

# Cykliny D v regulaci a dysregulaci buněčného cyklu u mnohočetného myelomu

## Cyclins D in Regulation and Dysregulation of the Cell Cycle in Multiple Myeloma

Kubiczková L.<sup>1,2</sup>, Dúčka M.<sup>1</sup>, Sedlaříková L.<sup>1</sup>, Kryukov F.<sup>1</sup>, Hájek R.<sup>1,2</sup>, Ševčíková S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

<sup>2</sup> Oddělení klinické hematologie, FN Brno

### Souhrn

Mnohočetný myelom je druhé nejčastější hematoonkologické onemocnění charakterizované klonální proliferací plazmatických buněk a produkcí monoklonálního imunoglobulinu. Jedná se o heterogenní onemocnění, avšak mnohé studie uvádějí, že dysregulace cyklínů D patří k sjednocujícím událostem v rané patogenezi mnohočetného myelomu. Téměř u všech pacientů s tímto onemocněním byla pozorována zvýšená exprese alespoň jednoho z cyklínů D, nicméně v mnoha případech je mechanismus jejich zvýšené exprese neznámý. Kromě známých a dobře popsaných úloh cyklínů D v buněčném cyklu se ukazuje, že mají i jiné funkce, kterými mohou přispívat k progresi nádorových onemocnění. Cykliny D slouží také jako prognostický marker a ke klasifikaci podskupin mnohočetného myelomu. V tomto přehledovém článku se zaměříme na význam cyklínů D u mnohočetného myelomu.

### Klíčová slova

mnohočetný myelom – cyclin D – patogeneze – regulace buněčného cyklu – TC skupiny

### Summary

Multiple myeloma is the second most common hematological disease characterized by clonal proliferation of plasma cells and monoclonal immunoglobulin production. It is a heterogeneous disease; however, dysregulation of cyclins D seems to be an early unifying pathogenic event in multiple myeloma. In almost all patients, there is increased expression level of at least one of the cyclins D. Nevertheless, the mechanism of this increase is unknown in many cases. Next to well-known roles of cyclins D in the cell cycle, they have many other functions contributing to tumor cell progression. Cyclins D are prognostic markers and are also used for subclassification of multiple myeloma. In this review, we focus on significance of cyclins D in multiple myeloma.

### Key words

multiple myeloma – cyclin D – pathogenesis – cell cycle regulation – TC groups

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021622434, grantem IGA Ministerstva zdravotnictví NT14575, NT12130 a NT13190 a interním grantem LF MU MUNI/11/InGA17/2012.

This study was supported by scientific program of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports MSM0021622434, Grant of the Ministry of Health NT14575, NT12130 and NT13190 and internal grant of Faculty of Medicine, Masaryk University MUNI/11/InGA17/2012.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



**RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.**  
Babákova myelomová skupina  
Ústav patologické fyziologie  
LF MU, Brno  
Kamenice 5, A3  
625 00 Brno  
e-mail: sevcik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 12. 5. 2013

Přijato/Accepted: 6. 6. 2013

## Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění terminálních stadií B lymfocytů, známých jako monoklonální plazmatické buňky (PB). Pro MM jsou charakteristické tři základní znaky, které rovněž slouží k jeho diagnóze. Především jde o infiltraci kostní dřevě (KD) maligními PB, dále pak o produkci M-Ig (především jde o IgG a IgA, méně často o IgM nebo IgD), který bývá detekován v moči a/nebo v séru. Výjimečně, pokud jsou maligní buňky vysoce dediferencované, tvoří pouze lehké řetězce imunoglobulinu (Ig),  $\kappa$  nebo  $\lambda$ . Třetím znakem jsou osteolytické léze. Dnes je již známo, že všechny případy MM jsou předcházeny premalignním stavem, monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) [1,2].

U MM byly popsány dvě onkogenní dráhy, které vedou k jeho vzniku. Na základě těchto raných onkogenních událostí je pak možné MM rozdělit do dvou skupin: hyperdiploidní MM, který zahrnuje asi 50 % všech případů nemoci, a nonhyperdiploidní MM [3,4]. Pro hyperdiploidní nádory jsou typické numerické aberace jako monozomie chromozomů 13, 14, 16 a 22 a trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 15, 19 a 21 [5]. Naopak typ nonhyperdiploidní je charakterizován přítomností recipročních chromozomál-

ních translokací zahrnujících lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) (14q32) [6], méně často i lokus pro lehký řetězec (IgL):  $\kappa$  (2p12) anebo  $\lambda$  (22q11) [7]. Asi ve 40 % případů MM byla popsána přítomnost pěti opakovaných recipročních translokací *IgH*, které jsou příčinou změny pozice různých genů či onkogenů, jejichž exprese je deregulovaná po translokaci do oblasti zesilovače transkripce *IgH*. Zmíněnými translokačními partnery jsou oblasti 11q13 (*CCND1*), 4p16 (*FGFR3* a *MMSET*), 6p21 (*CCND3*), 16q23 (*MAF*) a 20q11 (*MAFB*), tedy oblasti chromozomů, kde se nacházejí geny pro cykliny D nebo jejich transkripční faktory [4,8].

## Cykliny D

Počáteční studie všech tří molekul cyklinů D (D1, D2 a D3) odhalily jejich podobnou strukturu, funkční redundanci, různou expresi v odlišných typech tkání a odlišnou expresi v závislosti na vývojovém stadiu buněk. *Cyklin D1* je vysoce exprimován v játrech, naopak *cyklin D3* v thymu. Dále bylo zjištěno, že exprese *cyklinu D3* je specifická pro mladé proliferující tkáň, zatímco exprese *cyklinu D1* se během vývoje mění [9].

Každý cyklin D je kódován vlastním genem. Gen pro cyklin D1 se nachází

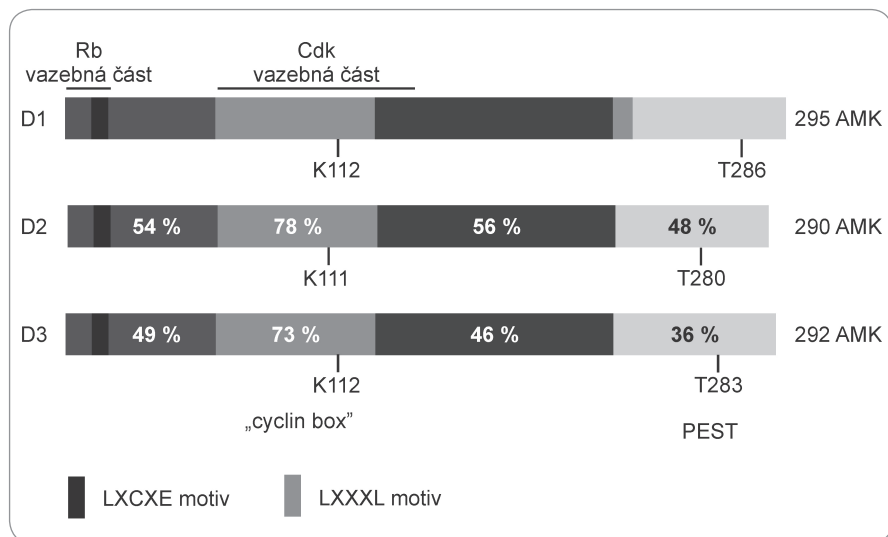
v lokusu 11q13, gen pro cyklin D2 pak v lokusu 12p13 a cyklin D3 je kódován lokusem 6p21 [10]. I přesto, že geny leží na rozdílných chromozomech, proteinové struktury jsou si značně podobné; cykliny D2 a D3 jsou identické z 62 %, s cyklinem D1 pak sdílejí homologii z 62 %, resp. 51 % (obr. 1). Největší homologie mezi cykliny D (78 %) se vyskytuje v doméně označované jako „cyclin box“, která zprostředkovává vazbu cyklinů s cyklin-dependentními kinázami (Cdk) a je nezbytná pro interakci komplexu cyklin-Cdk s inhibitory Cdk p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> a p57<sup>Kip2</sup>. Všechny tři cykliny D sdílejí LxCxE motiv na N konci, kterým se vážou na protein Rb. Na C konci mají doménu PEST bohatou na prolin, kyselinu glutamovou, serin a treonin, která je charakteristická pro rychle degradovatelné proteiny. Na C konci se také nachází i specifický treoninový zbytek, jehož fosforylací je aktivována degradace cyklinů D v proteazomu (Thr<sup>286</sup> u cyklinu D1, Thr<sup>280</sup> u cyklinu D2 a Thr<sup>283</sup> u cyklinu D3). Úsek mezi doménou „cyclin box“ a C koncem obsahuje domény, které jsou mezi cykliny D jen slabě konzervovány a jsou zodpovědné za interakci cyklinu D1 s transkripčními faktory (TF) [11].

Je známo, že cyklin D1 vystupuje ve dvou izoformách, druhá izoforma cyklinu D1 vzniká alternativním sestřihem mRNA pro cyklin D1 a označuje se jako cyklin D1b. Cyklin D1b je dlouhý 274 aminokyselin, s cyklinem D1 je identický v prvních 240 aminokyselinách a liší se svým C koncem, kde postrádá exon 5 nesoucí některé klíčové interakční motivy včetně aminokyselinového zbytku Thr<sup>286</sup>, jehož fosforylací je kontrolován jak export cyklinu D1b z jádra, tak jeho stabilita [12]. Ve srovnání s cyklinem D1 se počas rozpadu cyklinu D1b neliší, rozdílná je však jeho lokalizace, jelikož se nachází pouze v buněčném jádře [13,14].

## Cykliny D v regulaci buněčného cyklu

Cykliny D jsou regulačními podjednotkami holoenzymu, který je aktivní v průběhu rané fáze G1 a umožňuje progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze tím, že fosforyluje protein Rb [15].

V závislosti na typu tkáňe tvoří cykliny D komplex s jednou ze dvou kataly-

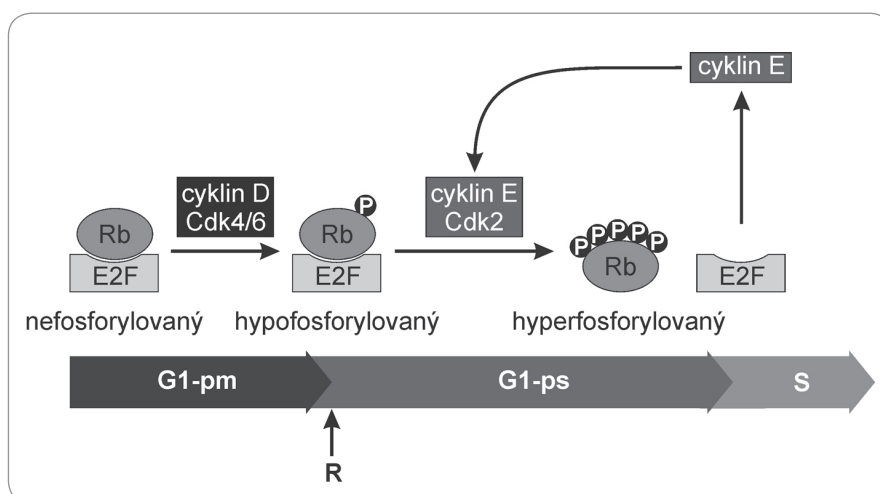


Obr. 1. Porovnání proteinových struktur cyklinu D2 a D3 s cyklinem D1.

Srovnání proteinových struktur cyklinů D2 a D3 s cyklinem D1. Všechny cykliny D obsahují LxCxE motiv, kterým se vážou na protein Rb. Největší homologie se dále vyskytuje v doméně „cyclin box“, která zprostředkovává jejich vazbu na Cdk. Na C konci mají doménu PEST, která je charakteristická pro rychle degradovatelné proteiny. AMK znázorňují velikost daného cyklinu D a procenta udávají míru homologie mezi cyklinem D1 a cykliny D2 a D3.

tických podjednotek, buď s Cdk4, nebo s Cdk6. Vzájemnou kombinací cyklinů s Cdk4/6 může vzniknout až šest typů komplexů, které vykazují podobné biochemické funkce [16]. Na rozdíl od jiných typů cyklinů, jejichž koncentrace se periodicky mění během progresu buněčného cyklu nezávisle na okolních vlivech, hladina cyklinů D závisí na signálech z mimobuněčného prostředí. Pokud tedy dojde k mitogenní stimulaci, hladina cyklinů D se navyšuje, spolu se zánikem stimulu pak hladina cyklinů D klesá. Navíc je exprese cyklinů D v buňce regulována různými TF, což umožňuje v závislosti na typu tkáně aktivovat různé cykliny D, a tím i aktivitu Cdk4/6 [17,18]. Po vzniku komplexu cyklinu D s Cdk4/6 dochází k částečné fosforylaci nádorového supresoru retinoblastoma proteinu (Rb) a vzniku tzv. hypofosforylované formy Rb [15]. Rb obsahuje až 16 potenciálních míst pro fosforylaci, pouze tři z nich jsou preferovány komplexy cyklinů D s Cdk4/6, konkrétně Ser<sup>780</sup>, Ser<sup>795</sup> a Thr<sup>826</sup> [19]. Fosforylace proteinu Rb komplexem cyklin D/Cdk4/6 vede mimo jiné k disociaci specifických histonových deacetyláz (HDAC), chromatin remodelujících enzymů, které blokují expresi genu pro cyklin E. Díky tomu může dojít k navýšení hladiny cyklinu E, který záhy tvoří komplex s Cdk2.

V počáteční fázi G<sub>1</sub> je komplex cyklin E/Cdk2 suprimován Cdk inhibitorem p27<sup>Kip1</sup>, který naopak, stejně jako p21<sup>Cip1</sup>, neinhibuje komplex cyklin D/Cdk4/6, ale aktivuje jej [20]. Z toho důvodu je pro vznik aktivního komplexu cyklin D/Cdk4/6 nutné navýšení nejen hladiny cyklinu D, ale i p27<sup>Kip1</sup>, který je vázán v komplexu cyklin E/Cdk2. Dochází tedy k vyvážení inhibitoru p27<sup>Kip1</sup> z komplexu cyklin E/Cdk2, tím se zvyšuje jeho nevázaná forma, která přispívá k aktivaci komplexu cyklin D/Cdk4/6, a zároveň dochází k aktivaci komplexu cyklin E/Cdk2 [16]. Aktivní komplex cyklin E/Cdk2 fosforyluje dále pRb v pozici Ser567, a tím vytváří hyperfosforylovanou inaktivní formu pRb, která posléze uvolňuje rodinu transkripčních faktorů E2F, čímž je iniciována transkripce genů potřebných pro přechod do fáze S, včetně genu pro cyklin E [21,22]. Dalším substrátem komplexu cyklin E/Cdk2 je



**Obr. 2. Postupná fosforylace proteinu Rb zabezpečující přechod z fáze G1 do S.**

Pro progresi buněčného cyklu je důležitá hypofosforylace Rb pomocí komplexu cyklin D/Cdk4/6. Hyperfosforylace pRb pomocí komplexu cyklin E/Cdk2 inaktivuje pRb, který není schopen vázat transkripční faktor E2F, čímž je umožněn přechod buňky do S fáze buněčného cyklu.

G1-pm – G1-postmitotická fáze, G1-ps – G1-pre-S fáze, R – restrikční bod

jeho inhibitor p27<sup>Kip1</sup>, který je fosforylací označen pro ubiquitinaci a následnou degradaci proteazomem.

Pozorujeme zde tedy pozitivní zpětnou vazbu, kdy komplex cyklin E/Cdk2 suprimuje protein pRb, čímž dochází k aktivaci transkripčního faktoru E2F, což vede ke zvýšené expresi cyklinu E, který pak v komplexu s Cdk2 může udržovat supresi Rb a inaktivaci p27<sup>Kip1</sup>. Díky tomu dochází k progresi buněčného cyklu z poslední části fáze G1 do S (obr. 2) [23].

#### Modely mapující funkci cyklinů D v různých fázích hematopoézy

Myši deficientní pouze pro jeden z cyklinů D, konkrétně D1, jsou menší, s častějším projevem retinopatie, nicméně hematopoéza je u nich postižena jen minimálně, což poukazuje na značnou funkční redundanci cyklinů D [24].

Aby bylo možné poznat specificky funkci jednotlivých cyklinů D, byly vytvořeny myši deficientní pro dva typy cyklinů a exprimující pouze jeden typ: D1, D2 nebo D3. Bylo zjištěno, že v rané fázi embryogeneze se myši vyvíjejí normálně, což znamená, že cykliny D mohou být aspoň v průběhu embryonálního vývoje zaměnitelné nebo že vývoj určitých typů tkání může být nezávislý na přítomnosti cyklinů D. Nicméně později ve vý-

voji myši exprimujících pouze cyklin D1 byly pozorovány poruchy hematopoézy, které vedly k těžké anémii a úmrtí. Také u myši exprimujících pouze cyklin D2 nebo D3 docházelo k vývojovým abnormalitám, které dříve či později po narození vedly k úmrtí [25].

Naopak myši deficientní pro všechny tři typy cyklinů D nejsou životaschopné ani během embryogeneze, což znamená, že pro proliferaci savčích buněk je nutná přítomnost alespoň jednoho typu cyklinu D. Pomocí tohoto modelu bylo zjištěno, že se embrya neexprimující cykliny D vyvíjejí normálně až do embryonálního dne 13,5, kdy je již vyvinuta většina tkání a orgánů. Po 13. dni vývoje se však u embryí začaly objevovat poruchy ve vývoji srdce, anémie a poruchy cirkulace, které společně vedly k úmrtí do 16. dne embryonálního vývoje [26]. Na základě zmíněného modelu bylo také prokázáno, že přítomnost cyklinů D je nutná pro progresi buněčného cyklu během S a G2/M fáze a jejich deficiencie u hematopoetických kmenových buněk (HSCs) vede k jejich sníženému počtu, neschopnosti tvořit kolonie a celkově ochromuje vývoj dalších buněčných stadií. U buněk odvozených z těchto myši byla navíc testována schopnost onkogenní transformace po vnesení vektorů nesoucích onkogeny Ras a Myc. Bylo pozorováno,

že u cyklin D deficientních buněk byla velmi snížena vnímavost k onkogenním stimulům, což naznačuje, že přítomnost cyklinů D je potřebná k plné onkogenní transformaci, alespoň v případě těchto onkogenů [26].

Pomocí *in vitro* modelu založeného na primokulturách CD34+ hematopoetických progenitorových buněk bylo zjištěno, že navýšení exprese cyklinu D1 je důležité pro diferenciaci buněk do myeloidní linie a selektivní navýšení cyklinu D3 naopak do linie megakaryocytární [27]. Toto pozorování potvrzují dřívější studie, ve kterých bylo prokázáno, že fyziologicky jsou u HSCs zastoupeny hlavně cykliny D2 a D3 a jejich snížená exprese je nezbytná pro terminální diferenciaci buněk do granulocytární myeloidní linie [28,29]. Pomocí transgenních myších modelů bylo dále prokázáno, že u transgenních myší se zvýšenou expresí cyklinu D3 (a v mnohem menším množství také cyklinu D1) byla nápadně zvýšena polyploidizace megakaryocytů [30,31]. Zmíněná pozorování naznačují, že cykliny D nejsou důležité pouze v procesu progresu buněčného cyklu, ale hrají zásadní úlohu také v procesu samotné diferenciaci HSCs.

Pro proliferující B lymfocyty je typická přítomnost cyklinů D2 a D3, zejména pak akumulace cyklinu D2 je velmi důležitá během progresu přes G1 bod restrikce [32,33]. Pomocí myšího modelu deficientního pro cyklin D2 bylo prokázáno, že přítomnost tohoto cyklinu je nutná pro BCR indukovanou proliferaci B lymfocytů. Navíc byla u těchto myší velmi snížena CD5+ B buněčná složka a byly pozorovány deficity v přemyslu imunoglobulinové IgG třídy, což naznačuje, že cyklin D2 je kritický pro vývoj CD5+ B lymfocytů, dále je důležitý pro jejich klonální expanzi závislou na kontaktu s antigenem a je klíčovou molekulou v BCR signální kaskádě [34]. Zajímavé je, že zmíněné B lymfocyty jsou stále schopny proliferace po jiné než BCR stimulaci, nicméně doba progresu do S fáze je značně delší. Progrese je u nich možná díky kompenzaci ztráty funkce cyklinu D2 cyklinem D3, který je zodpovědný za fosforylaci pRb [35].

### Role cyklinů D u mnohočetného myelomu

Důležité poznatky o úloze cyklinů D v B buňkách přinesly studie mapující expresi cyklinů D u B buněčných malignit, jako jsou leukemie, lymfomy a mnohočetný myelom. Cykliny D se podílejí na patogenezi lymfomů, u lymfomu plášťových buněk (mantle cell lymphoma – MCL) nesoucích translokaci t(11;14) byla pozorována konstitutivně zvýšená exprese cyklinu D1, který je fyziologicky přítomen pouze u proliferujících progenitorů B buněk [36]. Navíc u cyklin D1 negativních MCL byla popsána zvýšená exprese cyklinů D2 a/nebo D3 [37]. U chronické lymfocytární leukemie (CLL) a lymfoplazmocytní leukemie (LPL) byla naopak popsána zvýšená exprese cyklinu D2, ale ne D1 ani D3, což může naznačovat, že patologické buňky u těchto onemocnění tvoří maligní protějšky normálních CD5+ B buněk [38]. U MM byla popsána deregulovaná exprese všech typů cyklinů D.

U myelomových PB buněk byla pozorována zvýšená exprese genů pro cykliny D1, D2 i D3 téměř u všech případů MM a MGUS, i přesto však míra proliferace zůstává velmi nízká [39,40]. Deregulace cyklinů D u MM je přibližně v 25 % případů způsobena přímo, translokací IgH do oblastí zahrnujících geny *CCND1* (11q13), *CCND3* (6p21), nebo nepřímo, translokací IgH do oblastí genů pro transkripční faktory *MAF* (*c-MAF*, 16q23 nebo *MAFB*, 20q11), které regulují expresi cyklinu D2. Mírně zvýšená exprese cyklinů D2 je přítomna také u případů MM s translokací (4;14) zahrnující *MMSET/FGFR3*, nicméně mechanismus této deregulace není zatím jasný [40].

Navíc i přesto, že u normálních B buněk a PB není cyklin D1 přítomen, asi u 2/3 případů MGUS a MM bez primární IgH translokace byl cyklin D1 a někdy i D2 exprimován bílelicky. Tato dodatečná kopie chromozomu 11 se vyskytuje téměř výhradně u hyperdiploidních MM exprimujících cyklin D1. U zbývajících třetiny MM případů bez IgH translokace, z nichž je asi 40 % hyperdiploidních, je popsána zvýšená exprese cyklinu D2 v myelomových PB ve srovnání s normálními PB. Konečně, vzácně se vyskytující případy MM (< 5 %), u kterých není

navýšena exprese žádného z cyklinu D, mají často inaktivován *Rb*, čímž jsou schopny zajistit progresi buněčného cyklu bez nutnosti navýšení hladiny cyklinů D [40].

Vzhledem k úloze cyklinů D v progresi buněčného cyklu z fáze G1 do S se předpokládalo, že deregulovaná exprese cyklinu D1 povede ke zvýšené proliferaci. Nicméně sled reakcí vedoucích k posunu z G1 do S je regulován Cdk inhibitory (např. p18<sup>INK4c</sup>), a proto ke zvýšené proliferaci myelomových buněk dochází až v průběhu pozdějších onkogenních událostí, které inaktivují *Rb* nebo Cdk inhibitory [41]. Bylo však popsáno, že vyšší hladina cyklinů D1 u MM prodlužuje trvání S fáze [42].

Mezi nově popsané, nekatalytické funkce cyklinů D u MM patří jejich schopnost bránit v apoptóze. Přítomnost cyklinu D1 vede k intracelulární akumulaci různých molekulárních chaperonů, jejichž funkcí je regulace sbalování proteinů. Důležitým antiapoptotickým chaperonem, jehož exprese je aktivována cyklinem D1, je Hsp70 (z angl. heat shock protein), který se váže na proteiny Bax a AIF (apoptózu indukující faktor), a tím zamezuje jejich schopnostem navodit apoptózu. Ovlivňuje také transkripční faktor NF-κB, který reguluje jak pro-apoptotické, tak i anti-apoptotické geny. Hsp70 by mohl být mediátorem cytoprotektivního efektu cyklinu D1 bránícího navození apoptózy určitými léky [43]. Cytoprotektivní funkce chaperonu Hsp70 byla pozorována také u myelomových buněk, proto by Hsp70 mohl být atraktivním cílem léčby MM v případech, kdy je exprimován cyklin D1 [44].

Nově zjištěnou funkcí cyklinu D1 je jeho úloha při opravách poškozené DNA po působení ionizujícího záření. Na opravě DNA pomocí homologní rekombinace se podílejí proteiny BRCA2 a RAD51. Bylo zjištěno, že BRCA2 podporuje vazbu cyklinu D1 do poškozených míst v DNA, kde cyklin D1 přímou interakcí pomáhá vázat rekombinázu RAD51. Dále bylo objasněno, že nižší hladina cyklinu D1 oslabuje vazbu RAD51 na poškozenou DNA a inhibuje proces homologní rekombinace, čímž zvyšuje citlivost buněk k radiaci. Tento

efekt byl pozorován u maligních buněk postrádajících protein Rb, což znamená, že cyklin D1 není nezbytný pro proliferaci Rb negativních buněk, avšak hraje důležitou úlohu při opravě radiací poškozené DNA. Tato nově objevená funkce cyklinu D1 by mohla být v budoucnu využita k cílené inhibici cyklinu D1 i u Rb negativních MM, které se doposud jeví jako necitlivé k inhibici exprese cyklinu D1 [45].

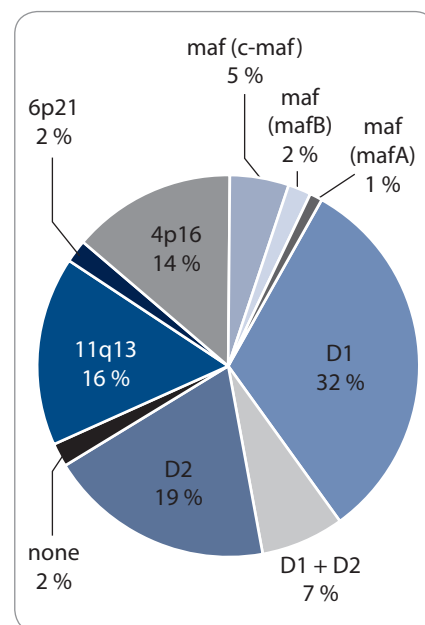
### Molekulární klasifikace na základě přítomnosti translokací a exprese cyklinů D

Extrémně nízká míra proliferace spolu s dysregulací cyklinů D u MM a MGUS je v souladu s poznatky získanými na myším modelu, kde nadměrná exprese transgenního *Ccnd1* v B buňkách narušila jejich normální vývoj nebo míru proliferace. Samotná nadměrná exprese *Ccnd1* také nevedla k vývoji nádoru u myši, pokud nebyl navíc přítomen další aktivovaný transgen jako *Myc* či *Ras* [46,47]. Zvýšená exprese genů pro cykliny D u více než 2/3 MM a MGUS, u typu hyperdiploidního i nonhyperdiploidního vedla ke stanovení hypotézy, podle které je dysregulace cyklinů velmi časnou, možná i iniciační onkogenní událostí vedoucí ke vzniku MM. K nejranějším onkogenním změnám pravděpodobně dochází již v B buňkách

germinálního centra a zdá se, že jsou přítomny i dále v premaligních buňkách u MGUS [39].

Analýza raných onkogenních změn, tedy pěti opakujících se IgH translokací, specifických trizomií a všeobecně zvýšené exprese cyklinů D vedla k vytvoření nového klasifikačního systému TC (translokace a cyklin D) (obr. 3). Podle tohoto systému je možné MM rozdělit do osmi skupin, čtyři skupiny jsou založeny na přítomnosti opakovaných translokací: TC *11q13* (*CCND1*), TC *6p21* (*CCND3*), TC *4p16* (*MMSET* a obvykle i *FGFR3*) a TC *maf*, *16q23* (*c-MAF*) + *20q11* (*MAFB*). Další čtyři skupiny byly vytvořeny na základě změněné exprese cyklinů D bez přítomnosti translokace. Patří sem skupiny TC *D1*, TC *D1 + D2*, TC *D2* a skupina TC *NONE*, ve které je zvýšená exprese cyklinů D normální. Všechny vyjmenované skupiny mají odlišnou genovou expresi a klinický vývoj (tab. 1) [39].

Jelikož typickým klinickým příznakem MM je výskyt osteolytických ložisek, byla provedena korelace mezi přítomností ložisek a TC skupinami. Osteolytická ložiska byla pozorována s vysokou prevalencí (asi 90 %) u skupin TC *6p21*, TC *11q13*, TC *D1* a TC *D1 + D2*, nižší prevalence (asi 55 %) pak byla sledována u skupin TC *4p16* a TC *maf*. Dále bylo prokázáno, že určité TC skupiny mají důležitý prognostický význam.



**Obr. 3.** Distribuce genetických podtypů u nově diagnostikovaných případů MM pomocí TC klasifikace. Koláčový graf znázorňuje relativní výskyt různých genetických podtypů MM na základě TC klasifikace.

S horší prognózou je spojena skupina TC *4p16* a TC *maf*, naopak lepší prognózu mají pacienti ze skupin TC *11q13*, TC *D1* a TC *NONE*. Tyto výsledky naznačují, že TC klasifikace může být užitečná pro klasifikaci pacientů s odlišnými podtypy MM [39].

**Tab. 1.** TC skupiny. Rozdělení MM do podskupin na základě přítomnosti opakujících se translokací a deregulace exprese cyklinů D [39].

TC skupina	Primární translokace	Translokační partner	Cyklin D	Ploidie	Proliferační index	Prognóza
6p21	6p21	<i>CCND3</i>	D3	NH	průměrný	? dobrá
11q13	11q13	<i>CCND1</i>	D1	D, NH	průměrný	dobrá
D1	žádná	žádný	D1	H	nízký	dobrá
D1+D2	žádná	žádný	D1 a D2	H	vysoký	? špatná
D2	žádná	žádný	D2	H, NH	průměrný	?
NONE	žádná	žádný	žádný	NH	průměrný	? dobrá
4p16	4p16	<i>FGFR3/MMSET</i>	D2	NH > H	průměrný	špatná
	16q23	<i>c-maf</i>				
MAF	20q11	<i>mafB</i>	D2	NH	vysoký	špatná
	8q24	<i>mafA</i>				

H – hyperdiploidní, NH – nonhyperdiploidní

## Souhrn

V rané patogenezi MM dochází u většiny pacientů k dysregulaci cyklínů D. I přes jejich funkci v regulaci buněčné proliferace, dysregulace cyklínů D u myelomových buněk není spojena s vyšší proliferací, ale s prodlouženým trváním fáze S. Vystává tedy otázka, jakým mechanismem se cykliny D podílejí na patogenezi MM. Jednou z možností může být aktivace chaperonu Hsp70, který chrání buňky před apoptózou. Při studiu myších modelů bylo zjištěno, že *cykliny D* jsou potřebné pro vstup hematopoetických kmenových buněk do buněčného cyklu a že buňky exprimující cykliny D jsou citlivější k onkogenní transformaci zprostředkované onkogeny MYC a RAS. Mutace těchto onkogenů byly popsány i u MM.

U 25 % případů MM je příčinou dysregulace cyklínů D translokace zahrnující gen pro IgH a gen pro *cyklin D1*, *cyklin D3* nebo pro TF MAF aktivující transkripci genu pro *cyklin D2*. Asi u 40 % případů s navýšenou expresí *cyklinu D1* není přítomná translokace zasahující *cyklin D1*, ale dochází k jeho bialelické expresi. Jednou z příčin může být mutace genů *RAS*, které kódují proteiny zapojené do regulace exprese *cyklinu D1*. Prevalence těchto mutací je 20–30 %.

Na základě dysregulace exprese *cyklinů D*, opakujících se translokací a specifických trizomií je možné MM rozdělit do osmi TC skupin. Všechny tyto skupiny mají odlišnou genovou expresi a klinický vývoj. S lepší prognózou je spojována skupina TC *11q13*, *TC D1* a *TC NONE*. Naopak horší prognózu mají pacienti patřící do skupin *TC 4p16* a *TC MAF*.

V budoucnu by bylo zajímavé zjistit, zda jsou u MM cykliny D dysregulované i na proteinové úrovni, a dále objasnit nové funkce cyklínů, které by mohly vést k nalezení nových terapeutických cílů a k zlepšení léčby MM.

## Literatura

- Adam Z, Pour L, Krejčí M et al. Mnohočetný myelom. In: Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J (eds). Speciální onkologie. Praha: Galén 2010: 321–329.
- Hájek R, Adam Z, Ščudla V et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Trans Hematol Dnes 2012; 18 (Suppl 1): 1–89.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. Cancer Res 2004; 64(4): 1546–1558.

- Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene 2001; 20(40): 5611–5622.
- Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 2002; 100(4): 1417–1424.
- Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(24): 13931–13936.
- Fonseca R, Blood E, Rue M et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood 2003; 101(11): 4569–4575.
- Chesi M, Bergsagel PL. Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011; 2011: 344–353.
- Sun W, Lee DK, Lee CC et al. Differential expression of D-type G1 cyclins during mouse development and liver regeneration in vivo. Mol Reprod Dev 1996; 43(4): 414–420.
- Xiong Y, Menninger J, Beach D et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. Genomics 1992; 13(3): 575–584.
- Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. Nat Rev Cancer 2011; 11(8): 558–572.
- Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA et al. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. Oncogene 2006; 25(11): 1620–1628.
- Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. Cancer Res 2003; 63(21): 7056–7061.
- Solomon DA, Wang Y, Fox SR et al. Cyclin D1 splice variants. Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. J Biol Chem 2003; 278(32): 30339–30347.
- Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. Curr Opin Genet Dev 2002; 12(1): 47–52.
- Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell 2002; 2(2): 103–112.
- Weinberg RA. pRb and control of the cell cycle clock. In: Weinberg RA (ed.). The biology of cancer. New York: Garland Science 2007: 255–307.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 1999; 13(12): 1501–1512.
- Martinsson HS, Starborg M, Erlandsson F et al. Single cell analysis of G1 check points—the relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb. Exp Cell Res 2005; 305(2): 383–391.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA et al. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. EMBO J 1999; 18(6): 1571–1583.
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell 1999; 98(6): 859–869.
- Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. Mol Cell Biol 1998; 18(2): 753–761.
- Foster DA, Yellen P, Xu L et al. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). Genes Cancer 2010; 1(11): 1124–1131.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A et al. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. Genes Dev 1995; 9(19): 2364–2372.
- Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. Genes Dev 2002; 16(24): 3277–3289.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel V et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. Cell 2004; 118(4): 477–491.
- Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M et al. Lineage-specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. Br J Haematol 2000; 110(3): 663–673.
- Dai MS, Mantel CR, Xia ZB et al. An expansion phase precedes terminal erythroid differentiation of hematopoietic progenitor cells from cord blood in vitro and is associated with up-regulation of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2. Blood 2000; 96(12): 3985–3987.
- Kato JY, Sherr CJ. Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(24): 11513–11517.
- Zimmer JM, Ladd D, Jackson CW et al. A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle. Mol Cell Biol 1997; 17(12): 7248–7259.
- Sun S, Zimmer JM, Toselli P et al. Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes. Haematologica 2001; 86(1): 17–23.
- Solvason N, Wu WW, Kabra N et al. Induction of cell cycle regulatory proteins in anti-immunoglobulin-stimulated mature B lymphocytes. J Exp Med 1996; 184(2): 407–417.
- Tanguay DA, Chiles TC. Regulation of the catalytic subunit (p34<sup>PSK-13</sup>/cdk4) for the major D-type cyclin in mature B lymphocytes. J Immunol 1996; 156(2): 539–548.
- Solvason N, Wu WW, Parry D et al. Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. Int Immunol 2000; 12(5): 631–638.
- Lam EW, Glassford J, Banerji L et al. Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. J Biol Chem 2000; 275(5): 3479–3484.
- Motokura T, Bloom T, Kim HG et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. Nature 1991; 350(6318): 512–515.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. Blood 2005; 106(13): 4315–4321.
- Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R et al. Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. Blood 1995; 85(10): 2870–2876.
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. Blood 2005; 106(1): 296–303.
- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. Leukemia 2009; 23(12): 2210–2221.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. J Clin Oncol 2005; 23(26): 6333–6338.
- Kuroda Y, Sakai A, Tsuyama N et al. Ectopic cyclin D1 overexpression increases chemosensitivity but not cell proliferation in multiple myeloma. Int J Oncol 2008; 33(6): 1201–1213.
- Roué G, Pichereau V, Lincet H et al. Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. Oncogene 2008; 27(36): 4909–4920.
- Liu M, Aneja R, Liu C et al. Inhibition of the mitotic kinesin Eg5 up-regulates Hsp70 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in multiple myeloma cells. J Biol Chem 2006; 281(26): 18090–18097.
- Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. Nature 2011; 474(7350): 230–234.
- Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB et al. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. EMBO J 1994; 13(15): 3487–3495.
- Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML et al. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. EMBO J 1994; 13(9): 2124–2130.