

APLIKACE DNA ČIPŮ U LYMFOIDNÍCH MALIGNIT

DNA MICROARRAYS IN LYMPHOID MALIGNANCIES

SWOBODA M.^{1,2}, VÁŠOVÁ I.^{2,3}, KOTAŠKOVÁ J.¹, MALČÍKOVÁ J.³, FABIÁN P.¹, TICHÝ B.³, BERKOVCOVÁ J.⁴, KLABUSAY M.^{2,3}, REJTHAR A.⁵

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

² LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

⁴ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLOMOUC

⁵ PATOLOGICKO ANATOMICKÝ ÚSTAV, FN U SV. ANNY, BRNO

Souhrn

Diagnostika hematologických malignit je v současnosti založena na morfologických kritériích, doplněných o analýzy několika molekulárních markerů. Uvnitř řady takto definovaných jednotek však pacienti vykazují heterogenní odpověď na aplikovanou léčbu a odlišný klinický vývoj onemocnění. Vystává tedy otázka, co je příčinou tohoto stavu? Selhávají stávající diagnostické metody nebo klasifikační systémy hematologických malignit? Zhoubné novotvary obecně představují chorobu genomu. Z tohoto důvodu je naděje vkládána do DNA čipů (DNA microarrays), neboť se jedná o zařízení schopné ve velmi krátkém čase paralelně detekovat a kvantifikovat expresi až desítky tisíc genů. DNA čipové analýzy nám umožňují globální pohled na genomovou expresi nádoru a identifikaci molekulárních markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci nádorového onemocnění, zejména se zřetelem na vývoj a efektivní použití cílené terapie. V případě lymfoidních malignit DNA čipy již přinesly několik významných objevů s jednoznačným klinickým dopadem. Jejich souhrn přinášíme v našem přehledovém článku.

Klíčová slova: lymfom, leukémie, DNA čipy, predikce a prognóza, cílená léčba.

Summary

The diagnosis of hematologic malignancies is currently based on morphology and analysis of a few of molecular markers of cancer cells. Responses to treatment and clinical outcomes of patients within these diagnostic categories are heterogenous. What is the reason of this situation? The inadequacy of existing diagnostic methods or diagnostic categories? Cancer is, in essence, a genetic disease. DNA microarrays represents a tool capable of both detecting and quantifying expression of tens of thousands genes (expression profiling) in a very short period of time. On this account DNA microarrays are used to identify new molecular markers important for diagnostic and classification of cancer and prediction of treatment outcome. The aim of this review article is to introduce to some fundamental discoveries provided by microarray technology in lymphoid malignancies.

Key words: lymphoma, leukemia, microarrays, prediction and prognosis, target therapy.

Diagnostika hematologických malignit je v současnosti založena na morfologických kritériích, doplněných o analýzy několika molekulárních markerů. Uvnitř řady takto definovaných jednotek pacienti vykazují heterogenní odpověď na aplikovanou léčbu a odlišný klinický vývoj onemocnění. Vystává tedy otázka, co je příčinou tohoto stavu? Selhávají stávající diagnostické metody nebo klasifikační systémy hematologických malignit? Obecně lze konstatovat, že zhoubné novotvary představují chorobu genomu, jehož patologické alterace (chromozomální aberace nebo genové mutace) vedou k maligní transformaci buňky a kumulace těchto změn ovlivňuje vývoj nádorového onemocnění. Relativně vysoký počet genů s primárně (onkogeny a supresorové geny), ale zejména se sekundárně pozměněnou expresí je možnou příčinou stavu, kdy na základě analýzy jednoho nebo několika z nich nelze vždy dosáhnout optimální diagnostické diskriminanty nebo prediktivního faktoru daného onemocnění. Z tohoto důvodu je naděje vkládána do DNA čipů (DNA microarrays), které představují zařízení schopné ve velmi krátkém čase paralelně detekovat a kvantifikovat expresi až desítky tisíc genů (stanovit profil genomové exprese) a nebo

identifikovat variabilitu genetického kódu. DNA čipové analýzy nám umožňují globální pohled na genomovou expresi nádoru a identifikaci molekulárních markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci nádorového onemocnění, zejména se zřetelem na vývoj a efektivní použití cílené terapie (1). V případě lymfoidních malignit DNA čipy již přinesly řadu významných objevů s jednoznačným klinickým dopadem. Jejich souhrn přinášíme v našem přehledovém článku.

1. DIFÚZNÍ VELKOBUNĚČNÝ LYMFOM Z B-LYMFOCYTŮ (DLBCL)

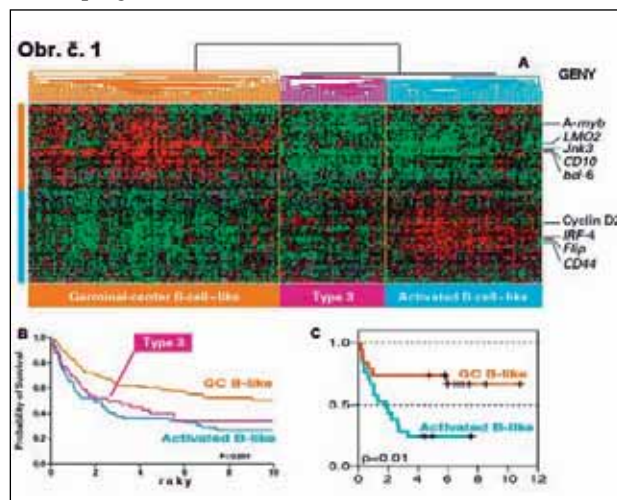
DLBCL má nejvyšší incidenci z celé skupiny ne Hodgkinských lymfomů (NHL). Jedná se o agresivní onemocnění, jehož potenciální kurabilita souvisí zejména se zavedením kombinované chemoterapie založené na antracyclinech, která vede k vyléčení přibližně 40% pacientů. Modifikace režimů chemoterapie, ať už v podobě intenzifikace nebo počtu cytostatik, nepřinesly přesvědčivé změny v léčebných výsledcích. Určitá naděje spočívá v biologické terapii monoklonálními protilátkami (2). Klinická heterogenita onemocnění proto vede ke snaze o identifikaci prognostických markerů. Jak se ukázalo

na začátku osmdesátých let, morfologická kritéria (definující např. imunoblastickou, centroblastickou, anaplastickou variantu DLBCL) nedosahovala přesvědčivého prognostického významu (3). S postupným rozvojem imunohistochemických a později zejména molekulárně genetických metod, bylo možné studovat expresi jednotlivých markerů na proteinové nebo genové úrovni. Ani s touto pomocí však nedošlo k nalezení silných prediktorů, neboť u řady z nich existovaly rozporuplné výsledky (např. CD10, CD44, BCL-6) (4,5,6). Tyto rozpaky se staly mnohem znatelnějšími ve světle pozitivních výsledků mezinárodního projektu „International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project“, založeného však na analýze běžně dostupných klinických parametrů a laboratorních vyšetření. Jeho závěry byly publikovány v roce 1993, a to v podobě prognostického indexu „IPI“ (International Prognostic Index) (7). Index IPI dosahoval mnohem vyšší prognostické síly než tradičně používaná klinická stádia, na druhou stranu nebylo možné přehlédnout, že mezi pacienty uvnitř jednotlivých prognostických skupin stále existovaly významné rozdíly ve vývoji choroby. S ohledem na podstatu nádorového onemocnění jsou v současnosti naděje vkládány zejména do komplexních analýz genové exprese pomocí technologie DNA čipů (1).

1.1. Molekulární taxonomie DLBCL

Jak již bylo uvedeno, subklasifikace DLBCL na základě morfologických kritérií neměla v klinickém vývoji onemocnění odpovídající korelát. Až použití DNA čipů vedlo k odhalení nových variant DLBCL, které se výrazně liší svým biologickým chováním. První práci na toto téma publikoval A. Alizadeh s kolektivem svých stanfordských spolupracovníků. Autoři pro tento účel použili DNA čipy vlastní produkce, tzv. lymfočipy, nesoucí na svém povrchu sondy pro více než 17 000 genů exprimovaných zejména v lymfocytech a v lymfatické tkáni. Získané hodnoty genové exprese byly podrobeny shlukové analýze, která na základě jejich podobnosti identifikovala dvě dosud nerozpoznané varianty DLBCL, označené jako: „Germinal Center B-cell like DLBCL“ (GCBC-like DLBCL; B-lymfocytům zárodečného centra podobný DLBCL) a „Activated B-cell like DLBCL“ (ABC-like DLBCL; aktivovaným B-lymfocytům podobný DLBCL). Názvy byly odvozeny z podobnosti profilů genové exprese obou variant s profily B-lymfocytů vycházejících buď ze zárodečného centra (GC-germinal center) lymfatického folikulu, nebo z antigenem aktivovaných a mitoticky aktivních B-lymfocytů periferní krve. Zajímavé zjištění nastalo po korelaci uvedené molekulární klasifikace DLBCL s klinickými údaji. Pacienti s GCBC-like DLBCL (21 případů) měli signifikantně lepší výsledky 5ti-letého přežití, než pacienti s ABC-like DLBCL (22 případů) (76% vs 16% pacientů, $p < 0,01$; obrázek č. 1C). Multivariabilní analýza potvrdila, že tato klasifikace je nezávislým prognostickým faktorem, schopným stratifikovat i pacienty se stejnou hodnotou indexu IPI (8). Stanfordská skupina ve svém výzkumu pokračovala a o dva roky později publikovala práci, která obsahovala výsledky analýzy souboru 240 pacientů s DLBCL. Zřejmě vyšší počet lymfomů způsobil, že mezi původně dvěma zřetelně odlišnými variantami byla nalezena varianta třetí, označená jednoduše „Type-3 DLBCL“ (třetí typ DLBCL). Všechny tři varianty DLBCL se lišily profilem genové exprese (obrázek č. 1A), i když v parametrech přežití přetrvávaly jednoznačné rozdíly jen mezi ABC-like a GCBC-like DLBCL (5-leté přežití ve skupině GCBC-like DLBCL 60% pacientů, ABC-like DLBCL 35%, Type-3 DLBCL 39%, obrázek č. 1B) (9). Uvedená molekulární klasifikace byla později transformována na proteinovou úroveň, kde je založena na imunohistochemické detekci (IHC) několika antigenů. GCBC-like DLBCL jsou od ABC-like DLBCL odlišeny nejčastěji na základě pozitivní exprese povrchového antigenu CD10 a/nebo proteinu BCL-6 a negativní exprese proteinu

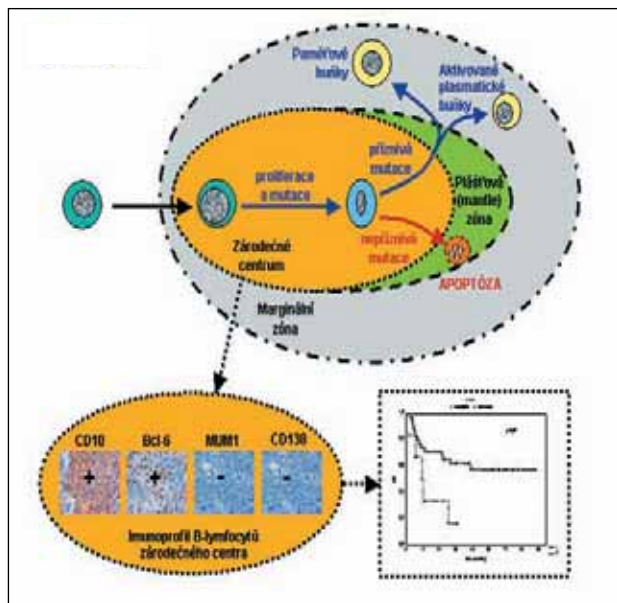
MUM1/IRF4 (multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4) a povrchového antigenu CD138 (10). I naše vlastní, dosud nepublikované, výsledky získané z hodnocení souboru 48 pacientů s DLBCL ukazují, že obě výše uvedené varianty DLBCL jsou identifikovatelné pomocí IHC a mají rozdílnou prognózu (obrázek č.2).



Obrázek č. 1: (A) Dendrogram shlukové analýzy, na kterém je patrné rozdělení DLBCL (sloupce) do tří skupin definovaných na základě podobnosti exprese vybrané skupiny genů (řádky): 1. Germinal Center B-cell like DLBCL; 2. Type-3 DLBCL; 3. Activated B-cell like DLBCL. Expresí genů je v dendrogramu kódována barevně. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném DLBCL. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. Na pravé straně dendrogramu jsou uvedeny geny s nejvyšší diskriminační hodnotou. Převzato a upraveno z ref. č. 9, podrobně viz. text. (B a C) Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití u pacientů s jednotlivými variantami DLBCL, kteří byli léčeni kombinovanou chemoterapií založenou na antracyclinech. Hodnoty na ose „x“ jsou uvedeny v letech. (B) převzato a upraveno z reference č. 9, podrobně viz. text. (C) převzato a upraveno z reference č. 8, podrobně viz. text. Jak ukazují křivky Type-3 DLBCL a Activated B-cell like DLBCL mají horší prognózu, než Germinal Center B-cell like DLBCL. Rovněž profil genové exprese vykazuje větší podobnost mezi Type-3 DLBCL a Activated B-cell like DLBCL.

DNA čipové analýzy přispěly rovněž k molekulární charakteristice dalších varianty DLBCL, a to primárně mediastinálního B-lymfocytárního lymfomu (mediastinal large B-cell lymphoma, MLBCL). MLBCL není histopatologickými metodami jednoznačně odlišitelný (11) a jeho diagnostika se proto opírá o korelaci klinických údajů s diagnózou DLBCL. Incidence MLBCL převažuje u mladších pacientů, častěji jsou to ženy (1,8:1), medián věku se nachází v rozmezí 30-35 let. Onemocnění typicky postihuje zejména mediastinum, ale může i „metastazovat“, nejčastěji do ledvin, CNS a jater (11,12). MLBCL je agresivní onemocnění, na druhou stranu relativně dobře odpovídá na primární léčbu. Některé studie prokázaly dosažení lepších léčebných výsledků než u klasického DLBCL, pakliže byla chemoterapie kombinována s radioterapií (3-leté přežití v 82% případů) (13). Jak jsme již uvedli, z morfologického pohledu není MLBCL od DLBCL jednoznačně odlišitelný. Obě varianty vykazují difúzní proliferaci velkých B-lymfocytů s bledou cytoplasmou a ani na úrovni jednotlivých molekulárních znaků není patrná výrazná diference. Jejich imunofenotyp sdílí přítomnost povrchových antigenů typických pro B-lymfocytární linii (CD19, CD20, CD22 a CD79a), ale na rozdíl od DLBCL, MLBCL postrádají imunoglobulinovou komponentu BCR receptoru a pouze vyjimečně nesou translokaci BCL-2 nebo BCL-6 genu. Naopak nadměrnou sklerotizaci potvrzuje zvýšená exprese genů extracelulární matrice ve vzorcích MLBCL, zejména fibronectinu a kolagenu typ III a IV (11,12). O buněčném původu MLBCL nebyl dosud učiněn definitivní závěr. Výsledky CGH (comparative genomic hybridization) a DNA

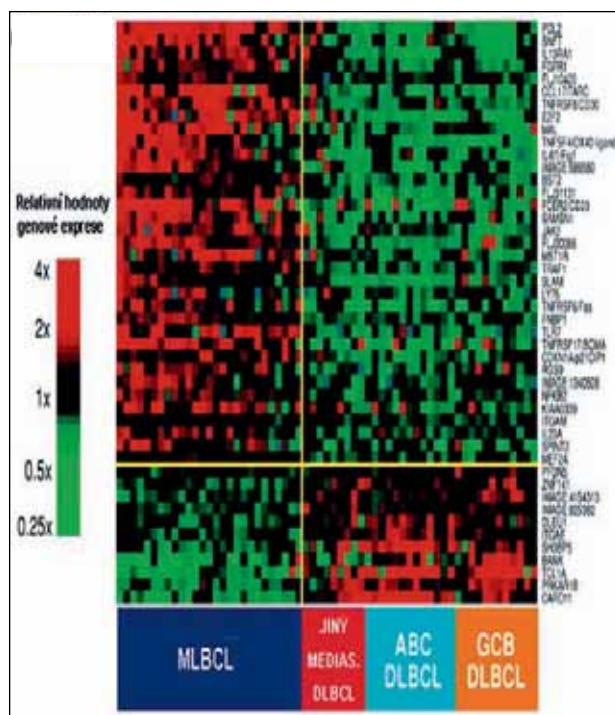
čipových analýz odhalily na úrovni genomu podobnost mezi MLBCL a klasickým Hodgkinovým lymfomem typu nodulární sklerózy (HL-NS). MLBCL a HL-NS sdílejí některé chromosomální a genové abnormality, například amplifikaci krátkého raménka chromosomu 9 (75% MLBCL) a 2 (20% MLBCL), které způsobují zvýšenou expresi genů JAK2, PDL2, PDL1 (9p24) a REL (2p16). Tyto změny jsou u DLBCL detekovány jen velmi zřídka, stejně jako zvýšená exprese proteinů CD30, MAL, STAT1, TRAF1, IL-13R α , CD58 a TARC. (11,12). Podobnost na molekulární úrovni zčásti potvrzují i kazuistiky z klinické praxe popisující pacienty s HL-NS, u kterých dochází do jednoho roku od ukončení léčby k relapsu choroby, která nese jednoznačné histopatologické charakteristiky DLBCL (14). Byly ale zaznamenány i opačné případy (12). Zajímavou práci na toto téma publikoval A. Rosenwald, který se svými spolupracovníky z NCI (National Cancer Institute, USA) analyzoval rozsáhlou skupinu 274 pacientů s DLBCL. Autoři identifikovali 46 genů, jejichž exprese byla statisticky signifikantně odlišná ($p < 0.001$) mezi MLBCL (46 pacientů) a DLBCL (obrázek č. 3). Iniciálně byla diagnóza MLBCL stanovena na základě klinických charakteristik, přičemž 76% těchto lymfomů mělo profil genové exprese charakterizující MLBCL (35 pacientů), 15% (7 pacientů) vykazovalo profil odpovídající GCBC-like DLBCL a 9% (4 pacienti) profil ABC-like DLBCL. Pacienti v poslední skupině měli značně nepříznivý vývoj choroby, zemřeli do 2 let od stanovení diagnózy. Pokud byli hodnoceni pouze pacienti s MLBCL definovaným na základě profilu genové exprese, pětiletého přežití dosáhlo 64% pacientů, ve srovnání se 46% DLBCL (11). Z klinického hlediska má dosud největší význam aberace chromosomu 2 vedoucí ke zvýšené expresi genu c-REL a k následné aktivaci signální dráhy NF- κ B, která je v případě MLBCL vhodným terčem k vývoji cílené terapie (15). V předcházející části textu jsme čerpali rovněž z výsledků práce Savage K. a kol. kteří studovali profil genové exprese na souboru 176 pacientů s DLBCL a 34 pacientů s MLBCL (12).



Obrázek č. 2.: Na podkladě profilu genové exprese je možné DLBCL rozdělit na dvě základní varianty: Germinal Center B-cell like DLBCL (GCBC-like DLBCL; B-lymfocytům zárodečného centra podobný DLBCL) a „Activated B-cell like DLBCL“ (ABC-like DLBCL; aktivovaným B-lymfocytům podobný DLBCL). Pro obě varianty DLBCL byl definován charakteristický fenotyp, který je identifikovatelný pomocí imunohistochemického vyšetření. Pro lymfocyty zárodečného centra je charakteristická pozitivní exprese CD10 a/nebo Bcl-6, a naopak negativní exprese MUM1 a CD138, jenž je typická pro antigenem stimulované mitoticky aktivní plasmatické lymfocyty. Jak ukazuje Kaplan-Meierova křivka GCBC-like DLBCL má příznivější prognózu. Podrobně viz. text.

1.2. Prognostické profily genové exprese DLBCL

Vedle vzniku molekulární taxonomie DLBCL, paralelně probíhá i snaha o identifikaci profilů genové exprese, které by sloužily pouze k prognostickým nebo k prediktivním účelům. V roce 2002 publikovala M. Shipp s kolektivem bostonských spolupracovníků práci, ve které analyzovali genovou expresi 58 DLBCL, pocházejících od pacientů léčených chemoterapií na bázi CHOP režimu. V tomto souboru dosáhlo kompletní remise a minimálně pětiletého přežití bez relapsu onemocnění (RFS) 32 pacientů. Zbývajících 23 pacientů zemřelo v důsledku progresu choroby a 3 pacienti měli opakovaný relaps onemocnění, i když zůstávali na živu. Autoři identifikovali profil složený ze 13 genů, jejichž expresi se lišily lymfomy vyléčených pacientů („cured“) od pacientů, kteří neúspěšně bojovali s chorobou („fatal/refractory“). V prvním případě dosáhlo pětiletého přežití 72% pacientů, ve druhém případě 12% ($p < 0.0001$) (16). K sedmi genům spjatých se špatnou prognózou patřily geny kódující PKC β II a PDE4B, jejichž negativní prognostický význam byl později ověřen i na proteinové úrovni (17,18).



Obrázek č. 3.: DNA čipové analýzy přispěly rovněž k molekulární charakteristice primárně mediastinálního B-lymfocytárního lymfomu (mediastinal large B-cell lymphoma, MLBCL). Diagnostický profil MLBCL tvoří 46 genů, jejichž exprese je v dendrogramech kódována barevně. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném DLBCL. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. Na základě podobnosti genové exprese uvedených 46 genů (řádky) je tedy možné odlišit MLBCL od jiných variant DLBCL (sloupce). Převzato a upraveno z reference č. 11. Podrobně viz. text.

Ve stejném roce publikoval A. Rosenwald 17ti-genový prognostický profil, který vznikl z analýzy DLBCL 240 pacientů léčených kombinovanou chemoterapií založenou na aplikaci antracyklinů (nejčastěji režim CHOP). Uvedených 17 genů bylo s ohledem na svou biologickou funkci rozděleno do 5 kategorií. Zvýšená exprese genů v prvních třech kategoriích byla spjata s dobrou prognózou onemocnění, naopak zvýšená exprese genů čtvrté a páté kategorie s prognózou nepříznivou. První kategorii tvořily geny charakteristické pro B-lymfocyty zárodečného centra (např. BCL-6), druhou kategorii geny mající vztah k MHC komplexu II. třídy (např. HLA-DP α), třetí kategorii geny kódující proteiny extracelulární matrice (např.

kolagen a fibronectin) nebo spjaté s jejich syntézou (např. CTGF). Čtvrtou kategorií představovaly geny regulující buněčnou proliferaci (např. c-myc). Do žádné z uvedených funkčních kategorií nebyl zařaditelný gen kódující BMP6 protein, který jako jediný vytvořil pátku kategorií (9). Pro jednotlivé případy DLBCL bylo na základě údajů o expresi uvedených 17 genů vypočteno skóre, které stratifikovalo pacienty do čtyř prognostických skupin. Mezitím co v první a ve druhé skupině dosahovalo 5ti-letého přežití 73% a 71% pacientů, ve zbývajících dvou skupinách 34% a 15% pacientů ($p < 0,001$). Další prognostický genový profil, tentokrát složený ze 6 genů, byl publikován I. Lossossem v roce 2004. Opět se jednalo o stanfordský tým autorů, kteří nikoliv DNA čipy, ale tentokrát pomocí multiplexové kvantitativní Real-Time PCR reakce validovali expresi 36 genů, jenž byly součástí již dříve publikovaných prognostických profilů nebo se z hlediska prognózy a predikce zkoumaly samostatně (8,9,16). Na základě korelace údajů o genové expresi a parametrů přežití bylo uvedených 36 genů seřazeno podle jejich prediktivní síly a ze získaného pořadí byly vybrány tři geny s nejvyšší dosaženou kladnou (LMO2, BCL-6, fibronectin) a zápornou hodnotou (cyklin D2, SCYA3, BCL-2). Vznikla sestava šesti genů, která se stala základem pro výpočet MP-skóre (mortality-predictor score), jehož hodnota rozdělila pacienty s DLBCL do tří prognostických skupin. Pacienti ve skupině s nízkým rizikem (20 pacientů) dosáhli pětiletého přežití v 65% případů, ve skupině se střední mírou rizika (18 pacientů) ve 49% a v poslední, vysoce rizikové skupině (20 pacientů), pouze v 15% případů ($p < 0,004$). V multivariabilní analýze prokázali autoři nezávislost MP-skóre na ostatních běžně užívaných klinicko-patologických parametrech, včetně indexu IPI (19). Svůj prognostický model navíc úspěšně verifikovali na dvou nezávislých souborech DLBCL, a to na souboru 58 lymfomů M. Shipp a 240 lymfomů A. Rosenwalda. Obě práce již byly popsány výše (9,16).

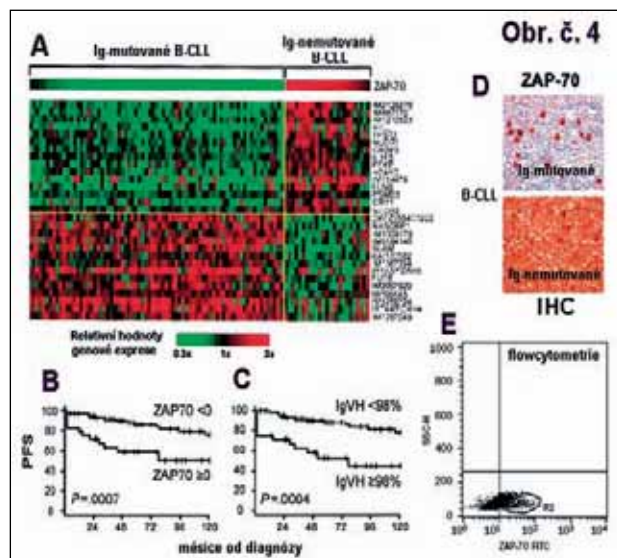
2. FOLIKULÁRNÍ LYMFOM (FL)

Folikulární lymfom se v incidenci NHL řadí na druhé místo. I přestože je obecně považován za indolentní onemocnění, klinický průběh jednotlivých případů je variabilní a může docházet k transformacím do agresivních lymfomů (2).

Velmi zajímavou preklinickou práci zabývající se výhradně folikulárním lymfomem publikoval Hervé Hussen. Pomocí DNA čipů analyzoval a následně porovnal profil genové exprese fyziologických B-lymfocytů vycházejících ze zárodečného centra a lymfocytů folikulárního lymfomu. Výsledkem analýzy byla identifikace 28 genů s nízkou a 37 genů s vysokou expresí v lymfocytech FL ve srovnání s fyziologickým protějškem. Nezávislá metoda (kvantitativní Real-Time PCR) potvrdila výsledek DNA čipů ve 32 případech z výše uvedeného počtu genů. Mezi 24 geny s vysokou expresí byly i dva geny, jejichž proteiny patří k významným negativním regulátorům buněčného cyklu: p21^{CIP1} a p16^{INK4a}. Tento náález koresponduje s přirozeným, indolentním, vývojem onemocnění. K nadměrně exprimovaným genům patřily ty, jejichž proteiny se účastní procesů mezibuněčných interakcí (TNF, IL2RG a IL4RA) nebo slouží jako transkripční faktory (PAX5 a ID-2). Naopak nízkou expresi u FL vykazovaly geny MRP8 a MRP14. Jejich proteiny hrají významnou roli v buněčné adhezi (20).

Prognostický profil genové exprese publikovalo několik autorů. Glass AM a kol. analyzovali párové vzorky FL získané v průběhu indolentní a agresivní fáze onemocnění u jednotlivých pacientů. Pomocí DNA čipů identifikovali profil genové exprese složený z 81 genů, který v kontrolním souboru s 94% přesností odlišil vzorky pocházející z indolentní, nebo z agresivní fáze choroby. Geny tohoto profilu bylo možné rozdělit do několika funkčních kategorií: a) regulátory buněčného cyklu (CCNE2, CCNA2, CDK2, CHEK1); b) regulátory DNA syntézy (TOP2A, PLOD3A, POLE2); c)

regulátory metabolismu (FRSB, RARS, LDHA); d) zástupci dalších signálních cest (PIK4CA a MAPK1) a e) geny jednoznačně související s tumor infiltrujícími T-lymfocyty a makrofágy (CD3D, CXCL12 a TM4SFA2). Kromě poslední kategorie, byly ostatní geny zvýšeně exprimovány v agresivní fázi FL (21).



Obrázek č. 4: (A) Dendrogram shlukové analýzy přehledně znázorňuje rozdíl v genové expresi dvou základních skupin B-CLL, které se liší mutačním stavem IgVH. Nejvyšší diskriminační hodnotu dosáhl gen pro protein ZAP-70 (1. řádek). Expresí genů (řádky) je v dendrogramu kódována barevně. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v dané B-CLL (sloupce). Kaplan-Meierovy křivky znázorňují časy do progresu choroby (PFS) u pacientů s B-CLL v závislosti na přítomnosti: (B) exprese genu ZAP-70 (počet molekul mRNA), nebo (C) mutace IgVH (gen pro IgVH byl v daném případě považován za mutovaný tehdy, sdílel-li se zárodečnou buněčnou linií v nukleotidové sekvenci méně než 98% homologii). (D) Imunohistochemický průkaz proteinu ZAP-70 ve skupině B-CLL s mutovaným, nebo nemutovaným IgVH. (A-D) převzato a upraveno z reference č. 42. (E) průkaz pozitivní exprese proteinu ZAP-70 pomocí flowcytometrické analýzy s fluorescenčně značenou monoklonální protilátkou u pacienta s B-CLL s nemutovaným IgVH. Převzato a upraveno z reference č. 44.

Vliv mikroprostředí na biologické chování nádoru studovali Dave S. a kol. na souboru 191 pacientů s FL. Výsledkem byly dva genové profily („Profil imunitní odpovědi 1“ a „Profil imunitní odpovědi 2“) záměrně složené z genů exprimovaných pouze v tumor infiltrujících buňkách (T-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky). „Profil imunitní odpovědi 1“ byl asociovaný s dobrou prognózou a obsahoval zejména geny charakteristické pro T-lymfocyty (CD7, CD8B1, ITK, LEF1) a makrofágy (ACTN1 a TNFSF13B), naopak „profil imunitní odpovědi 2“ obsahoval převážně geny zvýšeně exprimované v dendritických buňkách a/nebo v makrofázích (TLR5, FCGR1A, SEPT10, LGMN a C3AR1) a korespondoval se špatnou prognózou vývoje FL (22). O prognostickém významu tumor infiltrujících makrofágů (TIM) u pacientů s FL hovoří i Farinhova práce, ve které byly TIM detekovány imunohistochemicky na základě přítomnosti CD68 antigenu. Pacienti s vysokým počtem TIM dosahovali delšího celkového přežití než v opačném případě (< 15 TIM/high-power zorné pole). Multivariabilní analýza prokázala nezávislost tohoto parametru na indexu IPI (23). Z obecného pohledu není prognostický význam TIM jednoznačný. V případě solidních tumorů existují práce, které naopak potvrzují negativní prognostický význam TIM. Z tohoto rozporu je evidentní, že izolovaná detekce TIM nemusí mít jasnou výpovědní hodnotu. Není totiž vyloučeno, že existují jednotlivé subpopulace makrofágů, které se liší svou biologickou funkcí (podobně jako v případě T-lymfocytů). Na druhé straně může být biologická diverzita TIM indukovaná sekundárně, například T-lymfocyty nebo samot-

nými nádorovými buňkami, tzv. „parakrinní smyčka“ (24). Za zmínku stojí i práce, která se zabývala profilem genové exprese pacientů s FL s rozdílnou odpovědí na terapii monoklonální protilátkou proti CD20 receptoru (rituximab). Dosud bez podrobnější interpretace stojí zjištění autorů, že FL s nedostatečnou léčebnou odpovědí na rituximab měly profil genové exprese podobný více buňkám pocházejícím z fyziologické lymfatické tkáně krčních uzlin a sleziny, než skupině FL, která velmi dobře reagovala na cílenou imunoterapii (25).

3. LYMFOM PLÁŠTOVÉ ZÓNY / MANTLE CELL LYMPHOMA (MCL)

I v případě MCL je možné sledovat klinickou heterogenitu onemocnění. Ačkoliv medián celkového přežití dosahuje 3 až 4 let, existují mezi jednotlivými pacienty výrazné rozdíly. Na straně jedné stojí ti, kteří podlehnou progresi MCL do jednoho roku od stanovení diagnózy, na druhé straně jsou pacienti přežívající více než 10 let. Pro MCL je obecně charakteristická chromozomální aberace t(11;14)(q13;q32), jenž vede k nadměrné expresi cyklinu D1. Rozdíly v jeho kvantitě však nevysvětlují odlišnosti v klinickém průběhu jednotlivých případů MCL, i když existují ojedinělé práce, které prokazují negativní prognostický význam vysoké hladiny cyklinu D1 (26). Analýzou genové exprese MCL pomocí DNA čipů se mezi prvními zabývala Rosenwaldova práce. Soubor obsahoval 92 pacientů s MCL, jehož diagnóza byla stanovena na základě morfologických kritérií a přítomnosti vysoké hladiny cyklinu D1 (CCND1+). V úvodní fázi analýzy bylo identifikováno více než 1000 genů, jejichž exprese se MCL lišily od ostatních NHL. Diagnostický profil MCL nakonec utvořilo 42 genů, přičemž gen pro CCND1 byl záměrně vyřazen. Autoři testovali uvedený profil na kontrolním souboru NHL, kde dosáhl správné identifikace MCL v 98% případů (27).

Zajímavým zjištěním bylo, že sedm případů NHL s negativní expresí cyklinu D1 (CCND1-) bylo na podkladě uvedeného profilu klasifikováno jako CCND1+ MCL. U těchto lymfomů byla následně nalezena nadměrná exprese cyklinu D2 nebo D3 (27). Existenci CCND1- MCL s prokázanou expresí cyklinu D2 nebo D3 potvrdily i další práce, což naznačuje určitou „funkční zastupitelnost“ jednotlivých cyklinů D v případě patogeneze MCL (28). Rosenwaldova práce vedla rovněž k identifikaci prognostického genového profilu MCL, který obsahoval 48 genů ve významné vazbě k době celkového přežití ($p < 0,001$) (27).

Studiem prognosticky nepříznivé blastoidní varianty MCL (BV-BCL) se zabývala publikace de Vose a kol. Autoři identifikovali 118 genů, jejichž exprese se MCL a BV-MCL vzájemně odlišovaly. Ke skupině genů s vyšší expresí u BV-MCL patřily například: cyklin-dependentní kináza 4 (CDK4); onkogeny: c-myc, c-pim1 a c-pim2; inhibitory apoptózy: DAD1 a RSK1; a transkripční faktory: YY1 a CDC25B. V případě CDK4 a CDC25B přitom existuje přímá spojitost s CCND1. Vazba CDK4 a CDC25B na CCND1 umožňuje iniciaci přechodu přes kontrolní body buněčného cyklu G1/S a G2/M. Oba posledně jmenované geny byly autory označeny za potenciální kandidáty k cílené terapii, která by u BV-MCL mohla dosáhnout lepšího terapeutického úspěchu, než stávající cytostatická léčba (27,29).

4. CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKÉMIE Z B-LYMFOCYTŮ (B-CLL)

Další hematologickou malignitou, při jejímž studiu jsou s úspěchem využívány DNA čipy, je B-CLL. Onemocnění postihuje zejména jedince nad 50 let věku a s incidencí 3:100 000 patří k nejrozšířenějším typům leukémie (pozn. WHO klasifikace řadí B-CLL k hematologickým malignitám vycházejícím ze zralých forem B-lymfocytů, tedy do stejné skupiny, jako NHL) (30,31). V histopatologickém obraze je pro B-CLL charakteristická akumulace zralých monomorfních monoklonálních B-lymfocytů s typickým imunofenotypem

(32). Klinicky je B-CLL charakterizována jako lymfoproliferativní onemocnění relativně nízké malignity, nicméně s velmi variabilním průběhem. Mezitím co u větší části pacientů se jedná o indolentní onemocnění, se kterým se mohou potýkat i po desetiletí, ve druhé skupině dochází k rychlé progresi choroby, které mohou podlehnout během několika měsíců. Klinické klasifikace B-CLL navržené Raiem nebo Binetem mají jen omezený prognostický význam, a to zejména u časných stádií nemoci (Binet A, Rai 1 a 2), ve kterých je však diagnostikována většina pacientů (34,35). Proto nastala potřeba identifikace molekulárních prognostických markerů. Zpočátku byl výzkum zaměřen především na hledání chromosomálních aberací. Bohužel, konvenční cytogenetické techniky u pomalu progresujících buněčných populací selhávaly, v důsledku čehož byly chromosomální aberace detekovány pouze u 40-50% případů B-CLL. Výrazný posun přineslo až zavedení metody FISH, která prokázala nejenom vyšší frekvenci (až 85% případů), ale i větší spektrum chromosomálních změn u B-CLL. K prognosticky významným patří delece 17p13 a 11q22-q23, které jsou spjaty se špatnou prognózou (medián přežití 32 a 79 měsíců) a s vyšší pokročilostí choroby v době diagnózy, naopak trisomie 12q, normální karyotyp a delece 13q14 byly častěji detekovány u pacientů s delším přežitím (medián 114, 111 a 133 měsíců) (35). Autoři Haslinger a kol. porovnávali expresní profily B-lymfocytů 11 zdravých dárců a 100 B-CLL pacientů nesoucích některou z těchto aberací. Lokalizace rozdílně exprimovaných genů u jednotlivých skupin poměrně dobře korelovala s lokalizací relevantních aberací, je tedy pravděpodobné, že chromosomální aberace hrají roli v patogenezi B-CLL a jsou jednou z příčin klinické heterogenity onemocnění B-CLL (36).

Další studie prokázaly, že rovněž výskyt somatických mutací v genech kódujících variabilní části těžkého (V_H) řetězce imunoglobulinů (Ig) má vztah k predikci klinického vývoje onemocnění (obrázek č. 4C). Na základě výskytu nebo absence těchto mutací je možné B-CLL členit do dvou skupin. B-CLL vycházející z „paměťových“ B-lymfocytů, které již prošly zárodečným centrem a jsou nositeli IgV_H mutací (M-B-CLL, mutated B-CLL), a B-CLL z „naivních“ B-lymfocytů (pre-GC B-lymfocyty), které do zárodečného centra dosud nevstoupily, nebo se v něm nesetkaly s antigenem, a proto nenesou žádnou somatickou mutaci genů IgV_H (UM-B-CLL, unmutated B-CLL) (37,38). Medián celkového přežití (OS) pacientů ve skupině UM-B-CLL se pohybuje v rozmezí 79-119 měsíců, zatímco ve skupině M-B-CLL je několikanásobně delší a u řady těchto pacientů onemocnění vůbec nevyžaduje léčbu. Mutační status IgV_H je nezávislým prognostickým faktorem, který pacienty stratifikuje bez ohledu na klinické stádium B-CLL. Tak například u pacientů klinického stádia „Binet A“ byl ve skupině UM-B-CLL medián OS 95 měsíců a ve skupině MB-CLL 293 měsíců ($P = 0.0008$) (37-39).

Vzhledem k tomu, že přítomnost nebo absence somatické mutace genů pro IgV_H je vázána na odlišné maturační stádium B-lymfocytů, bylo překvapením, že první mikročipové analýzy genové exprese B-CLL nevedly při použití nezávislých (unsupervised) shlukových analýz k identifikaci profilu genové exprese, který by obě skupiny B-CLL odlišil. Tato skutečnost naopak podporuje hypotézu, že B-CLL sdílí společný buněčný původ, ve kterém procházejí stejným mechanismem maligní transformace (40). Problematikou interpretaci vyvolávají výsledky další studie, ve které autoři na souboru 100 pacientů vyselektovali genový profil, na jehož základě bylo možné odlišit M-B-CLL od UM-B-CLL. Kuriózní však bylo, že pouze u mužů. Autoři přitom analyzovali zpočátku celý soubor, následně zvlášť mužskou a ženskou populaci. Jak u mužů (62 pacientů), tak i u žen (38 pacientek) představovala skupina M-CLL přibližně 55% případů (36). Je snad příslušnost k pohlaví determinantou genové exprese leukemických buněk? Myšlenka to není tak úplně zavržení hodná, uvědomíme-li si, že incidence B-CLL je u mužů přibližně 2x vyšší než u žen,

a že v několika studiích byla prokázána jednoznačná souvislost mezi výskytem UM-B-CLL a mužským pohlavím. Například v Damleově práci byl poměr mužů a žen ve skupině UM-B-CLL 11:1 a 1,1:1 ve skupině M-B-CLL ($p<0,003$), v Oscierově souboru 2,4:1 u UM-B-CLL a 1:1,1 u M-B-CLL ($p=0,003$) a v Hamblinově souboru 2:1 u UM-B-CLL a 1,1:1 u M-B-CLL ($p>0,05$) (37-39). Oscier navíc prokázal příslušnost k mužskému pohlaví jako negativní prognostický faktor, neboť po 10 letech v jeho souboru přeživalo 64% mužů a 87% žen ($p=0,01$) (39). Vzhledem k tomu, že incidence hematologických malignit je obecně vyšší u mužů než u žen, přičemž v ojedinělých případech se může jednat o výrazné rozdíly (např. HCL 5:1, Burkittův lymfom sporadická forma 2-3:1, endemická forma 2:1, MCL 2:1), stojí souvislost pohlaví a hematologických malignit za bližšího prozkoumání (30,31). Po „selhání“ nezávislých shlukových analýz byl k identifikaci genových profilů specifických pro M-B-CLL a UM-B-CLL použit jiný biostatistický přístup, pracující již od počátku s informací, který ze vzorků je, a nebo není nositelem mutace IgV_H . Tímto způsobem byl na pilotním souboru 28 pacientů identifikován první genový profil čítající 175 genů, jejichž exprese se mezi vzorky UM-B-CLL a M-B-CLL výrazně lišila. Ke třem genům s nejvyšší diskriminační hodnotou patřil i ZAP-70, kódující stejnojmennou proteinkinázu. Gen ZAP-70 byl exprimován ve všech případech UM-B-CLL, a naopak v žádném vzorku M-B-CLL (41). O dva roky později publikovali stejní autoři práci, ve které podrobili DNA čipové analýze celkem 107 pacientů s B-CLL, přičemž v 74% se jednalo o M-B-CLL (obrázek č. 4A). I v tomto případě byla exprese ZAP-70 výrazně vyšší u UM-B-CLL než u M-B-CLL ($p<0,001$) a ze všech 240 genů v profilu ZAP-70 dosahoval nejvyššího diskriminačního potenciálu k odlišení obou skupin B-CLL (správně klasifikoval 93% vzorků, $p<0,001$) (42). Podobné výsledky přinesla i další práce (43).

Objevení ZAP-70 patří dosud k nejvýznamnějším příspěvkům DNA čipů do klinické praxe v oblasti prediktivní diagnostiky lymfoidních malignit. Jeho exprese je silným a nezávislým molekulárním prediktorem nepříznivé prognózy (obrázek č. 4B) (42,44). Jako názorný příklad uvádíme výsledky práce Orchardové a kol., jenž studovali expresi ZAP-70 v souboru 167 pacientů s B-CLL. Jednoznačná mutace IgV_H byla detekována u 65% pacientů. Medián celkového přežití ve skupině s negativní expresí ZAP-70 přesahoval 24 let, zatímco ve skupině s pozitivní expresí byl 9,3 roku ($p<0,0001$) (44). Pro klinickou praxi je zásadní i skutečnost, že genová exprese ZAP-70 odpovídá výskyt proteinu, který lze velmi jednoduše stanovit pomocí flowcytometrie (obrázek č. 4E) nebo imunohistochemie (obrázek č. 4D), přičemž senzitivita a specifita těchto metod se pohybuje nad 95%. Z hlediska technické variability, ale rovněž s ohledem na korelaci s proteinovou expresí ZAP-70 a s údaji o klinickém průběhu choroby, je gen pro IgV_H považován za mutovaný tehdy, sdílí-li se zárodečnou buněčnou linií v nukleotidové sekvenci méně než 97% homologií (40,44).

Jako poslední příklad využití DNA čipů u B-CLL uvedeme identifikaci profilu genové exprese predikujícího odpověď na fludarabin. Rosenwald a kol. tak učinili na souboru 7 pacientů. Většina genů z tohoto profilu měla funkční vztah k signální dráze proteinu p53, což odpovídá situaci v in-vitro systémech, kde kultivace maligních lymfocytů s fludarabinem vyvolává odpověď závislou na stavu signální dráhy p53 a vede k pozitivní selekci buněk s mutovaným proteinem. Tímto mechanismem dochází k indukci sekundární rezistence a k selhání protinádorové léčby (45).

5. AKUTNÍ LYMFOLASTICKÁ LEUKÉMIE (ALL)

ALL je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění v dětském věku. I přestože v posledních desetiletích bylo dosaženo vynikajících léčebných výsledků, stále existuje skupina pacientů, která tomuto onemocnění podlehne. Rizikové paci-

enty spolehlivě neodhalí ani použití stávajících klinických, cytogenetických a molekulárních markerů (46). DNA čipy se proto nabízí jako vhodná metoda ke hledání nových prediktivních a prognostických ukazatelů. Jedny z prvních mikročipových analýz, které byly na souborech primárních lidských tumorů vůbec provedeny, se týkaly právě pacientů s akutními leukemiemi. V roce 1999 publikovala skupina T. Goluba v časopisu Science práci, ve které autoři na základě profilu genové exprese dokázali odlišit obě hlavní skupiny akutních leukemií (ALL a AML) (47). Optimismus autorů tehdy spočíval zejména v budoucnosti DNA čipů, které považovali za hlavní nástroj rozvíjející se prediktivní diagnostiky. Představovali si, že pro každou skupinu nádorových onemocnění budou existovat specifické DNA čipy, nesoucí na svém povrchu sondy pouze pro omezený počet relevantních genů, a jejich pomocí bude možné stanovit přesnou diagnózu choroby, určit nejvhodnější možnou léčbu a předpovědět prognózu pacienta. Je příjemné sledovat, jak se jejich vize postupně naplňují. O tři roky později publikovali Armstrong a kol. práci, ve které identifikovali profil genové exprese specifický pro skupinu leukemií s chromosomální abercí postihující mixed-lineage leukemia (MLL) gen. Tato skupina ALL má z hlediska svého biologického chování nepříznivou prognózu a právě odlišný klinický průběh a přítomnost patologické chromosomální aberace vedly k jejímu vyčlenění a označení MLL (mixed-lineage leukemia; nebo Re-MLL-ALL, Rearrangements-MLL-ALL). Armstrongova práce byla realizována na souboru 37 pacientů a profil genové exprese dokázal jednoznačně od sebe odlišit ALL, MLL a AML. Při podrobnější analýze autoři zjistili, že profil MLL se nápadně podobá profilu genové exprese hematopoetických progenitorů stojících ve vývojové řadě na rozcestí myeloidních a lymfoidních linií. Tím potvrdili výsledky jiných prací, které poukazovaly na rozporuplný fenotyp těchto nádorových buněk (exprese lymfoidních znaků CD79B, CD44 a CD19, naopak ztráta exprese lymfocytárního antigenu CD10, nebo koexprese myeloidních antigenů CD15 a CD65). Z mikročipové analýzy dále vyplynulo, že MLL, ve srovnání s ALL a AML, ve zvýšené míře exprimují geny HOXA9, HOXA5 a HOXA4, které se podílejí na regulaci diferenciace pluripotentní hematopoetické buňky a jejích progenitorů, a dále FLT3 gen, kódující stejnojmenný receptor růstového faktoru, jenž se vyskytuje výhradně u hematopoetických kmenových buněk (CD34+). Přítomnost interní tandemové mutace FLT3 genu je detekována přibližně u 20-30% procent případů AML a je jednoznačným nepříznivým prediktivním a prognostickým faktorem (48). Podrobnějším studiem expresního profilu MLL se zabýval i Tsutsumi a kol. (49). Proteiny výše popisovaných genů mohou být vhodnými kandidáty pro cílenou léčbu. Z tohoto pohledu si nelze přát nic jiného, než aby i v případě MLL byl objeven další „Gleevec“, jako v případě CML s fúzním BCR/ABL genem. V této souvislosti se v současnosti vkládají nemalé naděje do inhibitorů tyrozin-kinázové aktivity FLT3 receptoru (50).

Další rozsáhlá práce byla provedena na souboru 360 vzorků ALL pocházejících od dětských pacientů. Autoři na základě profilu genové exprese složeného z 271 genů rozdělili ALL do sedmi skupin: 1. BCR-ABL, 2. E2A-PBX1, 3. TEL-AML1, 4. MLL, 5. hyperploidní karyotyp, 6. T-ALL a sedmá skupina s dosud nejasným významem. Profil genové exprese klasifikoval všechny analyzované vzorky ALL s mnohem větší přesností, než by se stalo pouze s ohledem na výskyt specifických genových alterací. Tak například čtyři případy ALL byly zařazené do skupiny TEL-AML1 i přesto, že u nich nebyla RT-PCR reakcí nalezena žádná známá chimerická přestavba. Sekvenční analýza TEL však prokázala jeho mutaci (51). O rok později publikoval stejný autorský tým práci potvrzující existenci uvedených 7 molekulárně definovaných skupin ALL, přičemž tentokrát s použitím jiné DNA čipové platformy (52). Zajímavé práce byly publikovány se specifickým zaměřením na akutní lymfatické leukémie vycházející z T-lymfocytární

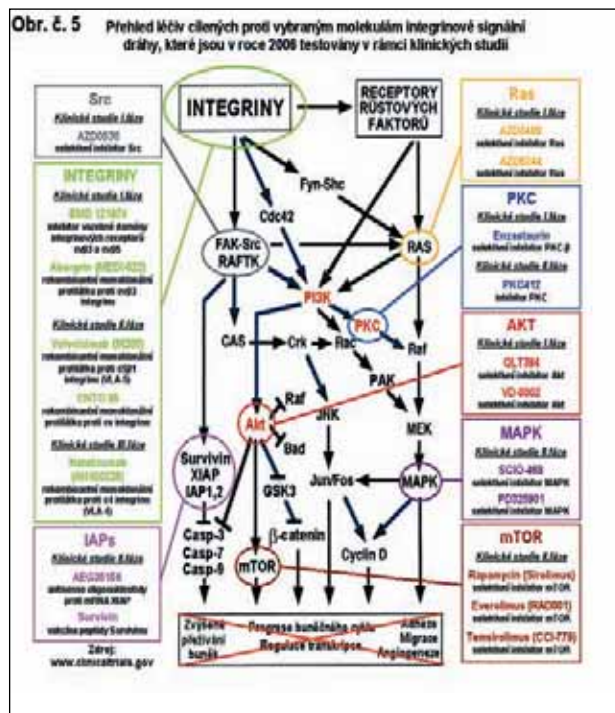
řady (T-ALL). Z jejich výsledků vyplývá, že na základě profilu genové exprese je možné T-ALL rozdělit do tří skupin, pro které je charakteristická nadměrná exprese jednoho ze tří transkripčních faktorů: LYL1, HOX11, nebo TAL1. Genový profil T-ALL s nadměrnou expresí LYL1 a genů podléhajících jeho regulaci byl podobný profilu genové exprese pro-T-lymfocytů, a podobně v případě T-ALL s nadměrnou expresí HOX11, nebo TAL1, byla pozorována shoda s profilem časných, nebo pozdních kortikálních T-lymfocytů. Na rozdíl od molekulární klasifikace DLBCL, rozdělení T-ALL na základě podobnosti k jednotlivým vývojovým stádiím T-lymfocytů jenom potvrdilo stávající imunologické dělení T-ALL (53,54).

Mechanismy chemorezistence a predikce vnímavosti na vybraná cytostatika a kortikoidy se staly předmětem několika prací. Holeman a kol. sledovali změny genové exprese v lymfoblastech pacientů s ALL, které byly v in-vitro podmínkách kultivovány s prednisolonom, vinkristinem, cytosinarabinsidem a daunorubicinem. Pomocí DNA čipů autoři identifikovali genové profily predikující chemosenzitivitu k aplikovaným látkám a potvrdili známou skutečnost, že in-vitro detekovaná chemorezistence jednoznačně koreluje s vysokým rizikem relapsu choroby (55). Použití DNA čipů vedlo rovněž k určení genů, jejichž exprese se významně lišila mezi ALL s nízkou, nebo s vysokou kumulací metotrexát-polyglutamátů - metabolitů metotrexátu. Toto zjištění by mohlo v budoucnosti vést k individualizaci terapeutických protokolů pacientů s ALL ve smyslu intenzity dávky metotrexátu nebo jeho úplné záměny za jiné cytostatikum (56). Cytoprotektivní účinek mikroprostředí, ve kterém se lymfoblasty nacházejí, může být další příčinou relapsů leukémií po indukční terapii. Za normálních okolností jsou hematopoietické buňky v mikroprostředí kostní dřeně v kontaktu se stromálními buňkami a s okolními složkami extracelulární matrice (ECM). Kromě řady esenciálních růstových faktorů, které produkují stromální buňky, je pro přežívání hematopoietických buněk důležitý již prostý kontakt s těmito buňkami a s vláknitými složkami ECM (např. fibronectin, vimentin, laminin, kolagen) zprostředkovaný pomocí receptorů adheze (např. integrinové receptory, VCAM-1). A právě stimulace receptorů adheze mimo jiné spouští signální dráhy vedoucí k inhibici apoptózy. Uvedený cytoprotektivní účinek se stává významným zejména za nepříznivých podmínek, například v přítomnosti cytostatika. Astier a Svoboda jako první publikovali profil genové exprese B-lymfoblastů, které po stimulaci integrinových receptorů přežily i ve stresových podmínkách (bez přítomnosti růsto-

vých faktorů nebo při kultivaci s doxorubicinem). Výsledkem jejich práce byla identifikace několika signálních drah realizujících antiapoptotický účinek integrinových receptorů (např. signální dráha PI3K-Akt a XIAP/Survivin-Caspasa-3/7) (57,58). O významu receptorů adheze svědčí existence řady klinických studií s monoklonálními protilátkami proti integrinovým receptorům nebo s inhibitory jednotlivých kináz integrinových signálních drah (obrázek č. 5).

Závěr:

Komplexní analýzy genové exprese pomocí DNA čipů umožňují realizovat nový pohled na genom nádorových buněk. V případě lymfoidních malignit uvedené analýzy již přinesly první výsledky použitelné v klinické praxi pro diagnostiku, klasifikaci a predikci vývoje nádorového onemocnění.



Poděkování:

Práce byla podpořena grantem MZ ČR: NR 8231/3

Literatura:

- Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. *Lékař a technika* 2004;35:67-75.
- Freedman AS, Nadler LM. Non-Hodgkin's lymphoma. In: Holland, Frei et al. *Cancer medicine*, 5th ed., B.C. Decker Inc. 2000; pp. 2 034-2059.
- Nathawani B, Dixon D, Jones S, et al. The clinical significance of the morphological subdivision of diffuse „histiocytic“ lymphoma: A study of 162 patients treated by the Southwest Oncology Group. *Blood* 1982;60:1068.
- Colomo L, Lopez-Guillermo A, Peralas M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101(1):78-84.
- Jalkanen S, Joensuu H, Soderstrom KO, et al. Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest* 1991;87:1835-1841.
- Muris J.J., Meijer C.J., Vos W., et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006;208(5):714-23.
- A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329(14):987-94.
- Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(25):1937-47.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103(1): 275-82.
- Rosenwald A., Wright G., Leroy K., et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003;198(6):851-62.
- Savage K.J., Monti S., Kutok J.L., et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;102(12):3871-9.
- Zinzani PL, Martelli M, Magagnoli E, et al. Treatment and clinical management of primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: MACOP-B regimen and mediastinal radiotherapy monitored by (67)Gallium scan in 50 patients. *Blood* 1999;94:3289-3293.
- Zarate-Orsola A, Medeiros LJ, Longo DL, et al. Non-hodgkin's lymphomas arising in patients successfully treated for Hodgkin's disease. A clinical, histologic, and immunophenotypic study of 14 cases. *Am J Surg Pathol* 1992;16:885-895.
- Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 2005;87:163-208.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction on by gene-expression profiling and supervised machine learning. *2002;8(1):68-74.*
- Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C., et al. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005;18(10):1377-84.
- Espinosa I., Briones J., Bordes R., et al. Membrane PKC-beta 2 protein expres-

- sion predicts for poor response to chemotherapy and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Hematol* 2006;85(9):597-603.
19. Lossos I.S., Czerwinski D.K., Alizadeh A.A., et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004;350(18):1828-37.
 20. Hussen H, Carideo EG, Neuberg D, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 2002;99:282-289.
 21. Glass AM, Kersten J, Delahaye LJM, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 2005;105:301-307.
 22. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159-2169.
 23. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma. *Blood* 2005; 106: 2169-2174.
 24. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004;64(19):7022-9.
 25. Bohan SP, Troyanskaya OG, Alter O, et al. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:1926-1930.
 26. Meusers P, Hense J, Brittinger G. Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia* 1997;Suppl 2: S60-4.
 27. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-197.
 28. Chuang SS, Huang WT, Hsieh PP, et al. Mantle cell lymphoma in Taiwan: clinicopathological and molecular study of 21 cases including one cyclin D1-negative tumor expressing cyclin D2. *Pathol Int* 2006;56(8):440-8.
 29. De Vos S, Krug U, Hofmann WK, et al. Cell cycle alterations in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (BV-MCL) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and BV-MCL. *Diagn Mol Pathol* 2003;12:35-43.
 30. Novotny 2003 CR, ÚZIS ČR Praha, 2006, str. 31-69.
 31. National Cancer Institute, SEER Incidence and US Death Rates 1975-2003, Bethesda, USA, www.nci.gov; www.cancer.gov.
 32. Garand R and Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol. Cell Ther* 1996; 38: 471 - 486.
 33. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
 34. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
 35. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 2000; 343:1910-1916.
 36. Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profile of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004; 22(19): 3937 - 3949.
 37. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated IgVH genes are associated with more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848 - 1854.
 38. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as a novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 95: 2455 - 2457.
 39. Oscier D.G., Gardiner A.C., Mould S.J., et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100(4):1177-84.
 40. Weistner A, Staudt LM. Towards molecular diagnosis and targeted therapy of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 2003;40:296-307.
 41. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639 - 1647.
 42. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S., et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101(12):4944-51.
 43. Ferrer A, Ollila J, Tobin G, et al. Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetic and Cytogenetic* 2004; 153: 69 - 72.
 44. Orchard J.A., Ibbotson R.E., Davis Z., et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363 (9403):105-11.
 45. Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukaemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood* 2004;104:1428-1434.
 46. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol* 2005;23(31):7942-50.
 47. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.
 48. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. 2002; 30(1) :41-7.
 49. Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K et al. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res* 2003 ;63(16):4882-7.
 50. Brown P, Lewis M, McIntyre E, et al. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 2006;20(8):1368-1376.
 51. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1(2) :133-43.
 52. Ross ME, Zhou X, Song G et al. 1-40 Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102(8): 2951-9.
 53. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2003;40:274-280.
 54. Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, et al. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2004;363:535-6.
 55. Holleman A, Cheok MH, den Boer M et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004 ;351(6):533-42.
 56. Kager L, Cheok M, Yang W et al. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest* 2005; 115(1):110-7.
 57. Astier AL, Ronghui X, Svoboda M, et al. Temporal gene expression profile of human precursor B leukemia cells induced by adhesion receptor: identification of pathways regulating B-cell survival. *Blood* 2003;101(3):1118-1127.
 58. Astier AL, Svoboda M, Hinds E, et al. Integrins regulate survival of pre-B-ALL cells through differential IAP and caspase-7 ubiquitination and degradation. *Leukemia* 2004;18:873-875.