

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Studium buněčného cyklu
u maligních lymfomů řady B**

Jana Šiftancová

PRAHA 2007

Školitelka: RNDr. Petra Mandřáková, Ph.D.

Prohlašuji, že práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce.

V Praze dne

1. 9. 2007

Jana Šiftancová



Poděkování:

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Petře Mandřákové, Ph.D. za trpělivost, vlídnost a odborné vedení při zpracování mé diplomové práce. Zároveň chci poděkovat spolupracovníkům Mgr. Elišce Stránské, Haně Kortánkové a MUDr. Vítovi Camprovi za jejich ochotu přispět cennou radou a pomocí. Dále také celé laboratoři imunohistochemie, vedené RNDr. Marcelou Mrhalovou, Ph.D., za poskytnutí imunohistochemických výsledků pro srovnání dat. Všem by jsem ráda poděkovala za jejich přátelskou pomoc a příjemné pracovní prostředí.

Granty

Interní grant FNM 9757 (2006):

Vyšetřování proliferační aktivity u non-Hodgkinských lymfomů s nízkým stupněm malignity pomocí průtokové cytometrie. Korelace s morfoloogickým nálezem a klinickou manifestací, vliv na prognózu a léčebnou odpověď.

Hlavní řešitel: MUDr. Kamarádová Kateřina

Interní grant FNM 9754 (2006):

Studium exprese proteinů p53 a cyklinu D1 jako indikátorů maligního procesu metodou western blotting.

Hlavní řešitel: Mgr. Stránská Eliška

Výzkumný záměr FNM 00000064203 číslo 6704 (2007):

Zdokonalení komplexní morfoloogické a molekulární diagnostiky různých typů malignit dětí a dospělých k individualizaci terapie.

Hlavní řešitel: RNDr. Mrhalová Marcela, Ph.D.

Studium buněčného cyklu u maligních lymfomů řady B

Abstrakt

Úvod: U maligních lymfomů má buněčná kinetika souvislost s histologickým gradem a klinickým chováním nádorů. Předmětem studie bylo sledování proliferace buněk (MFI CD71; PI) a exprese významných regulátorů buněčného cyklu cyklinu D1, p21, p27 a p53 u pacientů s infiltrací B buněčných ne-Hodgkinských lymfomů (B-NHL). Exprese těchto proteinů bývá u nádorů často deregulována a detekce hladiny těchto proteinů mohou pomoci při stanovení diagnózy a prognózy pacienta.

Metody: Metodou průtokové cytometrie jsem u 112 pacientů analyzovala proliferační aktivitu stanovením obsahu DNA a proliferačního indexu (PI) a mediánu intenzity fluorescence transferinového receptoru CD71 (MFI). Proteiny cyklin D1, p21, p27 a p53 jsem analyzovala průtokovou cytometrií (n = 80) a western blotem (n = 61).

Výsledky: Proliferační aktivita buněk se zvyšovala s agresivitou lymfomu [PI ($p < 0,0001$), MFI CD71 ($p < 0,0075$)]. Vysokou proliferační aktivitu jsem zjistila u B-NHL s aneuploidní DNA [PI ($p < 0,0001$), MFI CD71 ($p < 0,0016$)]. Ukázala jsem, že stanovení MFI CD71 a PI je vhodný marker pro odlišení nízce maligního folikulárního lymfomu (FL) od jiných, vysoce maligních, B-NHL s identickým imunofenotypem (Burkittův lymfom, difuzní velkobuněčný lymfom, FL high). Overexprese cyklinu D1 zjištěná těmito metodami byla typická pro MCL, oproti ostatním non-MCL lymfomům ($p < 0,0001$). U proteinu p21 jsem nenalezla statisticky významný vztah mezi proliferací, typem B-NHL nebo stupněm malignity. U proteinu p27 byla patrná nepřímá úměra mezi proliferační aktivitou buněk a jeho expresí. Vysoké hladiny tohoto inhibitoru jsem prokázala u nízce maligních lymfomů s nízkou proliferační aktivitou ($p < 0,0002$) a naopak tomu bylo u lymfomů vysoce maligních. Overexpresi p53 jsem detekovala zejména u agresivních lymfomů. Ta byla často doprovázena chromozomálními aberacemi a slabou expresí p27.

Závěr: Získané výsledky ukazují na význam analýzy proliferační aktivity ve vztahu se stupněm malignity B-NHL. Ověřují dostatečnou citlivost metody průtokové cytometrie i WB k detekci cyklinu D1 a jsou tudíž vhodné k diagnostice MCL. Výsledky prokazují prognostický význam stanovení proteinů p27 a p53, na druhou stranu neukazují na jednoznačnou využitelnost analýzy proteinu p21 jako prognostického znaku.

Klíčová slova: B-NHL, buněčný cyklus, proliferace buněk, cyklin D1, p21, p27, p53

Analysis of cell cycle in B-cell lymphomas

Abstract

Introduction: In malignant lymphomas, the cell kinetics is related to the histological grade as well as to the clinical behavior. The aim of the study was to investigate the cell proliferation (MFI CD 71; PI) and the expression of important regulators of the cell cycle, i.e. cyclin D1, p21, p27 and p53, in patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL). The expression of these proteins is often deregulated and the quantification of these proteins might be helpful for the specification of the diagnosis and prognostication of patients.

Methods: The proliferative activity was analysed in 112 patients by flow cytometry through assessment of the amount of DNA, proliferation index (PI), and median fluorescence intensity of transferrin receptor CD 71 (MFI): Further, cyclin D1, p21, p27 and p53 were analyzed by means of flow cytometry (n = 80) and western blot (n = 61).

Results: Cell proliferation activity increased according to the increasing malignancy of lymphomas [PI (p < 0.0001), MFI CD71 (p < 0.0075)]. Increased proliferative activity was detected in B-NHL with aneuploid DNA [PI (p < 0.0001), MFI CD71 (p < 0.0016)]. I demonstrated that the assessment of MFI CD71 and PI is a suitable method for the distinguishing between the low-grade follicular lymphomas (FLs) and high-grade B-NHLs with identical immunophenotype (Burkitt lymphoma, diffuse large B cell lymphomas, FL high). The overexpression of cyclin D1 detected by these methods was typically present in mantle cell lymphomas (MCLs), in contrast to the other non-MCL lymphomas (p < 0.0001). No statistically significant association between the p21 protein expression and the proliferation, the type or grade of the specific B-NHL was disclosed. The inverse correlation between the proliferative activity and the p27 expression was evident in the data. I demonstrated high level of this inhibitor in low-grade lymphomas with low proliferative activity (p < 0.0002) in contrast to high-grade lymphomas. I detected an overexpression of p53 especially in aggressive lymphomas, which are accompanied with chromosomal aberrations and low level of p27 expression.

Conclusions: The obtained results pointed out the importance of the analysis of the proliferative activity and its correlation to the grade of B-NHL. They confirmed the superior sensitivity of flow cytometry and WB as methods for cyclin D1 detection and therefore they are suitable for diagnostic evaluation of MCL. The results prove prognostic value of the p27 and p53 proteins assessment, on the other hand, they don't show clear evidence for a potential use of p21 as a prognostic marker.

Keywords: B-NHL, cell cycle, cell proliferation, cyclin D1, p21, p27, p53

Obsah

1	Úvod	12
2	Literární přehled	14
2.1	Maligní lymfomy B řady	14
2.1.1	Historie klasifikace hematooonkologických onemocnění	14
2.1.2	WHO klasifikace lymfomů	15
2.1.2.1	B-NHL	15
2.2	Buněčný cyklus	18
2.2.1	Obecné charakteristiky	18
2.2.2	Základní vlastnosti jednotlivých fází	18
2.2.3	Proliferační markery	19
2.2.3.1	CD71	20
2.2.3.2	Ki-67	20
2.2.4	Regulace buněčného cyklu	20
2.2.4.1	Regulace buněčného cyklu komplexem cyklin-cdk	21
2.2.4.1.1	Cykliny D typu	23
2.2.4.2	Inhibitory cyklin dependentních kináz	25
2.2.4.2.1	Inhibitor buněčného cyklu p21	25
2.2.4.2.2	Inhibitor buněčného cyklu p27	27
2.2.4.3	Tumor-supresorový gen p53	28
2.2.4.3.1	Gen a struktura lidského TP53	28
2.2.4.3.2	Funkce proteinu p53	29
2.2.4.3.3	Poškození proteinu p53	31
3	Materiál a metodika	32
3.1	Materiál a chemikálie	32
3.1.1	Materiál	32
3.1.2	Používané roztoky a chemikálie	32
3.1.2.1	Protilátky	32
3.1.2.2	Roztoky	33
3.2	Metody	37
3.2.1	Průtoková cytometrie	37
3.2.2	Western blot	41
3.3	Statistická analýza	44
4	Výsledky	45
4.1	Proliferační markery	45

4.2	Proteiny buněčného cyklu	52
4.2.1	Cyklin D1	53
4.2.2	Protein p21	55
4.2.3	Protein p27	57
4.2.4	Protein p53	61
5	Diskuze	64
5.1	Ploidie, proliferační aktivita buněk a s tím související prognóza.....	64
5.2	Cyklin D1	66
5.3	Protein p21	67
5.4	Protein p27	68
5.5	Protein p53.....	70
6	Souhrn	72
7	Seznam literatury	74

Zkratky

14-3-3 - multifunkční rodina regulačních bílkovin

Apaf-1 - protein účastnící se v apoptóze

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

B-ALL - prekurzorová B lymfoblastická leukemie

B-CLL - chronická lymfocytická leukemie

bax - onkogen (bcl-2 associated X protein)

BL - Burkittův lymfom / leukemie

B-PLL - B prolymfocytární leukemie

CAK - aktivační kináza cdk

c-AMP - cyklický adenosin 3, 5 - monofosfát

CD - diferenciační antigeny (cluster of differentiation)

CD 71 - proliferační marker, receptor pro transferin

cdc25 - fosfatáza buněčného cyklu, specificky defosforylující cdk

cdk - cyklin dependentní kinázy

CIP/KIP - inhibitory cyklin-dependentních kináz (cdk-interagující protein/kináza-inhibující protein, cdk-interacting protein/kinase-inhibitory protein)

C-Myc - protoonkogen účastnící se regulace proliferace buňky

DI - DNA index

DLBCL - difuzní velkobuněčný lymfom řady B

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DNA-PK - DNA-dependentní protein kinázou

E2F - transkripční faktor

EBV - virus Epsteina a Barrové

FACS - průtokový cytometr (fluorescence-activated cell sorter)

Fas - receptor pro FAS ligand účastnící se apoptózy

FITC - fluorescein izothiokyanát

FL - folikulární lymfom

FL1, FL2, FL3 - detektor fluorescence

FSC - přední rozptyl (forward scatter)

G₀ - klidová fáze buněčného cyklu

G₁ - fáze buněčného cyklu předcházející fázi S

G₂ - fáze buněčného cyklu následující po fázi S a předcházející mitózu

GADD45 - marker progresu buněčného cyklu (Growth arrest and DNA damage 45 protein)

HCL - leukemie z vlasatých buněk

HIV - virus lidské imunodeficiency (human immune deficiency virus)

HL - Hodgkinův lymfom

IGF-BP3 - růstový faktor (Growth Factor Binding Protein 3)

IgH - těžký řetězec imunoglobulinu

IHC - imunohistochemie

INK - inhibitory cyklin-dependentních kináz

KD - kostní dřev

Ki-67 - proliferační marker

LPL - lymfoplazmocytární lymfom

LU - lymfatická uzlina

M - mitotická fáze

MALT - lymfom marginální zóny extranodálního typu

MCL - lymfom pláštěvé zóny

MDM2 - onkoprotein (Mouse Double Minute 2)

Mik1 - kináza fosforylující cdk1

MM - mnohočetný myelom

MPF - faktor podporující M-fázi (mitose promoting factor)

mRNA - jednovláknová informační ribonukleová kyselina

MZL - lymfom marginální zóny

NHL - non-Hodgkinův lymfom

p16, p15, p18, p19 - regulační proteiny buněčného cyklu

p21, p27, p53, p57, p48 - regulační proteiny buněčného cyklu

PCNA - proliferační marker

PE - fykoerytrin

PE-Cy5 - tandemový konjugát (FRET)

PEST - oblast bohatá na prolin, kyselinu glutamovou, serin a treonin.

PI - proliferační index (zde % buněk S+G₂/M-fáze)

PK - periferní krev

Puma - protein účastnící se v apoptóze

R2 - protein účastnící se oprav DNA

Rb - protein retinoblastomu

REAL - Revised European-American Classification of Lymphoid neoplasms

RNA - ribonukleová kyselina

S - fáze buněčného cyklu charakterizovaná proteosyntézou

SLL - malobuněčný lymfom

SMZL - lymfom marginální zóny splenický

SSC - boční rozptyl (side scatter)

SV40 - virus Simian 40

TGF- β - transformující růstový faktor beta

Wee1 - kináza fosforylující cdk1

WHO - světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

1 Úvod

Studium a poznání biologie růstu a diferenciaci s tím spojené jsou v současné době jedním z nejdůležitějších témat studií.

Pochopení dějů, které se odehrávají v nádorové buňce (role růstových faktorů, regulace buněčného cyklu a apoptózy, znalost mechanismů signální transdukce, transkripce, mechanismů metastazování a řady dalších) mohou vést k zavádění nových molekulárně biologických a genových, netoxických a nádorově specifických léčebných postupů.

Nádorová transformace vzniká následkem genetických změn, které způsobují nekontrolovatelné buněčné dělení. Podle posledních celosvětových studií mají nádorová onemocnění stoupající tendenci. Pro malou úspěšnost terapie a tím i relativně vysokou mortalitu je stále nejdůležitější primární a sekundární prevence.

Diagnostické cíle se zaměřují zejména na včasné určení choroby kombinací přístupů morfologických, cytometrických i molekulárně biologických. Snahou je definovat změny již v přednádorovém, případně v preklinickém stadiu. Důležitá je hlavně přesná diagnóza se správně stanoveným stupněm malignity nádorů, aby mohla být nasazena co nejefektivnější léčba.

Tématem této práce je studium proteinů buněčného cyklu u lymfomů. Lymfom je obecný název pro celou řadu nádorů, které vznikají z nekontrolovaně se dělících buněk lymfatického systému. Dle WHO klasifikace se primárně dělí na lymfom Hodgkinův (HL) a ne-Hodgkinův (NHL). NHL se dále dělí na lymfomy z B, méně časté z T a vzácně i z NK buněk (HARRIS 1999, JAFFE et al. 2001).

Lymfomy nepatří mezi příliš častá onemocnění, tvoří „pouhých“ 6 % všech nově zjištěných nádorových onemocnění. Z toho NHL zastupují necelých 5 % a zbývající 1 % připadá na HL. Maligní lymfomy představují pátý nejčastější nádor u mužů ve Spojených státech a sedmý až osmý v Evropě. V České republice je výskyt lymfomů také na páté pozici a četnost onemocnění NHL je odhadována přibližně na 1400 nových případů ročně (KOZÁK 2005).

NHL postihují převážně muže, kdy poměr onemocnění u mužů je skoro dvojnásobný než u žen. Výskyt NHL exponenciálně vstupuje s věkem. Medián věku při diagnóze bývá kolem 50 let. Podle statistik narůstá výskyt NHL u dospělých nad 30 let mnohem rychleji než výskyt ostatních nádorů. Za posledních 40 let vzrostl o 40 %, přičemž nejrychleji roste ve věkových skupinách nad 45 let, a zejména pak nad 75 let (PAPAJÍK 2004).

Příčiny vzniku této nemoci nejsou dosud přesně známy. Popsána již byla řada faktorů, které riziko lymfomů zvyšují.

Cílem mé práce bylo osvojit si laboratorní dovednosti a následně přispět k porozumění patogeneze NHL v závislosti na expresi důležitých regulátorů buněčného cyklu.

Cíle:

1) Zavést cytometrickou DNA-analýzu buněčného cyklu a data porovnat s expresí proliferačních markerů stanovených cytometricky (CD71) a imunohistochemicky (Ki-67).

2) Zavést vyšetřování cyklinu D1 pomocí průtokové cytometrie a WB. Srovnání výsledků s imunohistochemií. Tento protein je klíčový pro diagnózu lymfomu z plášťových buněk (MCL).

3) Zavést cytometrické i western blotové (WB) vyšetřování inhibitorů buněčného cyklu p21 a p27, které jsou důležité v regulaci a proliferaci buňky a mohly by mít prognostický význam, včetně vzájemného srovnání výsledků.

4) Zavést vyšetřování proteinu p53 pomocí průtokové cytometrie a WB za současné korelace výsledků s imunohistochemií. Mezi nejčastěji se vyskytující mutace u lidských nádorů patří ty, které postihují právě antionkogen p53. Některé mutace mohou způsobit hromadění tohoto proteinu, který se následně stává detekovatelným. Tento gen je mutován u více jak 50 % nádorů a nese s sebou horší prognózu pro pacienta.

5) Ověření využitelnosti výsledků pro diagnostiku a stanovení prognózy u B-NHL.

2 Literární přehled

2.1 Maligní lymfomy B řady

2.1.1 Historie klasifikace hematologických onemocnění

V průběhu posledních 30 let 20. století docházelo intenzivně k opakované snaze o vytvoření systematiky hematologických malignit. Tyto specifické nádory vycházejí z kmenových buněk a diferenciačních stádií lymfopoézy. Tradičně jsou nazývané leukemie a lymfomy.

Leukemie je charakterizována infiltrativním a minimálně destruktivním růstem nejčastěji monoklonálních nádorových buněk v kostní dřeni a většinou i přítomností v periferní krvi. Nádory s velkou přítomností transformovaných buněk v periferní krvi jsou leukemické. Naopak ty, které v periferní krvi nemají transformované buňky, jsou aleukemické.

Lymfom roste zpočátku jako invazivní lokální nádor s tendencí k destruktivnímu růstu a častými metastázami. Lymfomy mohou postihovat kostní dřeň a leukemizovat.

Vývoj klasifikací lymfomů směřoval od čistě popisné morfologické klasifikace popisované v padesátých letech Rappaportem ke klasifikaci, která vycházela z diferenciačních stádií lymfoidních elementů (Lukes a Collins 1974). Obě tato hlediska se pokusili sjednotit v tzv. Kielské (Lennertově) klasifikaci (1975, 1978), která vycházela z nových poznatků fyziologie lymfocytů. Velké množství diagnostických jednotek pak vedlo k neúměrně zjednodušující tzv. „Working formulation for Clinical Use“ neboli „Pracovní formulace“ (1982). Zde se lymfomy dělily na nízce, středně a vysoce maligní s ne příliš dobrou morfologickou specifikací v každé skupině (DIELBOLD et al. 1997, ADAM et al. 1998).

Pro hodnocení nádorových onemocnění, vycházejících z lymfatických tkání, vznikla v roce 1993 tzv. „A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms“ zkráceně označovaná jako REAL klasifikace. Tato klasifikace v sobě zahrnuje reálné nozologické jednotky, definované na základě morfologie, imunofenotypizace, klinických rysů a genetiky. REAL klasifikace rovněž rozlišuje histologický grading a klinickou agresivitu nemoci. (HARRIS et al. 1994, ADAM et al. 1998, HARRIS et al. 2000)

Nejnovější klasifikací z roku 2001 je klasifikace Světové zdravotnické organizace (World Health Organization) označovaná jako WHO klasifikace. Rovněž vychází ze stejných principů jako REAL klasifikace. WHO klasifikuje všechny hematologické nádory, které rozděluje podle vzniku z příslušné fyziologické vývojové řady na nádory myeloidních

tkání, nádory z lymfatických tkání, nádorová onemocnění vycházející z mastocytů a nádory z histiocytů a dendritických buněk (HARRIS et al. 1999, HARRIS et al. 2000, JAFFE et al. 2001).

2.1.2 WHO klasifikace lymfomů

Lymfom je neoplastický útvar, který vzniká proliferací lymfatické tkáně. Nejčastěji se vyskytuje v mízních uzlinách, ale také může vznikat z lymfoidních buněk v jiných orgánech (např. trávicí trakt, kůže a jiné).

Lymfomy jsou rozděleny na dva základní typy. Jsou to lymfomy HL a NHL. NHL jsou potom děleny na nádory z B a T/NK buněk (JAFFE et al. 2001).

2.1.2.1 B-NHL

Tato práce je zaměřena na nádory z B buněk (Tab. 1). Stručná charakteristika nejčastějších B-NHL je uvedena v dalším textu (podrobněji viz seminární práce ŠIFTANCOVÁ 2005).

Nádory z prekurzorů B buněk

- Prekurzorová B lymfoblastická leukemie / lymfom (B-ALL/LBL)

Nádory ze zralých (periferních) B buněk

- Malobuněčný lymfocytický lymfom / leukemie (B-CLL/SLL)
- B prolymfocytární leukemie (B-PLL)
- Lymfoplazmocytární lymfom (LPL)
- Leukemie z vlasatých buněk (HCL)
- Plazmocytární myelom (MM)
- Lymfom marginální zóny (MZL)
- Folikulární lymfom (FL)
- Lymfom plášťové zóny (MCL)
- Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL)
- Burkittův lymfom / leukemie (BL)

Tab. 1: Dělení maligních B lymfoproliferací podle WHO klasifikace (JAFFE et al. 2001)

B-CLL: B-CLL, zástupce nízce maligních lymfomů, vyskytující se zejména u mužů nad 50 let, charakterizuje přítomnost buněk vzhledu zralých lymfocytů v periferní krvi a hojná infiltrace kostní dřeně a lymfatických uzlin. Může se transformovat v lymfom s vyšším stupněm malignity (Richterův syndrom) (Obr. 1, Obr. 2, Graf 1) (JENNINGS et al. 1997, MONAGHAN et al. 2003, HALLEK et al. 2005).

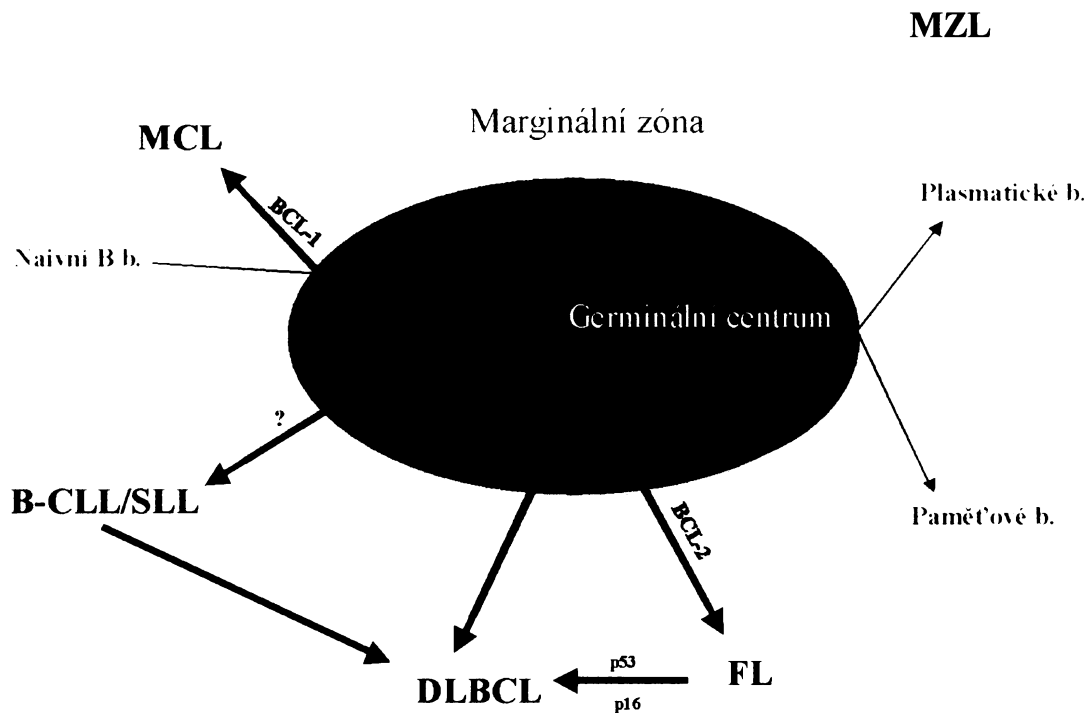
MZL: Dle WHO klasifikace se dělí na splenický, nodální a extranodální lymfom. Nejpočetnější jsou extranodální (MALT) lymfomy v trávicím traktu, dále ve slinných žlázách, plicích, kůži aj.. MALT lymfomy žaludku mají souvislost s chronickou infekcí *Helicobacter pylori*. Nízce maligní lymfom roste lokálně a nešíří se do okolních orgánů (Obr. 1, Obr. 2, Graf 1) (ISAACSON 1996, CATOVSKY A MATUTES 1999, HARRIS a ISAACSON 1999, DOGAN a ISAACSON 2003).

FL: Jedná se o nízce maligní nádor lymfatických uzlin z buněk zárodečných center folikulů. Většinou se objevuje u dospělých pacientů. U FL se vyskytuje translokace t(14;18); BCL-2 gen bývá přeskupen u 70-90 % případů (LIMPENS et al. 1991). Prognóza se zhoršuje se zvyšujícím se podílem centroblastů a s difúzním typem růstu. Je možná transformace do high-grade velkobuněčného B lymfomu (Obr. 1, Obr. 2, Graf 1) (GROGAN 1996, JAFFE et al. 2001).

MCL: Z malobuněčných lymfomů má nejhorší prognózu, spojuje nepříznivé znaky low a high-grade lymfomů. Objevuje se u starších lidí, převážně mužů, kdy poměr muž : žena je 7:1. Postižené jsou lymfatické uzliny, Waldeyerův okruh, slezina, kostní dřeň a v extranodální lokalizaci trávicí trakt. Translokace t(11;14) přítomná u většiny pacientů vede k přeskupení a aktivaci BCL-1 (cyklin D1) genu (Obr. 1, Obr. 2, Graf 1). (SZCZARKOWSKI et al. 1996, CAMPO et al. 1999, LIU et al. 2002).

DLBCL: Vyskytuje se v různých věkových kategoriích. Asi ve 40 % případů se lymfom objevuje mimo lymfatické uzliny. Vzniká buď z nízce maligního B-buněčného lymfomu, nebo de novo. Jde o agresivně se chovající nádor, který je potenciálně léčitelný (Obr. 1, Obr. 2, Graf 1) (CHAN et al. 1995, JAFFE et al. 2001, XU et al. 2001).

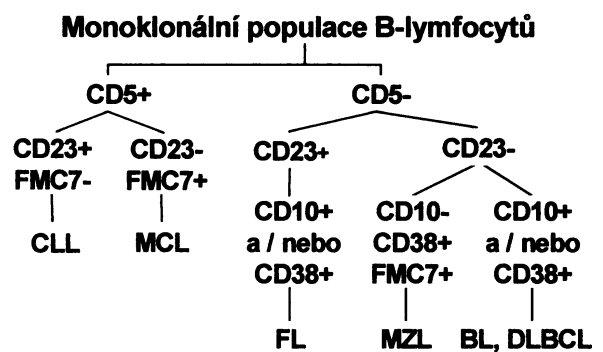
BL: Agresivní B lymfom, vyskytující se převážně „endemicky“ v rovníkové Africe, kde jsou postiženi hlavně mladí lidé. U nás se vyskytuje sporadicky nebo bývá spojen s imunodeficitem. Je to vysoce agresivní lymfom definovaný translokací genu c-MYC, vyvolaný nejspíše virem Epsteinovým-Barrové (Obr. 1, Obr. 2, Graf 1) (BLUM et al. 2004).



Obr. 1: Sekundární folikul: Patogeneze vzniku maligních lymfomů a následné transformace. Zobrazeny části sekundárního folikulu a z nich vznikající příslušné lymfomy.



Graf 1: Zastoupení jednotlivých maligních lymfomů (JAFPE 2001)



Obr. 2: Zjednodušené schéma základní imunofenotypizace B-NHL

2.2 Buněčný cyklus

2.2.1 Obecné charakteristiky

Základním předpokladem růstu a vývoje, ale i fixace náhodně vzniklých mutačních změn všech organismů je buněčné dělení. Kontrola buněčného cyklu je pro každou buňku složitou záležitostí a její narušení může mít za následek přeměnu normální buňky v buňku nádorovou. Tato buňka pak nepodléhá regulačním mechanismům a je schopna nekontrolovaného růstu.

Buněčný cyklus můžeme na základě morfologických a biochemických charakteristik rozdělit do několika základních fází (G_0 , G_1 , S, G_2 , a M-fáze). Cyklus je ukončen rozdělením buňky za vzniku dvou dceřiných buněk. Doba mezi dvěma mitotickými fázemi, kdy buňka přepisuje své geny, syntetizuje proteiny a zvětšuje svůj objem, se označuje jako interfáze.

2.2.2 Základní vlastnosti jednotlivých fází

G_0 -fáze je klidová fáze buněčného cyklu, ve které buňka plní své základní funkce a udržuje bazální metabolismus. V případě obdržení stimulačních signálů může buňka opět přejít z G_0 -fáze do G_1 -fáze a začít se znovu dělit.

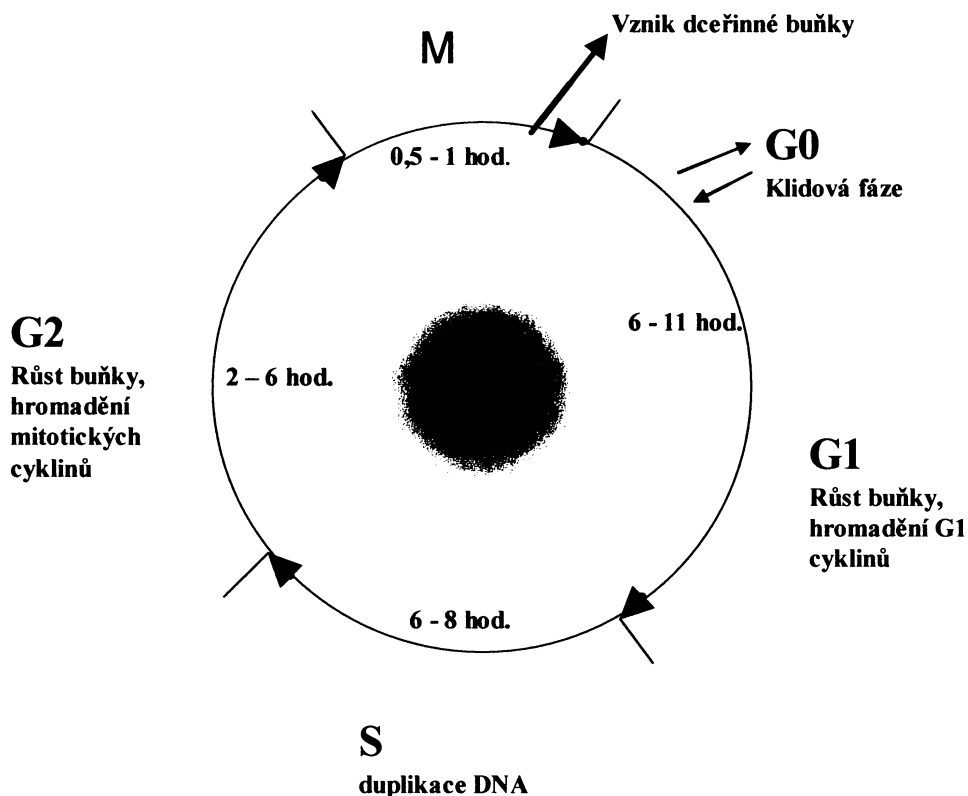
G_1 -fáze je interval mezi ukončením mitózy a začátkem syntézy DNA. Typická je intenzivní syntéza všech typů RNA v jádře. V cytoplazmě probíhá proteosyntéza a buňka roste. Délka G_1 -fáze se může lišit a obvykle určuje délku celého buněčného cyklu.

Během S-fáze buňka replikuje svoji jadernou DNA, což je základní předpoklad pro buněčné dělení. V cytoplazmě jsou syntetizovány histony. S-fáze se nachází mezi dvěma fázemi (G_1 , G_2), ve kterých buňka roste. Po skončení S-fáze buněčné jádro obsahuje dvojnásobné množství DNA.

G_2 -fáze je interval mezi koncem syntézy DNA a začátkem mitózy. Je typická dalším růstem buňky, proteosyntézou, přičemž ve zvýšené míře je syntetizován tubulin a další proteiny sloužící k výstavbě mitotického aparátu. V G_2 -fázi cyklu probíhá kontrola ukončení DNA replikace před vstupem do mitózy.

Během M-fáze neboli mitotické fáze je v mikroskopu pozorovatelné jaderné dělení (mitóza) a cytoplazmatické dělení (cytokineze). Proces se skládá z šesti fází, z nichž prvních pět (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze) představuje dělení jádra a šestou fází je vlastní rozdělení buňky (cytokineze).

G₁, S, G₂ a M-fáze jsou známé součásti buněčného cyklu, ovšem ne všechny buňky se řídí tímto standardním schématem. Cyklus buněčného dělení rychle se dělících buněk obvykle trvá 24 hodin (Obr. 3). Z toho na mitózu připadá asi 30 minut, na G₁-fázi 9 hodin, na S-fázi 10 hodin a G₂-fázi 4,5 hodiny (https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1387.html). Ačkoliv délka jednotlivých fází cyklů je do určité míry proměnlivá, největší variabilita je v G₁-fázi. Nejsou-li buňky v G₁-fázi připraveny k replikaci DNA, vstupují do G₀-fáze, klidového stádia, ve kterém mohou setrvat několik dní, týdnů nebo i let, než opět pokračují v proliferaci (ALBERTS et al. 1998, LODISH et al. 2004).



Obr. 3: Schéma buněčného cyklu

2.2.3 Proliferační markery

Proliferace je základní parametr, který je stanovován u různých typů nádorů v souvislosti s určením stupně jejich malignity a tím i prognostického významu. Buněčnou proliferaci provází změny v zastoupení a expresi některých antigenů - vyšetřovanými proliferačními znaky mohou být např. CD71, Ki-67, PCNA aj., přičemž proliferační aktivitu buněk lze rovněž stanovit pomocí určení obsahu DNA (propidium iodid, bromdeoxyuridin) (LORAND-METZE et al. 2004).

2.2.3.1 CD71

CD71 (transferinový receptor) je transmembránový glykoprotein složený ze dvou podjednotek o celkové molekulové hmotnosti 190 kDa. Je exprimován především v rychle se dělících buňkách při přechodu z G_0/G_1 do S-fáze buněčného cyklu. CD71 je zapojen do příjmu železa (Fe^{3+}). Expresi receptoru je regulována metabolickou potřebou Fe^{3+} , které je nepostradatelné pro rostoucí buňky (NEWMAN et al. 1982, DANOVA et al. 1988, SHIH et al. 1990).

2.2.3.2 Ki-67

Ki-67 je jaderný protein, jehož exprese je asociována s buněčnou proliferací. Byly objeveny dvě izoformy o molekulové hmotnosti 345 a 395 kDa (SCHLÜTER et al. 1993). K expresi antigenu dochází ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (G_1 , S, G_2 a M), chybí ale v klidových buňkách, které se nachází v G_0 -fázi (GERDES et al. 1984, TAZZARI et al. 1990).

V G_1 -fázi je Ki-67 lokalizován převážně okolo jádra, v pozdějších fázích uvnitř jádra a během mitózy je většina proteinu přesunuta na povrch chromozómů (GERDES et al. 1984, VERHEIJEN et al. 1989). Jakmile se buňka dostane do neproliferujícího stavu (nejčastěji během anafáze a telofáze) dochází k rychlému odbourávání Ki-67 (BRUNO a DARZYNKIEWICZ 1992).

2.2.4 Regulace buněčného cyklu

Důležité procesy, jako je replikace DNA, mitóza a cytokineze, jsou řízeny řadou kontrolních systémů s cílem koordinovat jednotlivé fáze buněčného cyklu.

Regulace buněčného cyklu se uskutečňuje v kontrolních bodech v G_1 a G_2 -fázi. Pokud je třeba, aby buňka ještě rostla, umožňuje kontrolní bod v G_1 -fázi regulačnímu systému zastavit buněčný cyklus dříve, než je spuštěna replikace DNA. Druhý kontrolní bod velikosti se nachází v G_2 -fázi a umožňuje zastavit cyklus před vstupem do mitózy. Tento bod navíc umožní buňce zkontrolovat, zda je před vstupem do mitózy kompletně zreplikována DNA (ALBERTS et al. 1998).

Přechody mezi fázemi buněčného cyklu řídí rodina enzymů nazývaných cyklin-dependentní kinázy (cdk), které pro aktivaci vyžadují fosforylaci na serinu a threoninu, a následně zprostředkují přenos fosfátu na cílový substrát (FORD a FORD 1997). Katalytickou funkci plní po asociaci s příslušným cyklinem. Cdk s cyklinem vytváří heterodimerní proteiny skládající se ze dvou podjednotek. Koncentrace cyklinů se

v průběhu buněčného cyklu mění, čímž je aktivita jednotlivých kináz regulována (NIGG 1995, FORD a FORD 1997).

Dále je buněčný cyklus kontrolován prostřednictvím inhibitorů, které mají klíčový význam v regulaci buněčné proliferace. Zpětnovazebné signály zabraňují spuštění dalšího kroku v cyklu, dokud není předcházející krok úplně dokončen (ALBERTS et al. 1998, REJTHAR a VOJTĚŠEK 2002).

2.2.4.1 Regulace buněčného cyklu komplexem cyklin-cdk

Za vazbu a aktivaci cdk odpovídá konzervativní doména cyklinu nazývaná „cyklin box“ o velikosti zhruba 100 aminokyselin, která mění konformaci N-terminální oblasti partnerské kinázy a tím ji aktivuje. Cdk může asociovat s různými cykliny, přičemž typ navázaného cyklinu určuje, který cílový protein bude komplexem cyklin-cdk fosforylován. Každý takto vytvořený komplex má v procesu regulace buněčného cyklu svoji specifickou úlohu (NIGG 1995, SHERR a ROBERTS 1995, LODISH et al. 2004).

Cykliny jsou rozděleny na dvě hlavní třídy - G_1 cykliny a cykliny mitotické. G_1 cykliny jsou proteiny s relativně krátkou životností, váží se na cdk v průběhu G_1 -fáze a jsou důležité pro vstup do S-fáze cyklu. Zatímco mitotické cykliny mají životnost delší, váží se na cdk v průběhu G_2 -fáze a jsou důležité pro vstup do mitózy a zpravidla jsou odbourávány těsně před vstupem buňky do mitózy (FORD a FORD 1997).

V současné době je známo devět typů cyklin-dependentních kináz (označených čísly 1 až 9, přičemž pro cdk1 je užíváno taktéž synonymum cdc2) a jedenáct různých typů cyklinů (označují se velkými písmeny abecedy A až J a T) regulujících jednotlivé kroky buněčného cyklu (hlavní vybrané cdk a cykliny viz Tab. 2). Lze však předpokládat, že počty zástupců obou proteinových rodin zatím nejsou úplné (NIGG 1995, SHERR a ROBERTS 1995, CHELLAPPAN et al. 1998).

cdk	příslušný cyklin	fáze, kde působí
cdk1 (cdc2)	cyklin A a B	přechod G_2 /M a časná M
cdk 2	cyklin E	přechod G_1 /S
cdk 2	cyklin A	S
cdk 4	cyklin D1, D2, D3	G_1
cdk 6	cyklin D1, D2, D4	G_2
cdk 7	cyklin H	všechny fáze

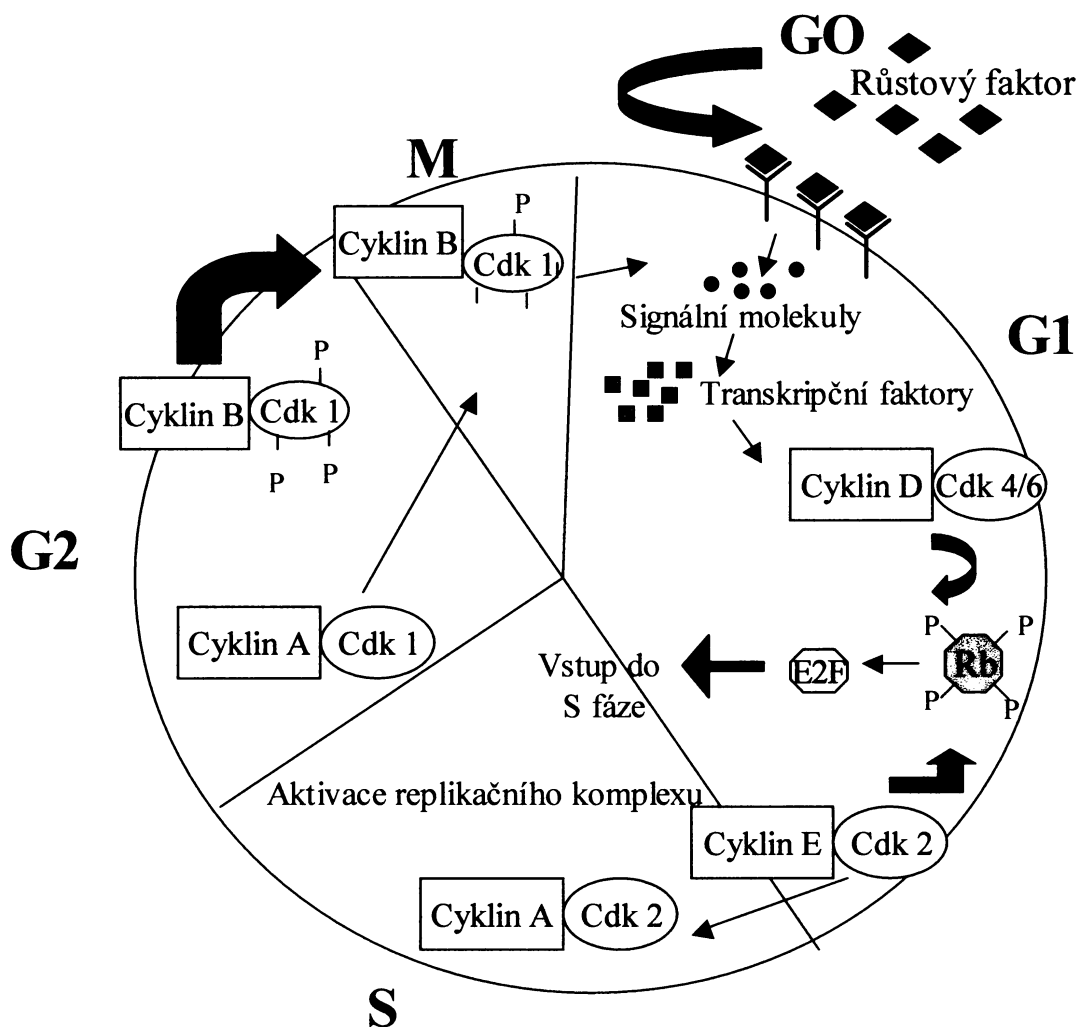
Tab. 2: Hlavní cdk a cykliny v buněčném cyklu

Na přechodu G₁/S-fáze se podílí komplexy cyklin E/cdk2, cyklin D1-D3/cdk4 a cyklin D1/cdk6 (SHERR 1994, OHTSUBO et al. 1995). Zvýšená exprese těchto cyklinů má za následek zkrácení G₁-fáze buněčného cyklu a rychlejší přechod do S-fáze. Naopak inaktivace cyklinu D1 v G₁-fázi brání ve vstupu do S-fáze.

Průběh S-fáze je kontrolován cyklinem A, vytvářejícím komplex s cdk2, která je uvolněna ze vzájemné interakce s cyklinem E po G₁/S přechodu. Kinázová aktivita cdk2 ve spojení s cyklinem A klesá v M-fázi (GIRARD et al. 1991).

Na přechodu mezi G₂/M se podílí komplexy cyklin A/cdk1 a cyklin B/cdk1 (KING et al. 1994, ARELLANO a MONERO 1997). Cdk1 je v komplexu fosforylována na Thr-161 aktivační kinázou (CAK), která se skládá z cdk7 a cyklinu H (JEFFREY et al. 1995, PAULOVICH a HARTWELL 1995). Fosforylace způsobuje konformační změny a zlepšuje vazbu cyklinů. K inaktivaci cdk1 dochází po fosforylaci na Thr-14 a Tyr-15 prostřednictvím kináz Wee1 a Mit1 nebo inhibičními proteiny p21 a p27. Defosforylace těchto míst pomocí fosfatázy cdc25 je nezbytná pro aktivaci cdk1 a další postup v buněčném cyklu (LEW a KORNBLUTH 1996).

Komplex cyklin B/cdk1 je známý jako faktor podporující M-fázi (MPF, mitose promoting factor). Aktivovaný komplex cyklin B/cdk1 fosforyluje celou řadu cílových proteinů. Mezi ně patří např. strukturní protein histon H1, jaderný laminin, vimentin a kaldesmon. Jejich fosforylace je velmi důležitá pro kondenzaci chromozomů, rozpad jaderných lamel, intermediálních filament a reorganizaci mikrofilament. Všechny tyto pochody jsou nezbytné pro vstup buňky do M-fáze (Obr. 4) (NIGG 1995, NURSE 1997, LODISH et al. 2004).



Obr. 4: Lokalizace cyklinů a cdk v buněčném cyklu

Hlady cyklinů jsou v buněčném cyklu ovlivňovány jejich syntézou a degradací. Cyklin A a B obsahují destrukční box rozpoznávající protein (DBRP), cykliny D a E „PEST“ sekvenci, což je oblast bohatá na prolin, kyselinu glutamovou, serin a treonin. Tyto proteinové sekvence jsou odpovědné za účinnou degradaci cyklinů, která je na konci příslušných fází buněčného cyklu zprostředkována ubiquitinem v proteazomech (GLOTZER et al. 1991, RECHSTEINER a ROGERS 1996).

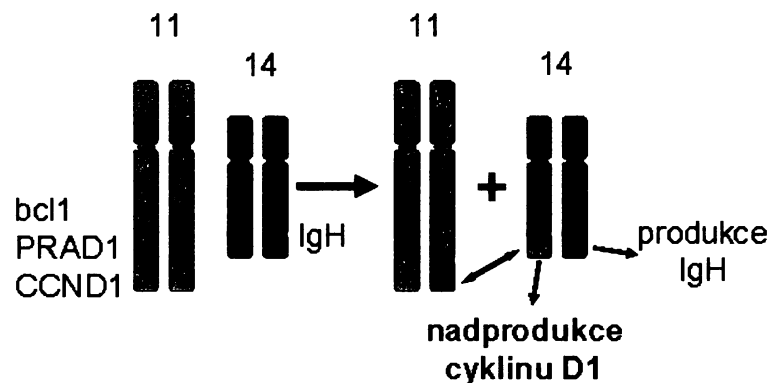
2.2.4.1.1 Cykliny D typu

V současné době jsou popsány 3 druhy cyklinů D - cyklin D1 je exprimován hlavně epiteliálními a některými mezenchymálními buňkami, cykliny D2 a D3 myeloidními a lymfatickými buňkami (OTT et al. 1997). Cykliny D tvoří komplexy s cdk4 a cdk6 a účastní se fosforylace proteinu Rb, čímž ho inaktivují a umožní vstup do S-fáze (KAPLAN et al. 2005, MATSUSHIME et al. 1994). K tomu, aby byly cykliny D funkční, musí být lokalizovány v jádře (BALDIN et al. 1993, DIEHL et al. 1998).

2.2.4.1.1.1 Cyklin D1

Cyklin D1 je jaderný protein patřící do rodiny G1 cyklinů, který hraje důležitou roli v regulaci přechodu G₁/S-fáze buněčného cyklu a tvoří komplexy s cdk4. Gen pro cyklin D1 (CCND1 = PRAD1 [Parathyroid Adenomatosis 1] = BCL1 [B-cell Leukemia /Lymphoma]) je lokalizován na chromozomu 11 v oblasti q13. Přepisem genu o 5 exonech vzniká hlavní transkript 4,5 kb velká mRNA a následně protein o molekulové hmotnosti 36 kDa tvořený 295 aminokyselinami (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BCL1.html>, COIGNET et al. 1996, DE BOER et al. 1997).

Zvýšená hladina cyklinu D1 může být indukována amplifikací chromozomálního regionu genu pro cyklin D1, nebo chromozomální translokací (11;14)(q13;q32) (Obr. 5) a má za následek zkrácení G₁-fáze, která je méně závislá na růstových faktorech, a rychlejší přechod do S-fáze buněčného cyklu (LAMMIE a PETERS 1991, OTT et al. 1997, SHERR 1994). Overexprese mRNA cyklinu D1 a vzápětí i vlastního proteinu může být detekována u většiny hematologických malignit nesoucích tuto translokaci (OTT et al. 1997).



Obr. 5: Chromozomální translokace (11;14)(q13;q32)

Vysoká hladina cyklinu D1 následkem chromozomální translokace (11;14)(q13;q32) je typická pro MCL a dochází k ní ve více než 90 % případů (OTT et al. 1997). Tato translokace a stejná genová fúze CCND1 s IgH se může vyskytnout ve 3-14 % případů i u MM (SOVERINI et al. 2003), B-PLL (BRITO-BABAPULLE et al. 1992), B-CLL (BRITO-BABAPULLE et al. 1992, SUZUKI et al. 1999), FL, SMZL (VASEF et al. 1997), ale v mnohem nižším procentu případů.

Expresce cyklinu D1 je používána především jako diagnostický marker MCL pro odlišení od ostatních B-buněčných malignit a může mít i význam prognostický.

2.2.4.2 Inhibitory cyklin dependentních kináz

Inhibitory cyklin-dependentních kináz (INK) mají schopnost inaktivovat komplexy cyklin-cdk a navodit zastavení buněčného cyklu v G_1 kontrolním bodě. INK jsou rozdělovány do dvou skupin podle jejich aminokyselinové sekvence a biochemických mechanismů jejich účinků (CLURMAN a ROBERTS 1995, CHELLAPPAN et al. 1998).

Do první, tzv. p16 rodiny INK4, jsou zařazovány proteiny p16 Ink4a, p15 Ink4b, p18 Ink4c a p19 Ink4d. Proteiny patřící do p16 rodiny jsou spojovány s G_1 -fází a inhibují především aktivitu komplexů cdk4 a cdk6 s cykliny D, které se podílejí na fosforylaci nádorového supresoru Rb (CARNERO a HANNON 1998, JAMES a PETERS 2000)

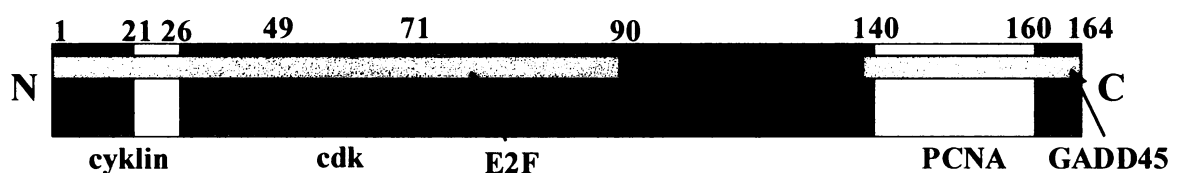
Do druhé rodiny CIP/KIP (cdk-interagující protein/kináza-inhibující protein, cdk-interacting protein/kinase-inhibitory protein) patří proteiny p21, p27 kip1 a p57 kip2, které jsou spojovány s G_1 a S-fází a inhibují širokou škálu komplexů cyklin-cdk (SHERR a ROBERTS 1995, FORD a FORD 1997).

2.2.4.2.1 Inhibitor buněčného cyklu p21

2.2.4.2.1.1 Gen a struktura

Lidský gen pro p21 se nachází na chromozomu 6p21.2, je tvořen 3 exony (přičemž 1 exon není překládán) a transkripce vzniká 2,1 kb velká mRNA. Gen kóduje polypeptid o délce 164 aminokyselin a molekulové hmotnosti 18 kDa (EL-DEIRY et al. 1993, HARPER et al. 1993, <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CDKN1AID139.html>).

Protein p21 z rodiny CIP/KIP sdílí homologii na N konci s proteinem p27 (42 %) a s proteinem p57 (47 %) (LLOYD et al. 1999), zatímco na C konci je variabilní v délce i funkci (CHEN et al. 1995, LUO et al. 1995). P21 obsahuje domény interagující s řadou proteinů (Obr. 6). Nachází se hlavně v jádře a minimálně v cytoplasmě.



Obr. 6: Struktura proteinu p21 s protein interagujícími doménami

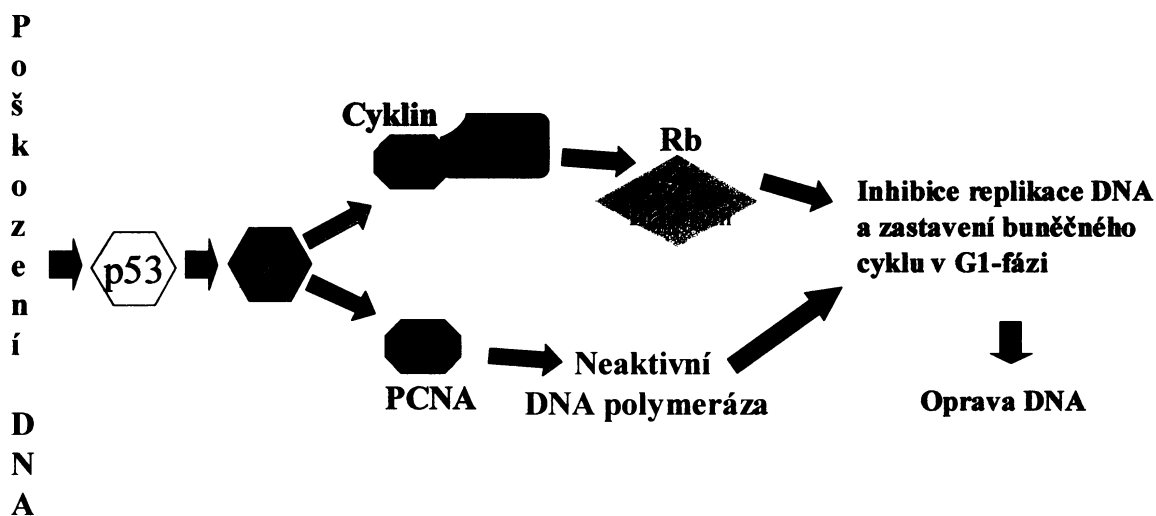
2.2.4.2.1.2 Funkce proteinu p21

Protein p21 je transkripčně aktivován p53 závislými (nemutovanou formou proteinu p53) a p53 nezávislými mechanismy, které jsou spouštěny buněčným stresem (MICHIELI

et al. 1994). Má důležitou úlohu při kontrole buněčné proliferace díky schopnosti regulovat aktivitu komplexů cyklin-cdk v situacích, kdy buňky odpovídají na různé intracelulární a extracelulární signály (NIGG 1995, BALL a LANE 1996). V klidových buňkách je jeho hladina velmi nízká a vzrůstá teprve po aktivaci mitogenním signálem nebo v průběhu ontogeneze (CHELLAPPAN et al. 1998). Hladina tohoto proteinu je regulovaná proteolytickou degradací pomocí ubiquitinu (MAKI a HOWLEY 1997).

Po poškození DNA je k zastavení buněčného cyklu třeba zvýšené exprese p21. V G₁-fázi je zastavení cyklu způsobeno inhibicí tvorby komplexu mezi cykliny a cdk, čímž se zabrání fosforylaci proteinu Rb, která je nezbytná pro vstup buněk do S-fáze (MORGAN a KASTAN 1997, JAMES a PETERS 2000). V S-fázi p21 inhibuje replikaci DNA interakcí s PCNA, a blokuje tak schopnost PCNA aktivovat DNA polymerázu δ, která je nepostradatelná pro funkci DNA polymerázy (FLORES-ROZAS et al. 1994, WAGA et al. 1994, OGRYZKO et al. 1997). Protein p21 je potřebný i pro zastavení buněčného cyklu v G₂-fázi, díky jeho schopnosti vázat komplex cyklinu B1/cdk1 s PCNA, který je nutný pro vstup buňky do mitózy (NICULESCU et al. 1998, TOKAMOAKI ANDO et al. 2001).

Protein p21, interagující jak s komplexy cyklinů-cdk, tak s PCNA, koordinuje funkci cdk v regulaci buněčného cyklu s procesy replikace a reparace DNA (Obr. 7) (CHELLAPPAN et al. 1998).



Obr. 7: Regulace buněčného cyklu pomocí p21 zastavení buněčného cyklu a opravy DNA

Snížená hladina exprese proteinu p21 byla detekována v mnoha typech nádorů, především v souvislosti s nefunkčním proteinem p53. Absence funkčního proteinu p21 má za následek porušení regulace buněčného cyklu, abnormální diferenciaci buňky a silnou predispozici k transformaci, která vede ke vzniku nádoru (BALL et al. 1997, AHMAD et al. 1998)

2.2.4.2.2 Inhibitor buněčného cyklu p27

2.2.4.2.2.1 Gen a struktura

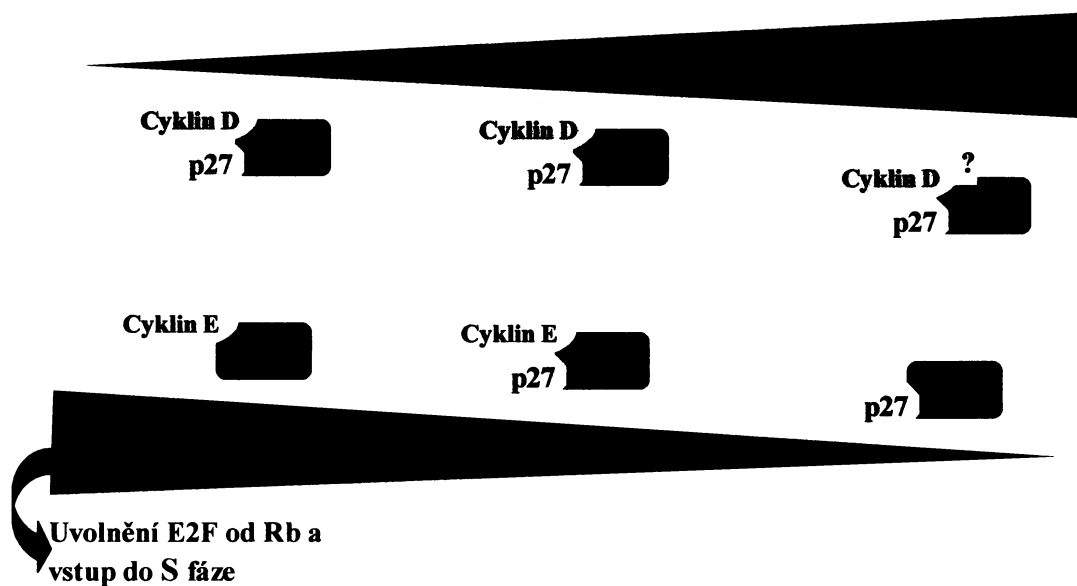
Gen p27 je lokalizován na chromozomu 12p13 na přechodu 12p12-12p13.1 (PONCE-CASTANEDA et al. 1995), skládá se ze 2 exonů a jeho transkripce vzniká 2,5 Kb velká mRNA a hladina tohoto proteinu je regulovaná postrančně. Gen kóduje protein o velikosti 198 aminokyselin a molekulové hmotnosti 22 kDa. (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CDKN1BID116.html>).

N-terminální konec, obsahující vazebné místo pro cyklin-cdk, vykazuje značnou homologii s dalšími členy rodiny CIP/KIP (RICARDO et al. 1999). Na C-terminálním konci je signální doména pro jadernou lokalizaci a místo pro fosforylaci cdk1 (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CDKN1BID116.html>).

2.2.4.2.2.2 Funkce proteinu p27

Aktivita proteinu p27 je regulována řadou faktorů - transformující růstový faktor β (TGF- β), kontaktní inhibice zprostředkovaná N-catherinem nebo zvýšené hladiny cytokinů a cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) (KATO et al. 1994, POLYAK et al. 1994, ERLANSON et al. 1998). Akumuluje se v klidových buňkách a při odpovědi na mitogenní stimulaci jeho hladina klesá (XIONG et al. 1993, KATO et al. 1994, TOYOSHIMA a HUNTER 1994). Po mitogenním stimulu dochází k fosforylaci proteinu p27 na C konci komplexem cyklin E/cdk2, která způsobí polyubiquitinaci proteinu a následnou degradaci v proteazomu (VLACH et al. 1997, SLINGERLAND a PAGANO 2000).

Protein p27 blokuje vstup z G₁ do S-fáze. Silně inhibuje především komplex cyklin E/cdk2, který je nezbytný k fosforylaci proteinu Rb (POLYAK et al. 1994). Rovněž asociuje s komplexem cyklin D/cdk4 a později s cyklin A/cdk1 (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CDKN1BID116.html>). Asociace proteinu p27 s cyklin D/cdk4 nebo s cyklin E/cdk2 blokuje fosforylaci u cdk4 na treoninu 172 a u cdk2 na treoninu 160 a tím znemožňuje aktivaci cdk (Obr. 8) (FIRPO et al. 1994, KATO et al. 1994).



Obr. 8: Schéma funkce p27: Akumulace proteinu p27 s komplexem cyklin D/cdk4 během diferenciacie. Když je komplex cyklin D/cdk4 saturován p27, dochází k vazbě p27 na cyklin E/cdk2 a inhibuje funkci cdk2. Ztráta kinázové aktivity cdk2 způsobí vyvázání cyklinu E z komplexu. Ztráta cyklin D/cdk4 kinázové aktivity je zatím neznámá.

Exprese proteinu p27 je u různých typů nádorů odlišná. Udává se, že u nízké maligních je vysoká a u vysoce maligních je naopak nízká. Exprese proteinu p27 v „normálních“ tkáních je nepřímo úměrná proliferačnímu indexu. (ERLANSON et al. 1998, SANCHEZ-BEATO et al. 1999, CHIARLE et al. 2002). Mutace v genu pro p27 byla pozorována jen ojediněle u některých lymfomů a leukémií (SANCHEZ-BEATO et al. 1999).

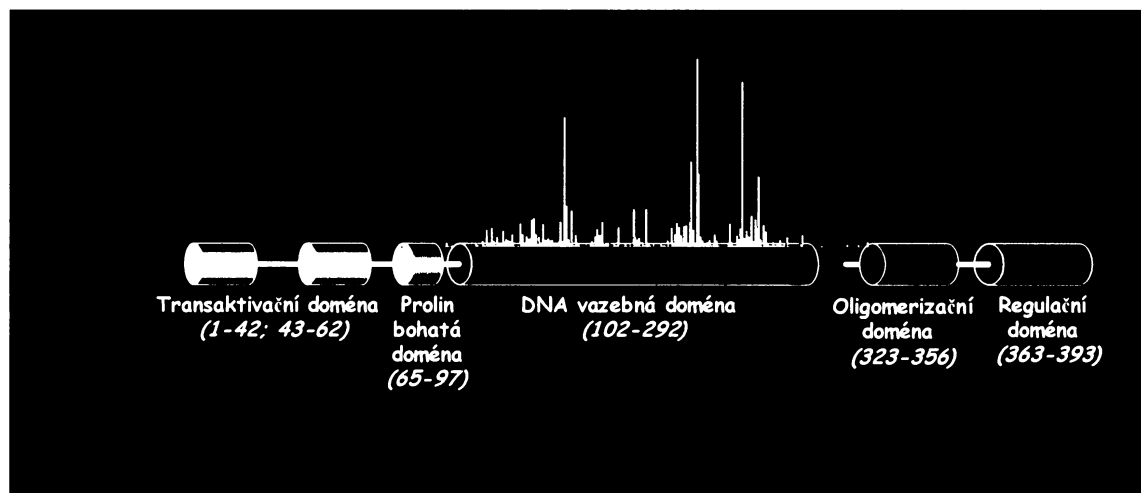
2.2.4.3 Tumor-supresorový gen p53

2.2.4.3.1 Gen a struktura lidského TP53

Gen TP53 byl poprvé identifikován roku 1979 jako buněčný protein vázající T antigen viru SV40, kumulující se v jádře. Byl označen jako klíčový tumor-supresorový protein (LANE a CRAWFORD 1979, LINZER a LEVINE 1979).

Lidská forma p53 je kódována genem TP53 na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1). Gen je složen z 11 exonů a tvoří 20 kb jaderné DNA. Transkripcí vzniká 3 kb velká mRNA. Protein je upraven řadou post-translačních modifikací, fosforylací, acetylací a ubiquitinací.

Protein p53 o 393 aminokyselinokyselinových zbytcích a molekulové hmotnosti 53 kDa se skládá z několika domén: N-koncová část obsahuje transkripčně aktivovanou doménu (TAD - aktivující transkripční faktory) a doménu bohatou na prolin; centrální část zahrnuje DNA vazebnou doménu (DBD) obsahující atomy zinku a arginin; C - koncová část obsahuje oligomerizační doménu (OD) zodpovědnou za tetramerizaci a negativní regulační doménu (Obr. 9) (<http://en.wikipedia.org/wiki/P53# Structure>).



Obr. 9: Struktura proteinu p53 se zobrazenyými „hot-spots“ 175, 245, 248, 273, 282 (=místa s nejčastějšími mutacemi) (upravené z: http://www-p53.iarc.fr/SlideShow2006_files/frame.htm#slide0169.htm)

2.2.4.3.2 Funkce proteinu p53

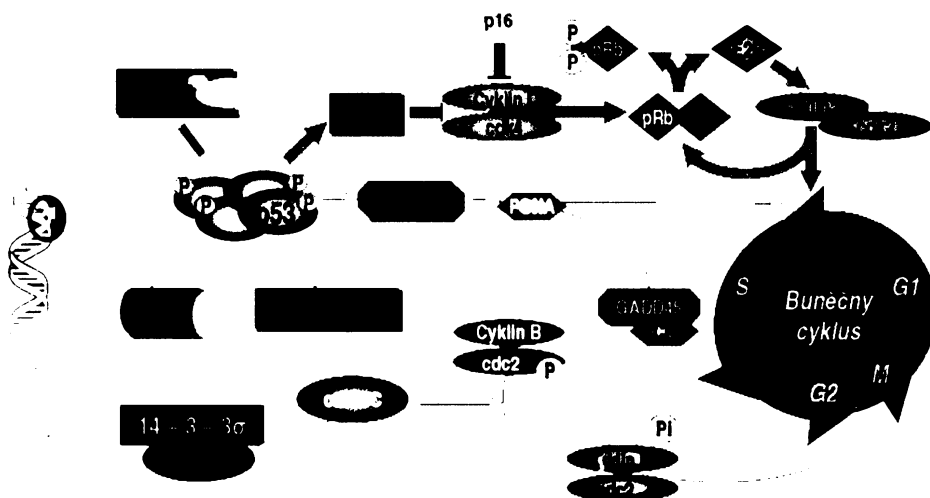
Protein p53 je často nazýván „strážcem genomu“ a je indukován buněčným stresem. V závislosti na míře poškození DNA spouští buď mechanismy vedoucí k programované smrti buňky (apoptóze) nebo indukuje zastavení buněčného cyklu v G₁-fázi.

Aktivace proteinu p53 je vyvolaná poruchami v DNA. Tyto poruchy mohou být způsobeny různými typy záření, UV světlem nebo mutagenními látkami a jsou zodpovědné za rapidní zvýšenou expresi transkripčně aktivního proteinu p53. Takto nahromaděný protein se váže na specifické sekvence DNA a stimuluje expresi celé řady genů. Cílových genů bylo již popsáno více než 60, včetně těch, jejichž produkty navozují blok buněčného cyklu v G₁-fázi (p21) a v G₂-fázi (14-3-3σ, GADD45), apoptózu (Bax, Apaf-1, Fas, Puma, aj.), opravy DNA (p48, R2) (Obr. 10) (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/P53ID88.html>, YANG et al. 2000, ŠMARDOVÁ 2003). Cílem zastavení buněčného cyklu v G₁-fázi zprostředkovaného proteinem p53 je získání dostatečně dlouhé doby k reparaci poškozené DNA před její další syntézou (KASTAN et al. 1991, PRIVES 1998). Zvýšením hladiny p53 se iniciuje exprese genu GADD45, kódující protein, který vazbou

na PCNA inhibuje replikaci DNA a zahájí expresi genu který kóduje protein p21. Protein p21 inhibuje tvorbu komplexu mezi cykliny a cdk. Tím brání fosforylaci proteinu Rb, která je nezbytná pro vstup buněk do S-fáze (Obr. 10). V případě správné funkce proteinu p53 je po odstranění chyb v DNA buněčný cyklus obnoven. Nejsou-li tyto chyby v DNA odstraněny, spouští p53 v buňce pochody vedoucí k apoptóze aktivací genů bax a IGF-BP3 (FORD a FORD 1997, BENNETT 1999).

Hladina, funkce a stabilita proteinu p53 je v buňce kontrolována řadou mechanismů. Mezi nejznámější patří onkoprotein MDM2 (Murine Double Minute 2 = Mouse Double Minute 2), který je lokalizován v oblasti q13-14 na dlouhém raménku chromozomu 12. MDM2 je negativní regulátor proteinu p53 a má za úkol udržovat jeho hladinu na nízké úrovni a inhibovat jeho transkripční aktivitu. Po navázání MDM2 na N-konec p53 v jádře dochází k přenosu do cytoplazmy a rychlé degradaci ubiquitinací v proteazomu (Obr. 10). Mezi MDM2 a p53 se jedná o autoregulační zpětnovazebný princip, kde gen pro MDM2 je transaktivován samotným p53 proteinem. Buněčný stres může navodit změny ve vazbě MDM2 a p53. Často dochází k fosfotylaci p53 na serinu 15, což zhorší vazbu na MDM2 a způsobí snížení rychlosti odbourávání proteinu p53 (CLINELLI et al. 1998, REISMAN a LOGING 1998, BENNETT 1999, BULLOCK a FERSHT 2001). Tímto mechanismem může docházet k hromadění proteinu p53 a bylo prokázáno, že tato akumulace je často nezávislá na mutaci p53 (CESARMAN et al. 1993, VILLUENDAS et al. 1993).

Poškození DNA způsobuje fosforylaci p53 na řadě míst (Ser 6, Ser 9, Ser 15, Ser 20, Ser 33, Ser 46, Ser 315 a Ser 392). Tyto fosforylace jsou zajištěny převážně ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) kinázou a DNA-PK (DNA-dependentní protein kinázou) (BURMA et al. 1999, SAITO et al. 2002).



Obr. 10: Schéma funkce proteinu p53 (upravené z: <http://bexo.lf1.cuni.cz/Studenti/Texty/Cyklus2006.pdf>)

2.2.4.3.3 Poškození proteinu p53

Inaktivace genu TP53 delecí či bodovou mutací vede k transformaci a vzniku nádorů různých typů. Somatické mutace byly zaznamenány u více než 50 % lidských nádorů. Většina mutací má vliv na schopnost vazby proteinu p53 k DNA vazebné doméně (<http://en.wikipedia.org/wiki/P53#Structure>). Ve více než 85 % jsou to bodové substituce typu missense ve vysoce konzervovaných regionech kódující sekvence exonu 5-8 (126-306) (Obr. 9) (VILLUENDAS et al. 1993, GREENBLATT et al. 1994). Velmi časté jsou transice, které se objevují u CpG dinukleotidů a jsou způsobené hlavně UV zářením, nebo transverze, které jsou způsobené alfatoxinem B1 či cigaretovým kouřem (benzpyren) (HOLLSTEIN et al. 1991, http://www-p53.iarc.fr/SlideShow2006_files/frame.htm#slide0169.htm).

Protein p53 se stává funkčním až po tetramerizaci a vazbě na DNA. Tetramerizace a vazby na DNA se účastní C-koncové oligomerizační domény p53. Je-li jedna či více z těchto 4 podjednotek mutovaných, stává se celý tetramer nefunkčním. K inaktivaci může dojít několika hlavními způsoby (STENGER et al. 1992, CHO et al. 1994) - ztrátou heterozygotnosti (v jedné alele vznikne bodová mutace a dojde k delecí druhé alely); tvorbou komplexů s virovými a buněčnými proteiny (HIV, EBV, T-antigen viru SV40, E1B protein adenovirů nebo E6 protein papilomavirů) (MAESTRO et al. 1995, FORD a FORD 1997, REISMAN a LOGING 1998, AHRENDT et al. 1999); amplifikací genu MDM2 což zvýší odbourávání proteinu p53 (HIGASHIYAMA et al. 1997, NASIR et al. 2001).

Nefunkční protein p53 se akumuluje v jádře, regulace je narušena a buňky nemohou podlehnout apoptóze. Mutace bývá asociována s agresivnější formou nádorů (HARRIS a HOLLSTEIN 1993, SIDRANSKY a HOLLSTEIN 1996) a současně je spojována i s rezistencí na radio- a chemoterapii (LOWE et al. 1994, RUSCH et al. 1995).

Na rozdíl od funkčního wt p53, který je v buňce během několika minut rychle degradován, mutovaná forma p53 má tendenci akumulovat se v jádře a protein se tak stává detekovatelný imunologickými metodami (VILLUENDAS et al. 1993, MAESTRO et al. 1995).

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Materiál

Nativní materiál (tumor, kostní dřeň, periferní krev) byl získán z operačních sálů jiných oddělení FN Motol (zejména chirurgických, ORL, hematologie a onkologie) od pacientů se suspekci nebo diagnózou B-NHL. Pro zajištění reprezentativnosti odběrů z primárních tumorů pro jednotlivé analýzy byl materiál peroperačně histologicky vyšetřen a rozdělen druhoatestovaným patologem; nativní část byla zpracována metodou průtokové cytometrie, část byla zamražena tekutým dusíkem pro potřeby vyšetření metodou western blot a uchována v hlubokomrazícím boxu při -80°C a část byla fixována formaldehydem pro podrobnější histologické a imunohistochemické vyšetření (IHC).

Standardními metodami laboratoře průtokové cytometrie byl stanoven imunofenotyp nádorových buněk. Při dostatečném množství materiálu byly izolovány jaderné elementy, které byly pro další použití zamraženy v -80°C ve fetálním bovinním séru (FBS) s dimethyl sulfoxidem (DMSO).

Do analýzy byly následně zahrnuti pouze pacienti s potvrzenou diagnózou B-NHL a infiltrací ve vzorku. Diagnóza byla stanovena na základě vyšetření průtokovou cytometrií v kombinaci s morfologickým vyšetřením doplněným imunohistochemií, popř. molekulární detekcí translokace. Pro srovnání byly výsledky pacientů s B-NHL porovnány s reaktivním materiálem.

3.1.2 Používané roztoky a chemikálie

3.1.2.1 Protilátky

Průtoková cytometrie: ředění protilátek dle doporučení výrobce

FITC CD19 (myší); Southern Biotech (SJ25-C1)

FITC CD14/PE CD45 (myší); Immunotech (Immu 19.2)

PE CD71 (myší); Immunotech (YDJ.1.2.2)

PE p53 (myší); Becton Dickinson (DO-7)

PE izotypová kontrola (myší); Becton Dickinson (IgG2_b)

PE p27 (myší); Santa Cruz (F8)

FITC p21 (myší); Santa Cruz (F5)

FITC cyklin D1 (myší); Becton Dickinson (DSC-6)
FITC izotypová kontrola (myší); Becton Dickinson (IgG2_a)
PE izotypová kontrola (myší); Santa Cruz (IgG1)
FITC izotypová kontrola (myší); Santa Cruz (IgG2_b)

Western Blot:

p53 (myší); Dako (DO-7) (1:1000 = 0,39 µg/ml)
p27 (myší); Lab Vision (Ab-1) (1:200 = 1 µg/ml)
p21(myší); Dako (SX118) (1:100 = 3,8 µg/ml)
cyklin D1(myší); Dako (DSC-6) (1:200 = 1,73 µg/ml)
sekundární protilátka HRP (kozí); Dako (1:1000 = 1,1 µg/ml)

3.1.2.2 Roztoky

Průtoková cytometrie

PBS - (sterilní, lékárna FNM)

množství na přípravu 1000 ml roztoku:

NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	1,44 g
KCl	0,20 g
H ₂ O	doplnit do 1000 ml
výsledné pH	7,2 - 7,4

20% Azid sodný (NaN₃) (Sigma) :

10 g azidu sodného doplníme do 50 ml destilovanou vodou.

PBS pro FACS I :

1000 ml PBS
1000 µl 20% azidu sodného
2000 µl želatiny (Sigma)

PBS pro FACS II :

200 ml PBS
1000 µl 20% azidu sodného
1000 µl FBS (PAA-Laboratories)

Lyzační činidlo 10x - (sterilní, lékárna FNM) :

pro lýzu erytrocytů.

NH ₄ Cl	8,30 g
NaHCO ₃	1,00 g
EDTA	0,038 g
H ₂ O	doplnit do 1000 ml
pH	7,2-7,3

Lyzační činidlo pro FACS :

250 ml 1x koncentrovaného lyzačního činidla
250 µl 20% azidu sodného

3,5% formaldehyd (Tamda)

naředěný 35% formaldehyd v PBS

0,1% Triton X-100 (Sigma)

naředěný Triton X-100 v PBS

Cell Fix (BD Biosciences):

10 krát naředěný cell fix v destilované vodě

Western blot:

Acrylamid 30% (Bis-Acrylamid 0,8%) :

60,0 g Acrylamidu (AA) (Amresco)

1,6 g Bis-Acrylamidu (Amresco)

200 ml destilované vody

10x TRIS-PUFR :

30,3 g Tris(hydromethyl)aminomethan (Serva)

144,0 g Glycin (Sigma)

1,0 litru destilované vody

Lyzační pufr 0,5l (NET + NP-40) :

- 150 mM NaCl (Amersham)
- 1% NP-40 (Amresco)
- 50 mM 10x TRIS(pH=8,0)
- 5mM EDTA (pH=8,0) (Sigma)

Pracovní lyzační roztok:

- 9,8 ml lyzačního pufu
- 200 µl PMSF (1:50)
- 1 tableta inhibitoru proteas (Complete mini) (Roche)

PMSF ředění (= phenylmethylsulfurylfluorid) :

- 87 mg PMSF (Biochemica)
- 5 ml isopropanolu (Sigma)

APS (= amonium persulfate) :

- 0,1 g APS (Amresco)
- 1 ml destilované vody

Elektroforetický roztok 500 ml (ELFO roztok):

- 450 ml destilované vody
- 50 ml 10x TRIS PUFR
- 2,5 ml 20% SDS (Amresco)

Blotovací roztok I : pro proteiny p27, p53 a cyklin D1

- 140 ml destilované vody
- 40 ml methanolu (Penta)
- 20 ml 10x TRIS PUFR
- 1 ml 20% SDS

Blotovací roztok II: pro protein p21

- 120 ml destilované vody
- 60 ml methanolu (Penta)
- 20 ml 10x TRIS PUFR

Blokovací roztok I: pro proteiny p27, p53 a cyklin D1

10 g sušeného mléka (Lactino)
200 µl TWEEN 20 (Amresco)
200 ml PBS (lékárna FNM)

Blokovací roztok II: pro protein p21

2 g sušeného mléka
200 ml PBS (lékárna FNM)

Promývací roztok po inkubaci protilátek I:

600ml PBS (lékárna FNM)
600 µl Tween 20

Promývací roztok po inkubaci protilátek II:

600ml PBS (lékárna FNM)

Running gel 12,5% :

12,5 ml Acrylamid (Amresco)
11,2 ml 1M TRIS pH 8,8
0,15 ml 20% SDS
6,2 ml destilované vody
0,08 ml APS
0,02 ml TEMED (Sigma)

Stacking gel 5% :

1,67 ml Acrylamid
1,25 ml 1M TRIS pH 6,8
0,05 ml 20% SDS
7,03 ml destilované vody
0,05 ml APS
0,01 ml TEMED

3.2 Metody

3.2.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie umožňuje oddělení buněčných subpopulací v závislosti na velikosti, struktuře buněk a množství vázaného fluorescenčního barviva, které rozliší vazbou protilátky značené fluorochromem určité specifické buněčné znaky. Protilátkami značenými různými fluorochromy lze identifikovat i několik znaků současně. Je to metoda využitelná v mnoha vědeckých disciplínách. Největší uplatnění však našla v medicíně a biologii.

Průtokový cytometr neboli FACS (fluorescence-activated cell scanner) je přístroj, jehož pomocí můžeme v krátkém časovém intervalu analyzovat tisíce buněk označených fluorescenčními protilátkami. Na rozdíl od fluorescenčního mikroskopu má velké množství předností.

Průtoková cytometrie funguje na principu hydrodynamické fokusace. Jednotlivé buňky v izotonickém roztoku (nosná tekutina, tzv. sheath fluid) protékají velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou nosná tekutina proudí. To usměrní buňky do tenkého proudu, kde postupují jedna za druhou průtokovou komůrkou a v ní protínají nejčastěji argonový laserový monochromatický světelný paprsek o vlnové délce 488 nm. Částice fyzikálně lomí, odrážejí a rozptylují laserové světlo procházející optickou soustavou. Základními prvky optické soustavy průtokových cytometrů jsou filtry propouštějící světlo o definovaných vlnových délkách (short band a long pass filtry). Jednotlivé světelné signály jsou převedeny na elektrické impulzy a zesíleny fotonásobičem (SHAPIRO 1988, LITZMAN et al. 1998).

Měřenými parametry jsou zejména rozptyl světla v malém úhlu, tzv. forward scatter (FSC - je přímo úměrný velikosti buněk) a rozptyl světla v 90° úhlu, tzv. side scatter (SSC - je ovlivněn hlavně granularitou částic).

Kromě těchto základních fyzikálních vlastností lze pomocí fluorescenčně značených protilátek rozlišovat buněčné subpopulace podle exprese povrchových i intracelulárních antigenů.

Emisní fluorescence protilátek se excituje paprskem laserového světla. Vysílané světlo je zachycováno fluorescenčními detektory FL1, FL2, FL3, což umožňuje rozlišení pozitivních a negativních buněk (přítomnost či absence vybraného markeru). Detektor FL1 rozlišuje nejčastěji znak označený FITC (fluorescein izothiokyanát) konjugovanou protilátkou, FL2 pak znak označovaný PE (fykoerytrin) konjugovanou protilátkou a FL3 zaznamenává marker značený např. PE-Cy5 [tandemový konjugát, přenáší energii mezi fluorochromy (FRET)] konjugovanou protilátkou. Nevýhodou vícebarevného značení je

omezená možnost odlišit mrtvé buňky a složitější vyhodnocování, přesto může být tento postup přínosnější, neboť umožňuje rozlišit i minoritní subpopulace buněk.

Zmrazování a uchovávání buněk pro průtokovou cytometrii:

Buněčná suspenze byla lyzována 30 minut lyzačním roztokem pro FACS, pak centrifugována (Universal 16R-Schoeller) (400 g, 12 minut). Supernatant byl odstraněn a peleta byla 2x promyta roztokem PBS pro FACS I. Do zamrazovací zkumavky bylo smícháno 900 μ l FBS a 100 μ l DMSO a přidány promyté zlyzované buňky. Takto připravená buněčná suspenze byla vložena do mrazícího boxu Mr. Frosty (Nalgen) s isopropanolem a umístěna do mrazícího boxu -80 °C (pozdolným poklesem teploty o 1 °C/min Mr. Frosty umožní optimální zmrazení buněčné suspenze).

Povrchové značení (CD14, CD19, CD45, CD71):

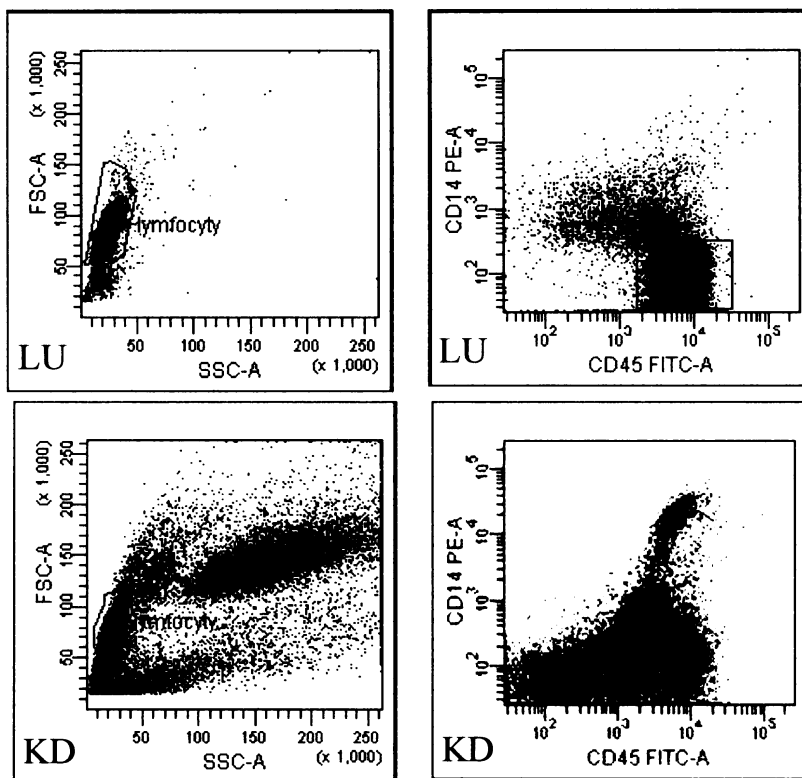
Do zkumavky bylo napipetováno cca 50 000 buněk vzorku (čerstvých, nebo rozmražených z FBS) a promyto 1,5 ml PBS pro FACS I. Centrifugováno (400 g, 5 minut), poté byl odstraněn supernatant a peleta byla ještě 2x promyta roztokem pro FACS I.

Po promytí byly přidány protilátky a 30 minut inkubovány ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci byl přidán lyzační roztok a buněčná suspenze byla 15 minut lyzována ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci byl vzorek centrifugován (400 g, 5minut), supernatant byl odstraněn a buňky byly promyty 1,5 ml PBS pro FACS I.

Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l PBS pro FACS I a byly měřeny a analyzovány na průtokovém cytometru.

Analýza dat (Diva Software):

Podle optických vlastností a silné exprese molekuly CD45 byly rozpoznány lymfocyty - lymfoidní gate (Obr. 11)

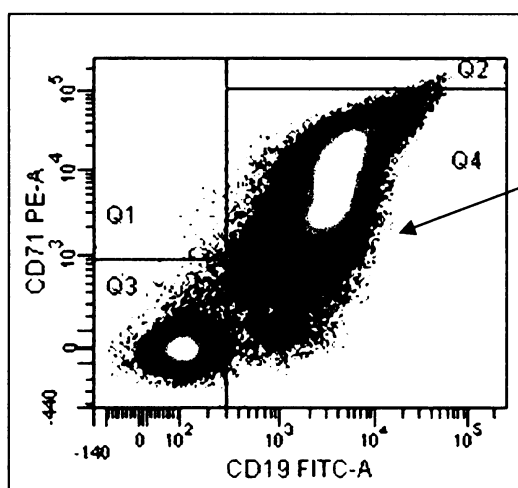


Obr. 11: Gate pro lymfocyty - lymfatická uzlina (LU) a kostní dřeň (KD)

Buňky v lymfoidním gate byly poté hodnoceny pro přítomnost či absenci vyšetřovaných znaků.

Hodnocení mediánu intenzity fluorescence (MFI) pro molekulu CD71:

Pro nádorové buňky CD19+ v lymfoidním gate byl stanoven MFI podle následujícího vzorce (Obr. 12)



MFI = podíl mediánu pozitivní populace populace nádorových buněk CD19+CD71+ a mediánu negativních (klidových) buněk

$$\text{MFI (CD71)} = \frac{\text{Q4 (CD19+CD71+)}}{\text{Q3 (CD19-CD71-)}}$$

Obr. 12: Schématické znázornění výpočtu MFI pro molekulu CD71 na nádorových lymfocytech CD19+

Intracelulární značení (p21, p27, p53, cyklin D1):

Do zkumavek bylo napipetováno po cca 50 000 buněk vzorku (krve, kostní dřeň nebo buněčné suspenze čerstvého či rozmraženého materiálu), 2x promyto 2 ml PBS a centrifugováno při 400 g po dobu 10 minut.

Po promytí bylo do zkumavek pipetováno 50 µl 3,5% formaldehydu. Vzorky byly jemně protřepány (TT2 minishaker, Ika) a inkubovány 10 minut ve tmě při pokojové teplotě.

Po inkubaci byly ke vzorkům přidány 2 ml PBS a proběhla centrifugace (700 g, 10 minut). Následně byl odstraněn supernatant, pelety byly protřepány, znovu promyty 2 ml PBS pro FACS II a centrifugovány (700 g, 10 minut). Po odstranění supernatantu byly pelety opět protřepány.

[Mezikrok pro vyšetření cyklinu D1: Vzorek připravovaný pro značení cyklinem D1 byl za stálého míchání převrstven 1 ml methanolu a vložen přes noc do - 20 °C. Druhý den byl vzorek centrifugován (700 g, 5 minut), promyt 4 ml PBS a centrifugován (700 g, 10 minut). Následně byl odstraněn supernatant, peleta protřepána, promyta 4 ml PBS pro FACS II a centrifugována (700 g, 10 minut). Po odstranění supernatantu byla peleta znovu protřepána.]

Po promytí bylo do zkumavek se vzorkem pipetováno 50 µl 0,1% Tritonu-X100. Vzorky byly jemně protřepány a inkubovány 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.

Po inkubaci byly ke vzorkům přidány 2 ml PBS pro FACS II a proběhla centrifugace (700 g, 10 minut). Následně byl odstraněn supernatant a pelety byly protřepány.

K takto připraveným vzorkům bylo přidáno po 10 µl Tritonu-X100, protřepáno, a značeno příslušnými protilátkami. Zkumavky se vzorkem s protilátkou byly překryty parafilmem a inkubovány přes noc v lednici.

Druhý den byly přidány 2 ml PBS pro FACS II a proběhla centrifugace (850 g, 5 minut). Následně byl odstraněn supernatant, pelety byly protřepány, znovu promyty 2 ml PBS pro FACS II a centrifugovány (850 g, 5 minut). Byl odstraněn supernatant a pelety protřepány. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl Cell Fix a byly měřeny a následně analyzovány na průtokovém cytometru.

Analýza dat: viz povrchové značení

Hodnocení MFI pro proteiny p21, p27, p53 a cyklin D1:

MFI pro uvedené proteiny byl stanoven jako podíl mediánu populace značené protilátkou příslušnou pro vyšetřovaný protein (p21, p27, p53 nebo cyklin D1) a mediánu izotypové kontroly

Cytometrická DNA - analýza

Pomocí průtokové cytometrie lze měřit obsah DNA v jednotlivých buňkách. Cytometrická DNA - analýza měří relativní fluorescenci barviva vázaného na jadernou DNA. Tím je nejčastěji propidium jodid, který se interkalačně váže na molekuly DNA.

Můžeme zjišťovat DNA - ploidi, která nám udává kolikrát obsahují nádorové buňky ve fázi G_0/G_1 buněčného cyklu více DNA než „normální“ diploidní buňky ve stejné fázi buněčného cyklu.

Dalším parametrem DNA - analýzy je kinetika buněčného cyklu. Podle obsahu DNA rozlišujeme fáze G_0/G_1 , S, G_2/M . Buňky, které se nacházejí v G_2/M -fázi buněčného cyklu by měly obsahovat dvojnásobné množství DNA než buňky v G_0/G_1 -fázi.

Postup značení DNA:

Do jedné zkumavky bylo napipetováno cca 50 000 buněk vzorku a do další zkumavky cca 50 000 buněk periferní krve od „zdravého dárce“. Poté bylo do obou zkumavek přidáno 62 μ l DNA kitu A (Cycle Test Plus DNA reagent Kit - BD) (trypsin) a inkubováno 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 50 μ l kitu B (RNAsa A, inhibitor tripsinu) a opět inkubováno 10 min ve tmě při pokojové teplotě. Na závěr bylo přidáno 50 μ l kitu C (propidium jodid) a inkubováno v lednici minimálně 10 minut. Vzorky byly změřeny maximálně do tří hodin po přípravě.

Analýza dat: ModFit LTTM – vyhodnoceny fáze G_0/G_1 , S, G_2/M , stanoven proliferací index (PI) jako součet S a G_2/M fáze

FACS: FACSCalibur, FASCCanto II (BD).

3.2.2 Western blot

Název Western blot (technika detekce proteinů) vznikl slovní hříčkou dle metody Southern blot (technika detekce DNA) zavedené Edwardem Southernem. Analogicky byl vytvořen i název pro metodu Northern Blot (technika detekce RNA).

Imunohistochemická detekce proteinů je velmi citlivá a specifická metoda, která umožňuje stanovit i malé množství antigenu (proteinu) v buněčné suspenzi či v tkáňovém homogenizátu.

Buněčné nebo tkáňové lyzáty jsou elektroforeticky rozděleny na SDS - PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyakrylamide gel electrophoresis). Díky SDS získávají stejný záporný náboj, putují na SDS gelu ke kladně nabitě elektrodě a jsou děleny podle své molekulové hmotnosti. Poté jsou elektroforeticky přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Přenesené proteiny jsou označeny protilátkami a vizualizovány pomocí

barevné reakce nebo chemiluminiscence. Na membráně se pozitivní signál objeví ve formě pruhu (bandu), jehož denzita a intenzita přímo úměrně odpovídá množství detekovaného proteinu. K určení molekulové hmotnosti sledovaného proteinu slouží speciální barvené markery.

Postup Western blot:

Příprava buněčného lyzátu:

Zamražené biotické vzorky byly na ledu lyzovány 50 - 200 μ l lyzačního roztoku po dobu 30 min. Během této doby byly každých 5 minut mechanicky homogenizovány. Po lyzaci byly vzorky protřepány na vortexu a pak centrifugovány 30 minut, 14500 g při 4 $^{\circ}$ C. Byl oddělen supernatant a k němu byl přidán stejný objem pufru namíchaný z 900 μ l Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Laemlii pufr) a 100 μ l mercaptoethanolu. Poté byly vzorky 5 minut povařeny na výhřevné ploténce (Labnet) při 100 $^{\circ}$ C a po zchlazení uchovávány v mrazáku při -20 $^{\circ}$ C.

Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA kitu

Principem kitu je vznik fialově zbarveného komplexu, který je následně fotometricky změřen. Barevný komplex vzniká reakcí BCA (bicinchinonové kyseliny) (Pierce) s kationty Cu^+ . Koncentrace proteinů je přímo úměrná množství vzniklého barevného komplexu, neboli množství zredukovaných iontů Cu^{2+} je přímo úměrné koncentraci proteinů.

Supernatant byl 10x zředěn destilovanou vodou. Poté bylo odebráno 10 μ l zředěného vzorku a přidáno 200 μ l roztoku BCA. Vzorky byly inkubovány 30 minut v lázni (Julabo TW8) o teplotě 37 $^{\circ}$ C. Současně byly připraveny roztoky zředěného bovinního sérum albuminu (škála 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 μ g/ml) pro kalibraci.

Po skončení inkubace byla změřena absorbance na spektrofotometru (ND-1000, NanoDrop Technologies) při vlnové délce 562 nm.

Elektroforéza (separace proteinů na polyakrylamidovém gelu):

Do připravené aparatury se skly o velikosti 100*100 mm a 1 mm spacers byly nalito cca 8 cm 12,5% running gelu, opatrně převrstveno destilovanou vodou a ponecháno 1 hodinu tuhnout. Poté byl nanesen 5% stacking gel až po okraj skel a vložen hřeben tak, aby výška stacking gelu byla cca 1,5 cm (prostor mezi running gelem a hřebenem).

Po ztuhnutí gelu byla skla s gelem upevněna do ELFO aparatury (Owl), zalita ELFO roztokem a naneseny vzorky (v koncentraci 30 μ g proteinu na jamku) a marker (Page Ruler - Fermentas 2 μ l na jamku). Elektroforetické dělení probíhalo při 80 V (cca 32

mA) po dobu 45 minut a poté zvýšena voltage na 120 V a necháno dalších 90 minut běžet.

Blotování (přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu):

Do připraveného blotovacího roztoku (I popř. II) byl cca na 5 minut vložen pevný filtrační papír a na hladinu roztoku byla položena nitrocelulózová membrána o velikosti 7x8 cm. Po ukončení elektroforézy byl do blotovacího roztoku vložen i running gel. Následně byl do semi-dry elektroblotu (Owl) vrstven zvlhčený filtrační papír, gel, membrána a nakonec opět filtrační papír. Elektroblot byl uzavřen a spuštěn pro proteiny p27, p53 a cyklin D1 (8 V, 500 mA, po dobu 1 hodiny), pro protein p21 (6 V, 100 mA, po dobu 30 minut a poté ještě na dalších 30 min při 8 V a 200 mA).

Po přeblotování byla membrána blokována 2 hodiny v blokovacím roztoku I (p27, p53, cyklin D1), resp. 30 minut v blotovacím roztoku II (p21).

Značení protilátkami:

Po blokaci byla membrána lehce osušena a přes noc v lednici značena primární protilátkou ředěnou v blokovacím roztoku (I popř. II).

Po inkubaci byla membrána osušena a promyta 4x po 25 minutách promývacím roztokem I (p27, p53, cyklin D1), resp. 4x po 5 minutách promývacím roztokem II (p21).

Poté byla membrána opět osušena a značena sekundární protilátkou ředěnou blokovacím roztokem (I popř. II) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

Po inkubaci byla membrána osušena a promyta 4x po 25 minutách promývacím roztokem I (p27, p53, cyklin D1), resp. 4x po 5 minutách promývacím roztokem II (p21).

Detekce proteinů na membráně pomocí ECL kitu

Po promytí byla membrána opět osušena, přiložena na sklo a přelita 3 ml ECL (Amersham) detekčního roztoku (v poměru složek kitu 1:1), který jsme nechali působit 1 minutu.

Reakce ECL kitu je založena na principu chemiluminiscence, kde luminol v kitu je oxidován HRP na sekundární protilátce. Dochází k emisi světla, které je následně zachyceno na fotografický film (hyperfilm - Amersham). Film je vyvolán a přítomnost, či absence proteinu je stanovena podle intenzity pruhů (bandů) o dané velikosti.

3.3 Statistická analýza

Pomocí programu StatView byla stanovena statistická významnost. Byl použit neparametrický test Kruskal Wallis - pro více než 2 nezávislé proměnné (popř. Mann-Whitney - pro 2 nezávislé proměnné), který nevyžaduje předpoklad Gaussova (normálního) rozložení. Pravděpodobnost na hladině $p < 0,05$ byla považována za statisticky významný rozdíl (*), při $p < 0,01$ byly výsledky považovány za vysoce významné (**) a při $p < 0,001$ byly za velmi vysoce významné (***) .

4 Výsledky

4.1 Proliferační markery

Proliferaci pomocí stanovení PI a MFI (CD71) jsem metodou průtokové cytometrie vyšetřila u 112 pacientů (43 žen a 69 mužů s mediánem věku 61 let, věkové rozmezí se pohybovalo mezi 8 a 87 lety) . 68x byla vyšetřena tkáň (59 uzlin, 4 tumory, 2 mediastina, 1 prs, 1 štítná žláza, 1 tonsila), 36x KD (kostní dřeň) a 8x PK (periferní krev). Podrobnější zastoupení viz Tab. 3.

Low-grade			
B-CLL	44	Tkáň	18
		KD	21
		PK	5
FL low	12	Tkáň	11
		KD	1
MALT	3	Tkáň	2
		KD	1

Reaktivní			
Reaktivní	14	Tkáň	7
		KD	6
		PK	1

Intermediate-grade			
MCL	13	Tkáň	5
		KD	6
		PK	2

High-grade			
FL high	2	Tkáň	2
DLBCL	22	Tkáň	22
BL	2	Tkáň	1
		KD	1

Tab. 3: Zastoupení vyšetřených pacientů - rozdělení podle příslušné diagnózy, stupně malignity a analyzovaného materiálu.

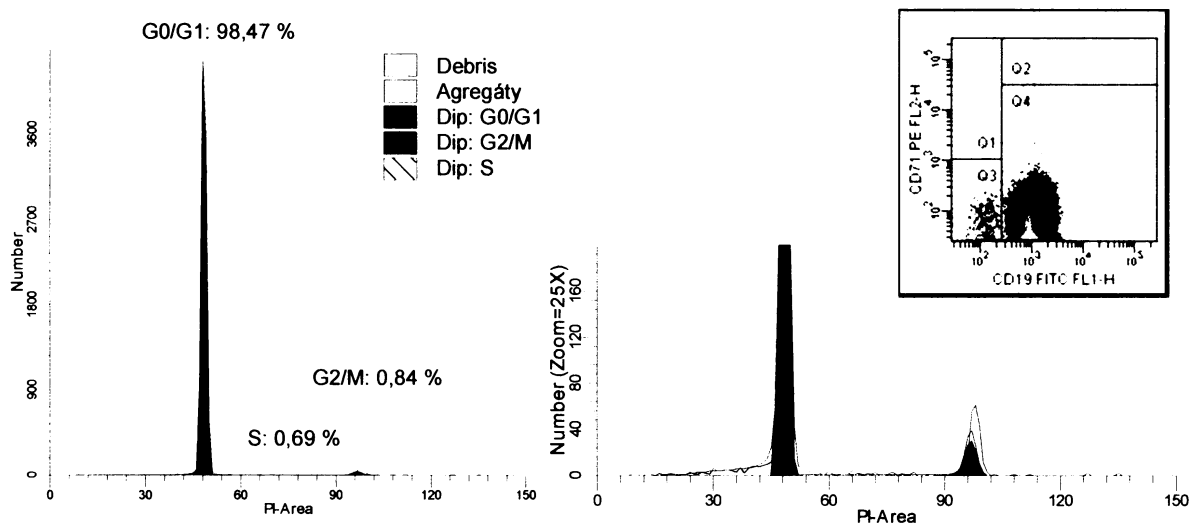
V primárních nádorech níže maligních lymfomů (medián - 2,22) jsem zjistila téměř trojnásobně nižší hodnoty PI v porovnání s lymfomy středně maligními (medián - 6,36) a téměř pětinásobně nižší hodnoty v porovnání s lymfomy vysoce maligními (medián - 10,30) (Tab. 4, Obr. 13, Obr. 14, Graf 2, Graf 3). PI reaktivních vzorků tkání (medián - 2,99) byl srovnatelný s PI low-grade lymfomů.

V KD a PK (Tab. 4) je rovněž PI nejnižší u low-grade (medián - 3,12 resp. 1,53), vyšší u intermediate-grade (medián - 7,15 resp. 3,11) a nejvyšší u high-grade lymfomů (medián - 10,00; PK bez nádorových buněk). Reaktivní KD vykazovaly relativně vysoký PI (medián - 13,54), naopak v PK s reaktivním nálezem byl PI nízký (medián - 1,33) a byl opět srovnatelný s nálezem u low-grade lymfomů.

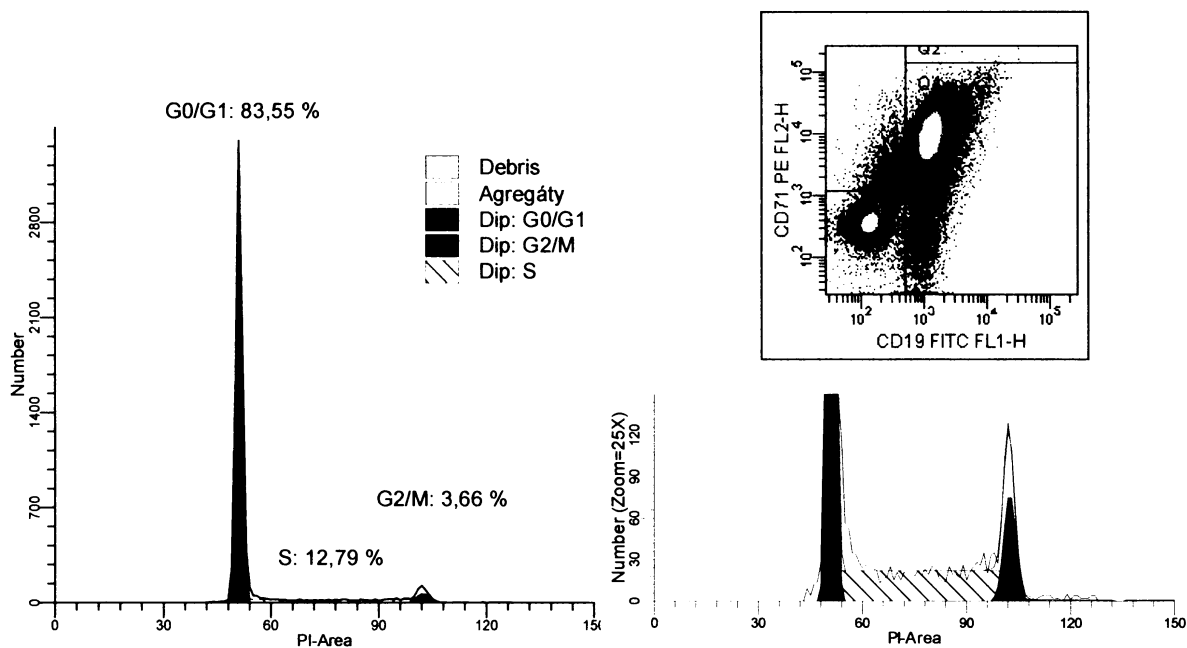
	Tkáň	KD	PK
B-CLL	1,12	2,78	1,53
FL low	3,00	16,10	-
MALT	1,75	7,92	-
MCL	6,36	7,15	3,11
FL high	8,52	-	-
DLBCL	9,56	-	-
BL	39,70	10,00	-
reaktivní	2,99	13,54	1,33
low-grade	2,22	3,12	1,53
intermediate	6,36	7,15	3,11
high-grade	10,30	10,00	-

	Tkáň	KD	PK
B-CLL	2,33	0,80	1,00
FL low	3,59	-	-
MALT	7,59	9,70	-
MCL	2,20	0,75	1,45
FL high	13,90	-	-
DLBCL	15,02	-	-
BL	26,60	5,10	-
reaktivní	4,11	2,00	3,30
low-grade	2,58	0,88	1,00
intermediate	5,7	0,75	1,45
high-grade	15,47	5,10	-

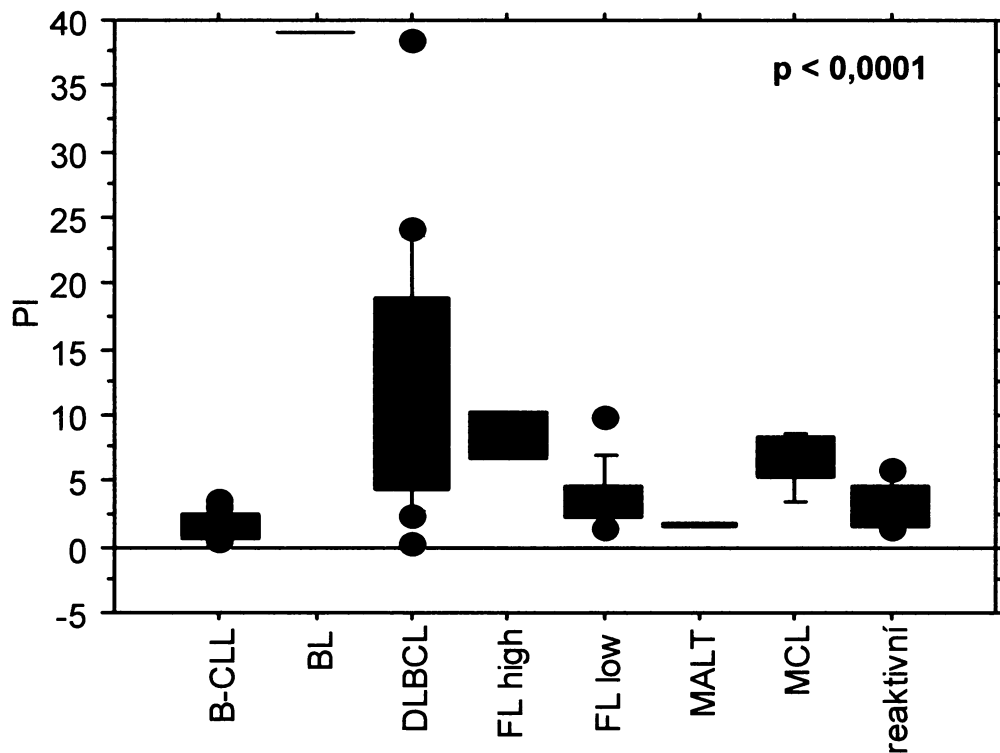
Tab. 4: Mediány hodnot PI a MFI CD71 ve tkáních, KD, PK. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty pouze s jedním vzorkem, pomlčkou - jsou proškrtnuty hodnoty, kdy nebyl k dispozici infiltrovaný materiál.



Obr. 13: DNA ploidie lymfomu nízké malignity (B-CLL) s malou proliferační frakcí, což koreluje s proliferačním znakem CD 71 (MFI CD71 - 0,89) - cytometrická analýza.

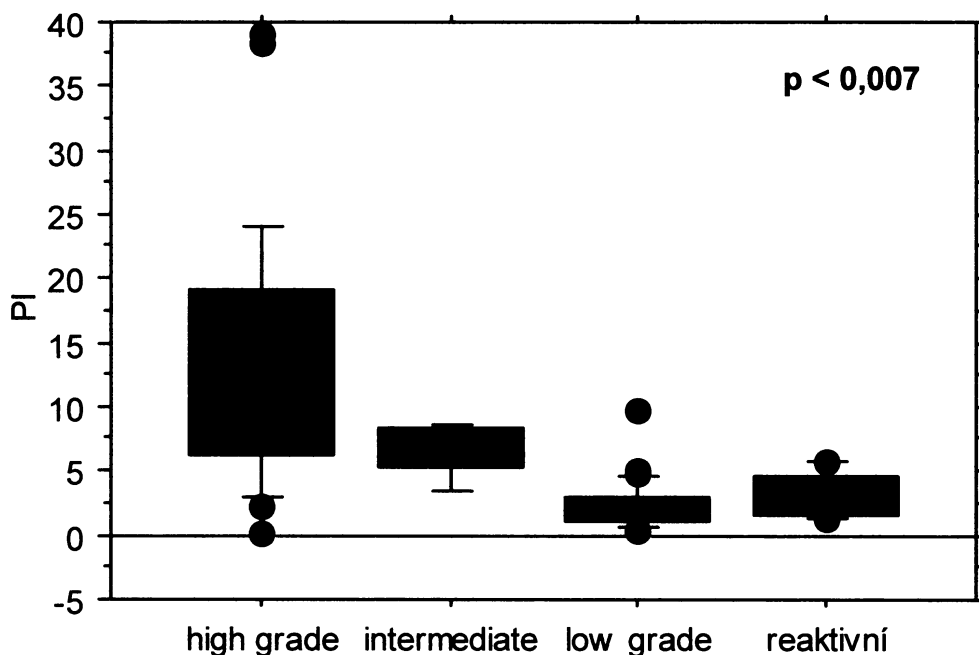


Obr. 14: DNA ploidy vysoce maligního lymfomu (DLBCL) s vysokou proliferační frakcí, což koreluje s proliferačním znakem CD 71 (MFI CD71 - 15,5) - cytometrická analýza.



Graf 2: Porovnání PI u jednotlivých typů B-NHL - cytometrická analýza. Silně proliferyjící agresivní lymfomy.

Statistika: $p < 0,0001$ ***



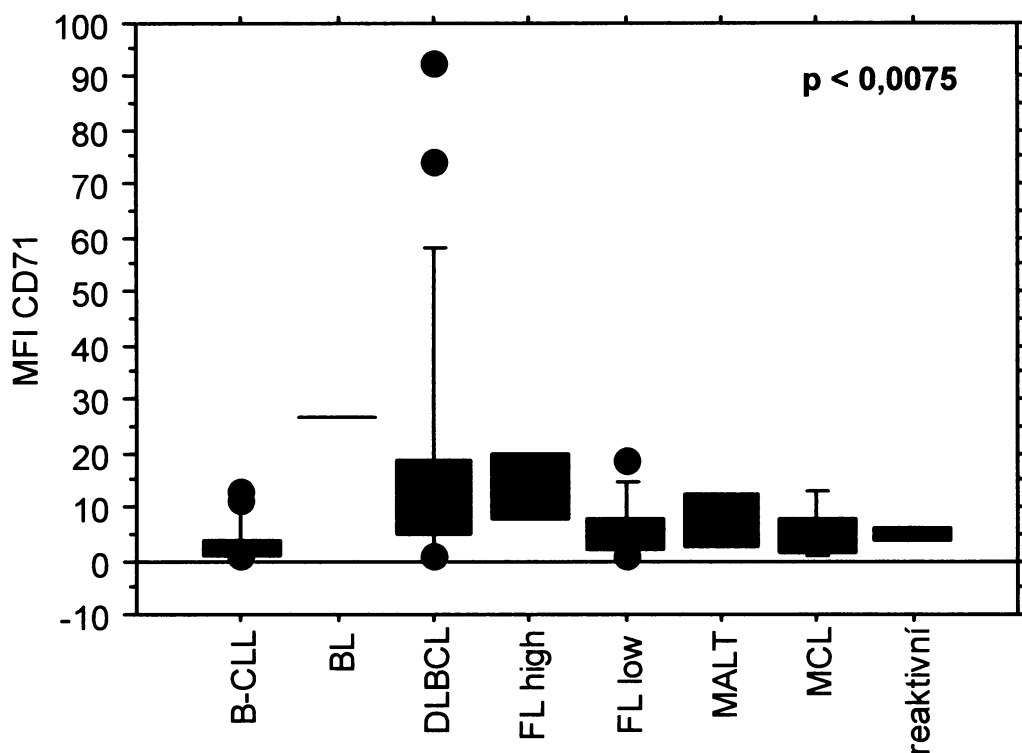
Graf 3: PI u nízně, středně a vysoce maligních B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - cytometrická analýza.

Statistika: $p < 0,007$ **

Hodnoty MFI CD71 kopírovaly hodnoty získané u PI. Nejméně proliferovaly low-grade lymfomy (medián - 2,58), poté intermediate (medián - 5,7) a nejvíce high-grade lymfomy (medián - 15,47) (Tab. 4, Graf 4, Graf 5). Vzorky reaktivních tkání vykazovaly 1,6x vyšší MFI CD71 (medián - 4,11) než low-grade lymfomy.

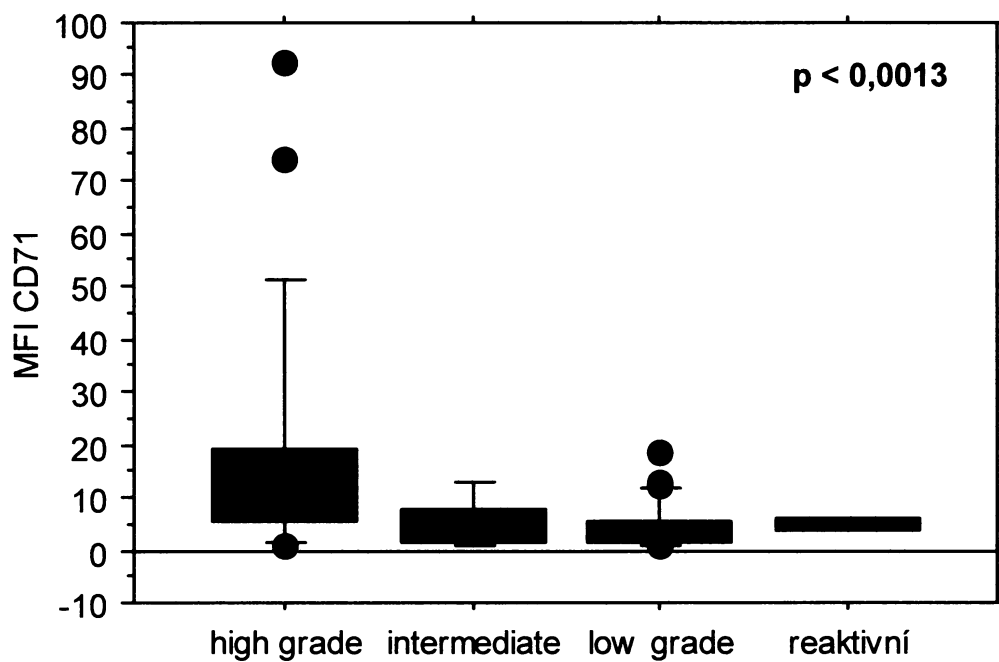
Obdobný trend byl i u KD a PK (Tab. 4) (low-grade: medián - 0,88 resp. 1,00; vyšší u intermediate-grade: medián - 0,75 resp. 1,45; nejvyšší u high-grade lymfomů: medián - 5,10; PK bez nádorových buněk). MFI CD71 reaktivních KD i PK se vyznačoval mediánem 2,00 resp. 3,30 a byl nižší než u high-grade lymfomů.

Výsledky analýzy proliferačních znaků (PI a MFI CD71) byly porovnány s IHC vyšetřením Ki-67, kdy byla prokázána nízká proliferace u low-grade lymfomů a vysoká u high-grade lymfomů. Výsledky vykazují korelaci v 82 % (u 44 srovnaných pacientů).



Graf 4: Porovnání MFI CD71 u jednotlivých typů B-NHL - cytometrická analýza. Silně proliferující agresivní lymfomy.

Statistika: $p < 0,0075$ **



Graf 5: MFI CD71 u níže, středně a vysoce maligních B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - cytometrická analýza.

Statistika: $p < 0,0013$ **

Porovnání proliferace u pacientů s diploidní a aneuploidní DNA

Ze 112 vyšetřených pacientů jsem prokázala u 14 pacientů aneuploidní DNA, 12 z nich patřilo do skupiny high-grade lymfomů (Tab. 5, Obr. 15). Z analýzy bylo patrné, že aneuploidní (a to především tetraploidní) populace jsou oproti diploidním silně proliferace aktivní (Obr. 16, Graf 6, Graf 7). Veškeré uváděné PI jsou již vztaženy k celku.

Zastoupení pacientů s diploidní a aneuploidní DNA

	diploidní	aneuploidní	
B-CLL	44 (44)	0 (44)	0 (44)
FL low	11 (12)	0 (12)	1 (12)
FL high	0 (2)	2 (2)	0 (2)
MALT	3 (3)	0 (3)	0 (3)
MCL	12 (13)	0 (13)	1 (13)
DLBCL	13 (22)	5 (22)	4 (22)
BL	1 (2)	0 (2)	1 (2)
reaktivní	14 (14)	0 (14)	0 (14)

	diploidní	aneuploidní	
low-grade	58 (59)	0 (59)	1 (59)
intermediate-grade	12 (13)	0 (13)	1 (13)
high-grade	14 (26)	7 (26)	5 (26)
reaktivní	14 (14)	0 (14)	0 (14)

Tab. 5: Zastoupení vyšetřených pacientů s diploidní a aneuploidní DNA - rozdělení podle příslušné diagnózy a stupně malignity.

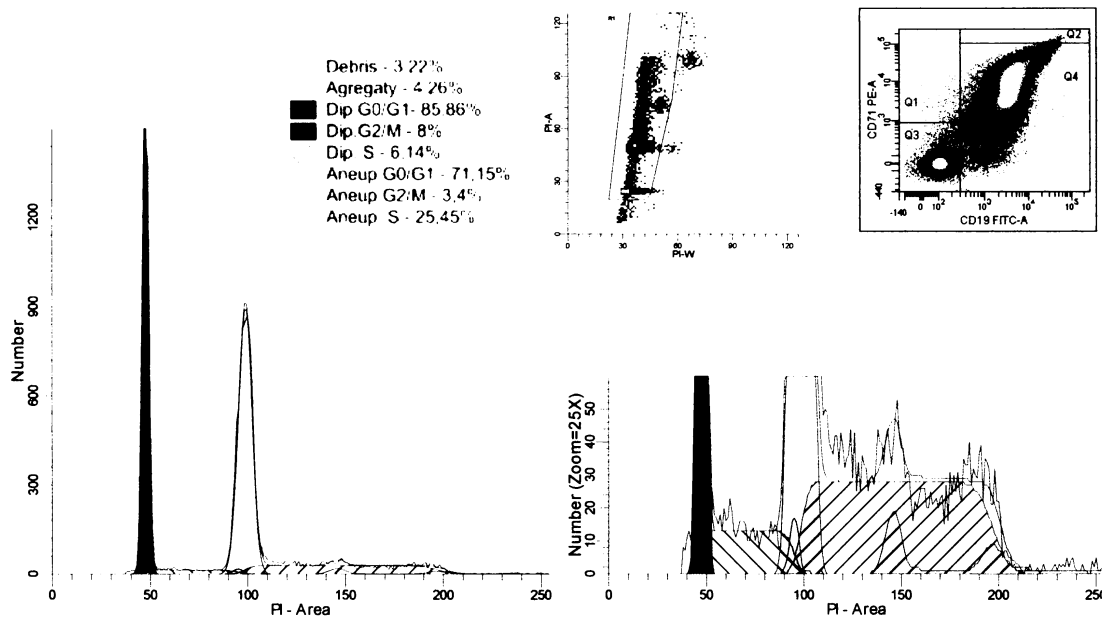
zastoupení pacientů s aneuploidní DNA



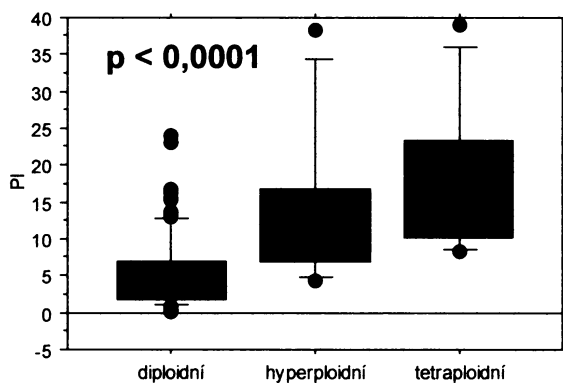
- tetraploidní
- hyperploidní
- diploidní

	DI
Diploidní	= 1
Hyperploidní	> 1
Tetraploidní	= 2

Obr. 15: Zastoupení pacientů s aneuploidní DNA s rozdělením na hyperploidní a tetraploidní aneuploidie; DI = DNA index.

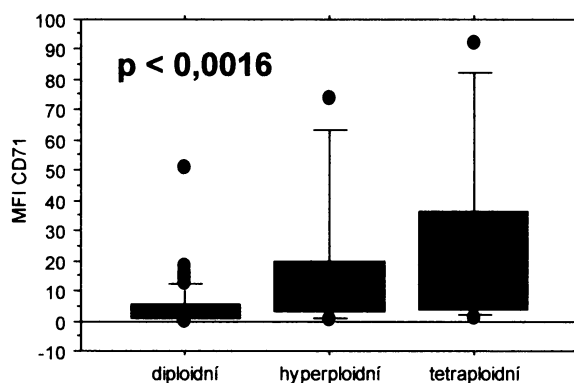


Obr. 16: Proliferace u pacienta s DLBCL s vysokým podílem tetraploidní populace a výraznou proliferační aktivitou (MFI CD71 - 39,78) - cytometrická analýza.



Graf 6: Vysoký PI pacientů s aneuploidní DNA v porovnání s pacienty s diploidní DNA - cytometrická analýza

Statistika: $p < 0,0001$ ***



Graf 7: Vysoký MFI CD71 u pacientů s aneuploidní DNA v porovnání s pacienty s diploidní DNA - cytometrická analýza.

Statistika: 0,0016 **

4.2 Proteiny buněčného cyklu

Metodou průtokové cytometrie jsem u 80 pacientů analyzovala vybrané proteiny buněčného cyklu (25 žen a 55 mužů s mediánem věku 60let, věkové rozmezí se pohybovalo mezi 29 a 85 lety) (43 tkání - 39 uzlin, 1 mediastinum, 1 prs, 1 štítná žláza, 1 žaludek; 28 KD; 9 PK) (Tab. 6) a metodou WB 61 pacientů (25 žen a 36 mužů s mediánem věku 67 let ve věkovém rozmezí 21-86 let) (veškerý materiál pouze tkáně - 56 uzlin, 2 štítné žlázy, 2 tumory, 1 prs) (Tab. 7).

Provedla jsem korelaci dat získaných oběmi metodami, výsledky analýzy proteinu p53 a cyklinu D1 byly navíc korelovány s IHC.

Výsledky průtokové cytometrie jsou prezentovány jako podíl mediánu populace značené protilátkou příslušnou pro vyšetřovaný protein (p21, p27, p53 nebo cyklin D1) a mediánu izotypové kontroly (MFI).

Výsledky WB byly hodnoceny podle intenzity signálu ve škále: -, 1+, 2+, 3+.

Low-grade			
B-CLL	34	Tkáň	12
		KD	17
		PK	5
FL low	9	Tkáň	9
MALT	3	Tkáň	1
		KD	2

Reaktivní			
Reaktivní	4	Tkáň	1
		KD	2
		PK	1

FACS

Intermediate-grade			
MCL	13	Tkáň	4
		KD	6
		PK	3

High-grade			
FL high	1	Tkáň	1
DLBCL	15	Tkáň	15
BL	1	KD	1

Tab. 6: Zastoupení cytometricky vyšetřených pacientů - rozdělení podle příslušné diagnózy, stupně malignity a analyzovaného materiálu.

Low-grade			
CLL	12	Tkáň	12
FL low	7	Tkáň	7
MALT	2	Tkáň	2
Intermediate-grade			
MCL	11	Tkáň	11

Reaktivní			
Reaktivní	3	Tkáň	3

WB

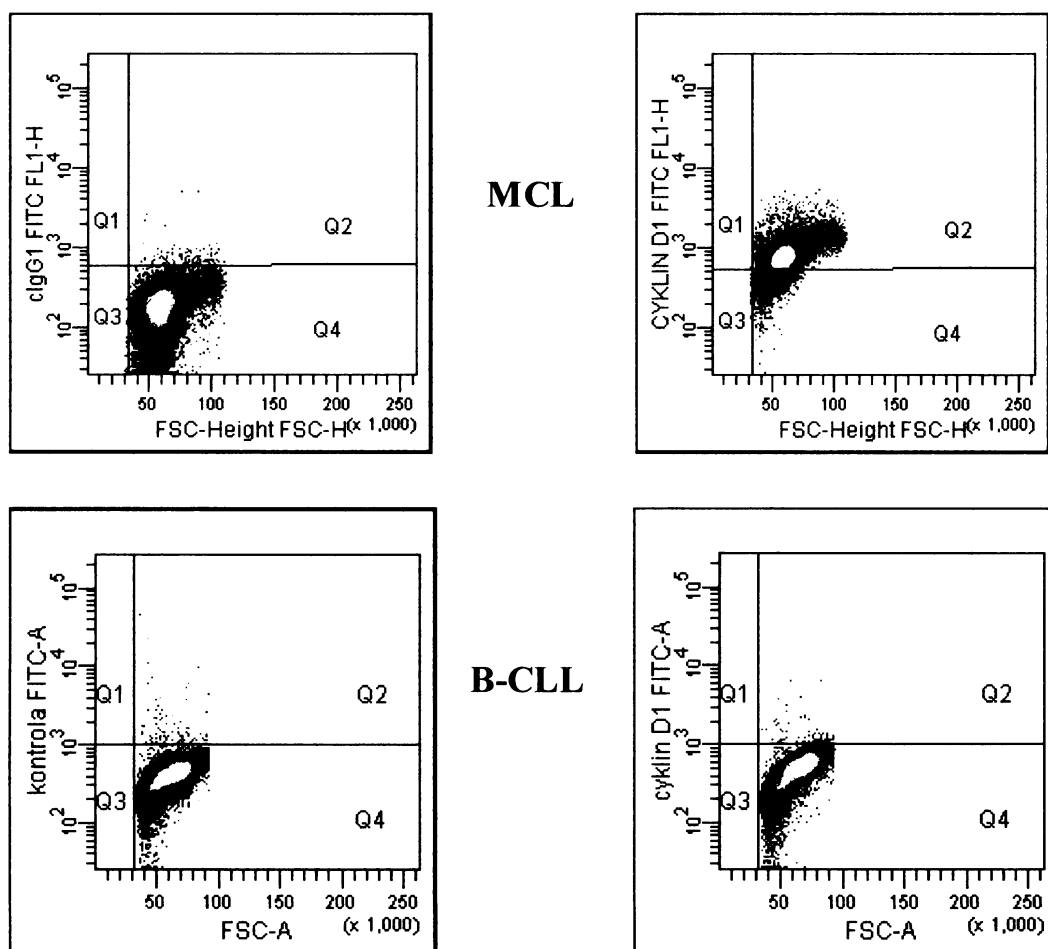
High-grade			
FL high	3	Tkáň	3
DLBCL	22	Tkáň	22
BL	1	Tkáň	1

Tab. 7: Zastoupení pacientů vyšetřených western blotem - rozdělení podle příslušné diagnózy, stupně malignity a analyzovaného materiálu.

4.2.1 Cyklin D1

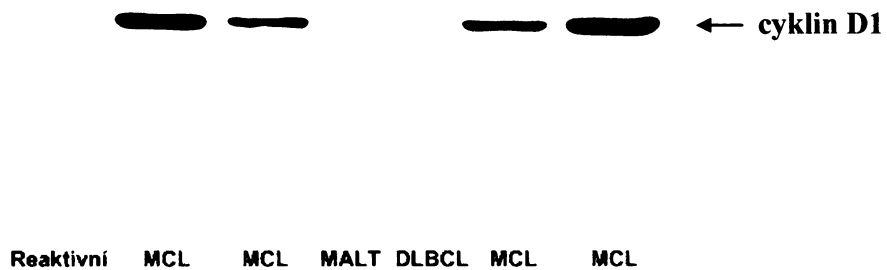
Prokázala jsem, že analýzu cyklinu D1 lze cytometricky provádět pouze z čerstvého materiálu a vhodným materiálem je bioptický odběr. Vzorky nelze uchovávat ve FBS v -80°C a ani dlouhodoběji fixovat v methanolu v -20°C . Jako optimální se jevila fixace v methanolu v -20°C přes noc a následné značení příslušnou protilátkou.

U všech pacientů s diagnózou MCL jsem cytometricky prokázala overexpresi cyklinu D1 (medián MFI - 4,53). Non-MCL lymfomy měly hladinu cyklinu D1 výrazně nižší (medián MFI - 1,67) (Obr. 17).

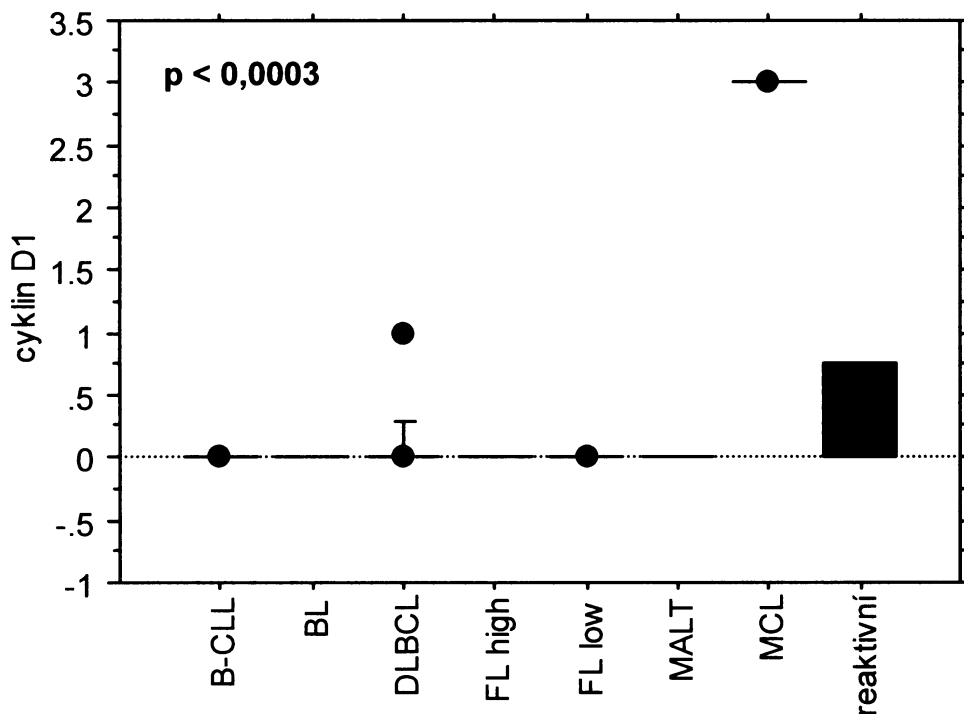


Obr. 17: Cytometrická detekce cyklinu D1 z čerstvého materiálu. Pozitivita cyklinu D1 u MCL (MFI cyklinu D1 - 4,53) a negativita u B-CLL (MFI cyklinu D1 - 1,20).

Overexpresi cyklinu D1 metodou WB hodnocenou jako 3+ jsem detekovala u všech 11 pacientů s MCL (Obr. 18). Ostatní non-MCL lymfomy byly až na 2 výjimky cyklin D1 negativní. U těchto 2 pacientů (DLBCL a reaktivní LU) jsem detekovala jen velmi slabou expresi cyklinu D1 (Graf 8, Graf 9).

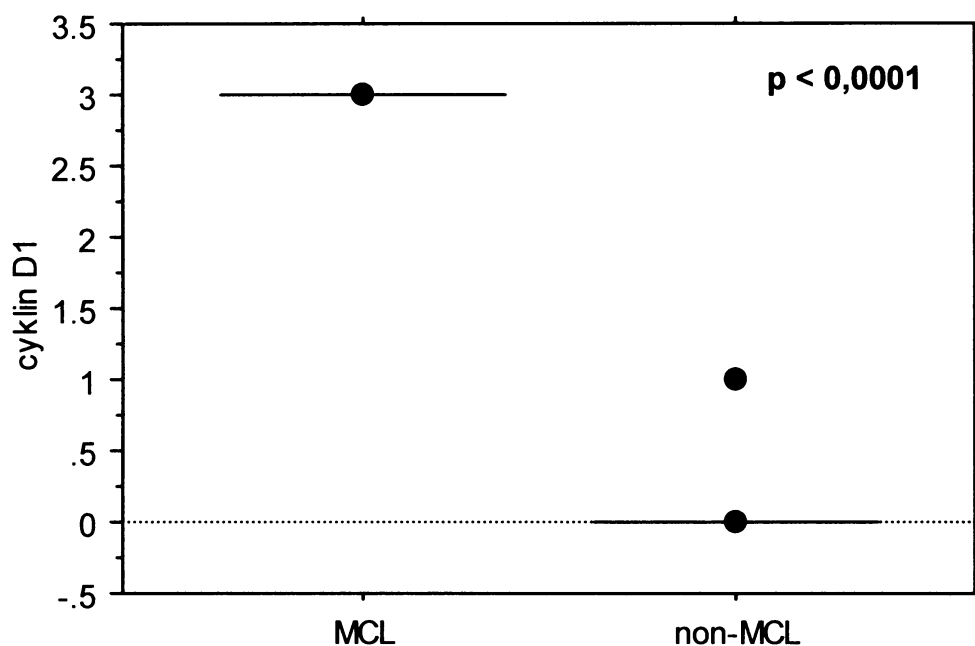


Obr. 18: Overexprese cyklin D1 u pacientů s MCL hodnocená jako 3+. Srovnání s výsledky pacientů s non-MCL - analýza WB.



Graf 8: Exprese cyklinu D1 u jednotlivých B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - analýza WB.

Statistika: $p < 0,0003$ ***



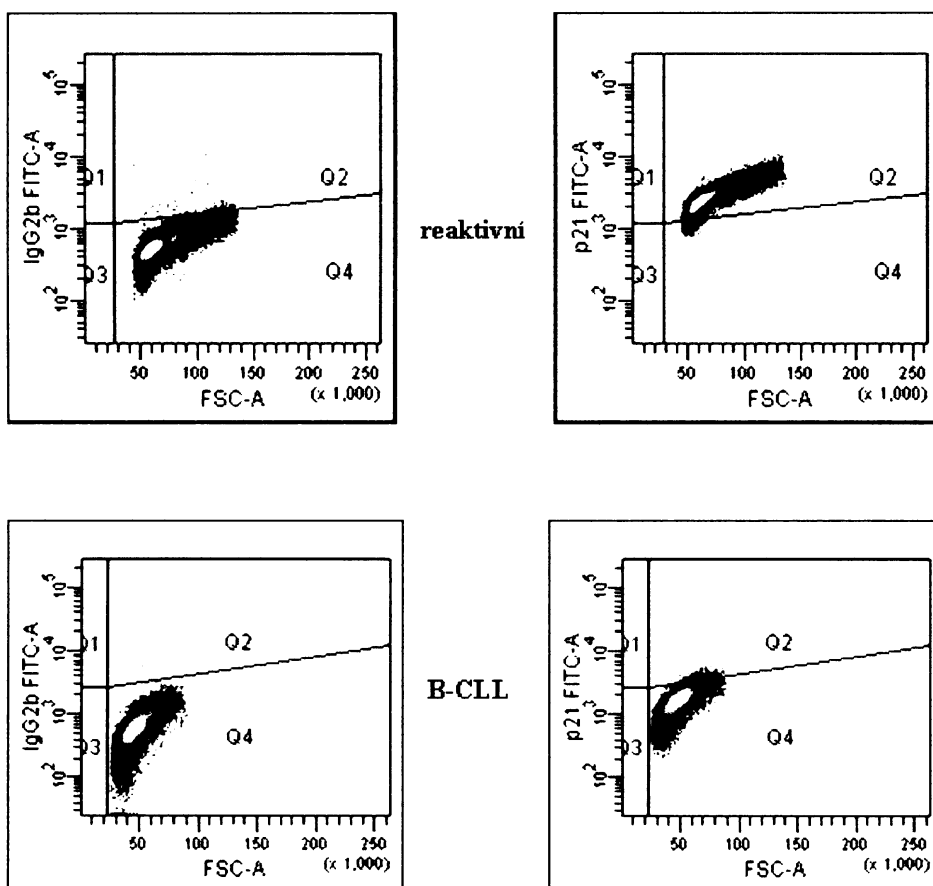
Graf 9: Porovnání exprese cyklinu D1 u MCL a non-MCL B-NHL - analýza WB.

Statistika: $p < 0,0001$ ***

Výsledky WB i průtokové cytometrie korelovaly ve 100 % případů s nálezy již dříve zavedené IHC.

4.2.2 Protein p21

Metodou průtokové cytometrie jsem u 2 vzorků tkání prokázala zvýšenou hladinu proteinu p21 (MFI - 4,54, resp. 5,40). Nejvyšší MFI jsem zjistila ve FL a reaktivní uzlině (Obr. 19). Další cytometricky vyšetřené B-NHL se vyznačovaly srovnatelnou expesí proteinu p21 a to ve tkáních, kostní dřeni i periferní krvi (Tab. 8). Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly u jednotlivých typů B-NHL, ani rozdíly v závislosti na stupni malignity.



Obr. 19: Cytometrická detekce proteinu p21. Pozitivita p21 u reaktivní LU (MFI p21 - 4,74) a negativita u B-CLL (MFI p21 - 2,60). Nález potvrzen i metodou WB (reaktivní viz 1.jamka, B-CLL viz 6.jamka Obr. 20).

B-CLL	2,88	2,88	2,60	low-grade	2,79	2,84	2,60
FL low	2,97	-	-	intermediate	3,52	2,00	2,81
MALT	2,59	1,76	-	high-grade	2,55	2,68	-
FL high	2,80	-	-				
DLBCL	2,55	-	-				
reaktivní	4,54	2,7	2,50				
MCL	3,52	2	2,81				
BL	-	2,68	-				

Tab. 8: Mediány hodnot MFI p21 ve tkáních, KD, PK. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty pouze s jedním vzorkem, pomlčkou - jsou proškrtnuty hodnoty, kdy nebyl k dispozici infiltrovaný materiál.

Velmi silnou expresi hodnocenou jako 3+ jsem detekovala metodou WB u 2 pacientů s diagnózou DLBCL. Pozitivitu označenou jako 2+ jsem prokázala u 1 pacienta s FL low, 3 pacientů s MCL, 8 pacientů s DLBCL a 2 reaktivních uzlin. Pozitivita 1+ byla

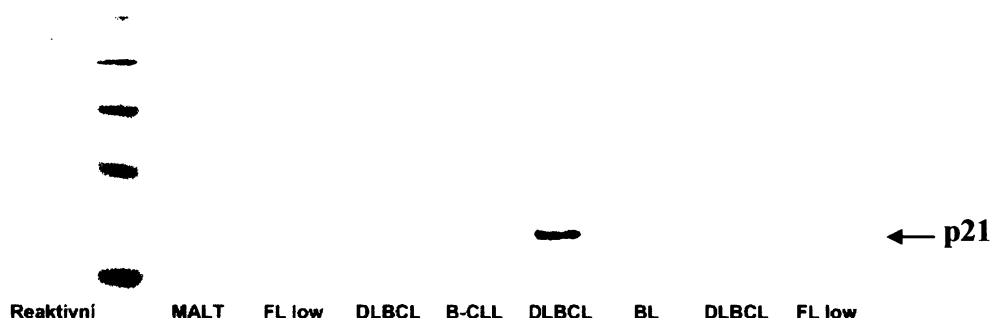
prokázána u low, intermediate i high-grade lymfomů (Tab. 9). Pozitivita 2+ a 3+ byla metodou WB častěji zjištěna u agresivnějších lymfomů (Obr. 20).

Detekce overexprese proteinu p21 WB

	1+	2+	3+
B-CLL	5 (12)	0 (12)	0 (12)
FL low	1 (7)	1 (7)	0 (7)
FL high	1 (3)	0 (3)	0 (3)
MALT	0 (2)	0 (2)	0 (2)
MCL	3 (11)	3 (11)	0 (11)
DLBCL	3 (22)	8 (22)	2 (22)
BL	0 (1)	0 (1)	0 (1)
Reaktivní	0 (3)	2 (3)	0 (3)

	1+	2+	3+
low-grade	6 (21)	1 (21)	0 (21)
intermediate-grade	3 (11)	3 (11)	0 (11)
high-grade	4 (26)	8 (26)	2 (26)
reaktivní	0 (3)	2 (3)	0 (3)

Tab. 9: Zastoupení pacientů vyšetřených metodou WB podle intenzity exprese p21 - rozdělení podle příslušné diagnózy a stupně malignity.



Obr. 20: Exprese p21 u pacientů s různými typy B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - analýza WB. Zleva: DLBCL (7. jamka) = 3+; reaktivní vzorek (1. jamka), DLBCL (5. a 9. jamka) = 2+; FL low (10. jamka) = 1+; ostatní hodnoceny jako negativní.

4.2.3 Protein p27

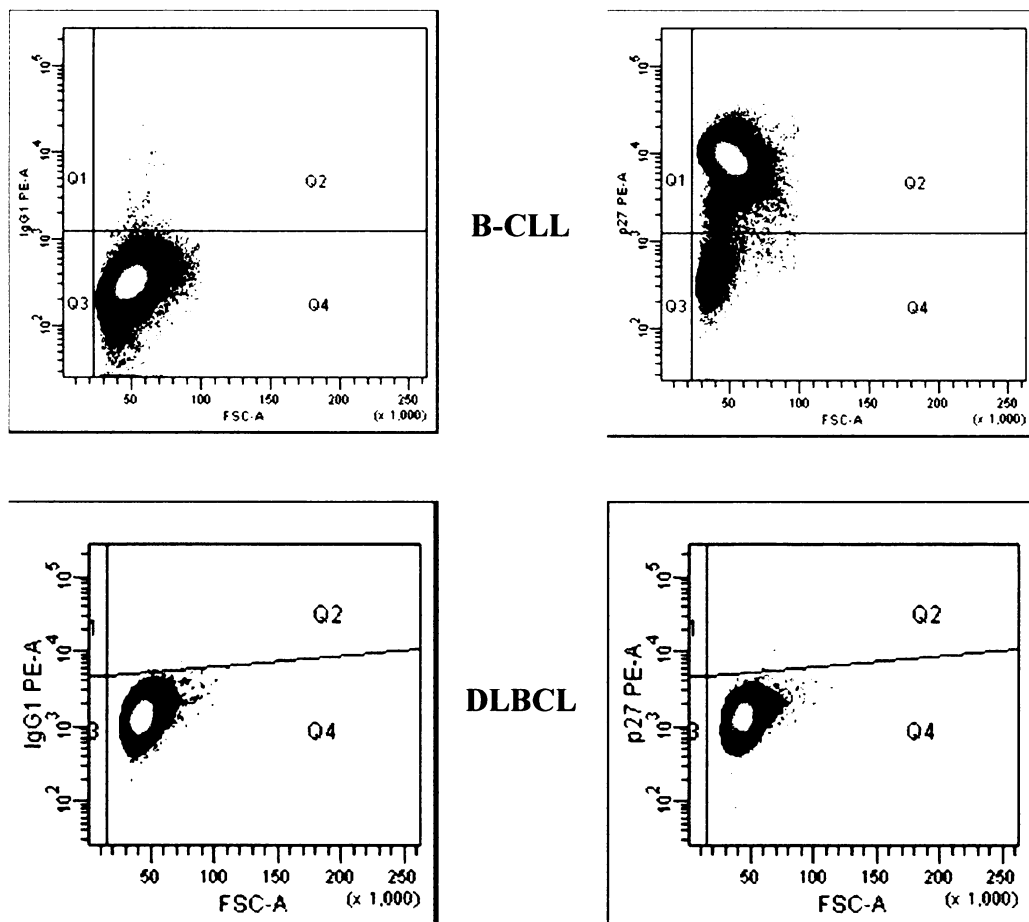
Vysokou expresi proteinu p27 jsem cytometricky prokázala u B-CLL, pro kterou je typické, že buňky nepodléhají apoptóze a setrvávají v G₀/G₁-fázi buněčného cyklu (medián MFI - tkáň 6,52; KD 14,30, PK 8,80) (Tab. 10). U dalších low-grade lymfomů (FL low a MALT) jsem zjistila slabší expresi (FL low medián MFI tkáň - 2,92; KD a PK bez

infiltrace; MALT medián MFI - tkáň 2,70; KD 2,58; PK bez infiltrace). Nizké hodnoty byly detekovány u MCL a nejnižší hodnoty u agresivních lymfomů (DLBCL, FL high a BL) (Tab. 10, Obr. 21, Graf 10).

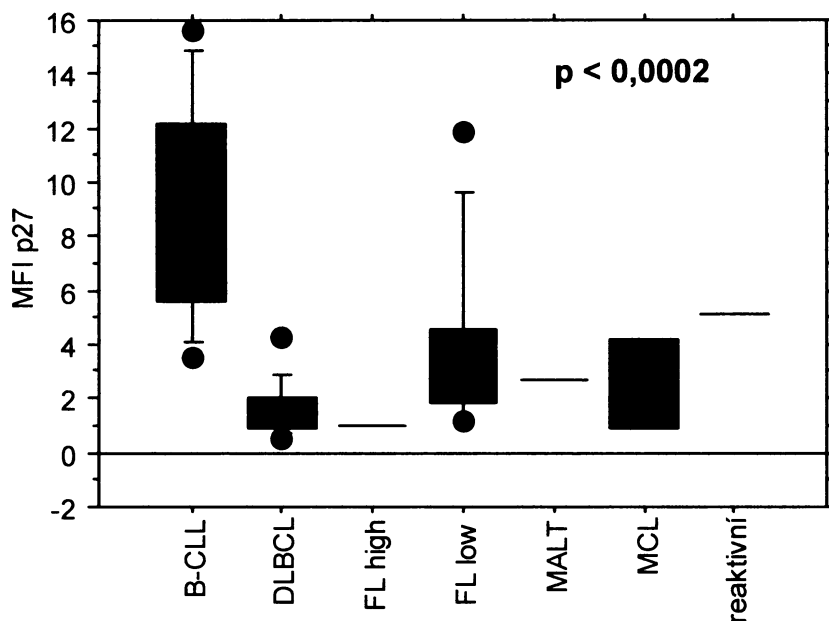
B-CLL	6,52	14,30	8,80
FL low	2,92	-	-
MALT	2,70	2,58	-
FL high	1,03	-	-
DLBCL	1,30	-	-
reaktivní	5,10	2,27	9,98
MCL	1,90	2,80	5,69
BL	-	4,14	-

low-grade	6,1	10,1	2,14
intermediate	1,9	2,80	5,69
high-grade	1,28	4,14	-

Tab. 10: Mediány hodnot MFI p27 ve tkáních, KD, PK. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty pouze s jedním vzorkem, pomlčkou - jsou proškrtnuty hodnoty, kdy nebyl k dispozici infiltrovaný materiál.



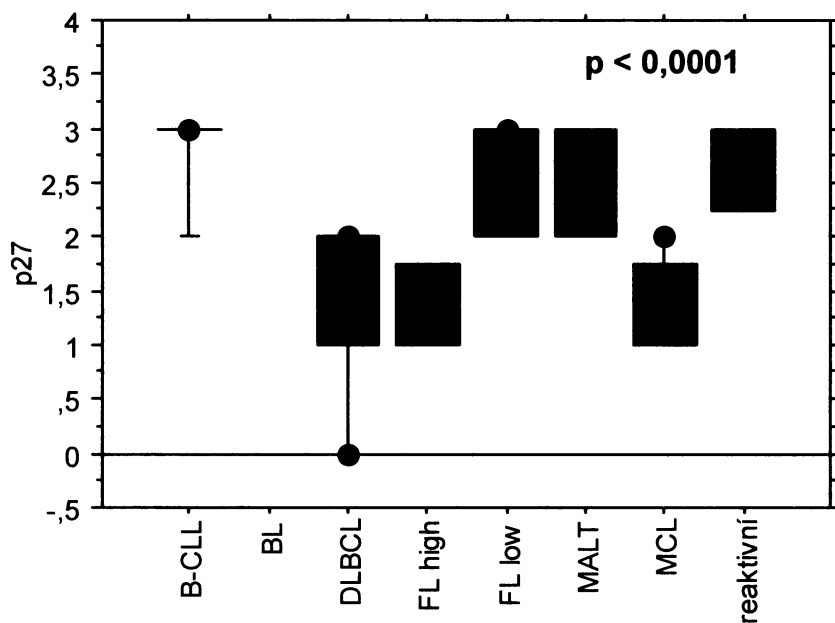
Obr. 21: Cytometrická detekce proteinu p27. Pozitivita p27 u B-CLL (MFI - 15,66) a negativita u DLBCL (MFI - 1,00). Nález potvrzen i metodu WB (data nejsou znázorněna).



Graf 10: MFI p27 u jednotlivých typů B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - cytometrická analýza. Silná exprese zjištěna u B-CLL.

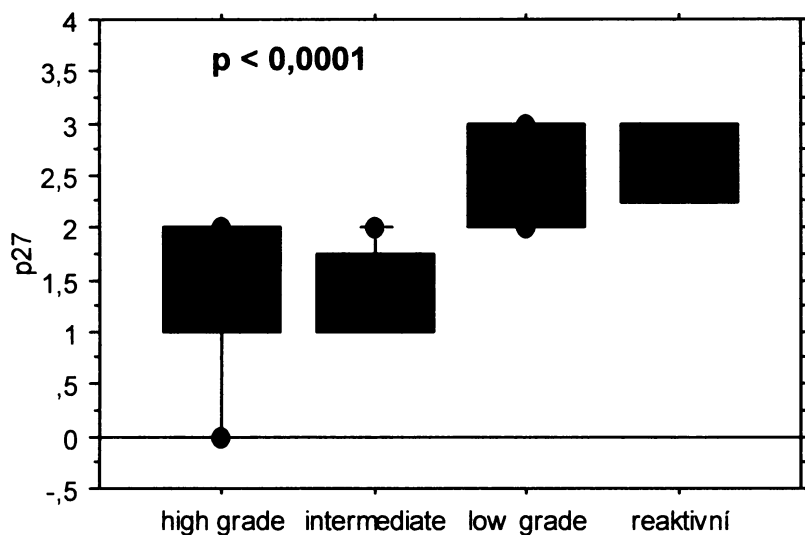
Statistika: $p < 0,0002$ ***

Data zjištěná průtokovou cytometrií jsou v korelaci s výsledky zjištěnými metodou WB (Graf 11, Graf 12, Obr. 22)



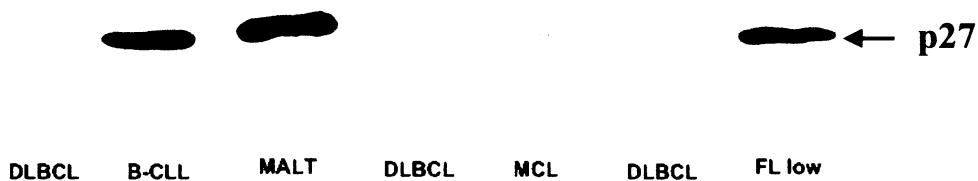
Graf 11: Porovnání exprese p27 u jednotlivých B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - analýza WB.

Statistika: $p < 0,0001$ ***



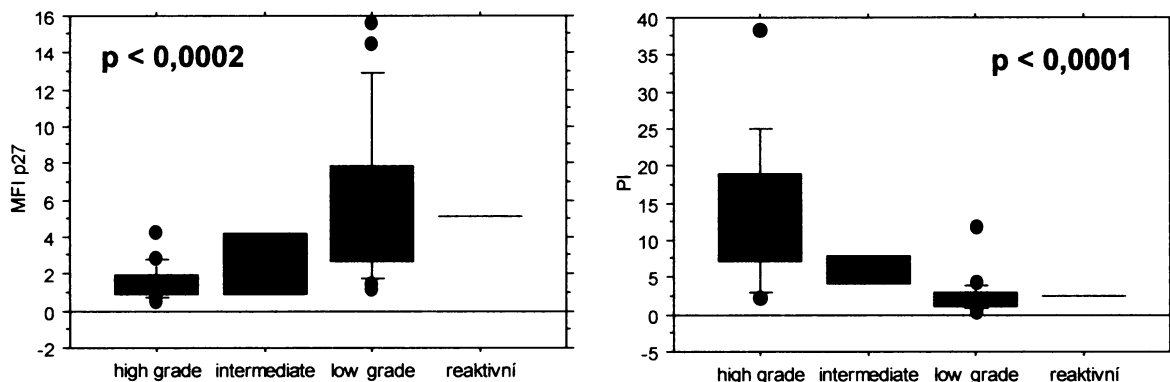
Graf 12: p27 u nízké, středně a vysoce maligních B-NHL, porovnání s reaktivními vzorky - analýza WB.

Statistika: $p < 0,0001$ ***



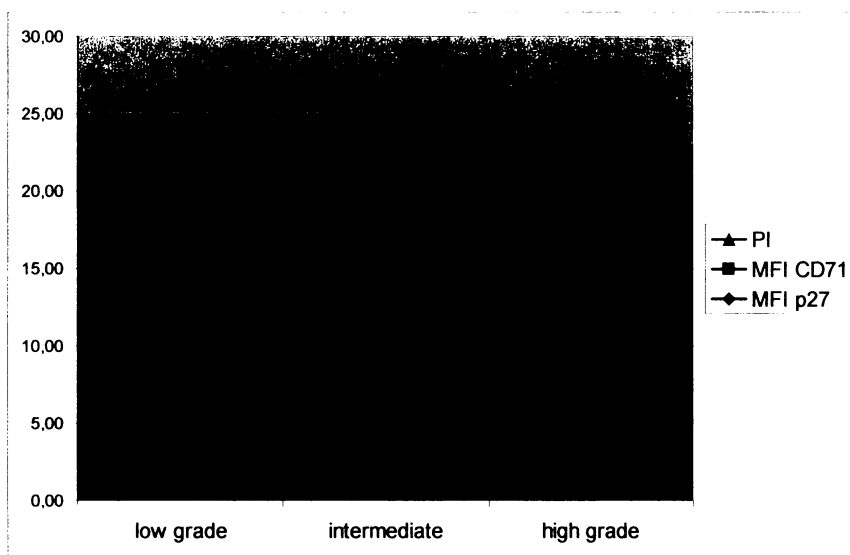
Obr. 22: Expres p27 u pacientů s různými typy B-NHL - analýza WB. Zleva: B-CLL (3. jamka), MALT (4. jamka) = 3+, FL low (8. jamka) = 2+; DLBCL (5. jamka), MCL (6. jamka) = 1+; ostatní hodnoceny jako negativní.

Expres proteinu p27 je nepřímo úměrná proliferační aktivitě buněk (Graf 13, Graf 14). Vysoká expres je charakteristická pro nízké maligní nádory, na rozdíl od nízké expres u nádorů vysoce maligních. Výjimku tvoří středně maligní lymfomy, kde jsem detekovala snížené hladiny p27, zatímco proliferační index byl ve srovnání s high-grade lymfomy nižší.



Graf 13: Závislost exprese proteinu p27 na PI - cytometrická analýza. Exprese p27 je nepřímo úměrná proliferační aktivitě buněk.

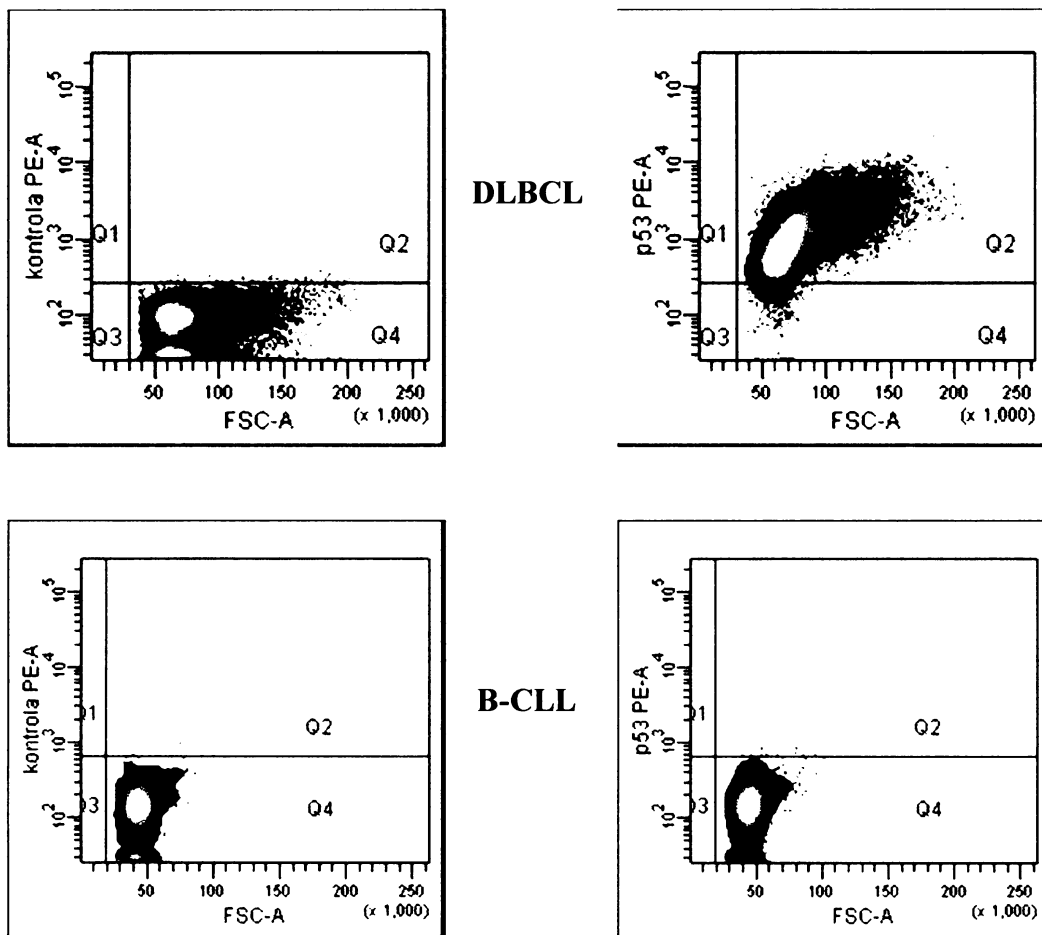
Statistika: ***



Graf 14: Závislost exprese p27, PI a MFI CD71 - cytometrická analýza. Vyšší proliferační aktivita agresivnějších B-NHL charakterizovaná vyšším PI a MFI CD71 je provázána nižší expresí proteinu p27.

4.2.4 Protein p53

Metodou průtokové cytometrie jsem u 2 pacientů (DLBCL a B-CLL) prokázala overexpresi proteinu p53, která může nasvědčovat o přítomnosti mutované formy p53 (Obr. 23). Metodou WB jsem overexpresi proteinu p53 označenou jako 3+ zjistila u 2 pacientů (DLBCL, B-CLL), expresi 2+ u 3 pacientů (DLBCL, MCL, BL) a 1+ u 3 pacientů (2x DLBCL, FL high) (Tab. 12, Obr. 24). U 5 pacientů s vyšší expresí proteinu p53 jsem vyšetřovala ploidii buněk a 4 z nich vykazovali DNA-aneuploidii (2x tetraploidní, 2x hyperploidní). U většiny vyšetřených pacientů jsem overexpresi nedetekovala (Tab. 11).



Obr. 23: Cytometrická detekce proteinu p53. Overexprese p53 u DLBCL s 92% aneuploidií (MFI - 15,05) a negativita u B-CLL (MFI - 1,10). Nález potvrzen i metodu WB (DLBCL viz 2.jamka, B-CLL viz 6.jamka Obr. 24).

B-CLL	2,46	1,13	2,14	low-grade	2,02	1,11	2,14
FL low	1,86	-	-	intermediate	1,74	1,13	1,38
MALT	1,31	1,04	-	high-grade	1,43	1,89	-
FL high	1,41	-	-				
DLBCL	1,41	-	-				
reaktivní	1,92	1	1,60				
MCL	1,74	1,13	1,38				
BL	-	1,89	-				

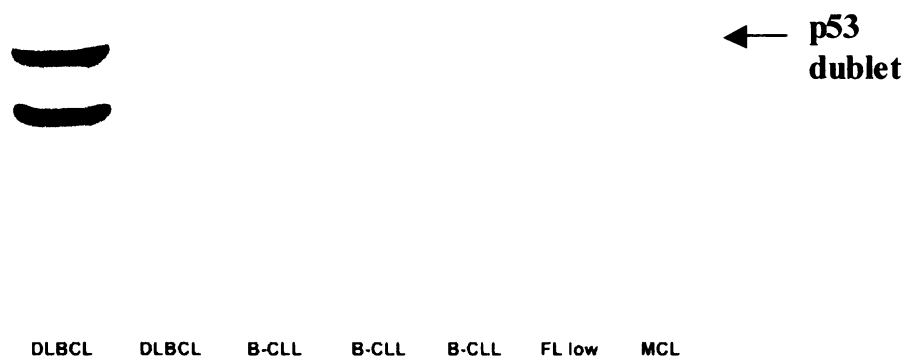
Tab. 11: Mediány hodnot MFI p53 ve tkáních, KD, PK. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty pouze s jedním vzorkem, pomlčkou - jsou proškrtnuty hodnoty, kdy nebyl k dispozici infiltrovaný materiál.

Detekce overexprese proteinu p53 WB

	1+	2+	3+
B-CLL	0 (12)	0 (12)	1 (12)
FL low	0 (7)	0 (7)	0 (7)
FL high	1 (3)	0 (3)	0 (3)
MALT	0 (2)	0 (2)	0 (2)
MCL	0 (11)	1 (11)	0 (11)
DLBCL	2 (22)	1 (22)	1 (22)
BL	0 (1)	1 (1)	0 (1)
Reaktivní	0 (3)	0 (3)	0 (3)

	1+	2+	3+
low-grade	0 (21)	0 (21)	1 (21)
intermediate-grade	0 (11)	1 (11)	0 (11)
high-grade	3 (26)	2 (26)	1 (26)
reaktivní	0 (3)	0 (3)	0 (3)

Tab. 12: Zastoupení pacientů vyšetřených metodou WB podle intenzity exprese p53 - rozdělení podle příslušné diagnózy a stupně malignity.



Obr. 24: Exprese p53 u pacientů s různými typy B-NHL - analýza WB. Zleva: DLBCL (2. jamka), B-CLL (4. jamka) = 3+; DLBCL (3. jamka) = 2+; ostatní hodnoceny jako negativní. Dvojitý band odpovídá dubletu p53 (spodní nefosforylované a vrchní fosforylované formě p53)

Vzájemná porovnání výsledků IHC a WB se shoduje v průměru v 91,5 % srovnaných 19 případů. Shoda WB a FACSu v expresi p53 je 97,3 % u 26 pacientů. Stejně tak i IHC a FACS je shoda 82 % (srovnání u 5 pacientů).

5 Diskuze

Skupina chorob řazených do kategorie maligní lymfomy je typická mnohotvárností biologického průběhu a odlišností léčebných postupů u jednotlivých nozologických jednotek. Vynikají různorodostí v průběhu nemoci a klinických projevech. Asi jediné, co mají tyto nemoci společného, je jejich původ z lymfoidní tkáně.

Agresivní formy lymfomů mohou neléčeného člověka usmrtit během několika týdnů, či měsíců, zatímco pacienti s nízcí maligním lymfomem mohou žít bez léčby i více než deset let. Některé lymfomy mají tendenci rychle se šířit do celého organismu, jiné naopak proliferují dlouhou dobu pouze v jednom místě a k vyplavení buněk dochází až po dlouhé době lokálního růstu. Z tohoto důvodu je určení diagnózy častý problém pro kliniky i pathology.

Pro nízcí agresivní lymfomy je typická pomalá progresse a již pokročilé klinické stádium při stanovení diagnózy. Medián přežití bývá mezi 5 - 10 roky. Kumulace nádorových buněk v organismu je způsobena převážně jejich poruchou apoptózy, nikoli jejich rychlou proliferací. To sebou přináší i nižší citlivost na léčbu a průběh nemoci se skládá z remisí a relapsů.

Na rozhraní mezi nízcí a vysoce agresivními lymfomy můžeme řadit MCL, který je potenciálně nevyléčitelný s mediánem přežití 3 - 5 let.

Agresivní formy lymfomů jsou charakteristické rychlejším klinickým průběhem a poměrně dobře odpovídají na léčbu. Pokud tyto choroby nejsou léčené, zahubí pacienta během několika měsíců od prvních příznaků. Tyto lymfomy jsou potenciálně léčitelné.

Je velmi důležité stanovit diagnózu pacienta co nejpřesněji pro nasazení co nejvhodnější léčby. To sebou přináší neustálé hledání nových poznatků a souvislostí, které by přispěly ke zlepšení diagnostiky a terapie.

5.1 Ploidie, proliferační aktivita buněk a s tím související prognóza

Proliferace je základní parametr, který je stanovován u různých typů nádorů v souvislosti s určením stupně malignity a tím i prognostického významu. IHC vyšetření se většinou zaměřuje na průkaz molekuly Ki-67, molekuly obecně uznávané pro stanovení proliferační aktivity nádorových buněk B-NHL (BAI et al. 2007, KOSTER et al. 2007).

Proliferační aktivitu však lze rychle a jednoduše stanovit metodou průtokové cytometrie pomocí určení obsahu DNA (LORAND-METZE et al. 2004), nebo detekcí specifických povrchových znaků (např. CD71) (WU et al. 2006).

Buněčnou proliferaci dle obsahu DNA jsem stanovila u 112 pacientů s infiltrací B-NHL. Vysoce maligní lymfomy měly v primárním nádoru téměř pětinasobně vyšší hodnoty PI než lymfomy nízce maligní. Středních hodnot dosahovaly středně maligní lymfomy. Obdobný trend byl u KD, kde však mohou být výsledky z důvodu hodnocení všech jaderných elementů ovlivněny částečně zachovanou krvetvorbou, a i PK. Počty vyšetřených KD a PK souvisí s biologickými vlastnostmi jednotlivých typů B-NHL, kdy ne každý lymfom má tendenci postihovat KD a leukemizovat.

Agresivní lymfomy vykazovaly mnohem vyšší proliferační aktivitu, která je dávana do souvislosti s vyšším stupněm malignity a horší prognózou, což prokazuje i řada dalších studií (REHN et al. 1990, JOENSUU et al. 1991, STOKKE et al. 1998). U agresivních lymfomů jsem zaznamenala vyšší počet pacientů s aneuploidní DNA. Ze 112 vyšetřených pacientů bylo 14 aneuploidních, z čehož 12 případů byly zástupci high-grade lymfomů s vysokou proliferační frakcí aneuploidní populace. Pacienti s tetraploidní DNA se vyznačovali vyšším PI oproti pacientům s hyperploidní DNA. S aneuploidií koreloval také horší průběh nemoci, což je v souladu s literárními údaji (BÖCKING et al. 1986, STETLER-STEVENSON a BRAYLAN 2001, LORAND-METZE et al. 2004).

U 4 pacientů s aneuploidní DNA jsem prokázala overexpresi p53 a velmi nízkou expresi (či absenci) proteinu p27, což naznačuje atypické vychýlení v regulaci buněčného cyklu a nepříznivou prognózu.

Paralelně s PI byl detekován i MFI receptoru CD71, který je exprimován především při přechodu z G_0/G_1 do S-fáze buněčného cyklu. Řada studií ukazuje, že agresivní nádory vyžadují zvýšený přísun železa pro aktivní metabolismus rychle rostoucích buněk (OMARY et al. 1980, GODING a BURNS 1981, NEWMAN et al. 1982). Tyto nádorové buňky vykazují vysokou densitu transferinového receptoru CD71, který je nezbytný pro transport železa do dělicích se buněk (GODING a BURNS 1981). Míra exprese CD71 nepřímo souvisí s dostupností železa v dělicích se buňkách a jeho zvyšující se exprese bývá spojována s buněčnou proliferací (OMARY et al. 1980).

I zde byl pozorován stejný trend - nejvyšší MFI CD71 jsem zjistila u high-grade, poté u intermediate a nejnižší u low-grade lymfomů. Jelikož byly analyzovány pouze CD19+ B lymfocyty, nebyl ani v KD výsledek zkreslován částečně zachovanou krvetvorbou.

Výsledky PI a MFI CD71 byly v 82 % korelaci s IHC vyšetřením Ki-67. Jednotlivé způsoby vyšetření proliferační aktivity však mají své přednosti. IHC vyšetření Ki-67 u B-NHL je považováno za standart, ale k jeho expresi dochází ve všech aktivních fázích

buněčného cyklu (G_1 , S, G_2 a M). Cytometrická analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA a stanovení PI, stejně jako zjištění MFI CD71, může lépe rozlišit buňky v určitých fázích buněčného cyklu.

Průkaz PI a MFI CD71 navíc umožňuje jednoznačné cytometrické odlišení BL, DLBCL a FL high od FL low lymfomů, jejichž léčba i prognóza jsou odlišné. Tyto typy B-NHL jsou identické svým imunofenotypem a jsou primárně odlišitelné na základě typických morfologických struktur. Autoři WU et al. 2006 obdobně ukazují, že na základě proliferace buněk detekované pomocí CD71 či obsahu DNA je možné od sebe navzájem odlišit CD10+ lymfomy.

5.2 Cyklin D1

BCL1 (PRAD1) gen kóduje cyklin D1, který je důležitým regulátorem buněčného cyklu. Je exprimován především v G_1 -fázi a účastní se přechodu do S-fáze.

Cyklin D1 je u lymfocytů exprimován zřídka (UCHIMARU et al. 1997). Výjimkou je vysoká hladina cyklinu D1 následkem chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32), která je charakteristická pro MCL a předpokládá se, že je hlavní příčinou špatné prognózy tohoto lymfomu (BOSCH et al. 1994, OTT et al. 1997). Overexprese cyklinu D1 je tudíž důležitá především pro diagnostiku MCL (OTT et al. 1997, KAPLAN et al. 2005).

Ve WB vyšetření byla patrná zcela jednoznačná pozitivita cyklinu D1 (3+) u všech pacientů s diagnózou MCL. Pouze u 2 pacientů (DLBCL a reaktivní LU) jsem detekovala velmi slabou expresi cyklinu D1 (1+). Oba tito pacienti vykazovali i 2+ pozitivitu proteinu p21 a p27. Některé studie poukazují na horší prognózu u pacientů, u kterých byla detekována zvyšující se hladina cyklinu D1 a p21 a vysvětlují to vyšší proliferací buněk (HASKOVEC 2003, POLAK 2003a).

Cyklin D1 jsem se snažila detekovat i metodou průtokové cytometrie. Jak uvádí KAPLAN et al. 2005 ve své publikaci, detekce cyklinu D1 pomocí průtokové cytometrie je poměrně obtížná a málo kdo se do ní pouští. Proto asi většina publikovaných dat je získána metodou WB, IHC a RT-PCR.

Cyklin D1, jak jsem pozorovala, je velmi citlivý na fixaci a na stabilitu. Ukázalo se, že nezbytná a šetrná je fixace methanolem, kdy nedochází k poškození vazebných epitopů pro protilátku. Zároveň je nejvhodnější při fixaci methanolem pracovat s tkání, kde na rozdíl od KD a PK nejsou přítomny granulocyty způsobující sražení vzorku. Ani snaha oddělit granulocyty za pomoci gradientové centrifugace nebyla vždy úspěšná, v některých případech se nepovedlo nezralé granulocyty odseparovat.

Současně je i velmi důležité detekovat cyklin D1 z čerstvého materiálu. Ačkoliv výrobce udává možnost uchování vzorku v methanolu až po dobu 30 dnů, jeho overexpresi jsem u pacientů s MCL detekovala pouze při fixaci v methanolu přes noc. Po delší době fixace byl výsledek negativní. Stejný vzorek jsem zkoušela analyzovat i po rozmražení z FBS a následné fixaci methanolem a i zde byl cyklinu D1 negativní.

Vzhledem k relativně nízké incidenci MCL jsem měla k dispozici 3 nativní bioptické vzorky, všechny se vyznačovaly signifikantně vyšším MFI v porovnání s non-MCL lymfomy.

Ačkoli role cyklinu D1 v buněčném cyklu a jeho potřeba pro přechod z G₁ do S-fáze je zjevná, vysoké hladiny tohoto proteinu nejsou spojovány s abnormálně vysokou proliferační aktivitou (POLAK et al. 2005). Vysoká hladina cyklinu D1 a relativně nízká proliferace je u MCL vysvětlována vyvázáním cyklinu D1 inhibitorem p27. Tato interakce umožňuje stabilizaci komplexu cyklin D/cdk 4 a zároveň zamezuje interakci proteinu p27 s komplexem cyklin E/cdk 2, což v konečném důsledku vede k progresi buněčného cyklu do S-fáze (SHEAFF et al. 1997, CHIARLE et al. 2001).

I mé výsledky potvrzují tuto hypotézu. U pacientů s diagnózou MCL a overexpresí cyklinu D1 jsem detekovala jen velmi nízké hladiny proteinu p27 jak ve WB, tak i v průtokové cytometrii a proliferační aktivita byla oproti agresivním high-grade lymfomům nižší.

Expresi cyklinu D1 stanovenou metodou WB i cytometricky jsem porovnávala s IHC průkazem. Výsledky byly ve vzájemné korelaci 100 %. IHC průkaz cyklinu D1, který je na pracovišti dobře zavedený, je poměrně náročný na provedení a pro správné hodnocení vyžaduje značné zkušenosti. Metoda WB umožňuje analýzu ze zamraženého a dlouhodobě uchovaného materiálu a přináší jednoznačné výsledky. Limitací průtokové cytometrie je nutnost práce s nativním bioptickým vzorkem a dodržení požadavků na fixaci.

Metoda WB, a při dostupnosti nativního čerstvého vzorku tkáně i průtoková cytometrie, jsou vhodné pro diagnostiku MCL.

5.3 Protein p21

Protein p21 patří do rodiny inhibitorů a při poškození DNA hraje klíčovou roli při zastavení buněčného cyklu. Ke zvýšení hladiny tohoto proteinu dochází až následkem mitogenní stimulace (CHELLAPPAN et al. 1998).

Snížená hladina exprese proteinu p21 byla detekována v mnoha typech nádorů, především v souvislosti s nefunkčním proteinem p53. Absence proteinu p21 má za

následek porušení regulace buněčného cyklu, abnormální diferenciaci buňky a silnou predispozici k transformaci, která vede ke vzniku nádoru (EL-DIERY et al. 1993, BALL et al. 1997, MAESTRO et al. 1997, VILLUENDAS et al. 1997, AHMAD et al. 1998).

Zároveň se objevují publikace, které považují vyšší hladinu proteinu p21 za prognosticky horší a ukazují, že pacienti se silnou expresí p21 přežívají kratší dobu, než pacienti bez exprese tohoto proteinu. Vyšší exprese proteinu p21 zde bývá spojována s vysokým proliferačním indexem (BARETTON et al. 1999, OSMAN et al. 1999, POLAK et al. 2003b, NEMES et al. 2005).

Detekce proteinu p21 metodou WB není snadná a vyžaduje šetrný přístup. Protein je citlivý na detergenty (SDS, Tween 20) a při delší blokaci a promývání dochází k jeho odmývání.

Expresi proteinu p21 ve WB jsem zjistila u různých typů B-NHL spíše v souvislosti s nízkou hladinou proteinu p27 (2x DLBCL = 3+; 8 DLBCL, 3 MCL, 1 FL low, 2 reaktivní vzorky = 2+; 5 B-CLL, 1 FL low, 1 FL high, 3 MCL, 3 DLBCL = 1+ . 29 pacientů protein p21 neexprimovalo. Jak je vidět, exprese p21 není charakteristická pro některý konkrétní typ B-NHL, lze však konstatovat, že vysokou expresi hodnocenou jako 3+ jsem nezjistila ani u jednoho nízké maligního lymfomu. Výsledky naznačují, že vyšší hladiny p21 jsou typičtější pro agresivní lymfomy s vyšší proliferační aktivitou, nicméně i ve skupině agresivních B-NHL byly zastíženy lymfomy bez exprese proteinu p21. U nich nelze bez molekulárního průkazu jednoznačně vyloučit mutaci v genu pro p53. 2 pacienti s high-grade B-NHL (DLBCL a BL) s overexpresí proteinu p53, bez exprese p21, jsou z mutace v genu TP53 vysoce suspektní.

Cytometrické výsledky vyšetření proteinu p21 nebyly statisticky signifikantní. Průtoková cytometrie neumožňovala vždy jednoznačné odlišení p21 negativních buněk od pozitivních podle intenzity exprese (MFI). Metoda se jeví pro detekci zmíněného proteinu jako méně citlivá.

Exprese proteinu p21 u lymfomů je stále velmi nejasná a jsou třeba další studie, které by přispěly k lepšímu pochopení patogeneze.

5.4 Protein p27

Protein p27 je inhibitorem cdk, který reguluje přechod z G₁ do S-fáze buněčného cyklu. Jeho exprese je u různých typů nádorů odlišná. V nenádorových tkáních a ve většině nádorů je mezi p27 a proliferačním indexem nepřímo úměrný vztah (ERLANSON et al. 1998, SANCHEZ-BEATO et al. 1999, CHIARLE et al. 2002, QI et al. 2006). Hromadí

se v klidových buňkách a při odpovědi na mitogenní stimulaci jeho hladina klesá (XIONG et al. 1993, KATO et al. 1994, TOYOSHIMA a HUNTER 1994).

V korelaci s literárními údaji jsem zjistila u nízkce maligních lymfomů velmi vysokou expresi proteinu p27 při nízkém proliferačním indexu, oproti vysoce maligním lymfomům s nízkou hladinou p27 a vysokou proliferační aktivitou a to jak metodou WB, tak cytometricky (ERLANSON et al. 1998, QUINTANILLA-MARTINEZ et al. 1998).

Nejvyšší hladinu p27 vykazovala B-CLL, pro kterou je typická velmi nízká proliferační aktivita, způsobená akumulací buněk v časně G₀/G₁-fázi buněčného cyklu (DIGHIERO et al. 1991, O`BRIEN et al. 1995). S tím souvisí i fakt, že vysoká hladina p27 u B-CLL je asociována se vzrůstající nádorovou populací a horší prognózou, protože nádorové buňky nemohou podlehnout apoptóze a kumulují se v organismu (VRHOVAC 1998).

U 4 pacientů s vysoce maligními lymfomy (3x DLBCL, BL) vyšetřených WB byla patrná úplná ztráta exprese proteinu p27. U 2 p27 negativních pacientů s DLBCL (1 p53+ a 1 p53-) jsem navíc prokázala 90 % hyperploidních buněk s vysokou proliferační aktivitou. To nasvědčuje horší prognóze a progresi onemocnění.

Výjimku tvoří středně maligní lymfomy (MCL) s nízkou hladinou p27 a, v porovnání s high-grade lymfomy, nižší proliferační aktivitou (QUINTANILLA-MARTINEZ et al. 1998, CHIARLE et al. 2002, QUINTANILLA-MARTINEZ et al. 2003). Protein p27 interaguje s typicky overexprimovaným cyklinem D1 a stabilizuje tak komplex cyklin D/cdk 4. Tím se zamezí vazbě p27 s komplexem cyklin E/cdk 2 a v konečném důsledku dojde k posunu do S-fáze (BOSCH et al. 1994, OTT et al. 1997, SHEAFF et al. 1997, CHIARLE et al. 2001, QUINTANILLA-MARTINEZ et al. 2003).

Zjistila jsem, že u high-grade lymfomů s nízkou expresí p27 častěji pozorujeme vyšší expresi molekuly p21 a naopak je tomu u low-grade lymfomů. Tato skutečnost může mít souvislost se způsobem aktivace inhibitorů. Exprese proteinu p27 je indukována např. TGF- β nebo kontaktní inhibicí a klesá po mitogenní stimulaci. Hladina p21 naopak po mitogenním stimulu stoupá a to může být příčina její vyšší exprese u high-grade lymfomů, které jsou aktivovány a prolifерují.

Prokazují, v souladu s literaturou, že protein p27 je vhodný prognostický marker. Ztráta exprese p27 se pojí s kratší dobou přežívání a horší prognózou (výjimku tvoří B-CLL, kde je tomu naopak) (VRHOVAC 1998, ERLANSON et al. 1998, LLOYD et al. 1999, SANCHEZ-BEATO et al. 2001)

Zdá se, že role p27 v regulaci buněčného cyklu je klíčová. Objevení molekulárních mechanismů regulace exprese proteinu p27 by mohlo vést k zlepšení terapie nádorových onemocnění (NICKELEIT et al. 2007).

5.5 Protein p53

Hladina proteinu p53 je v nenádorových buňkách nízká a zvyšuje se v závislosti na míře poškození DNA. Zvyšující se hladina p53 má vliv na zastavení buněčného cyklu v G₁ a G₂-fázi.

Gen TP53 bývá v nádorech často mutován, což může způsobit stabilizaci proteinu p53. Ke stabilizaci však nemusí docházet pouze mutací genu TP53 - může být navozena řadou fosforylací proteinu, které způsobují špatnou vazbu na p53-degradující proteiny a tím znemožňují (či zpomalují) jeho odbourání (FUCHS et al. 1998, BENNETT 1999, HAUPT et al. 1999, BULLOCK a FERSHT 2001). Na rozdíl od funkčního wt p53, který je v buňce během několika minut rychle degradován, mutovaná (či stabilizovaná) forma p53 má tendenci akumulovat se v jádře a protein se tak stává detekovatelný imunologickými metodami (VILLUENDAS et al. 1993, MAESTRO et al. 1995).

Z 61 pacientů vyšetřených WB jsem u 8 detekovala protein p53 (4x DLBCL, BL, FL high, MCL, B-CLL). U 2 pacientů (DLBCL a B-CLL) jsem zjistila vysokou expresi p53 a to jak metodou WB, tak cytometricky. Pacient s DLBCL byl p21-, p27-, s aneuploidní DNA (92 % buněk hyperploidních) a s velmi vysokou proliferační frakcí (MFI CD71 - 74,5; PI - 38,38). Data nasvědčují pro mutaci genu TP53 a naznačují velmi agresivní chování nádorové populace, což je v korelaci s klinickými údaji. Pacient s B-CLL byl velmi slabě p21+, silně p27+, s diploidní DNA a s nízkou proliferací. V tomto případě je mutace v genu pro p53 méně pravděpodobná. Přesto je třeba brát silnou expresi p53 v úvahu, protože u B-CLL může souviset s transformací do high-grade lymfomu (Richterův syndrom) (BANNERJI a BYRD 2000). Transformace v době diagnózy prokázána nebyla.

S expresí p53 jsem porovnala hodnocení ploidií. U 4 p53 pozitivních pacientů (data ploidie dostupná u 5 pacientů) jsem zjistila aneuploidní DNA (2x tetraploidní, 2x hyperploidní). U pacienta s MCL, s expresí p53 hodnocenou jako 2+, jsem prokázala 59 % tetraploidních buněk. Na spojitost mezi tetraploidií a overexpresí p53 u MCL poukazuje i OTT et al. 1998, který zvažoval možnou souvislost tetraploidie s overexpresí cyklinu D1 u MCL. Moje výsledky naznačují souvislost exprese p53 s chromozomálními aberacemi a poukazují na horší prognózu.

Expresí proteinu p53 stanovená metodou WB korelovala v 97,3 % s průtokovou cytometrií a v 91,5 % s IHC. U většiny pacientů jsem nedetekovala overexpresi p53 metodou WB ani průtokovou cytometrií. Overexpresi proteinu p53 jsem prokázala hlavně u high-grade B-NHL, což je v korelaci s literárními údaji (SIDRANSKY a HOLLSTEIN 1996, CHIARLE et al. 2000). Overexprese proteinu p53 je spojována s narušením regulace buněčného cyklu a má za následek i rezistenci na radio- a chemoterapii (LOWE et al. 1994, RUSCH et al. 1995).

Průkaz overexprese p53 je vhodným prognostickým znakem, který lze dobře sledovat jak metodou WB, tak i průtokovou cytometrií.

6 Souhrn

Cílem mé diplomové práce bylo zavedení vyšetřování proteinů buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie a western blotu a nalezení vztahu mezi expresí vyšetřovaných proteinů a příslušnou diagnózou B-NHL.

Zavedla jsem cytometrické vyšetřování proliferační aktivity buněk prostřednictvím MFI CD71 a určení obsahu DNA, včetně průkazu ploidie DNA. Z diagnostického hlediska jsem zavedla cytometrické a WB stanovení exprese cyklinu D1, jehož overexprese způsobená translokací t(11;14) je charakteristická pro MCL. Neméně důležité jsou inhibitory buněčného cyklu p21 a p27, které jsem začala vyšetřovat rovněž oběma metodami. V neposlední řadě jsem zavedla cytometrickou a WB detekci proteinu p53 - regulátoru buněčného cyklu, jehož mutace a overexprese je často spojována se vznikem nádorového onemocnění a horší prognózou.

Prokázala jsem vysokou proliferační aktivitu u high-grade lymfomů (BL, DLBCL, FL high), nižší u intermediate lymfomů (MCL) a nejnižší u low-grade lymfomů (B-CLL, MALT, FL low). Sledované znaky MFI CD71 a PI byly ve vzájemné korelaci a data byla vysoce statisticky signifikantní. Ve srovnání s imunohistochemicky stanoveným Ki-67 byly tyto proliferační znaky statisticky významnější a určení proliferační aktivity tímto způsobem může být přesnější. Prokázala jsem, že obě metody jsou vhodné pro cytometrické odlišení B-NHL s obdobným imunofenotypem a různým stupněm malignity (odlišení FL low od BL, DLBCL, FL high), které se výrazně liší způsobem terapie.

Overexpresi cyklinu D1 jsem detekovala ve 100 % MCL. Ostatní non-MCL lymfomy byly cyklin D1 negativní, s výjimkou 2 velmi slabě, ve srovnání s MCL zanedbatelně, pozitivních případů. Získaná data jsou velmi vysoce statisticky významná a ukazují, že průkaz overexprese cyklinu D1 potvrzuje diagnózu i bez molekulárního vyšetření translokace t(11;14).

Analýza inhibitorů cdk ukázala především význam detekce proteinu p27, který je exprimován v buňkách v klidové fázi. Zjistila jsem nepřímou úměru mezi p27 a proliferací buněk. U high-grade lymfomů jsem ukázala nízkou expresi proteinu p27 s vysokou proliferační aktivitou a naopak tomu bylo u low-grade lymfomů. Výjimku tvořily MCL s nízkou expresí p27, bez výrazné proliferace, způsobenou vyvázáním funkčního proteinu p27 cyklinem D1. Ukazují, že kromě odlišení low-grade a high-grade B-NHL, je možné protein p27, který je typicky overexprimován u B-CLL, použít i pro její odlišení od jiných B-NHL s obdobným imunofenotypem. Získaná data jsou velmi vysoce statisticky signifikantní.

U proteinu p21 nebyla data statisticky signifikantní, ale zvyšující se hladiny tohoto inhibitoru byly detekovány spíše u agresivnějších B-NHL.

Overexpresi proteinu p53 jsem zjistila převážně u agresivních lymfomů. Většinou byla doprovázena dalšími prognosticky horšími znaky, jako je aneuploidie, silná proliferace buněk, nízká exprese p27 i horší klinický průběh.

Závěrem lze shrnout, že jsem splnila cíle své diplomové práce a vyšetřování znaků, kterými jsem se zabývala je přínosné jak pro diagnostiku, tak pro prognózu pacienta.

7 Seznam literatury

- Adam Z., Doubek M., Mayer J., Vorlíček J. (1998): REAL klasifikace maligních lymfoproliferativních onemocnění, jejich imunofenotypické znaky a klinická diagnostika. *Klinická onkologie* 11: 2-16.
- Ahmad N., Feyes D. K., Agarwal R., Mukhtar H. (1998): Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6977-6982.
- Ahrendt S. A., Halachmi S., Chow J. T., Wu L., Halachmi N., Yang S. C., Wehage S., Jen J., Sidransky D. (1999): Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7382-7387.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie*. Nakladatelství Espedo publishing. Překlad z anglického originálu *Essential Cell Biology*: 547-589.
- Ando T., Kawabe T., Ohara H., Ducommun B., Itoh M., Okamoto T. (2001): Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem* 276: 42971-42977.
- Arellano M., Moreno S. (1997): Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 559-573.
- Bai M., Tsanou E., Skyrilas A., Sainis I., Agnantis N., Kanavaros P. (2007): Alterations of the p53, Rb and p27 tumor suppressor pathways in diffuse large B-cell lymphomas. *Anticancer Res* 27: 2345-2352.
- Baldin V, Lukas J., Marcote M. J., Pagano M., Draetta G. (1993): Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7: 812-821.
- Ball K. L., Lane D. P. (1996): Human and plant proliferating-cell nuclear antigen have a highly conserved binding site for the p53-inducible gene product p21. *Eur J Biochem* 237: 854-861.
- Ball K. L., Lane S., Fahraeus R., Smythe C., Lane D. P. (1997): Cell cycle arrest and inhibition on Cdk 4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21^{WAF1}. *Curr Biol* 7: 71-80.
- Bannerji R., Byrd J.C. (2000): Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Op Oncol* 12: 22-29.
- Baretton G. B., Klenk U., Diebold J., Schmeller N., Lohrs U. (1999): Proliferation- and apoptosis- associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer* 80: 546-555.
- Bennett M. R. (1999): Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 58: 1089-1095.
- Blum K. A., Lozanski G, Byrd J. C. (2004): Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104: 3009-3020.

Böcking A., Chatelain R., Auffermann W., Krüger G. R. F., Asmus B., Wohltmann D., Schuster C. (1986): DNA-grading of malignant lymphomas. I. Prognostic significance, reproducibility and comparison with other classifications. *Anticancer Res* 6: 1205-1216.

Bosch F., Jares P., Campo E., Lopez-Guillermo A., Piris M. A., Villamor N., Tassies D., Jaffe E. S., Montserrat E., Rozman C., et al. (1994): PRAD1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 84: 2726-2732.

Brito-Babapulle V., Ellis J., Matutes E., Oscier D., Khokhar T., MacLennan K., Catovsky D. (1992): Translocation t(11;14)(q13;q32) in chronic lymphoid disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 158-165.

Bruno S., Darzynkiewicz Z. (1992): Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 25: 31-40.

Bullock A. N., Fersht A. R. (2001): Rescuing the function of mutant p53. *Nature Rev Cancer* 1: 68-76.

Burma S., Kurimasa A., Xie G., Taya Y., Araki R., Abe M., Crissman H. A., Ouyang H., Li G. C., Chen D. J. (1999): DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem* 274: 17139-17143

Campo E., Raffeld M., Jaffe E. S. (1999): Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 36: 115-127.

Carnero A., Hannon G. J. (1998): The INK4 family of CDK inhibitors. See Ref 119: 43-51.

Catovsky D., Matutes E. (1999): Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes / splenic marginal-zone lymphoma. *Semin Hematol* 36: 148-154.

Cesarman E., Inghirami G., Chadburn A., Knowles D. M. (1993): High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 143: 845-56.

Clinelli M., Magnelli L., Chiarugi V. (1998): Redundant down-regulation pathways for p53. *Pharmacol Res* 37: 83-85.

Clurman B. E., Roberts J. M. (1995): Cell cycle and cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 87: 1499-1501.

Coignet L. J., Schuurin E., Kibbelaar R. E., Raap T. K., Kleiverda K. K., Bertheas M. F., Wiegant J., Beverstock G., Kluin P. M. (1996): Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood* 87: 1512-1519.

Danova M., Riccardi A., Giodano M., Girino M., Mazzini G., Dezza L., Ascari E. (1988): Cell cycle-related proteins: a flow cytofluorometric study in human tumors. *Biol Cell* 64: 23-28.

de Boer C. J., van Krieken J. H., Schuurin E., Kluin P. M. (1997): Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol* 8 (Suppl 2): 109-117.

- Diehl A., Cheng M., Rousel M. F., Sherr C. J. (1998): Glycogen synthase kinase-3 regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499-3511.
- Dielbold J., Audouin J., Molina T. (1997): Classification of malignant lymphomas: the updated Kiel classification. *Haematologia* 28: 155-167.
- Dighiero G., Tavade P., Chevret S., Fenaux P., Chastang C., Binet J. L. (1991): B-cell chronic lymphocytic leukemia: Present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood* 78: 1901-1914.
- Dogan A., Isaacson P. G. (2003): Splenic marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 20: 95-103.
- El-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.
- Erlanson M., Portin C., Linderholm B., Lindh J., Roos G., Landberg G. (1998): Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92: 770-777.
- Firpo E. J., Koff A., Solomon M. J., Roberts J. M. (1994): Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin-2 induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 14: 4889-4901.
- Flores-Rozas H., Kelman Z., Dean F. B., Pan Z. Q., Harper J. W., Elledge S. J., O'Donnell M., Hurwitz J. (1994): Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8655-8659.
- Ford I. M., Ford Ch. J. (1997): *Molecular biology of cancer*. BIOS scientific publishers limited. Oxford
- Fuchs S. Y., Adler V., Pincus M. R., Ronai Z. (1998): MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10541-10546.
- Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H. H., Schwab U., Stein H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715.
- Girard F., Strausfeld U., Fernandez A., Lamb N. J. C. (1991): Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67: 1169-1179.
- Glotzer M., Murray A. W., Kirschner M. W. (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138.
- Goding J. W., Burns G. F. (1981): Monoclonal antibody OKT-9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 127: 1256-1258.
- Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., Harris C. C. (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878.
- Grogan T. M. (1996): New classification of low-grade lymphoma. *Annals of Oncology* 7 (Suppl. 6): S3-S12.

- Hallek M., Stahel R. A., Greil R. (2005): ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Oncology* 16 (Suppl. 1): i50-i51.
- Harper J. W., Adami G. R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S. J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Diebold J., Flandrin G., Muller-Hermelink H. K., Vardiman J. (2000): Lymphoma classification – from controversy to consensus. The R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms. *Annals of Oncology* 11 (Suppl.1): 3-10.
- Harris C. C., Hollstein M. (1993): Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329: 1318–1327.
- Harris N. L., Isaacson P. G. (1999): What are the criteria for distinguishing MALT lymphoma from non-MALT lymphoma at extranodal sites? *Am J Clin Pathol* 111 (Suppl.1): 126-132.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Diebold J., Flandrin G., Flandrin G., Muller-Hermelink H. K., Vardiman J., Lister T. A., Bloomfield C. D. (1999): The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissue. *Annals of Oncology* 10: 1419-1432.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Stein H., Banks P. M., Chan J. K., Cleary M. L., Delsol G, De Wolf-Peeters C., Falini B., Gatter K. C. et al. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms. A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361-1392.
- Haskovec C., Polak J., Ullmannova V., Hradcova M., Stockbauer P. (2003): Expression of cyclin D1 negatively correlates with growth properties of leucemic cells. 8th Annual Congress of the European Hematology Association – Lyon: 41
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M (1999): MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299.
- Higashiyama M., Doi O., Kodama K., Yokouchi H., Kasugai T., Ishiguro S., Takami K., Nakayama T., Nishisho I. (1997): MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer* 75: 1302-1308.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C. (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
- Chan J. K. C., Blank P., Cleary M. C., Delsol G., De Wolf-Peeters C., Falini B., Gatter K. C., Grogan T. M., Harris N. L., Isaacson P. G. et al. (1995): A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms Proposed by the International Lymphoma Study Group. A Summary Version. *Amer J Clin Pathology* 103: 543-560.
- Chellappan S. P., Giordano A., Fisher P. B. (1998): Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 57-103.

- Chen J., Jackson P. K., Kirschner M. W., Dutta A. (1995): Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374: 386-388.
- Chiarle R., Budel L. M., Skolnik J, Frizzera G., Chilosi M., Corato A., Pizzolo G., Magidson J., Montagnoli A., Pagano M., Maes B., Wolf-Peeters C, Inhirami G. (2000): Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 95: 619-626.
- Chiarle R., Fan Y., Piva R., Boggino H., Skolnik J., Novero D., Palestro G., Peeters Ch. D. W., Chilosi M., Pagano M., Inhirami G. (2002): S-Phase kinase-associated protein 2 expression in NHL lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S-phase. *American Journal of Patology* 160: 1457-1465.
- Chiarle R., Pagano M., Inghirami G. (2001): The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. *Brest Cancer Res* 3: 91-94.
- Cho Y., Gorina S., Jeffre P. D., Pavletich N. P. (1994): Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355.
- Isaacson P. G. (1996): Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 88: 751-752
- Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. W. (2001): WHO classification of tumours; Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissue. IARC Press . Lyon: 135-174.
- James M. C., Peters G. (2000): Alternative product of the p16/CDKN2A locus connects the Rb and p53 tumor suppressors. *Prog Cell Cycle Res* 4: 71-81.
- Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P. (1995): Mechanism of CDK activation revealed by the structure of cyclin A - CDK2 complex. *Nature* 376: 313-320.
- Jennings C. D., Foon A. K.(1997): Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90: 2863-2892.
- Joensuu H., Klemi P. J., Soderstrom K. O., Jalkanen S. (1991): Comparison of S-phase fraction, working formulation, and Kiel classification in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 68:1564-1571.
- Kaplan D., Mayerson H, Husel W., Lewandowska K., MacLennan G. (2005): D cyclins in lymphocytes. *Cytometry Part A* 63A: 1-9.
- Kastan M. B., Onyerkwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R. W. (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 53: 6304-6311.
- Kato J. Y., Matsuoka M., Polyak K., Massague J., Sherr C. J. (1994): Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79: 487-496.
- King R. W., Jackson P. K., Kirschner M. W. (1994): Mitosis in transition. *Cell* 79: 563-571.

- Koster A., Tromp H. A., Raemaekers J. M., Borm G. F., Hebeda K., Mackenzie M. A., van Krieken J. H. (2007): The prognostic significance of the intra-follicular tumor cell proliferative rate in follicular lymphoma. *Haematologica* 92: 184-190.
- Kozák T. (2005): Rituximab v léčbě agresivních ne Hodgkinských lymfomů. *Medical Tribune* 9: 5.
- Lammie G. A., Peters G. (1991): Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells* 3: 413-420.
- Lane D. P., Crawford L. V. (1979): T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
- Lew D. J., Kornbluth S. (1996): Regulatory roles of cyclin-dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 8: 795-804.
- Limpens J., Jong G., Krieken J., Price C. G., Young B. D., Ommen G., Kluin P. M. (1991): Bcl2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6: 2271-2276.
- Linzer D. I. H., Levine A. J. (1979): Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Litzman J., Petřek M., Thon V. (1998): Vyšetřovací metody v klinické imunologii. *Masarykova univerzita v Brně*: 6, 7, 22-24.
- Liu Z., Dong H. Y., Gorczyca W., Tsang P., Cohen P., Stephenson C. F., Berger C. S., Wu C. D., Weisberger J. (2002): CD5- mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 118: 216-224.
- Lloyd R. V., Erickson L. A., Jin L., Kulig E., Qian X., Cheville J. C., Scheithauer B. W. (1999): p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154: 313-23.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser Ch. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S.L., Darnell J. (2004): *Molecular cell biology*. Freeman. 5. vydání: 853-896.
- Lorand-Metze I., Pereira F. G., Costa F. P., Metzke K. (2004). Proliferation in non-Hodgkin's lymphomas and its prognostic value related to staging parameters. *Cell Oncol* 26: 63-71.
- Lowe S. W., Bodis S., McClatchey A., Remington L., Ruley H. E., Fisher D. E., Housman D. E., Jacks T. (1994): p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266: 807-810.
- Luo Y., Hurwitz J., Massague J. (1995): Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375: 159-61.
- Maestro R., Glohini A., Doglioni C., Gasparotto D., Vukosavljevic T., De Re V., Laurino L., Carbone A., Boiocchi M. (1995): MDM2 overexpression does not account for stabilization of wild-type p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 85: 3239-3246.

- Maestro R., Gloghini A., Doglioni C., Piccin S., Vukosavljevic T., Gasparotto D, Carbone A., Boiocchi M. (1997): Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild – tipe form of p53 which is a functional transcriptional activator of the cyclin – dependent kinase inhibitor p21. *Blood* 89: 2523-2528.
- Maki C. G., Howley P. M. (1997): Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* 17: 355-363.
- Matsushime H., Quelle D., Shurtleff S., Shibuya M., Sherr C., Kato J. (1994): D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14: 2066-2076.
- Michieli P., Chedid M., Lin D., Pierce J. H., Mercer W. E., Givol D. (1994): Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 54: 3391-3395.
- Monaghan S. A., Peterson L. C., James C., Marszalek L., Khoong A., Bachta D. J., Karpus W. J., Goolsby C. L. (2003): Pan B-cell markers are not redundant in analysis of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cytometry B Clin Cytom* 56: 30-42.
- Morgan S. E., Kastan M. B. (1997): p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res* 71: 1-25.
- Nasir L., Rutteman G. R., Reid S. W., Schulze C., Argyle D. J. (2001): Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. *Cancer Lett* 174: 83-89.
- Nemes J. A., Nemes Z., Márton I. J. (2005): p21WAF1/CIP expression is marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 34: 274-279.
- Newman R., Schneider C., Sutherland R., Vodinelich L., Greaves M. (1982): The transferrin receptor. *Trends Biochem Sci* 1: 397-400.
- Nickeleit I., Zender S., Kossatz U., Malek N. P. (2007): p27kip1: a target for tumor therapies? *Cell Div* 2: 13.
- Niculescu A. B., Chen X., Smeets M., Hengst L., Prives C., Reed S. I. (1998): Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18: 629-643.
- Nigg E. A. (1995): Cyclin-dependent protein kinases - key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17: 471-480.
- Nurse P. (1997): Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer* 7: 1002-1004.
- O'Brien S., del Giolo A., Keating M. (1995): Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 85: 307-318.
- Ogryzko V. V., Wong P., Howard B. H. (1997): WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17: 4877-4882.
- Ohtsubo M., Theodoras A. M., Schumacher J., Roberts J. M., Pagano M. (1995): Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15: 2612-2624.

- Omary M. B., Trowbridge I. S., Minowada J. (1980): Human cell surface glycoprotein with unusual properties. *Nature* 286: 888-891.
- Osman I., Drobnjak M., Fazzari M., Ferrara J., Sher H. I., Condor-Cardo C. (1999): Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact of tumor progression. *Clin Cancer Res* 5: 2082-2088.
- Ott M. M., Bartkova J., Bartek J., Dürr A., Fisher L., Ott G., Muller-Hermelink H. K., Kreipe H. (1997): Cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity. *Blood* 8: 3154-3159.
- Papajík T. (2004): Nehodgkinské lymfomy. *Vesmír* 83: 377-380.
- Paulovich A. G., Hartwell L. H. (1995): A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 82: 841-847.
- Polak J., Hradcova M., Schwarz J., Klamova H, Stockbauer P., Kozak T., Müller J., Haskovec C. (2005): Expression of cyclins D1, D2 and D3 and Ki-67 in human leukemia. *Leuk Lymphoma* 46: 1605-1612.
- Polak J., Nadvornikova S., Klamova H., Haskovec C., Moravcova J. (2003a): Changes in expression of cyclins D1 and A1 and inhibitor of cyclin dependent kinase p21 CIP signalise progression of CML. 8th Annual Congress of the European Hematology Association – Lyon: 177
- Polak J., Pekova S., Schwarz J., Kozak T., Haskovec C. (2003b): Expresie inhibitorů cyklin-dependentních kináz u leukémií. *Čas Lék čes* 142: 25-28.
- Polyak K., Kato J. Y., Solomon M. J., Sherr C. J., Massague J., Roberts J. M., Koff A. (1994): p27 kip1, a cyclin-Cdk inhibitor links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8: 9–22.
- Ponce-Castaneda M. V., Lee M. H., Latres E., Polyak K., Lacombe L., Montgomery K., Mathew S., Krauter K., Sheinfeld J., Massague J., Cordon-Cardo C. (1995): p27kip1 chromosomal mapping to 12p 12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 55: 1211-1214.
- Prives C. (1998): Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95: 5-8.
- Qi C. F., Xiang S., Shin M. S., Hao X., Lee C. H., Zhou J. X., Torrey T. A., Hartley J. W., Fredrickson T. N., Morse III. H. C. (2006): Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and its deregulation in mouse B cell lymphomas. *Leuk Res* 30: 153-163.
- Quintanilla-Martinez L., Davies-Hill T., Fend F., Calzada-Wack J., Sorbada L., Campo E, Jaffe E. S., Raffeld M. (2003): Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphomas (MCL): implication for pathogenesis. *Blood* 101: 3181-3187.
- Quintanilla-Martinez L., Thieblemont C., Fend F., Kumar S., Pinyol M., Campo E, Jaffe E. S., Raffeld M. (1998): Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Am J Pathol* 153: 175-182.

- Rehn S., Glimelius B., Strang P., Sundström C., Tribukait B. (1990): Prognostic significance of flow cytometry studies in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 8:1-12.
- Rechsteiner M., Rogers S. W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271.
- Reisman D., Loging W. T. (1998): Transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Semin Cancer Biology* 8: 317-324.
- Rejthar A., Vojtěšek B. (2002): *Obecná patologie nádorového růstu*. Grada: 176-182.
- Rusch V., Klimstra D., Venkatraman E., Oliver J., Martini N., Gralla R., Kris M., Dmitrovsky E. (1995): Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 55: 5038–5042.
- Saito S., Goodarzi A. A., Higashimoto Y., Noda Y., Lees-Miller S. P., Appella E., Anderson C. W. (2002): ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 277: 12491-12494.
- Sanchez-Beato M., Camacho F. I., Martinez-Montero J. C., Saez A. I., Villuendas R., Sanchez-Verde L., Garcia J. F., Piris M. A. (1999): Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* 94: 765-772.
- Sanchez-Beato M., Saez A. I., Navas I. C., Algara P., Mateo M. S., Villuendas R., Camacho F. I., Sanchez-Aguilera A., Sanchez E., Piris M. A. (2001): Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. *Am J Pathol* 159: 205-213.
- Shapiro H. M. (1988): *Practical Flow Cytometry*. Alan R. Liss, Inc. New York : Citováno podle: Eckschlager T. a kolektiv (1999): *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Grada. Praha. 7-38.
- Sheaff R. J., Groudine M., Gordon M., Roberts J. M., Clurman B. E. (1997): Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11: 1464-1478.
- Sherr C. J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551- 555.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* 9: 1149-1163.
- Shih Y. J., Baynes R. D., Hudson B. G., Flowers C. H., Skikne B. S., Cook J. D. (1990): Serum Transferrin Receptor Is a Truncated Form of Tissue Receptor. *J Biol Chem* 265: 19077-19081.
- Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M. H. G., Key G., Flad H. D., Gerdes J. (1993): The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cycle-maintaining Proteins. *J Cell Biol* 123: 513-522.
- Sidransky D., Hollstein M. (1996): Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 47: 285–301.

Šiftancová J. (2005): Studium buněčného cyklu u maligních lymfomů řady B. Seminární práce.

Slingerland J., Pagano M. (2000): Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183:10-17.

Soverini S., Cavo M., Cellini C., Terragna C., Zamagni E., Ruggeri D., Testoni N., Tosi P., De Vivo A., Amabile M., Grafone T., Ottaviani E., Giannini B., Cangini D., Bonifazi F., Neri A., Fabris S., Tura S., Baccarani M., Martinelli G. (2003): Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 102: 1588-1594.

Stenger J. E., Mayr G. A., Mann K., Tegtmeyer P. (1992): Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol Carcinog* 5: 102-106.

Stetler-Stevenson M. and Braylan R. (2001): Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders, *Semin Hematol* 38: 111-123.

Stokke T., Smeland E. B., Kvaløy S., Holte H. (1998): Tumour cell proliferation, but not apoptosis, predicts survival in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 77: 1839-1841.

Suzuki R., Kuroda H., Komatsu H., Hosokawa Y., Kagami Y., Ogura M., Nakamura S., Kodaera Y., Morishima Y., Ueda R., Seto M. (1999): Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia* 13: 1335-1342.

Szczarkowski W., Davis B. H., Stone E., Waldum J. (1996): Mantle Cell Lymphoma. *Cytometry Forum* 9: 3.

Šmardová J. (2003): Vůdčí gen p53: Zpráva z konference. *Klinická onkologie* 16: 238-239.

Tazzari P. L., Bontadini A., Gobbi M., Tassi C., Dinota A., Visani G., Michieli M. G., Pileri S., Baccarani M., Tura S. (1990): Comparison of the DNA content, bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 antigen expression in human acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 3: 45-51.

Toyoshima H., Hunter T. (1994): p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67-74.

Uchimaru K., Taniguchi T., Yoshikawa M., Asano S., Arnold A., Fujita T., Motokura T. (1997): Detection of cyclin D1 (BCL1, PRAD1) overexpression by a simple competitive reverse transcription – polymerase chain reaction assay in t(11,14)(q13,q32) – bearing B-cell malignancies and/or mantle cell lymphoma. *Blood* 89: 965-974.

Vasef M. A., Medeiros L. J., Koo C., McCourty A., Brynes R. K. (1997): Cyclin D1 immunohistochemical staining is useful in distinguishing mantle cell lymphoma from other low-grade B-cell neoplasms in bone marrow. *Am J Clin Pathol* 108: 302-307.

Verheijen R., Kuijpers H. J. H., Schlingemann R. O., Boehmer A. L. M., van Driel R., Brakenhoff G. J., Ramaekers F. C. S. (1989): Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation-related antigen I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci* 92: 123-130.

Villuendas R, Pezzella F., Gatter K., Algara P., Sanchez-Beato M, Martinez P., Martinez J. C, Muñoz K., Garcia P., Sanchez L., Kocialkowsky S., Campo E., Orradre J. L, Piris M. A (1997): P21 WAF1/CIP1 and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21-immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J of Pathol* 181: 51-61.

Villuendas R, Piris M. A., Algara P., Sanchez-Beato M., Sanchez-Verde L., Martinez J. C., Orradre J. L., Garcia P., Lopez C., Martinez P. (1993): The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* 82: 3151-3156.

Vlach J., Hennrecke S., Amati B. (1997): Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *EMBO J* 16: 5334-5344.

Vrhovac R., Delmer A., Tang R., Marie J. P., Zittoun R., Ajchenbaum-Cymbalista F. (1998): Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 91: 4694-4700.

Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. (1994): The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369: 574-578.

Wu J. M., Borowitz M. J., Weir E. G. (2006): The usefulness of CD71 expression by flow cytometry for differentiating indolent from aggressive CD10+ B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 126: 39-46.

Xiong Y., Hannon G. J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704.

Yang Q., Manicone A., Coursen J. D., Linke S. P., Nagashima M., Forgues M., Wang X. W. (2000): Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. *J Biol Chem* 275: 36892-26898.

Publikace - sborníky

Mandáková P., Šiftancová J., Stránská E., Kortánková H., Campr V. : Upřesnění diagnostiky lymfomů z plášťových buněk cytometrickým stanovením overexpresu cyklinu D1. 9. seminář mladých patologů, 7.- 8.4 2006

Kamarádová K., Mandáková P., Šiftancová J., Kodet R., Kubáčková K. : Vyšetřování proliferativní aktivity u low-grade non-Hodgkinských B lymfomů pomocí průtokové cytometrie v korelaci s histologickým nálezem a klinickou manifestací. Sjezd slovenských a českých patologů. Mojmirovce, Slovensko, 6.-8.9 2006

Stránská E., Šiftancová J., Kortánková H., Campr V., Mandáková P. : Studium exprese cyklinu D1 v diagnostice lymfomu z plášťových buněk. Sjezd slovenských a českých patologů. Mojmirovce, Slovensko, 6.-8.9 2006

Stránská E., Šiftancová J., Kortánková H., Campr V., Mandáková P. : Flow cytometry analysis of cell cycle in non-Hodgkin's lymphomas. International Conference. Analytical Cytometry IV. Brno 23.-26.6 2007

Mandáková P., Kamarádová K., Kortánková H., Šiftancová J., Stránská E. : Discrimination of low-grade and high-grade CD10+ B-cell lymphomas by flow-cytometric assessment of CD71 and analyzing of cell cycle. International Conference. Analytical Cytometry IV. Brno 23.-26.6 2007

Kamarádová K., Mandáková P., Šiftancová J., Stránská E., Kortánková H., Forejtová V. : Discrimination of diffuse large B cell lymphoma and follicular lymphoma by flow cytometry using antigen CD71; correlation with morphology and immunohistochemistry. Sjezd slovenských a českých patologů. Rožnov pod Radhoštěm 29.-31.8 2007

Stránská E., Šiftancová J., Kortánková H., Mandáková P. : Usage of flow cytometry in the cell cycle analysis in non-Hodgkin's lymphomas; correlation with western blot analysis. Sjezd slovenských a českých patologů. Rožnov pod Radhoštěm 29.-31.8 2007

Mandáková P., Kamarádová K., Kortánková H., Šiftancová J., Stránská E., Campr V. : Proliferation markers in Zap70+ and Zap 70- B-cell chronic lymphocytic leukaemia. 21st European Congress of Pathology. Istanbul, Turkey 8.-13.9 2007