednotlivých dráhách si odpovídají)

4.8 Exprese prokaspasy-3 a kaspasy-3

Již dříve bylo publikováno (Stoetzer a kol., 1999), že spontánní i léky indukovaná apoptóza vede v B-CLL buňkách k aktivaci efektorové kaspasy-3. Tato aktivace se projeví štěpením inaktivního proenzymu na zkrácenou aktivní formu.

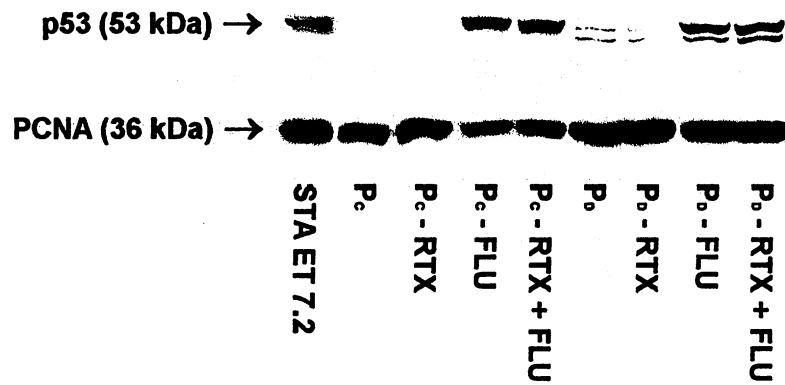
Z obrázku 16 je zřetelně vidět, že po působení rituximabu, fludarabinu i kombinace těchto dvou látek ke štěpení prokaspasy-3 nedošlo. Štěpení je jasně patrné pouze u pozitivní kontroly (PK). Kromě vzorků na obrázku bylo štěpení negativní i u dalších deseti testovaných případů.



Obr. 16: Štěpení prokaspasy-3 na aktivní kaspasu u dvou vzorků B-CLL ovlivněných příslušnými látkami (doba expozice 2 min; přiložená membrána ukazuje, že koncentrace proteinů v jednotlivých dráhách si odpovídají)

4.9 Exprese proteinu p53 po ovlivnění buněk rituximabem a fludarabinem

Za účelem monitorování aktivity proteinu p53 po aplikaci rituximabu, fludarabinu nebo obou těchto látek byl použit western blotting jako prostředek pro vizualizaci potenciální indukce tohoto proteinu. Buňky byly lyzovány po standardním předšetření rituximabem a po 24 hod po aplikaci fludarabinu (koncentrace $3,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jak je vidět na obrázku 17, tato indukce byla významná po přidání fludarabinu bez ohledu na předchozí předšetření rituximabem, zatímco samotná monoklonální protilátka indukci proteinu p53 nevyvolala.



Obr 17: Expresse proteinu p53 po ovlivnění buněk rituximabem a fludarabinem (obrázek je výsledkem dvojexpozice: nejprve byl detekován protein p53 a po odmytí membrány byla tato reprobována pro protein PCNA; doba expozice pro protein p53 2 min, pro PCNA 1 min)

5 Diskuse

Současná onkologie zažívá bouřlivý vývoj stále nových a dokonalejších léčebných preparátů. Tato na první pohled pozitivní skutečnost je však spojena s nedostatkem času a kapacit pro testování těchto nových látek. Je tomu tak i u monoklonální protilátky rituximab, jejíž testování bylo stěžejní částí této diplomové práce. Ačkoli je tato protilátka nejčastěji používána u pacientů s B-CLL a je velmi dobře známo, že nejdůležitějším negativním prognostickým faktorem z hlediska léčby pacientů jsou aberace v tumor supresoru *p53*, nebyla dosud provedena detailní studie sledující účinnost rituximabu na buňky s aberacemi *p53*.

5.1 Viabilita B-CLL buněk v tkáňové kultuře

Pro přesnou analýzu bylo zapotřebí vytvořit efektivní a zároveň přesný testovací systém. Buňky chronické lymfocytární leukémie se vyznačují některými specifickými vlastnostmi, kterými se liší od ostatních nádorových buněk a které bylo třeba zohlednit. Je dobře známo (Collins a kol., 1989), že tyto buňky nerostou v tkáňové kultuře a naopak zde umírají postupnou apoptózou. Proto bylo třeba nejprve ověřit, jaká bude viabilita buněk po předpokládané pětidenní kultivaci. Viabilitu jsem ověřovala u pěti reprezentativních vzorků metodou barvení trypanovou modří. Viabilita buněk byla po rozmražení vyšší než 90 % a po pěti dnech kultivace vyšší než 80 % u všech pěti testovaných vzorků. Tyto výsledky byly velmi uspokojivé. Podle mého názoru byly pozitivně ovlivněny kultivací buněk v 96-jamkové desce, kde se zdá být zajištěna optimální koncentrace buněk na plochu kultivace a kde dochází k dobrému provzdušnění buněk.

5.2 Komplexní analýza statutu *p53*

Dalším kritickým bodem celé práce bylo co nejpřesnější určení statutu tumor supresoru *p53*. Moje práce v tomto smyslu doplňovala metodiky prováděné ve FN Brno jinými pracovníky mého oddělení i jinými pracovišti. Celá komplexní analýza genu a proteinu *p53* se skládala z následujících metodik: funkční analýzy FASAY pro identifikaci mutovaných vzorků, následného sekvenování těchto vzorků pro přesnou identifikaci mutace, I-FISH analýzy pro určení delecí lokusu *p53* a western blottingu

pro monitorování hladiny proteinu p53 (metoda western blottingu byla součástí diplomové práce). Z této komplexní analýzy vyplynulo několik skutečností.

V souladu s očekáváními (Pettitt a kol., 2001) byla u drtivé většiny vzorků s aberacemi *p53/ATM* detekována buď jedna nebo druhá aberace. Z toho lze usuzovat, že selekční tlak v leukemických buňkách působí proti nějaké společné aktivitě těchto dvou genů (proteinů).

Ve shodě s publikovanými daty (Vojtěšek a kol., 1992) jsem u velké části vzorků (61 %) s aberacemi v *p53* detekovala silnou expresi proteinu p53. Všichni tito pacienti měli inaktivovány obě alely genu *p53* (Blagosklonny, 2000) a byli v různých stádiích nemoci. U šesti pacientů došlo k inaktivaci *p53* ještě před léčbou. Pět pacientů již bylo léčeno a k inaktivaci *p53* tedy mohlo dojít i prostřednictvím terapie, jelikož většina těchto léčených pacientů byla v minulosti léčena chlorambucilem, který může způsobovat mutace v genu *p53* (Sturm a kol., 2003).

U pacientky P9, která nese posunovou mutaci na aminokyselinové pozici 227 s následným stop-kodonem, docházelo jen k velmi slabé expresi zkráceného proteinu. Naopak další dva pacienti (P1, P2), kteří vykazují posunovou mutaci vedoucí k předčasnému stop-kodonu až v koncové, C-terminální oblasti p53, exprimovali zkrácený protein silně, na úrovni standardní mutace. U těchto tří vzorků s posunovou mutací a následným vznikem zkráceného proteinu byla zkrácená forma proteinu p53 viditelná na western blotu u pacientů P2 a P9. U pacientky P1 je protein p53 zkrácený pouze o 47 aminokyselin, a proto na western blotu nebyl rozlišitelný od standardní velikosti proteinu p53.

U pacientky P4, která má také inaktivovány obě alely genu *p53*, byla zjištěna bodová mutace v kodonu 181, jež vedla k záměnové mutaci, nikoli však ke zvýšené hladině proteinu p53. Tato mutace se vyskytuje velmi zřídka a výsledek tedy indikuje, že protein p53 je zřejmě inaktivován pouze částečně.

U pacientů, kteří měli pouze delecí nebo pouze mutaci jedné alely genu *p53*, ke zvýšené expresi proteinu p53 nedocházelo (Blagosklonny, 2000). U pacientů s oběma alelami genu *p53* funkčními (wt) nebo s delecí genu *ATM* jsem také zvýšenou expresi proteinu p53 nedetekovala, což odpovídá očekávání. Z toho lze říci, že metoda western blottingu je vhodná pro sledování stavu proteinu p53.

Sledování statutu proteinu p53 pomocí western blottingu velice vhodně doplňuje mutační i deleční analýzu genu *p53* a může přinést cenné poznatky o selekci kompletní inaktivace obou alel tohoto nádorového supresoru. Hypotéza o nezbytnosti

inaktivace obou alel u tumor supresorových genů patří ke stěžejním dogmatům onkologie (Testa a Hino, 2003). Protože u našich B-CLL vzorků vidíme i případy s aberacemi pouze jedné alely *p53* ($n = 6$), bude zajisté velmi zajímavé sledovat jejich další vývoj.

5.3 Rezistence B-CLL buněk a léčba

Celkovou situaci pacientů výrazně ovlivňuje léčba. Obecně se předpokládá, že leukemické buňky pacientů po léčbě mohou být celkově rezistentnější díky selekci a dokonce se má za to, že by léčba mohla výrazně napomáhat selekci nebo indukci mutací v *p53* (Sturm a kol., 2003).

Podle očekávání byli v našem souboru nejčastěji léčeni pacienti s aberacemi *p53* (11/18, 61 %), následování pacienty s delecemi *ATM* (7/14, 50 %) a wild-type pacienty (3/14, 21 %). Z našeho souboru pacientů se však nejeví, že by *in vitro* rezistence na fludarabin byla asociována s předchozí léčbou, neboť pouze 42 % pacientů rezistentních na fludarabin bylo v minulosti již léčeno. Toto je v rozporu s již dříve publikovanými výsledky (Aleskog a kol., 2005).

Na druhé straně se ovšem potvrdila jasná spojitost aberací *p53* s rezistencí na fludarabin (Döhner a kol., 1995; Stilgenbauer, Lichter a Döhner, 2000). Třináct pacientů (72 %) s aberacemi v *p53* bylo totiž na fludarabin *in vitro* rezistentní.

5.4 Testování viability po aplikaci léčebných látek

Stěžejním bodem mé práce bylo zavedení rychlého a přitom přesného stanovení viability B-CLL buněk po aplikaci monoklonální protilátky a/nebo chemoterapeutik. Protože není dosud zcela jasné, jakým mechanismem působí monoklonální protilátky, jevílo se jako nejvýhodnější zvolit nějaký obecný test pro měření buněčné viability a neupínat se pouze na apoptózu, která je jen jedním ze tří předpokládaných mechanismů působení rituximabu (Vorlíček, Vyzula, Adam a kol., 2000). Použila jsem tedy WST-1 assay, modernější verzi dobře známého MTT testu (Chumchalová a Kovařík, 2000), který měří viabilitu buněk na základě jejich metabolické aktivity.

Podle očekávání (Chow a kol., 2002) nezpůsobil rituximab samotný žádné dramatické snížení viability buněk. Naopak u většiny vzorků došlo k mírnému zvýšení

metabolické aktivity na 110 – 130 % ve srovnání s kontrolou, zatímco úbytek (do 80 %) jsem zaznamenala spíše výjimečně.

Používala jsem čtyři koncentrace fludarabinu, abych mohla sledovat závislost metabolické aktivity buněk na zvyšující se koncentraci. Závislost jsem pozorovala velmi zřetelně, s výjimkou rezistentních vzorků, kde se žádný efekt se vzrůstající koncentrací fludarabinu neprojevil. Z koncentrační řady jsem vybrala koncentraci fludarabinu $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, která poskytovala významné rozdíly mezi testovanými vzorky.

Vzorky s aberacemi v *p53* byly dle očekávání na fludarabin převážně rezistentní (72 %) a žádný nebyl citlivý. Všechny vzorky se zkrácenou (a tedy plně nefunkční) formou proteinu *p53* byly na fludarabin rezistentní. Mezi vzorky středně citlivými se vyskytovaly různé kombinace inaktivace alel *p53* – jeden vzorek s delecí jedné a mutací druhé alely genu *p53*, dva vzorky s mutací pouze jedné alely *p53*, jeden vzorek s delecí jedné alely *p53* a jeden vzorek s oběma alelami *p53* inaktivovanými mutacemi.

U vzorků s delecí *ATM* bylo pět vzorků (35,5 %) na fludarabin rezistentních, čtyři (29 %) středně citlivé a pět vzorků (35,5 %) bylo na fludarabin citlivých. Tento výsledek byl jedním z nejpřekvapivějších v celé mé práci. Již dříve bylo totiž publikováno (Alvi a kol., 2005; Kojima a kol., 2006), že B-CLL buňky s aberacemi *ATM* jsou na fludarabin rezistentní. Na druhé straně je však velmi dobře známo, že buňky jedinců s dědičným syndromem *ataxia telangiectasia* nesoucí zárodečnou mutaci v genu *ATM* jsou extrémně citlivé na poškození DNA (Pernin a kol., 1999; Song a kol., 2004). Mutační status druhé alely genu *ATM* neznáme, můžeme pouze predikovat vyšší pravděpodobnost mutace u vzorků s delecí tohoto genu (Austen a kol., 2005). V tomto ohledu tedy mé výsledky daleko lépe zapadají do obecného modelu funkce genu *ATM* a podporují pohled, že jeho aberace vedou k vyšší citlivosti na poškození DNA a nikoli k rezistenci.

U wild-type vzorků bylo sedm vzorků (50 %) na fludarabin rezistentních, pět (36 %) středně citlivých a dva vzorky (14 %) byly na fludarabin citlivé. Z toho tedy vyplývá, že vzorky wt jsou obecně citlivější na fludarabin než vzorky s aberacemi v *p53*, avšak více rezistentní než vzorky s delecí *ATM*.

Dále jsem prováděla testování kombinace rituximab/chlorambucil. Tato kombinace byla testována pouze na omezeném souboru vzorků jako pilotní studie. I zde se však ukazuje, že vzorky s aberacemi v *p53* jsou na chlorambucil převážně rezistentní

a žádný není citlivý, u vzorků s delecí *ATM* a wt vzorků je rezistence mnohem nižší a objevily se i vzorky, které byly na chlorambucil citlivé.

Zvolený *in vitro* systém se ukázal jako funkční. Umožnil mi jednak velmi dobře rozčlenit vzorky podle citlivosti na fludarabin a dále i pozorovat rozdíly v této citlivosti po předchozí aplikaci rituximabu. Výsledky byly homogenní a jsou velice dobře reprodukovatelné – testování jsem prováděla v kvadruplikátech a u některých vzorků jsem testování opakovala nezávisle na další desce. Všechny výsledky byly vyhodnoceny multivariační analýzou MANOVA (Meloun a Militký, 2006) na hladině významnosti $P = 0,05$.

Senzitivizační efekt rituximabu jsem prokázala u šesti (33 %) vzorků s aberacemi *p53*. Tento efekt nebyl závislý na způsobu inaktivace *p53*. U vzorků s delecí *ATM* došlo k senzitivizaci rituximabem u pěti (36 %) vzorků. Nejvýraznější senzitivizační efekt jsem však pozorovala u wt vzorků, kde došlo k ovlivnění osmi (57 %) vzorků.

Celkově tedy z výsledků plyne, že status genů *p53* a *ATM* je determinující pro citlivost B-CLL buněk k fludarabinu, avšak senzitivizace rituximabem je možná u všech tří skupin vzorků.

5.5 Expese klíčových proteinů regulujících apoptózu

Sledování indukce proteinu *p53* patří ke standardu experimentů analyzujících účinek léčebných látek na nádorové buňky. Proto jsem sledovala expresi tohoto proteinu po aplikaci rituximabu, fludarabinu nebo kombinace obou těchto látek. Pro toto sledování jsem použila opět metodu western blottingu. Po přidání fludarabinu došlo k významné indukci tohoto proteinu bez ohledu na předchozí aplikaci rituximabu. Samotná monoklonální protilátka však indukci proteinu *p53* nevyvolala. Tento výsledek odpovídá očekávání, protože fludarabin jako nukleosidové analogum poškozuje DNA buňky, zatímco u monoklonální protilátky se žádné genotoxické působení nepředpokládá.

Dále jsem u malého počtu vzorků zkusila sledovat hladinu proteinu Bax, protože podle některých prací (Pepper a kol., 1999) je nízká exprese proteinu Bax spojena s rezistencí B-CLL buněk na fludarabin. U testovaných vzorků jsem však žádnou souvislost mezi nízkou expresí proteinu Bax a rezistencí na fludarabin nevysledovala.

Stejně tak jsem sledovala i expresi proteinu Bcl-2, který je jedním z hlavních antiapoptotických proteinů. Bylo totiž publikováno (Pepper a kol., 2001), že zvýšená exprese tohoto proteinu determinuje citlivost B-CLL buněk na fludarabin. Ani u tohoto proteinu se jeho exprese u vzorků citlivých a rezistentních nijak významně nelišila a tuto souvislost se mi také nepodařilo dokázat.

Posledním proteinem, jehož expresi jsem sledovala, byla prokaspasa-3 a její štěpení na aktivní kaspasu-3, neboť již dříve bylo publikováno (Stoetzer a kol., 1999), že spontánní i léky indukovaná apoptóza vede v B-CLL buňkách k aktivaci efektorové kaspasy-3. Po působení rituximabu, fludarabinu i kombinace obou těchto látek na B-CLL buňky však k žádnému štěpení prokaspasy-3 nedocházelo, a tudíž se mi ani toto tvrzení nepodařilo prokázat.

Expese proteinu Bax, Bcl-2 a štěpení prokaspasy-3 na aktivní kaspasu-3 jsem sledovala pouze na omezeném počtu vzorků, proto tyto výsledky nelze považovat za určující. Pro získání reprezentativních výsledků bude zapotřebí sledovat expresi těchto proteinů u mnohem většího počtu vzorků. U proteinů Bax a Bcl-2 by také bylo vhodnější sledovat místo exprese jednotlivých proteinů jejich vzájemný poměr (Bcl-2 : Bax), který má lepší výpovědní hodnotu. Tyto proteiny spolu totiž tvoří heterodimer a na jejich vzájemném poměru závisí, zda apoptóza proběhne či nikoli. Pro kaspasu-3 bude třeba určit optimální čas působení a koncentraci testovaných látek. Pokud by alespoň u některých vzorků docházelo ke štěpení kaspasy-3, bylo by zajímavé korelovat toto štěpení s hladinou proteinu Bcl-2. U jednoduchého organismu *Caenorhabditis elegans* bylo totiž prokázáno, že protein Ced-9 (vysoce konzervovaný homolog lidského Bcl-2) zabraňuje apoptóze blokováním efektorových genů *Ced-3* a *Ced-4*, přičemž protein CED-3 je homologem lidské kaspasy-3 (Monney a kol., 1996). Je tedy možné, že zvýšená exprese proteinu Bcl-2 zabraňuje aktivaci kaspasy-3.

6 Shrnutí výsledků

Z výsledků diplomové práce vyplývají následující stěžejní závěry:

- Vysoká hladina proteinu p53 indikuje mutaci v genu *p53*, ne každá mutace však vede k vysoké proteinové hladině. Western blotting tak může sloužit jen jako doplňující metodika screeningu mutací v *p53*.
- Metabolický test viability buněk (WST-1 assay) je velmi spolehlivý nástroj pro sledování účinku monoklonální protilátky rituximab a cytostatik na B-CLL buňky, je dostatečně citlivý a vykazuje dobrou reprodukovatelnost.
- Status genů *p53* a *ATM* výrazně determinuje citlivost B-CLL buněk na fludarabin. Práce potvrzuje vysokou rezistenci vzorků s aberacemi v *p53*, na druhou stranu značné procento vzorků s delecí genu *ATM* vykazuje na fludarabin jasnou citlivost.
- Senzitivizace B-CLL buněk rituximabem pro následně aplikovaný fludarabin je možná u části vzorků bez ohledu na aberace *p53/ATM*. Výraznější procento senzitivizovaných vzorků je však vidět u vzorků wild-type.

7 Literatura

1. Adam Z., Vorlíček J. a kol. (2001): Chronická B-lymfocytární leukémie. In: Adam Z., Vorlíček J. a kol.: Hematologie II. Grada Publishing Praha, 1. vydání, str. 311.
2. Aleskog A., Larsson R., Hoglund M., Kristensen J., Nygren P., Lindhagen E. (2005): *In vitro* drug resistance in B cell chronic lymphocytic leukemia: a comparison with acute myelocytic and acute lymphocytic leukemia. *Anticancer Drugs*, Volume 16, str. 277 – 283.
3. Alvi A. J., Austen B., Weston V. J., Fegan C., MacCallum D., Gianella-Borradori A., Lane D. P., Hubank M., Powell J. E., Wei W., Taylor A. M. R., Moss P. A. H., Stankovic T. (2005): A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitine), overcomes the defect in p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival. *Blood*, Volume 105, str. 4484 – 4491.
4. Austen B., Powell J. E., Alvi A., Edwards I., Hooper L., Starczynski J., Taylor A. M. R., Fegan C., Moss P., Stankovic T. (2005): Mutations in the *ATM* gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of *IGVH* mutation status in patients with B-CLL. *Blood*, Volume 106, str. 3175 – 3182.
5. Banin S., Moyal L., Shieh S., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Smorodinsky N. I., Prives C., Reiss Y., Shiloh Y., Ziv Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, Volume 281, str. 1674 – 1677.
6. Begleiter A., Mowat M., Israels L. G., Johnston J. B. (1996): Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk. Lymphoma*, Volume 23, str. 187 – 201.
7. Blagosklonny M. V. (1997): Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*, Volume 15, str. 1889 – 1893.
8. Blagosklonny M. V. (2000): p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J.*, Volume 14, str. 1901 – 1907.

9. Bosanquet A. G., Sturm I., Wieder T., Essmann F., Bosanquet M. I., Head D. J., Dorken B., Daniel P. T. (2002): Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, Volume 16, str. 1035 – 1044.
10. Byrd J. C., Smith L., Hackbarth M. L., Flinn I. W., Young D., Proffitt J. H., Heerema N. A. (2003): Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab. *Cancer Res.*, Volume 63, str. 36 – 38.
11. Byrd J. C., Stilgenbauer S., Flinn I. W. (2004): Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology 2004*, str. 163 – 183.
12. Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M. (2002): Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 99, str. 15524 – 15529.
13. Cheson B. D. (1992): New antimetabolites in the treatment of human malignancies. *Semin. Oncol.*, Volume 19, str. 695 – 706.
14. Chiorazzi N., Hatzi K., Albesiano E. (2005): B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Volume 1062, str. 1 – 12.
15. Chow K. U., Sommerlad W. D., Boehrer S., Schneider B., Seipelt G., Rummel M. J., Hoelzer D., Mitrou P. S., Weidmann E. (2002): Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes *in vitro*: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica*, Volume 87, str. 33 – 43.
16. Chumchalová J., Kovařík J. (2000): Metodiky testování chemosenzitivity/chemoresistence nádorů *in vitro*. *Klinická onkologie*, Volume 13, str. 18 – 21.
17. Collins R. J., Verschuer L. A., Harmon B. V., Prentice R. L., Pope J. H., Kerr J. F. (1989): Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture *in vitro*. *Br. J. Haematol.*, Volume 71, str. 343 – 350.

18. de Vries A., Flores E. R., Miranda B., Hsieh H. M., van Oostrom C. T. M., Sage J., Jacks T. (2002): Targeted point mutations of *p53* lead to dominant-negative inhibition of wild-type *p53* function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 99, str. 2948 – 2953.
19. Doubek M., Ráčil Z., Mayer J. (2006): Klinické využití humanizované monoklonální protilátky alemtuzumab. MU Brno, 1. vydání, 103 s.
20. Döhner H., Fisher K., Bentz M., Hansen K., Benner A., Cabot G., Diehl D., Schlenk R., Coy J., Stilgenbauer S., Volkmann M., Galle P. R., Poustka A., Hunstein P., Lichter P. (1995): *p53* gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, Volume 85, str. 1580 – 1589.
21. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Eng. J. Med.*, Volume 343, str. 1910 – 1916.
22. Döhner H., Stilgenbauer S., Döhner K., Bentz M., Lichter P. (1999): Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J. Mol. Med.*, Volume 77, str. 266 – 281.
23. Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z. (1980): Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL Praha, 1. vydání, 223 s.
24. el Roubi S., Thomas A., Costin D., Rosenberg C. R., Potmesil M., Silber R., Newcomb E. W. (1993): *p53* gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of *MDR1/MDR3* gene expression. *Blood*, Volume 82, str. 3452 – 3459.
25. Faderl S., Keating M. J., Do K.-A., Liang S.-Y., Kantarjian H. M., O'Brien S., Garcia-Manero G., Manshouri T., Albitar M. (2002): Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*, Volume 16, str. 1045 – 1052.
26. Faderl S., Thomas D. A., O'Brien S., Garcia-Manero G., Kantarjian H. M., Giles F. J., Koller C., Ferrajoli A., Verstovsek S., Pro B., Andreeff M., Beran M., Cortes J., Wierda W., Tran N., Keating M. J. (2003): Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood*, Volume 101, str. 3413 – 3415.

27. Gaidano G., Ballerini P., Gong J. Z., Inghirami G., Neri A., Newcomb E. W., Magrath I. T., Knowles D. M., Dalla-Favera R. (1991): *p53* mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 88, str. 5413 – 5417.
28. Galton D. A., Wiltshaw E., Szur L., Dacie J. V. (1961): The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, Volume 7, str. 73 – 98.
29. Goodman M. G., Spinosa J. C., Saven A., Piro L. D., Wormsley S. (1996): New perspectives on the approach to chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, Volume 22, str. 1 – 10.
30. Grever M. R., Kopecky K. J., Coltman C. A., Files J. C., Greenberg B. R., Hutton J. J., Talley R., von Hoff D. D., Balcerzak S. P. (1988): Fludarabine monophosphate: a potentially useful agent in chronic lymphocytic leukemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, Volume 30, str. 457 – 359.
31. Hainaut P., Hollstein M. (2000): *p53* and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.*, Volume 77, str. 81 – 137.
32. Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D. G., Stevenson F. K. (1999): Unmutated *Ig V(H)* genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Volume 94, str. 1848 – 1854.
33. Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed J. C. (1993): *bcl-2* gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Volume 82, str. 1820 – 1828.
34. Hervé M., Xu K., Ng Y.-S., Wardemann H., Albesiano E., Messmer B. T., Chiorazzi N., Meffre E. (2005): Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J. Clin. Invest.*, Volume 115, str. 1636 – 1643.
35. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C. (1991): *p53* mutations in human cancers. *Science*, Volume 253, str. 49 – 53.
36. Hořejší V., Bartůňková J. (2001): *Základy imunologie*. TRITON Praha, 2. vydání, 152 s.
37. Hupp T. R., Lane D. P., Ball K. L. (2000): Strategies for manipulating the *p53* pathway in the treatment of human cancer. *Biochem. J.*, Volume 352, str. 1 – 17.

38. Juliusson G., Oscier D. G., Fitchett M., Ross F. M., Stockdill G., Mackie M. J., Parker A. C., Castoldi G. L., Guneo A., Knuutila S. a kol. (1990): Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *New Eng. J. Med.*, Volume 323, str. 720 – 724.
39. Kay N. E., Rai K. R., O'Brien S. (2006): Chronic lymphocytic leukemia: current and emerging treatment approaches. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, Volume 4, str. 1 – 12.
40. Keating M. J., Kantarjian H., O'Brien S., Koller C., Talpaz M., Schachner J., Childs C. C., Freireich E. J., McCredie K. B. (1991): Fludarabine: a new agent with marked cytoreductive activity in untreated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, Volume 9, str. 44 – 49.
41. Keating M. J., Kantarjian H., Talpaz M., Redman J., Koller C., Barlogie B., Velasquez W., Plunkett W., Freireich E. J., McCredie K. B. (1989): Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Volume 74, str. 19 – 25.
42. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, Volume 26, str. 239 – 257.
43. King D., Pringle J. H., Hutchinson M., Cohen G. M. (1998): Processing/activation of caspases, -3 and -7 and -8 but not caspase-2, in the induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, Volume 12, str. 1533 – 1560.
44. Kitada S., Andersen J., Akar S., Zapata J. M., Takayama S., Krajewski S., Wang H. G., Zhang X., Bullrich F., Croce C. M., Rai K., Hines J., Reed J. C. (1998): Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. *Blood*, Volume 91, str. 3379 – 3389.
45. Kojima K., Konopleva M., McQueen T., O'Brien S., Plunkett W., Andreeff M. (2006): Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome ATM-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Volume 108, str. 993 – 1000.
46. Kröber A., Seiler T., Benner A., Bullinger L., Brückle E., Lichter P., Döhner H., Stilgenbauer S. (2002): V_H mutation status, CD38 expression level, genomic

- aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Volume 100, str. 1410 – 1416.
47. Lane D. P. (1994): p53 and human cancers. *Br. Med. Bull.*, Volume 50, str. 582 – 599.
48. Lin T. S., Moran M., Lucas M., Waymer S., Jefferson S., Fischer D. B., Grever M. R., Byrd J. C. (2004): Antibody therapy for chronic lymphocytic leukemia: a promising new modality. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, Volume 18, str. 895 – 913.
49. Liu N. S., O'Brien S. (2004): Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Med. Oncol.*, Volume 21, str. 297 – 304.
50. Lozanski G., Heerema N. A., Flinn I. W., Smith L., Harbison J., Webb J., Moran M., Lucas M., Lin T., Hackbarth M. L., Proffitt J. H., Lucas D., Grever M. R., Byrd J. C. (2004): Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with *p53* mutations and deletions. *Blood*, Volume 103, str. 3278 – 3281.
51. Maloney D. G., Smith B., Rose A. (2002): Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin. Oncol.*, Volume 29, str. 2 – 9.
52. Mayer J. (2004): Klinické využití chimerické monoklonální protilátky rituximab. MU Brno, 1. vydání, 71 s.
53. Mayer J., Adam Z. (2004): Bioterapie. In: Adam Z., Vorlíček J. a kol.: *Obecná onkologie*. MU Brno, 1. vydání, str. 221.
54. Mayer J., Starý J. a kol. (2002): Etiologie, Morfologická diagnostika. In: Mayer J., Starý J. a kol.: *Leukemie*. Grada Publishing Praha, 1. vydání, str. 31 – 56.
55. Mavromatis B., Cheson B. D. (2003): Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, Volume 21, str. 1874 – 1881.
56. Meloun J., Militký M. (2006): *Kompendum statistického zpracování: metody a řešené úlohy*. Academia Praha, 2. přepracované a rozšířené vydání, 984 s.
57. Messmer B. T., Messmer D., Allen S. L., Kolitz J. E., Kudalkar P., Cesar D., Murphy E. J., Koduru P., Ferrarini M., Zupo S., Cutrona G., Damle R. N., Wasil T., Rai K. R., Hellerstein M. K., Chiorazzi N. (2005): *In vivo* measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.*, Volume 115, str. 755 – 764.
58. Monney L., Otter I., Olivier R., Ravn U., Mirzasaleh H., Fellay I., Poirier G. G., Borner C. (1996): Bcl-2 overexpression blocks activation of the death protease

- CPP32/Yama/apopain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Volume 221, str. 340 – 345.
59. Montserrat E., Lopez-Lorenzo J. L., Manso F., Martin A., Prieto E., Arias-Sampedro J., Fernandez M. N., Oyarzabal F. J., Odriozola J., Alcalá A., Garcia-Conde J., Guardia R., Bosch F. (1996): Fludarabine in resistant or relapsing B-cell chronic lymphocytic leukemia: the Spanish Group experience. *Leuk. Lymphoma*, Volume 21, str. 467 – 472.
60. Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, Volume 65, str. 55 – 63.
61. Nabhan C., Gartenhaus R. B., Tallman M. S. (2004): Purine nucleoside analogues and combination therapies in B-cell chronic lymphocytic leukemia: dawn of a new era. *Leuk. Res.*, Volume 28, str. 429 – 442.
62. Oscier D. G., Gardiner A. C., Mould S. J., Glide S., Dawis Z. A., Ibbotson R. E., Corcoran M. M., Chapman R. M., Thomas P. W., Copplestone J. A., Orchard J. A., Hamblin T. J. (2002): Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, *IGVH* gene mutational status, and loss or mutation of the *p53* gene are independent prognostic factors. *Blood*, Volume 100, str. 1177 – 1184.
63. Panasci L., Paiement J.-P., Christodoulopoulos G., Belenkov A., Malapetsa A., Aloyz R. (2001): Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair. *Clin. Cancer Res.*, Volume 7, str. 454 – 461.
64. Papajík T., Jarošová M., Plachý R., Indrák K. (2006): Chronická B-lymfocytární leukémie; Část I: Pohled na původ, biologii a genetické změny leukemických buněk. *Trans. Hemat. Dnes*, Volume 12, str. 53 – 61.
65. Pepper C., Thomas A., Hidalgo de Quintana J., Davies S., Hoy T., Bentley P. (1999): Pleiotropic drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia – the role of Bcl-2 family dysregulation. *Leuk. Res.*, Volume 23, str. 1007 – 1014.
66. Pepper C., Thomas A., Hoy T., Fegan C., Bentley P. (2001): Flavopiridol circumvents Bcl-2 family mediated inhibition of apoptosis and drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, Volume 114, str. 70 – 77.

67. Pernin D., Bay J. O., Uhrhammer N., Bignon Y. J. (1999): *ATM* heterozygote cells exhibit intermediate levels of apoptosis in response to streptonigrin and etoposide. *Eur. J. Cancer*, Volume 35, str. 1130 – 1135.
68. Pettitt A. R., Sherrington P. D., Stewart G., Cawley J. C., Taylor A. M. R., Stankovic T. (2001): p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of *ATM* as an alternative to *TP53* mutation. *Blood*, Volume 98, str. 814 – 822.
69. Plunkett W., Huang P., Gandhi V. (1990): Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin. Oncol.*, Volume 17, str. 3 – 17.
70. Prives C. (1998): Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, Volume 95, str. 5 – 8.
71. Robertson L. E., Chubb S., Meyn R. E., Story M., Ford R., Hittelman W. N., Plunkett W. (1993): Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood*, Volume 81, str. 143 – 150.
72. Rosypal S. (2002): Úvod do molekulární biologie, díl třetí. Třetí inovované vydání – dotisk 2002, vlastní náklad.
73. Rozman C., Montserrat E., (1995): Chronic Lymphocytic Leukemia. *New Eng. J. Med.*, Volume 333, str. 1052 – 1057.
74. Shieh S. Y., Ikeda M., Taya Y., Prives C. (1997): DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, Volume 91, str. 325 – 334.
75. Silber R., Degar B., Costin D., Newcomb E. W., Mani M., Rosenberg C. R., Morse L., Drygas J. C., Canellakis Z. N., Potmesil M. (1994): Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine and camptothecin analogs. *Blood*, Volume 84, str. 3440 – 3446.
76. Smolewski P., Szmigielska-Kaplon A., Cebula B., Jamroziak K., Rogalinska M., Kilianska Z., Robak T. (2005): Proapoptotic activity of alemtuzumab alone and in combination with rituximab or purine nucleoside analogues in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk. Lymphoma*, Volume 46, str. 87 – 100.
77. Song Y. H., Mirey G., Betson M., Haber D. A., Settleman J. (2004): The *Drosophila* *ATM* ortholog, dATM, mediates the response to ionizing radiation

and to spontaneous DNA damage during development. *Curr. Biol.*, Volume 14, str. 1354 – 1359.

78. Sorensen J. M., Vena D. A., Fallavollita A., Chun H. G., Cheson B. D. (1997): Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report. *J. Clin. Oncol.*, Volume 15, str. 458 – 465.
79. Stankovic T., Stewart G. S., Fegan C., Biggs P., Last J., Byrd P. J., Keenan R. D., Moss P. A. H., Taylor A. M. R. (2002): Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood*, Volume 99, str. 300 – 309.
80. Stilgenbauer S., Bullinger L., Lichter P., Döhner H., German CLL study group (2002): Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V_H gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*, Volume 16, str. 993 – 1007.
81. Stilgenbauer S., Döhner H. (2002): Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite $p53$ gene mutation and resistance to chemotherapy. *New Engl. J. Med.*, Volume 347, str. 452 – 453.
82. Stilgenbauer S., Lichter P., Döhner H. (2000): Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.*, Volume 4, str. 48 – 72.
83. Stoetzer O. J., Pogrebniak A., Scholz M., Pelka-Fleischer R., Gullis E., Darsow M., Nussler V., Wilmanns W. (1999): Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, Volume 13, str. 1873 – 1880.
84. Sturm I., Bosanquet A. G., Hermann S., Güner D., Dörken B., Daniel P. T. (2003): Mutation of $p53$ and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ.*, Volume 10, str. 477 – 484.
85. Šmardová J., Šmarda J., Koptíková J. (2004): Funkční varianty nádorového supresoru $p53$. *Biologické listy*, Volume 69, str. 191 – 214.
86. Taylor A. M. R., Metcalfe J. A., Thick J., Mak Y.-F. (1996): Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*, Volume 87, str. 423 – 438.
87. Testa J. R., Hino O. (2003): Tumor suppressor genes and the two-hit model of recessive oncogenesis: celebrating Alfred Knudson's 80th birthday. *Genes Chromosomes Cancer*, Volume 38, str. 286 – 287.

88. Trbušek M., Malčíková J., Šmardová J., Kuhrová V., Mentzlová D., Francová H., Bukovská S., Svitáková M., Kuglík P., Linková V., Doubek M., Brychtová Y., Začal J., Kujíčková J., Pospíšilová Š., Dvořáková D., Vorlíček J., Mayer J. (2006): Inactivation of *p53* and deletion of *ATM* in B-CLL patients in relation to *IgVH* mutation status and previous treatment. *Leukemia*, Volume 20, str. 1159 – 1161.
89. Trbušek M., Mayer J. (2004): Molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie se zaměřením na regulaci buněčného cyklu a apoptózy. *Časopis lékařů českých*, Volume 143, str. 84 – 89.
90. Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature*, Volume 408, str. 307 – 310.
91. Vojtěšek B., Bártek J., Midgley C. A., Lane D. P. (1992): An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods*, Volume 151, str. 237 – 244.
92. Vorlíček J., Vyzula R., Adam Z. a kol. (2000): *Praktická onkologie. Vybrané kapitoly*. Grada Publishing Praha, 1. vydání, 344 s.
93. Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P., Fenaux P. (1994): *p53* mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, Volume 84, str. 3148 – 3157.
94. Wendtner C. M., Eichhorst B. F., Hallek M. J. (2004): Advances in chemotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.*, Volume 41, str. 224 – 233.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1:** Křivky přežití B-CLL pacientů s mutovaným a nemutovaným *IgVH* lokusem
- Obr. 2:** Pravděpodobnost přežití od data diagnózy onemocnění u pacientů v pěti genetických kategoriích
- Obr. 3:** Křivky přežití 300 pacientů s delecí 17p a 11q (bez ohledu na mutační status *IgVH*), s mutovaným a nemutovaným *IgVH* lokusem (bez delece 17p nebo 11q)
- Obr. 4:** Struktura proteinu p53 včetně znázornění důležitých fosforylačních míst v jednotlivých doménách
- Obr. 5:** Chemická struktura chlorambucilu
- Obr. 6:** Chemická struktura fludarabinu
- Obr. 7:** Pravděpodobnost přežití od začátku terapie fludarabinem u 50 B-CLL pacientů s (12 pacientů) a bez (38 pacientů) delece *p53*
- Obr. 8:** Mechanismy působení monoklonálních protilátek
- Obr. 9:** Schematické znázornění struktury rituximabu
- Obr. 10:** Štěpení tetrazoliové soli WST-1 na formazan
- Obr. 11:** Schéma nasazení 96-jamkové desky
- Obr. 12:** Western blotting pacientů P1 – P9
- Obr. 13:** Western blotting pacientů P10 – P18
- Obr. 14:** Exprese proteinu Bax u pacientů rezistentních (R), středně citlivých (SC) a citlivých (C) na fludarabin
- Obr. 15:** Exprese proteinu Bcl-2 u pacientů rezistentních (R), středně citlivých (SC) a citlivých (C) na fludarabin
- Obr. 16:** Štěpení prokaspasy-3 na aktivní kaspasu u dvou vzorků B-CLL ovlivněných příslušnými látkami
- Obr. 17:** Exprese proteinu p53 po ovlivnění buněk rituximabem a fludarabinem

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1:** Nejčastější chromosomové aberace u B-CLL, jejich frekvence a prognóza
- Tabulka 2:** Koncentrace používaných cytostatik (koncentrace pro FLU v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro CLB v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Tabulka 3:** Pacienti s aberacemi v genu *p53* a exprese proteinu p53 (počet + značí velikost exprese proteinu p53)
- Tabulka 4:** Srovnání senzitivizace vzorků rituximabem v jednotlivých skupinách pacientů
- Tabulka 5:** Senzitivizace vzorků s aberacemi *p53* rituximabem

SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1:** Rozložení aberací v genu *p53* u testovaných pacientů
- Graf 2:** Exprese proteinu p53 u pacientů s aberacemi v genu *p53*
- Graf 3a:** Rezistence/citlivost vzorků s aberacemi v *p53* na fludarabin
- Graf 3b:** Rezistence/citlivost vzorků s aberacemi v *p53* na fludarabin
- Graf 4:** Rezistence/citlivost na fludarabin u vzorků s delecí ATM
- Graf 5:** Rezistence/citlivost na fludarabin u wt vzorků
- Graf 6:** Ukázka vzorku s aberací v *p53* (P10) senzitivizovaného rituximabem
- Graf 7:** Ukázka vzorku s delecí ATM senzitivizovaného rituximabem
- Graf 8:** Ukázka wt vzorku senzitivizovaného rituximabem
- Graf 9:** Ukázka vzorku s aberací *p53* (P16) bez senzitivizace rituximabem
- Graf 10:** Ukázka vzorku s delecí ATM bez senzitivizace rituximabem
- Graf 11:** Ukázka wt vzorku bez senzitivizace rituximabem

PŘÍLOHY

TESTOVÁNÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY RITUXIMAB U B-CLL BUNĚK *IN VITRO*

Čejková Soňa, Trbušek Martin, Chumchalová Jitka, Ročňová Ludmila, Mayer Jiří

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je nejčastější leukémie v západní světě. K její léčbě se stále používají alkylační látky a nukleosidová analoga. I zde se však prosazuje moderní trend v hematologii – použití monoklonálních protilátek (např. rituximab, anti-CD20). V literatuře je popsáno, že rituximab (rtx) má na B-CLL buňky jen omezené účinky, existuje však předpoklad, že by je mohl senzitivizovat pro cytostatika.

Po aplikaci samotného rituximabu na B-CLL buňky v různých koncentracích (10, 20, 30, 40 µg/ml) byla situace heterogenní. U některých vzorků rituximab zvyšoval a u jiných snižoval viabilitu buněk (detekovanou pomocí WST-1). Chování buněk bylo nezávislé na námi sledovaných parametrech: mutacích v genu *p53* a delecích lokusu *ATM*.

Většina B-CLL buněk ovlivněných rituximabem byla signifikantně citlivější k fludarabinu než buňky neovlivněné. Tato senzitivizace nebyla závislá na statusu *p53* a *ATM*. Vůbec nejcitlivější ke kombinaci rituximab-fludarabin byly buňky s delecí *ATM*.

Pro kombinaci rituximabu s fludarabinem (adenosinové analogum) jsme zvolili 2 základní přístupy – aplikovali jsme obě látky současně, nebo jsme po 72 hod ošetření buněk rituximabem přidali fludarabin. Naše průběžné výsledky naznačují, že B-CLL buňky jsou obecně více citlivé k fludarabinu po předchozím ošetření rtx, než pokud se aplikují obě látky současně.

Samotný mechanismus účinku rtx na B-CLL buňky se snažíme objasnit pomocí moderních genomických a proteomických přístupů.

Podporováno grantem IGA MZ č. 8445-3/2005

Abstrakt ve sborníku II. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Solen Olomouc, 2006, str. 12, ISBN 80-239-8240-0

IN VITRO TESTING OF MONOCLONAL ANTIBODY RITUXIMAB ON CELLS OF B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Čejková Soňa, Trbušek Martin, Chumchalová Jitka, Ročňová Ludmila, Mayer Jiří

Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Clinic of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most common adult leukemia in the Western world. The disease is generally treated by purine analogs or alkylator agents. Utility of monoclonal antibodies (Mab), e.g. rituximab – anti-CD20 or alemtuzumab – anti-CD52, represents a modern trend in a nowadays oncology. The efficacy of the B-cell specific Mab rituximab is, however, limited when used as a monotherapy. Promising results are being obtained, on the contrary, when the rituximab is combined with some standard chemotherapeutics. We tested this possibility for the most frequently used drug fludarabine, on our cohort of B-CLL samples characterized for two key tumor-suppressors, the p53 and ATM. A cell viability assay (WST-1) was used for the detection.

The rituximab itself applied in a standard concentration (10µg/ml) manifested a diverse effect on the B-CLL cells, with increasing a metabolic activity of some but decreasing in other samples. This phenomenon, which we study now in more details, was independent on the status of the monitored genes.

Resistance to fludarabin was obviously high in the samples bearing the p53 inactivation but not in the ones harboring the ATM deletion. The latter samples were even more sensitive to fludarabine than the *wild-type* cells. Sensitization by a standard dose of rituximab (applied for 72h) to subsequently used fludarabin (48h) in four different concentrations was possible for some samples of all the three categories. The p53/ATM status is thus important for the sensitivity to fludarabin itself, but does not count for the potentiation effect of rituximab. Recently, we are trying to elucidate the mechanism behind rituximab action by using modern genomic (DNA microarray) and proteomic (2-D elfo and MS detection) approaches.

This project is supported by grant IGA MZ no. 8445-3/2005.

Abstrakt ve sborníku XI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova universita Brno, 2007, str. 19, ISBN 80-210-4234-6

RITUXIMAB SENSITIZES SOME B-CLL SAMPLES TO FLUDARABINE AND CHLORAMBUCIL IN VITRO, REGARDLESS OF P53/ATM STATUS

Trbušek Martin, Čejková Soňa, Ročňová Ludmila, Potěšil David, Chumchalová Jitka, Šmardová Jana, Malčíková Jitka, Kuglík Petr, Doubek Michael, Brychtová Yvona, Pospíšilová Šárka, Mayer Jiří

Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Clinic of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno

Background: Aberrations of two co-operating genes, the p53 and ATM, significantly deteriorate prognosis and treatment options for B-CLL patients. Monoclonal antibody rituximab (anti-CD20) is preferably used in combination regimens in B-CLL, often in those containing fludarabine. Very few *in vitro* data exist, however, showing an effect of such common treatment on B-CLL cells with aberrant p53 and/or ATM. In this respect, the data are also missing for a potential application of rituximab with chlorambucil.

Aims: The aims were to assess the *in vitro* effect of the above mentioned combinations of drugs on B-CLL cells with various p53/ATM status.

Methods: An interphase FISH was used for a determination of p53 and ATM deletions. Functional FASAY analysis coupled to sequencing was employed to supplement the screening also for p53 mutations. A metabolic WST-1 assay monitored the drugs effect on cell viability. An *in vitro* system lacking active human plasma was used, thus omitting the CDC pathway. After rituximab pre-treatment (10µg/ml, 72h) the chemotherapeutics were applied in four concentrations for additional 48h (F: 25 - 0.4µg/ml; CLB: 50 - 6.25 µM). Two-way analysis of variance (ANOVA) was used for determination of rituximab pre-treatment significance.

Results: For the rituximab/fludarabine combination we tested forty samples having a median 85% of B-CLL lymphocytes, with the following characteristics: 13 were *wild-type*, 10 harbored ATM deletion (median 83% of deleted cells) and 17 exhibited p53 defects of various complexity - both alleles inactivation (del/mut and mut/mut) as well as the separate (one allele) aberrations (del or mut). The sensitivity to fludarabine was determined for the concentration 1.6µg/ml, which provided significant differences among the samples. The sensitivity was assessed as follows: resistant - viability \geq 60%; medium - viability $<$ 60% and \geq 40%; sensitive - viability $<$ 40%. The p53-affected samples were mostly resistant (71%) and none were sensitive. Among ATM deleted samples, on the contrary, 40% were sensitive, what was more than in *wild-type* subgroup (23%). Rituximab alone slightly increased a metabolic activity in most of samples, usually to 110-130% compared to untreated controls, while rarely a decrease was also noted (up to 80%). When the viability of fludarabine-treated and rituximab/fludarabine-treated samples was assessed in relation to fully untreated control, the positive sensitization effect of rituximab pre-treatment ($P < 0,05$) was noted as follows: within the p53-affected as well as ATM-deleted subgroups in 30% of samples and within the *wild-type* subgroup in 62% of samples. For the rituximab/chlorambucil testing, which was performed as a pilot

study in the same manner in eight samples, the positive effect of antibody pre-treatment was also noted in some samples of all the three subgroups.

Summary/Conclusions: Our results indicate that the p53/ATM status is critical for the sensitivity of B-CLL cells to fludarabine. Regardless of the p53 and ATM aberrations, some samples are available for the rituximab-mediated sensitization to this agent. Our pilot data also support a warranty of testing a combined regimen containing rituximab and chlorambucil.

Supported by grant IGA MH CR No. 8445-3/2005.

Přijato jako poster na 12. kongres European Hematology Association, Vídeň, 7. – 10. června 2007.