

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE

ÚSTAV KLINICKÉ A MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE

**ANALÝZA KLONÁLNÍHO PŘESKUPENÍ IGH A TCR RECEPTORŮ
V DIAGNOSTICE LYMFOPROLIFERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ
Z BIOPTICKÝCH VZORKŮ**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

OLOMOUC 2015

Mgr. MICHAELA ŠVÁCHOVÁ

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE

ÚSTAV KLINICKÉ A MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE

Mgr. MICHAELA ŠVÁCHOVÁ

**ANALÝZA KLONÁLNÍHO PŘESKUPENÍ IGH A TCR RECEPTORŮ
V DIAGNOSTICE LYMFOPROLIFERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ
Z BIOPTICKÝCH VZORKŮ**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

ŠKOLITEL: Mgr. JAN BOUCHAL, Ph.D.

STUDIJNÍ OBOR: LÉKAŘSKÁ BIOLOGIE

OLOMOUC 2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu a jiné prameny.

V práci jsou uvedeny výsledky imunohistochemie a klinického hodnocení, které byly získány ve spolupráci s MUDr. Patrikem Flodrem z Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a FN v Olomouci.

V Olomouci 21. ledna 2015

Mgr. Michaela Šváchová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D. za odborné vedení během celého postgraduálního studia, za konzultace, rady a pomoc při zpracování dizertační práce. Mé poděkování patří kolegům z Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a FN v Olomouci, MUDr. Patriku Flodrovi, za spolupráci při prezentaci vybraných komplikovaných případů a doc. MUDr. Martinu Tichému, CSc., za cenné rady a konzultace. Děkuji všem spolupracovníkům za vytvoření příjemného pracovního prostředí a především pak Mgr. Janě Steigerové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Aleně Lukášové, Evě Pimrové a Janě Holinkové za zajištění technické pomoci v laboratoři a Lence Prokopové za pomoc při zpracování dizertační práce. A v neposlední řadě patří velké poděkování celé mé rodině, synům Danielovi, Michalovi a Martinovi za trpělivost a mému příteli za podporu a pochopení během celého mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	8
1.1. Buňky a tkáně imunitního systému.....	8
1.1.1. Hematopoetické kmenové buňky	9
1.1.2. Vývoj B a T lymfocytů	11
1.1.3. Kontrola normální buněčné proliferace	13
1.2. B lymfocyty	14
1.2.1. Vývoj B-lymfocytů nezávislý na přítomnosti antigenu.....	15
1.2.1.1. Pro-B lymfocyt	15
1.2.1.2. Pre-B lymfocyt	16
1.2.1.3. Nezralý B lymfocyt.....	17
1.2.1.4. Zralý B lymfocyt.....	17
1.2.2. Vývoj B-lymfocytů závislý na přítomnosti antigenu.....	18
1.2.2.1. Germinální centrum (zárodečné centrum).....	20
1.2.2.2. Plazmatické buňky.....	22
1.2.2.3. Paměťové buňky	23
1.2.2.4. B-buněčný receptor	23
1.3. T lymfocyty	27
1.3.1. Pro-T lymfocyty.....	27
1.3.2. Pre-T lymfocyty.....	28
1.3.3. Zralé T lymfocyty	29
1.3.4. Paměťové T buňky	30
1.3.5. T-buněčný receptor.....	31
1.4. V(D)J rekombinace.....	34
1.4.1. Organizace zárodečných Ig a TCR genů	35
1.4.2. RAG1 a RAG2	37
1.4.3. Rekombinační signální sekvence.....	38
1.4.4. Mechanismus V(D)J rekombinace	38

1.4.5.	NHEJ oprava	41
1.5.	Lymfoproliferativní onemocnění	43
1.5.1.	Klasifikace lymfoproliferativních onemocnění.....	43
1.5.2.	Stručná charakteristika vybraných lymfoproliferativních onemocnění	46
1.5.2.1.	Prekurzorové B-buněčné neoplazie z nezralých B buněk	47
1.5.2.2.	Periferní B-buněčné neoplazie ze zralých B buněk.....	48
1.5.2.3.	Prekurzorové T-buněčné neoplazie z nezralých T buněk.....	52
1.5.2.4.	Periferní T-buněčné a NK-buněčné neoplazie ze zralých T a NK buněk..	53
1.5.2.5.	Hodgkinův lymfom (neoplazie z buněk Reedové-Sternberga).....	55
2.	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	56
3.	MATERIÁL A METODY	57
3.1.	Příprava tkání, izolace a kvantifikace DNA	57
3.1.1.	Zpracování bioptického materiálu	57
3.1.2.	Odparafínování tkáně	57
3.1.3.	Izolace genomové DNA.....	58
3.1.4.	Měření koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky.....	59
3.2.	Vyšetření klonality IgH a TCR.....	59
3.2.1.	Polymerázová řetězová reakce	59
3.2.2.	Kontrola integrity DNA pomocí kontrolní multiplex PCR.....	60
3.2.3.	Multiplexní PCR a heteroduplexní analýza pro IgH a TCR geny.....	60
3.2.4.	Elektroforéza v agarózovém a polyakrylamidovém gelu	64
3.2.5.	Zpevnění, barvení a snímání gelu CCD kamerou	65
3.3.	Imunohistochemické barvení	66
4.	VÝSLEDKY	67
4.1.	Zavedení metody analýzy klonality IgH a TCR	67
4.1.1.	Extrakce gDNA z bioptických vzorků a význam rozdílné fixace tkání.....	67
4.1.2.	Zavedení a optimalizace metody PCR k detekci klonality B a T buněk	69
4.1.3.	Optimalizace elektroforézy a vizualizace gelů	69

4.2.	Využití PCR analýzy v diagnostice lymfoproliferativních onemocnění	70
4.2.1.	Přehled vyšetření a klonální přeskupení u non-neoplastických lézí	70
4.2.2.	Analýza klonálního přeskupení IgH B buněk	73
4.2.3.	Analýza klonálního přeskupení TCR T buněk.....	73
4.3.	Histologická a molekulární analýza problematických případů	74
5.	DISKUZE	80
6.	SOUHRN	86
7.	SUMMARY	88
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	90
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ.....	93
10.	LITERATURA	97

1. ÚVOD

Lymfoproliferativní onemocnění jsou obvykle rutinně diagnostikována na základě histomorfologických a imunohistochemických kritérií. Ačkoliv data, získaná pomocí těchto metod jsou průkazná, v 5-10% případů je velice obtížné rozlišit reaktivní (polyklonální) lymfoidní proliferaci od neoplastické (monoklonální). Ke stanovení diagnózy, která je základní a nezbytnou podmínkou pro zahájení úspěšné léčby, se v těchto nejednoznačných případech využívá již zcela rutinně molekulárně-biologických metod, mezi něž patří polymerázová řetězová reakce (PCR). Pomocí této metody je možné detekovat klonální přeskupení imunoglobulinových (Ig) a T-buněčných receptorových (TCR) genů u maligních lymfomů a přispět tak ke správné interpretaci zjištěných dat a stanovení co nejspolehlivější diagnózy.

1.1. Buňky a tkáně imunitního systému

Imunitní systém člověka představuje komplex různých mechanismů, zajišťujících integritu organismu včetně jeho schopnosti zajistit ochranu proti různým onemocněním identifikací a likvidací patogenů a nádorových buněk. Důležitou složkou tohoto komplexu je lymfatický systém, jehož dvě nejdůležitější funkce jsou udržování rovnováhy tělních tekutin ve vnitřním prostředí organismu a zajištění imunity.

Imunitní systém představují v první řadě primární generativní orgány (kostní dřeň a thymus), které jsou místem tvorby a zrání B a T lymfocytů a sekundární periferní opouzdržené orgány (lymfatické uzliny a slezina), kde jsou naivní zralé lymfocyty aktivovány antigeny. Největší koncentraci lymfoidní tkáně nicméně nacházíme v neopouzdržených sekundárních orgánech, které tvoří zejména lymfoidní tkáň, spojenou se sliznicemi (MALT, mucosal-associated lymphoid tissue), např. lamina propria a Peyerovy plaky ve slizničním vazivu tenkého střeva (proto nesou i označení GALT, gut-associated lymphoid tissue), Waldeyerův okruh, zahrnující krční a nosní mandle nebo lymfoidní tkáň dýchacích cest spojenou s průduškami (BALT, bronchial-associated lymphoid tissue). Lymfoidní tkáň

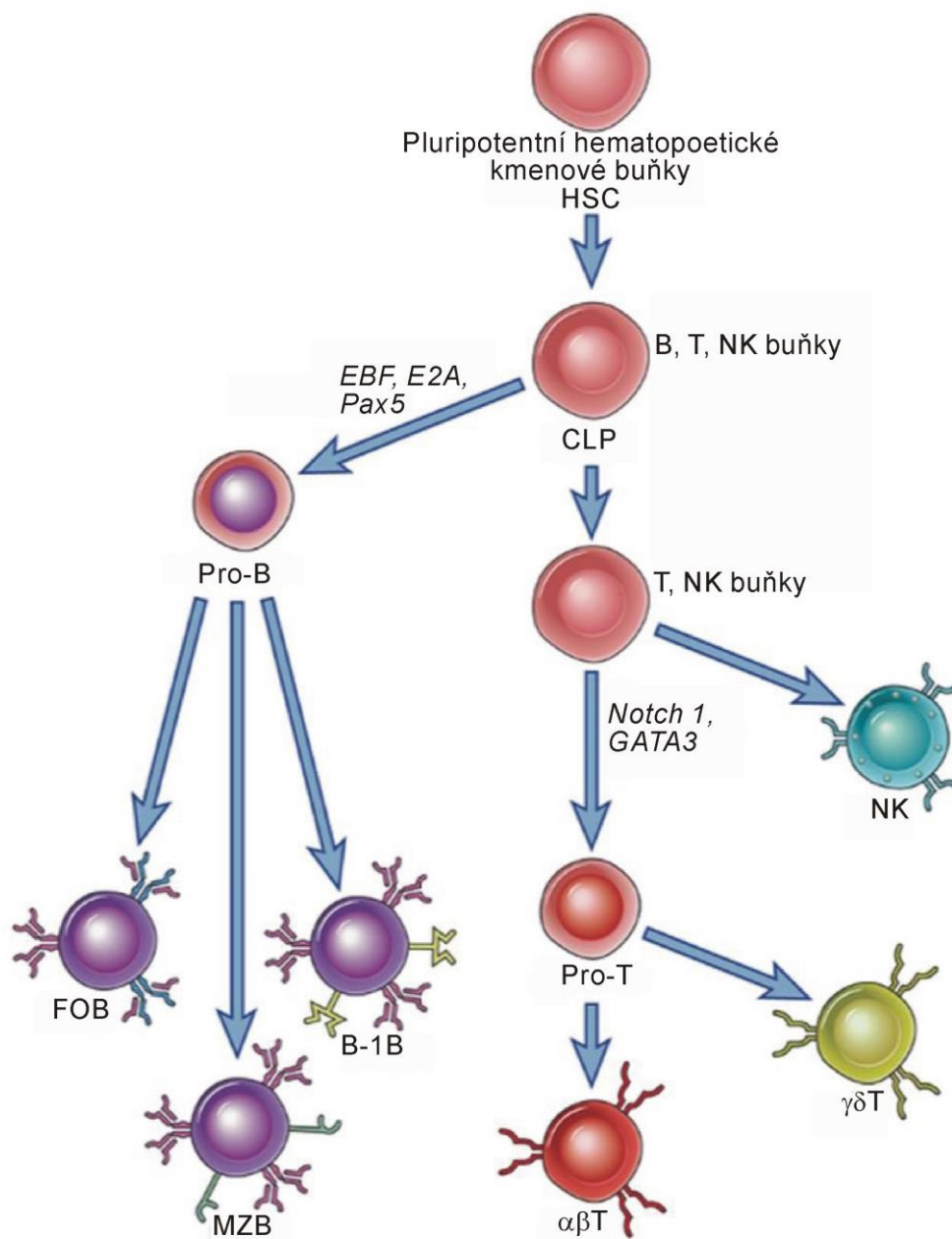
spojená se sliznicemi se podílí především na místně lokalizované imunitě (Ferenčík et al., 2005).

Lymfatické cévy, kopírující krevní řečiště, jsou specializovanou složkou oběhového systému, která neustále odvádí lymfu, extracelulární tekutinu, z tkání do lymfatických uzlin a do krve. Lymfatické uzliny jsou sekundární lymfoidní orgány, lokalizované podél lymfatických cév, kde se shromažďují naivní B a T lymfocyty. Slezina je zodpovědná za odstraňování starých nebo opsonizovaných krevních buněk z oběhu a je místem zahájení imunitní odpovědi v reakci na antigeny v krvi. Jak lymfatická uzlina, tak i bílá pulpa sleziny jsou členěny do folikulů, osídlených B buňkami, a do T-zóny, která je místem výskytu i zralých dendritických buněk, které jako buňky nabízející antigen (APC, antigen presenting cells) aktivují naivní T buňky. Folikulární dendritické buňky (FDC) aktivují B buňky v tzv. germinálním centru k produkci protilátek v rámci humorální imunitní odpovědi. Buňkami, které zastávají hlavní efektorové funkce v procesu přirozené i získané imunitní odpovědi, jsou tedy kromě lymfocytů i fagocyty (včetně neutrofilů a makrofágů) a APC buňky (makrofágy a dendritické buňky) (Abbas et al., 2012).

1.1.1. Hematopoetické kmenové buňky

Buňky imunitního systému se vyvíjejí z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (HSC, hematopoietic stem cell). HSC mají schopnost sebeobnovy (self-renewal) a zároveň v procesu krvetvorby, hematopoézy, dávají vznik všem krevním buněčným liniím. Hematopoetické kmenové buňky, které je možné identifikovat přítomností markerů, včetně typického povrchového antigenu CD34⁺ (CD, diferenciační skupina), c-Kit⁺ receptoru a absencí LIN⁻ (liniově-specifické markery), vznikají během prenatálního vývoje z hemangioblastu v mezodermální tkáni ve žloutkovém váčku, a pak se přesunují do aortogonadální mezonefros a následně do placenty a jater. Ke konci embryonálního vývoje přechází do nově vznikající kostní dřeně, kde stromální buňky a extracelulární matrix poskytují kmenovým buňkám zásobování a pomoc při regulaci diferenciace (Pospíšilová et al., 2013). Prvním krokem diferenciace pluripotentních HSC je rozlišení lymfoidní

a myeloidní/erytroidní buněčné linie, vytvářející populace progenitorových buněk. Z multipotentních lymfoidních progenitorových buněk (CLP, common lymphoid progenitor) vznikají T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK (natural killer) buňky a některé dendritické buňky (Obr. 1).



Obr. 1: Diferenciace B- a T-buněčné linie z prekurzorů. HSC, hematopoietic stem cell; CLP, common lymphoid progenitor; FOB, follicular B cell; MZB, marginal zone B cell; B-1B, B-1 B cell (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.1.2. Vývoj B a T lymfocytů

Nasměrování vývoje do B či T linie závisí na signálech z povrchových receptorů buněk. Jednotlivá stadia proliferace a diferenciaci B a T buněk jsou řízena a kontrolována:

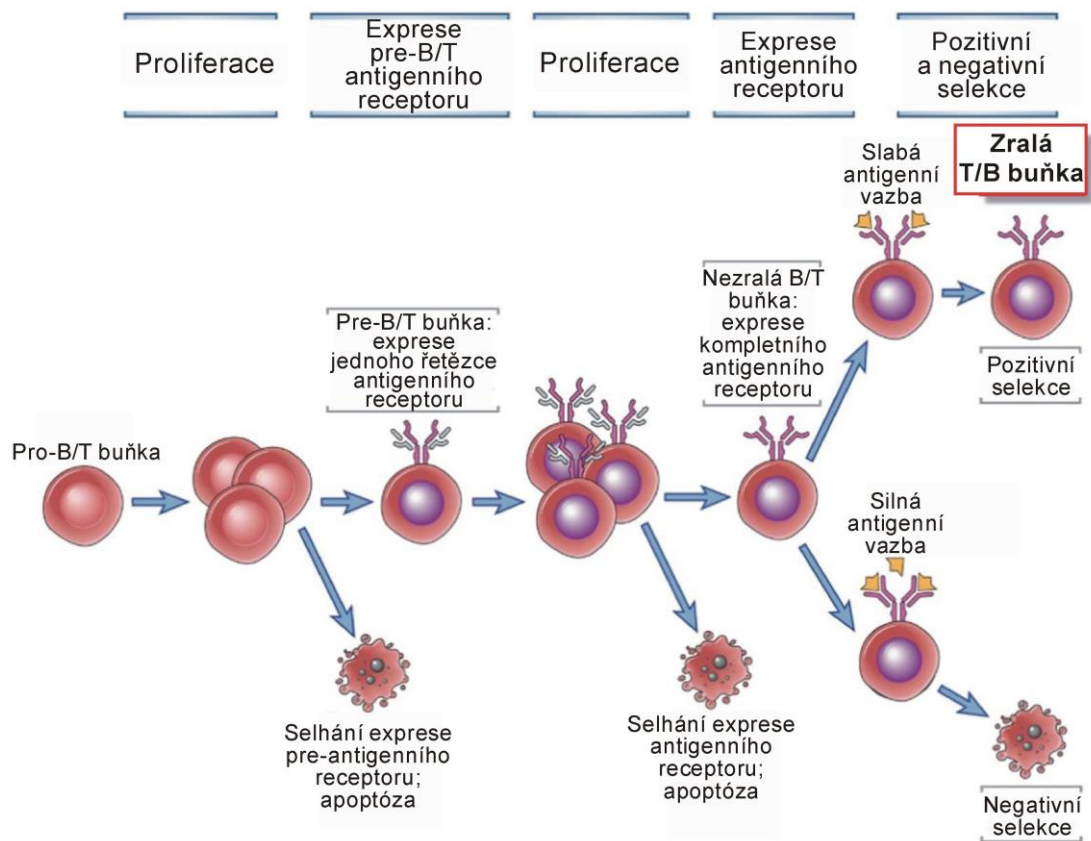
(a) celou řadou liniově-specifických transkripčních faktorů (např. EBF, E2A a Pax-5 u B buněk, Notch1 a GATA-3 u T buněk), růstovými faktory a cytokiny (např. CSF faktory stimulačními kolonie nebo interleukinem IL-7) nezbytnými pro proliferaci progenitorových T buněk (Abbas et al., 2012);

(b) DNA rekombinázami (RAG1 a RAG2, recombinase activating gene) a enzymem terminální deoxynukleotidyltransferázou (TdT), které řídí přeskupení a diverzifikaci B a T buněčných antigenních receptorových genových segmentů (subgenů) (Cobb et al., 2006; Abbas et al., 2012; Pospíšilová et al., 2013);

(c) DNA modifikujícím enzymem cytidin deaminázou (AID, activation-induced cytosine deaminase), která je klíčová v procesech izotypového přesmyku imunoglobulinových tříd a tzv. afinitní maturace, které probíhají v germinálních centrech sekundárních lymfoidních folikulů. Podstatou afinitní maturace je vnášení tzv. somatických hypermutací do variabilních oblastí přeskupených Ig genů s cílem produkovat protilátky s vysokou afinitou k antigenu (Küppers et al., 1999; Abbas et al., 2012; Pospíšilová et al., 2013).

Proliferační aktivita raných lymfocytů ustává před procesem přeskupení antigenních receptorových genů, což je klíčový moment ve vývoji lymfocytů, který je zodpovědný za tvorbu a obrovskou variabilitu protilátek a T buněčných receptorů. Probíhá bez závislosti na přítomnosti antigenu (podrobně viz kap. 1.4.). Proliferují pak pouze buňky, u kterých bylo přeskupení úspěšné a exprimují se geny, kódující první antigenní receptorový řetězec ve formě pre-B (pre-BCR) a pre-T (pre-TCR) buněčného receptoru. V B-buněčné linii je to protein těžkého řetězce Ig a TCR β řetězec $\alpha\beta$ T buněk. Takto jsou vyselektovány buňky, které přežívají, proliferují, diferencují a mohou pokračovat v další fázi maturace. Buňky, které nemají na svém povrchu funkční pre-antigenní receptory, nemohou přijímat pro přežití nezbytné signály a podstupují apoptózu (programovaná buněčná smrt). Dalším kontrolním bodem ve vývoji lymfocytů v primárních lymfoidních orgánech je proces *pozitivní selekce*,

který umožňuje přežití pouze lymfocytů s kompletně sestaveným antigenním receptorem. *Negativní selekci* se eliminují nebo mění lymfocyty s antigenními receptory, které silně reagují na vlastní antigeny, přítomné v generativních lymfoidních orgánech (Obr. 2). Vyvíjející se T buňky s vysokou afinitou k vlastním antigenům jsou eliminovány apoptózou, fenoménem označovaným jako *klonální delece*. Silně autoreaktivní nezralé B buňky mohou být v kostní dřeni indukovány ke změně specifiity Ig a podstoupit receptorovou editaci (receptor editing). Je to proces, který zahrnuje reaktivaci RAG genů, další VJ rekombinaci lehkých řetězců imunoglobulinu (IgL) a produkci nových, čímž je buňce umožněno exprimovat odlišný Ig receptor, již ne autoreaktivní (Küppers et al., 1999; Azulay-Debby a Melamed, 2007; Abbas et al., 2012). V případě selhání podstupují také autoreaktivní B buňky klonální delecii. Negativní selekce nezralých lymfocytů, jež je důležitým mechanismem zajišťujícím toleranci vůči vlastním antigenům, se také označuje jako tzv. *centrální tolerance* (Abbas et al., 2012).



Obr. 2: Kontrolní body maturace B a T lymfocytů (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.1.3. Kontrola normální buněčné proliferace

Ve všech tkáních lidského těla je velikost buněčné populace regulována relativně rychlými procesy proliferace, diferenciací a apoptózy. Rovnováha těchto dějů, především pak proliferace a apoptózy, umožňuje zachování tzv. tkáňové homeostázy a podporu imunitního dozoru. Tkáňová rovnováha může být narušena i za fyziologických podmínek, kdy poškození buněk a tkání zahájí procesy reparace či regenerace nebo realizuje obrannou imunitní odpověď v reakci na vstup cizorodých agens do organismu aktivní proliferací lymfocytů. U zdravého jedince je tento proces pod neustálou kontrolou, plně regulovaný a v rovnováze a po odeznění příčin se vrací do normálu. V opačném případě, kdy buňky nejsou z nějakého důvodu schopny reagovat na vnější či vnitřní fyziologické signály regulace apoptózy, vyhnou se kontrole a nadměrná proliferace může vést ke vzniku celé řady onemocnění, včetně nádorových a autoimunitních.

Množení (mitotické dělení) buněk je řízeno tak, aby odpovídalo potřebám organismu. V časných fázích vývoje jedince převažuje množení buněk (proliferace) nad zánikem, tedy apoptózou, v dospělosti je v rovnováze, ve stáří pak převažuje involuce (Masopust et al., 2003). Apoptóza, poprvé popsána v roce 1972, spolu s koordinovaným procesem buněčné proliferace zajišťuje formování eukaryotického organismu během vývoje, vytváření všech orgánů, tkání a jejich postupné revitalizace během života. Porušení tohoto provázaného mechanismu genovými mutacemi, ať už na straně regulace buněčného cyklu či apoptózy, potom vede ke zhoubnému nádorovému bujení (Diss et al., 2012; Pospíšilová et al., 2013).

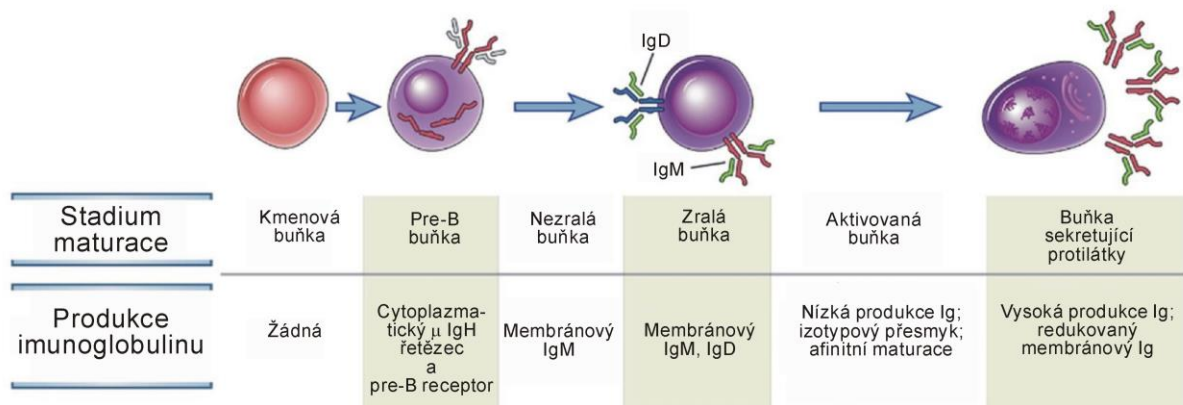
Apoptóza má nezastupitelnou roli i ve fungování krevního systému, např. v procesech pozitivní a negativní selekce funkčních buněk imunitního systému, během přeskupování genových segmentů vyvíjejících se lymfocytů a během procesů, probíhajících v germinálních centrech.

Mutace genů, kontrolujících apoptózu lymfocytů, jsou spojovány s vysokým rizikem vzniku jak autoimunitních lymfoproliferací, tak lymfomů, zvláště B-buněčných. Pacienti s autoimunitními syndromy, obvykle způsobené germinálními mutacemi FAS, mají vysoké riziko vzniku B-buněčných lymfomů a Hodgkinova lymfomu (Jaffe et al., 2008).

Z morfologického hlediska je apoptóza charakterizována změnami buněčné membrány, jadernou kondenzací, buněčnou redukcí, fragmentací DNA a tvorbou apoptotických tělísek. Je řízena vysoce organizovanou signální transdukcí, která je regulována vnějšími a vnitřními faktory, které ovlivňují navození apoptózy vnější receptorovou drahou nebo vnitřní mitochondriální. Některé buněčné typy využívají alternativní mechanismy apoptózy. Např. cytotoxické T lymfocyty a NK (přírození zabíječi) využívají cytotoxická granula, obsahující perforin a granzym pro eliminaci buněk infikovaných virem. Procesem apoptózy je zajištěna fragmentace buňky a odstranění vzniklých apoptotických tělísek fagocytózou sousedními buňkami či makrofágy bez vzniku potenciálně škodlivých zánětů (Rosypal, 2000; Pospíšilová et al., 2013).

1.2. B lymfocyty

Nové B buňky jsou v lidském organismu produkovány po celý život (Nuñez et al., 1996). Nejprve v játrech fétu, kde jsou označovány jako B-1 B buňky a poté se tvoří v kostní dřeni cirkulující B buňky, označovány jako folikulární B buňky. U ptáků tento proces probíhá v *Burza Fabricii*, proto název B lymfocyty. Během maturace prochází buňky B lymfocytární linie vývojovými stádii, které je možné odlišit charakteristickými povrchovými markery a specifickými modely genové exprese Ig. Během vývojové fáze nezávislé na antigenu buňky exprimují povrchové imunoglobuliny, což je nezbytnou podmínkou pro jejich přežití a funkci. Zralé B buňky pak migrují krví do sekundárních lymfoidních orgánů, kde jsou po interakci s exogenními antigeny aktivovány k terminální diferenciaci na výkonné buňky. Během antigen–dependentní fáze dochází k produkci specifických plazmatických a paměťových buněk, zajišťujících imunitní reakce (Obr. 3).



Obr. 3: Exprese Ig během maturace B lymfocytů (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.2.1. Vývoj B-lymfocytů nezávislý na přítomnosti antigenu

1.2.1.1. Pro-B lymfocyt

Vývoj B lymfocytů začíná od pluripotentní hematopoetické kmenové buňky, která se diferencuje na lymfoidní kmenovou buňku a dále na pro-B lymfocyt (progenitorový B lymfocyt) za účasti vnějších faktorů, jako např. SCF (stem cell factor), interleukinů IL-3, IL-7 a inzulinu podobnému růstovému faktoru 1. Exprese transkripčního faktoru Pax-5 je nezbytná nejen pro vznik pro-B buněk, ale i pro jejich další vývoj. Ve vývojových stádiích pro-B až pre-B lymfocytů se aktivuje rekombinázový komplex RAG1 a RAG2, který katalyzuje přeskupení subgenů (podrobněji viz kap. 1.4.).

V lymfocytech se během procesu přeskupení subgenů pro těžké řetězce imunoglobulinů (IgH, immunoglobulin heavy chain) aktivuje terminální deoxynukleotidyl-transferáza (TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase), specializovaná DNA polymeráza, která zařazuje zcela náhodně N-nukleotidy v místech zlomů DNA, které vznikly štěpením komplexů RAG1 a RAG2 a zvyšuje tak variabilitu Ig (Mederois and Carr, 1999; Tai a Peh, 2003) (viz kap. 1.4.). Ukončením přeskupení subgenů pro IgH se aktivita tohoto enzymu vypíná v pre-B lymfocytech, kdy začíná přeskupování subgenů pro lehké řetězce imunoglobulinů, proto se zde N-nukleotidy nevyskytují (Abbas et al., 2012).

1.2.1.2. Pre-B lymfocyt

Během této vývojové fáze dochází k definitivnímu uspořádání genu pro těžký řetězec μ , který se exprimuje jako první a vytváří spolu s tzv. náhražkovým lehkým řetězcem, složeným ze dvou proteinů $\lambda 5$ a Vpre-B, pre-B receptor (pre-B BCR, prekurzor receptoru pro antigen na povrchu B buněk). Exprese pre-BCR, jehož součástí je i heterodimer signálních molekul $Ig\alpha/Ig\beta$, je v procesu maturace B buněk prvním kontrolním bodem, kdy jsou buňky pozitivně selektovány pro další vývoj. Pokud je tedy první přeskupení těžkých řetězců na první alele produktivní a exprimuje se, k dalšímu přeskupení již nedochází, druhá alela zůstává v zárodečné konfiguraci (van Dongen et al., 2003). Jedná se o *alelickou exkluzi*, fenomén, kterým je zajištěno, že každá B buňka exprimuje jeden klonálně specifický receptor. Zbylé buňky jsou odstraněny apoptózou.

Druhým způsobem, jakým pre-BCR reguluje produkci antigenních receptorů, je stimulace přeskupení genů pro lehký řetězec κ (Abbas et al., 2012). Na povrchu B lymfocytu se při vyžívání exprimují i další molekuly, jako jsou CD79a a CD79b, které tvoří signální transdukční složku pre-BCR a je také součástí BCR receptoru na povrchu zralých B buněk; CD20, jako Ca^{++} iontový kanál reguluje B-buněčnou aktivaci a buněčný cyklus (Cragg et al., 2005); CD10 (CALLA, common acute lymphoblastic leukemia antigen), metaloproteináza inaktivující různé peptidové hormony; CD40 (tumor nekrotizující faktor), člen receptorové TNF rodiny (TNFR, tumor necrosis factor receptor), účastní se regulace vývoje a aktivace B buněk, přesmyku imunoglobulinových tříd a zastávající kostimulační roli v interakci mezi CD40 a ligandy T buněk (Durie et al., 1994; Armitage et al., 1992, Abbas et al., 2012); CD22, také označována jako B-lymfocytární buněčná adhezivní molekula (BL-CAM), představuje důležitý imunoterapeutický cíl u B-buněčných malignit, zvláště HCL (hairy cell leukemia) (Matsushita et al., 2008).

1.2.1.3. Nezralý B lymfocyt

Řetězec μ , který se jako první exprimuje a nejdříve se vyskytuje jen v cytoplasmě (označován jako cytoplazmatický μ -řetězec), se v nezralém B lymfocytu stává složkou povrchového (membránového) IgM, kdy je ukončeno přeskupování subgenů pro lehké řetězce κ nebo λ podobným způsobem, jako u IgH, ale bez přítomnosti D segmentu. Produkce κ řetězce brání druhému přeskupení řetězce λ , které se objevuje pouze v případě neproduktivního přeskupení řetězce κ . Hovoříme o fenoménu označovaném jako *izotypická exkluze* lehkých řetězců (Van Dongen et al., 2003, Pospíšilová et al., 2013). IgM molekuly exprimované na buněčném povrchu spolu s $Ig\alpha/Ig\beta$ tvoří funkční BCR, který zajišťuje přežití buněk a vypnutí exprese RAG genů a brání tak případnému dalšímu přeskupení. Nezralé buňky neproliferují ani se nediferencují, ale pokud rozpoznají v kostní dřeni vlastní antigeny s vysokou afinitou, mohou podstoupit receptorovou editaci (viz kap. 1.2.1.2.) (Küppers et al., 1999) nebo apoptózu, což představuje proces negativní selekce. Nezralé buňky, které nejsou autoreaktivní, opouští kostní dřeň a maturaci dokončují ve slezině před migrací do dalších periferních orgánů (Abbas et al., 2012).

1.2.1.4. Zralý B lymfocyt

Zralé B lymfocyty se dělí na podskupiny v závislosti na vývoji z různých progenitorů. HSC buňky odvozené z jater fétu jsou prekurzory B-1 B buněk ($CD5^+$ buňky), naopak B lymfocyty, vznikající z prekurzorů kostní dřene se označují jako B-2 B buňky ($CD5^-$ buňky), které diferencují v buňky folikulární nebo buňky marginální zóny (Obr. 1). Většina zralých B buněk patří do skupiny folikulárních B buněk, které se vyznačují současnou expresí těžkých Ig řetězců μ a δ , a ve spojení se stejným lehkým řetězcem κ nebo λ produkují dva membránové receptory se stejnou antigenní specifitou. Tyto zralé folikulární $IgM^+ IgD^+$ B buňky se také nazývají cirkulující, díky jejich migraci mezi lymfoidními orgány. Buňky B-1, které se hojně vyskytují v peritoneu a lymfoidních tkáních spojených se sliznicemi, vykazují menší diverzitu než ostatní B buňky, protože ve fetálních játrech nedochází k expresi TdT.

B-1 buňky stejně jako B buňky marginální zóny sekretují IgM, který reaguje s mikrobiálními antigeny. Buňky marginální zóny tudíž velice rychle reagují na mikroby vyskytující se v krvi a diferencují na krátce žijící, IgM sekretující, plazmatické buňky (Abbas et al., 2012).

K přeměně na dlouhožijící zralé B lymfocyty dochází za předpokladu sestavení funkčního BCR, což umožňuje interakci s buňkami nabízejícími antigen na svém povrchu. B buňky jsou pak buď eliminovány apoptózou nebo podstoupením genového přesmyku tříd produkují imunoglobuliny se stejnou specifitou, ale se změněnou efektorovou funkcí (Küppers et al., 1999).

IgM⁺IgD⁺ B lymfocyty představují hlavní zdroj zralých B lymfocytů, účastnících se primární imunitní odpovědi. Zralé B lymfocyty exprimují povrchové markery CD19 (součást koreceptorového komplexu), CD20, CD21 (CR2, complement receptor type 2), CD40 a molekuly hlavního histokompatibilního systému MHC II (MHC, major histocompatibility complex). Jako součást B-buněčného receptorového komplexu se exprimují řetězce CD79a a CD79b (Ig α a Ig β), které tvoří heterodimer, účastnící se transdukce signálu po stimulaci antigenního receptoru B buněk (Minegishi et al., 1999; Gauld et al., 2002). Exprese CD10, CD34, komplexů RAG1, RAG2 a TdT je ukončena. V této fázi vývoje exprimují buňky Bcl-2 (anti-apoptotický protein) a unikají apoptóze přechodem do sekundárních lymfatických orgánů. Zde se exprimují povrchové molekuly CD44 (adhezivní molekula) a CD62-L (L-selektin), které hrají důležitou roli v mezibuněčných interakcích, buněčné adhezi, extravazaci a následné migraci lymfocytů (Stoolman et al., 1989). Více než 95% B buněk v periferní krvi a sekundárních lymfoidních orgánech exprimuje molekulu CD20, která má funkci iontového kanálu důležitého v B-buněčné aktivaci (Craig and Foon, 2008).

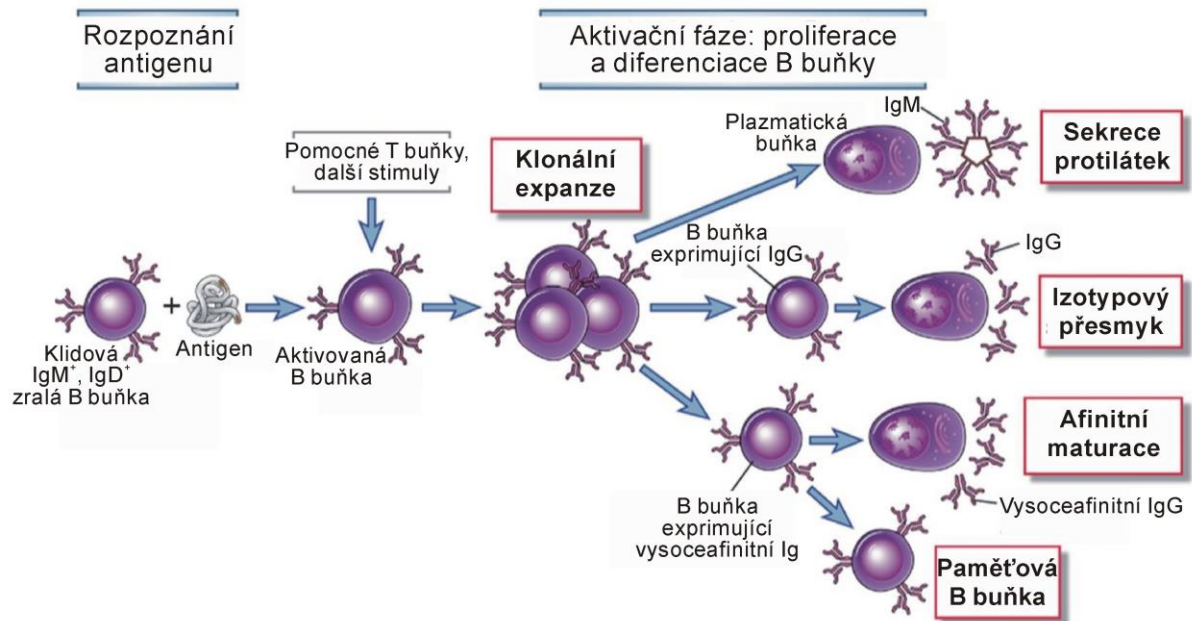
1.2.2. Vývoj B-lymfocytů závislý na přítomnosti antigenu

Zralé B lymfocyty, které se při přechodu do sekundárních lymfoidních orgánů nesetkaly s antigenem, jsou označovány jako naivní B buňky, nacházející se v klidové fázi (G₀ fáze buněčného cyklu). Takto cirkulují po dobu několika týdnů, a pokud nejsou aktivovány, podstupují apoptózu a jsou nahrazeny novými B buňkami. Setká-li se buňka

s antigenem, dochází k její aktivaci, přechodu z G_0 do G_1 fáze buněčného cyklu, stimulaci intenzivní proliferace, vedoucí ke klonální expanzi a diferenciaci, kulminující tvorbou paměťových buněk a buněk plazmatických, produkující protilátky (imunoglobuliny) (Obr. 4).

Aktivované buňky již neexprimují povrchový IgD a CD21, ale vyžadují expresi receptorů růstových faktorů, dále proteinů, zajišťujících mezibuněčnou interakci a molekul účastnících se vazeb aktivovaných B buněk v mikroprostředí sekundárních lymfoidních orgánů. Mezi tyto aktivační molekuly patří např. CD71, membránový receptor, vázající transferin, který je exprimován na proliferujících buňkách; CD25, transmembránový protein, přítomný na aktivovaných B a T buňkách a buněčný povrchový receptor smrti CD95 (Fas, Apo-1), člen TNF receptorové rodiny, který spouští po navázání ligandu CD95L (FasL) programovanou buněčnou smrt a může tak regulovat klonální expanzi autoreaktivních B buněk (Lam et al., 1997; Takahashi et al., 2001).

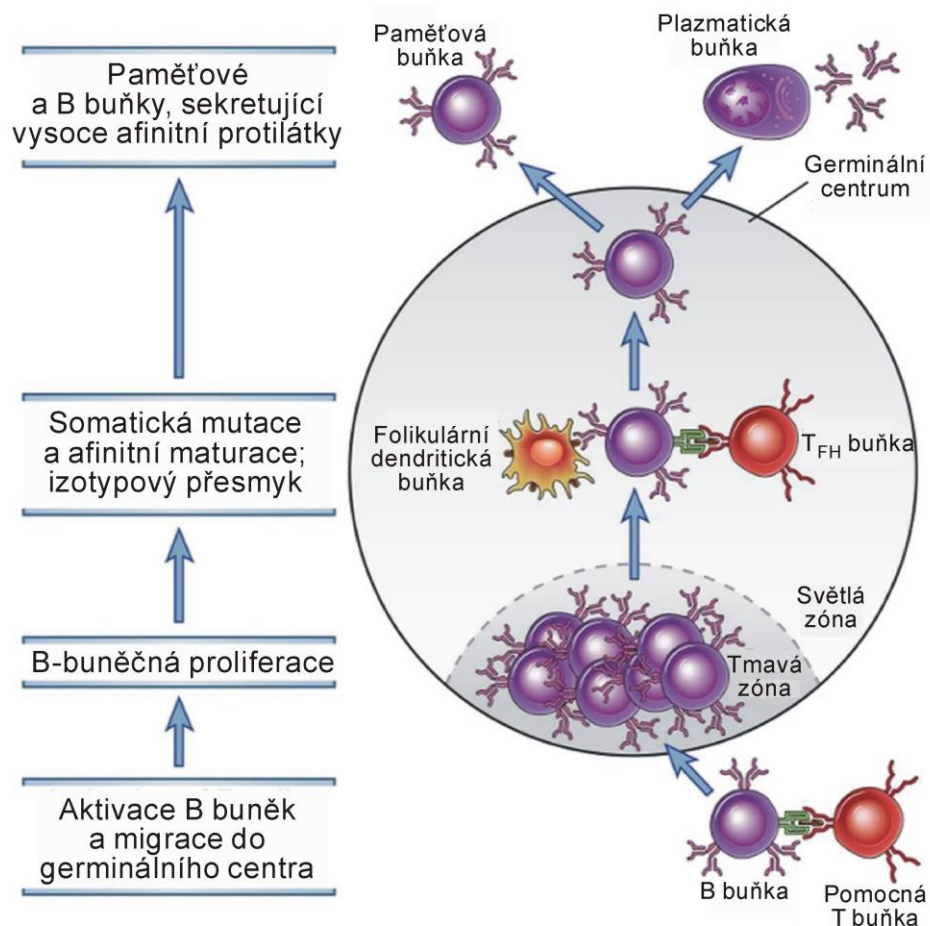
Aktivované T_H buňky (pomocné T lymfocyty) exprimují na svém povrchu ligand CD40, který se váže na receptor CD40 na povrchu antigenem stimulovaných B buněk a to v prostoru mezi folikuly a zónou T buněk sekundárních lymfoidních orgánů. K následné aktivaci B buněk pomocnými T buňkami dochází na dvou různých místech. T-dependentní B-buněčná aktivace imunitní odpovědi probíhá extrafolikulárně relativně brzy a ve folikulech germinálního centra, za přítomnosti specializovaných T_{FH} buněk (folikulární pomocné T buňky) probíhá za 4 až 7 dní. Výsledkem vazby CD40-CD40L jsou konformační změny, které přes aktivaci enzymové kaskády vedou až k aktivaci a translokaci transkripčních faktorů NF- κ B a AP-1 do jádra buňky, kde společně stimulují B buňky k proliferaci, diferenciaci a zvyšují syntézu a sekreci imunoglobulinů. Indukce transkripčních faktorů pomocí CD40 je také nezbytná pro následné formování germinálního centra a syntézu aktivací indukované cytidindeaminázy (AID), která je nezbytná v procesech izotypového přesmyku tříd a somatických mutací (Abbas et al., 2012; Pospíšilová et al., 2013) (Obr. 4).



Obr. 4: Fáze humorální B-buněčné odpovědi (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.2.2.1. Germinální centrum (zárodečné centrum)

Během primární imunitní odpovědi je produkována podtřída IgM s nízkou afinitou. Po následné antigenní stimulaci B-buněčných antigenních receptorů a CD40 vstupují B buňky do mikroprostředí folikulů germinálního centra (GC), kde proliferují a podstupují klonální expanzi (Rajewsky 1996; Hess et al., 1998; Abbas et al., 2012) (Obr. 5). V GC probíhá proces afinitní maturace, kterým se zvyšuje afinita protilátek ke konkrétnímu antigenu během T-dependentní humorální odpovědi a je výsledkem somatických mutací Ig genů. Tímto je zajištěno selektivní přežití B buněk, produkujících protilátky s nejvyšší afinitou (Küppers et al., 1999). Výskyt mutací je extrémně vysoký, až tisíckrát častější v porovnání se spontánními mutacemi v ostatních tkáních, proto se označují jako hypermutace (SHM, somatic hypermutation) (Peng et al., 1999). Mutace probíhají v oblasti V regionu, nejčastěji v CDR3 (complementarity determining region). Jejich výskyt je častější v IgG než IgM a přítomnost mutací koreluje se zvyšující se afinitou protilátek k antigenu, který indukoval imunitní odpověď (Küppers et al., 1999).



Obr. 5: Proliferace a vývoj B buněk v GC lymfatické uzliny (upraveno dle Abbas et al., 2012).

V konstantní oblasti Ig současně probíhají rekombinační děje označované jako přesmyk tříd (CSR, class-switch recombination), kterým dochází k produkci různých podtříd protilátek (IgG, IgA nebo IgE) (Küppers et al., 1999). SHM a CSR se spouští vazbou CD40, čímž dochází k indukci enzymu cytidindeaminázy, který exprimují intenzivně se dělící B buňky zárodečného centra označované jako centroblasty, tvořící tzv. tmavou zónu. Centrocyty, vznikající z hypermutovaných centroblastů a vytvářející anatomicky odlišnou tzv. světlou zónu, přicházejí v primárních folikulech do kontaktu s folikulárními dendritickými buňkami (FDC, follicular dendritic cell) a $CD4^+$ T_{FH} (folikulární pomocné T lymfocyty) buňkami. Jsou tak aktivovány k produkci protilátky s vysokou afinitou buď diferenciací na plazmatické buňky, které je sekretují, nebo se stávají paměťovými buňkami, které jsou naprogramovány po opakovaném kontaktu rozpoznat antigen. Diferenciace aktivovaných

B buněk na buňky plazmatické či paměťové závisí na signálech z B-buněčných receptorů, včetně antigenních a cytokinových, které indukují expresi specifických transkripčních faktorů, kontrolujících osud buňky (Abbas et al., 2012) (Obr. 5).

1.2.2.2. Plazmatické buňky

Potomstvo některých B buněk, které v reakci na antigen a T_H buňky proliferovalo, se diferencuje na plazmatické buňky. Tyto terminálně diferencované a morfologicky odlišné buňky, sekretující protilátky, se tvoří po aktivaci B buněk signály z BCR, CD40, TLR (Toll like receptor) a dalších receptorů, včetně cytokinových. Diferenciace je doprovázena represí Bcl-6, ztrátou exprese CD19, CD20 a transkripčního faktoru PAX5, klíčového inhibitoru plazmatické buněčné diferenciace, který je kontrolován transkripčním represorem Blimp1/PRDMI, regulátorem terminální B-buněčné diferenciace (Nera et al., 2006). Dále se exprimuje adhezivní molekula CD138, která představuje důležitý diagnostický marker plazmatických buněk, a také marker CD38, který se kromě své enzymatické funkce účastní mobilizace iontů Ca^{++} , signální transdukce a adheze.

Krátce žijící plazmatické buňky se tvoří během T-independentní odpovědi a během časně T-dependentní odpovědi v extrafolikulárních fokusech. Můžeme je nalézt v sekundárních lymfoidních orgánech a v periferních nelymfoidních tkáních. Dlouho žijící plazmatické buňky vznikají v germinálních centrech během T-dependentní imunitní odpovědi na antigen přijetím signálu z B-buněčných antigenních receptorů a cytokinu IL-21, produkovaného T_{FH} buňkami. Plazmatické buňky a jejich prekurzory, plazmablasty, mají schopnost osídlit kostní dřeň, slezinu a lymfatické uzliny, nicméně 70-80% plazmatických buněk osídluje střevo (Brandtzaeg et al., 1989). Většina těchto buněk sekretuje IgA a nese somaticky mutované variabilní oblasti genů, což potvrzuje germinální původ těchto buněk (Fischer a Küppers, 1998; Küppers et al., 1999).

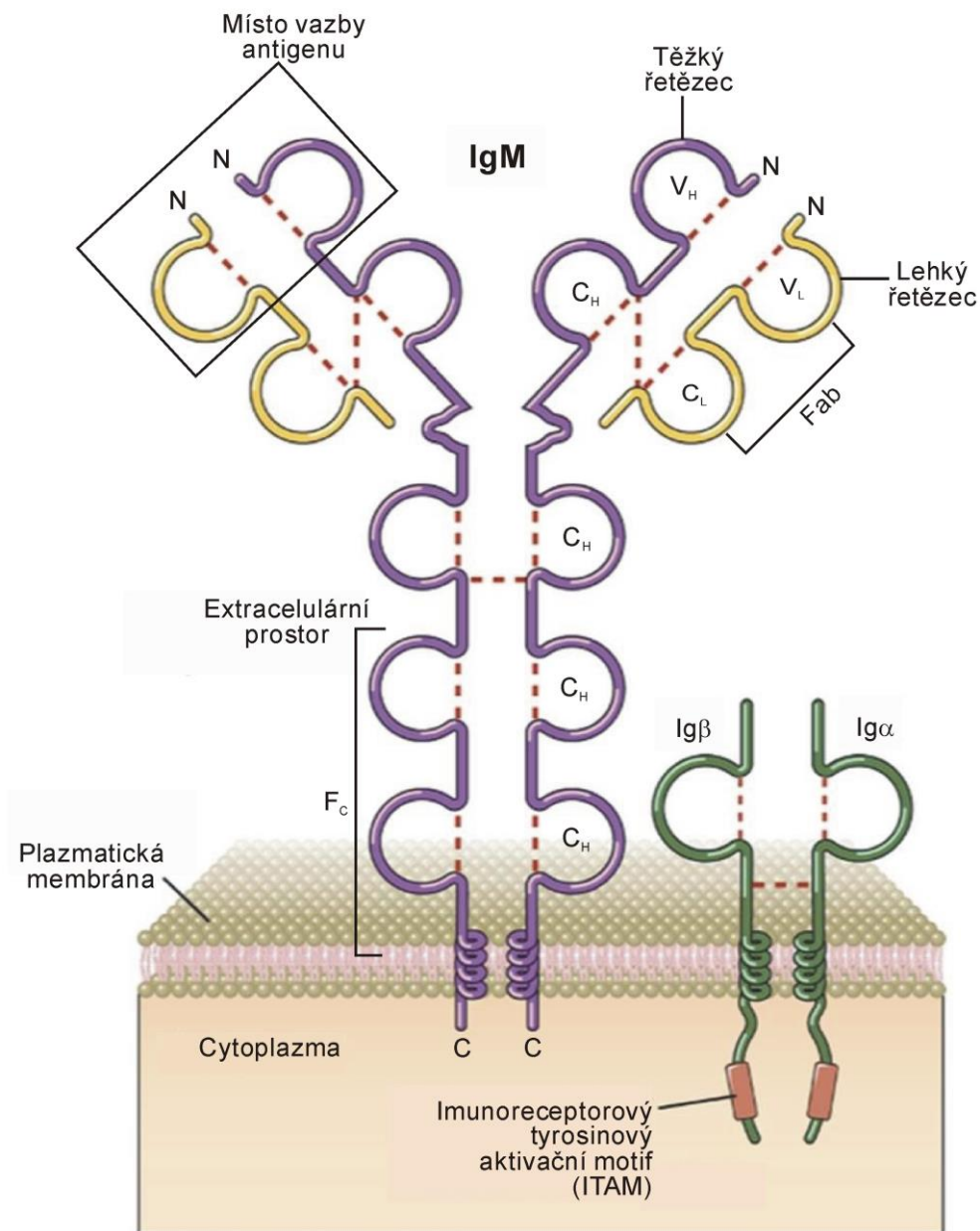
1.2.2.3. Paměťové buňky

V germinálních centrech získávají některé antigenem aktivované B buňky schopnost přežít po dlouhou dobu. Exprimují vysokou hladinu antiapoptotických proteinů Bcl-2. Některé z buněk zůstávají v místě vzniku, jiné cirkulují mezi krví a sekundárními lymfoidními orgány, kde jsou lokalizovány zvláště v místech invaze patogenů (Klein et al., 1998). Paměťové buňky se vyznačují přítomností vysoce afinitních (mutovaných) antigenních receptorů a jsou více senzitivní k antigenní stimulaci. Po opakované expozici antigenem proliferují a vytváří plazmatické buňky mnohem rychleji, než zralé B buňky (Abbas et al., 2012). Tyto plazmatické buňky jsou zodpovědné za tvorbu protilátek s vysokou afinitou během sekundární imunitní odpovědi, a pokud v germinálních centrech podstoupily přesmyk tříd, exprimují buď IgG, IgA nebo IgE, v opačném případě u „unswitched“ exprese IgM a IgD zůstává zachována. Somatické mutace Ig genů a exprese kostimulační molekuly CD27, která je členem TNF receptorové superrodiny (TNFSRF), jsou charakteristickým znakem paměťových buněk (Klein et al., 1998; Küppers et al., 1999; Fecteau et al., 2006). Využitím těchto markerů můžeme zařadit B buňky do podskupin: $IgM^+ IgD^+ CD27^-$, zralé naivní B buňky; $IgM^+ IgD^+ CD27^+$, „unswitched“ paměťové B buňky a $IgM^- IgD^- CD27^+$, paměťové B buňky s přesmykem tříd (Küppers et al., 1999).

1.2.2.4. B-buněčný receptor

Základní jednotkou molekuly protilátky, imunoglobulinu, je protein, složený z minimálně čtyř polypeptidových řetězců - dvou identických lehkých (IgL) a dvou těžkých (IgH), které jsou vzájemně spojeny disulfidickými vazbami, vytvořenými mezi zbytky cysteinů. Každý řetězec se skládá z karboxyl-terminální konstantní (C) oblasti s relativně neměnnou sekvencí aminokyselin u všech Ig příslušného typu těžkého nebo lehkého řetězce a aminoterminální variabilní (V) oblasti, kterou se Ig příslušného typu těžkého nebo lehkého řetězce navzájem liší. Variabilní oblast IgH je tvořena jednou Ig doménou a konstantní oblast třemi Ig doménami. Každý IgL řetězec je složen z jedné Ig domény V oblasti a jedné Ig domény C oblasti (Rosypal, 2000). Spojené variabilní domény jednoho těžkého a jednoho lehkého

řetězce, označované jako tzv. Fab-fragment (rozvětvená ramena Ig), vytváří vazebné místo pro antigeny, zatímco C oblast těžkých řetězců, spojená disulfidickými můstky a označovaná jako Fc-fragment, neparticipuje na rozpoznávání antigenu, ale váže se na receptory na povrchu leukocytů a interaguje tak s ostatními efektorovými molekulami a buňkami imunitního systému (Obr. 6.).

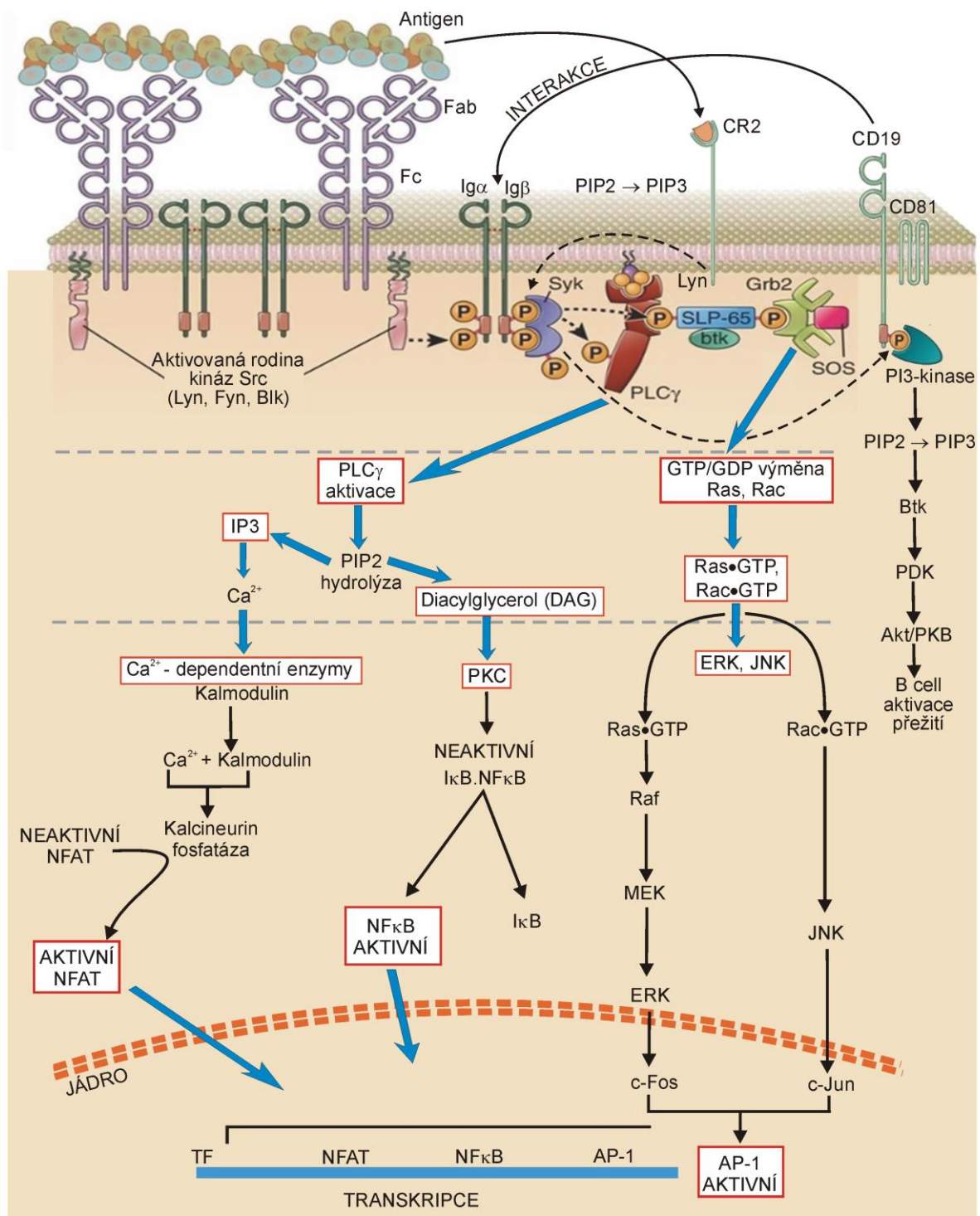


Obr. 6: Struktura B-buněčného receptoru (upraveno dle Abbas et al., 2012).

Membránový receptor třídy IgM a IgD je složen z vlastního povrchového imunoglobulinu, který je konstantní částí těžkého řetězce ukotven v membráně a vyznačuje se krátkými cytoplazmatickými konci, složenými pouze ze tří molekul aminokyselin (lysin, valin, lysin), které jsou však příliš krátké, aby mohly přenášet signály vzniklé po vazbě antigenu na BCR. Tyto signály jsou přenášeny pomocí signalizačních molekul $Ig\alpha$ a $Ig\beta$, které jsou vzájemně spojeny disulfidovou vazbou a nekovalentně spojeny s membránovým Ig (Tab. 1). Proteiny $Ig\alpha$ a $Ig\beta$ mají na svém cytoplazmatickém konci motiv ITAMs (ITAMs, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs), kterým zprostředkovávají transdukci signálu (Abbas et al., 2012).

Aktivace B buněk je zvyšována signály z koreceptorového komplexu a komplementových proteinů, které spojují vrozenou imunitu s adaptivní humorální odpovědí. Zralé B buňky exprimují na svém povrchu komplex složený z komplementového receptoru CR2 a membránových proteinů CD19 a CD81 (TAPA-1). Mikrobiální antigeny, nesoucí komplementový fragment C3, se tak současně vážou jak k molekule CR2, tak i k membránovému Ig na povrchu B buněk, což vede k iniciaci signalizační kaskády z BCR i CR2 komplexu, a tím k zesílení antigenní imunitní odpovědi (Obr. 7).

Hlavním zdrojem rozmanitosti protilátek je rekombinace subgenů V, D, J, a C, variabilita kódujících spojů, které vznikají v závislosti na tom, v kterém místě byla vlásenka štěpena a jaká je sekvence nukleotidů pro komplementární zaplňování P-nukleotidy. Obrovskou diverzitu Ig dále zajišťuje enzym TdT, který zcela náhodně zařazuje různý počet N-nukleotidů (viz kap. 1.4.). Dalším zdrojem rozmanitosti protilátek jsou somatické hypermutace, které probíhají ve vysoké frekvenci v GC sekundárních lymfatických orgánů. Konečným zdrojem rozmanitosti je pak spojování translací vytvořených lehkých a těžkých řetězců, které tvoří molekulu imunoglobulinu (Rosypal, 2000).

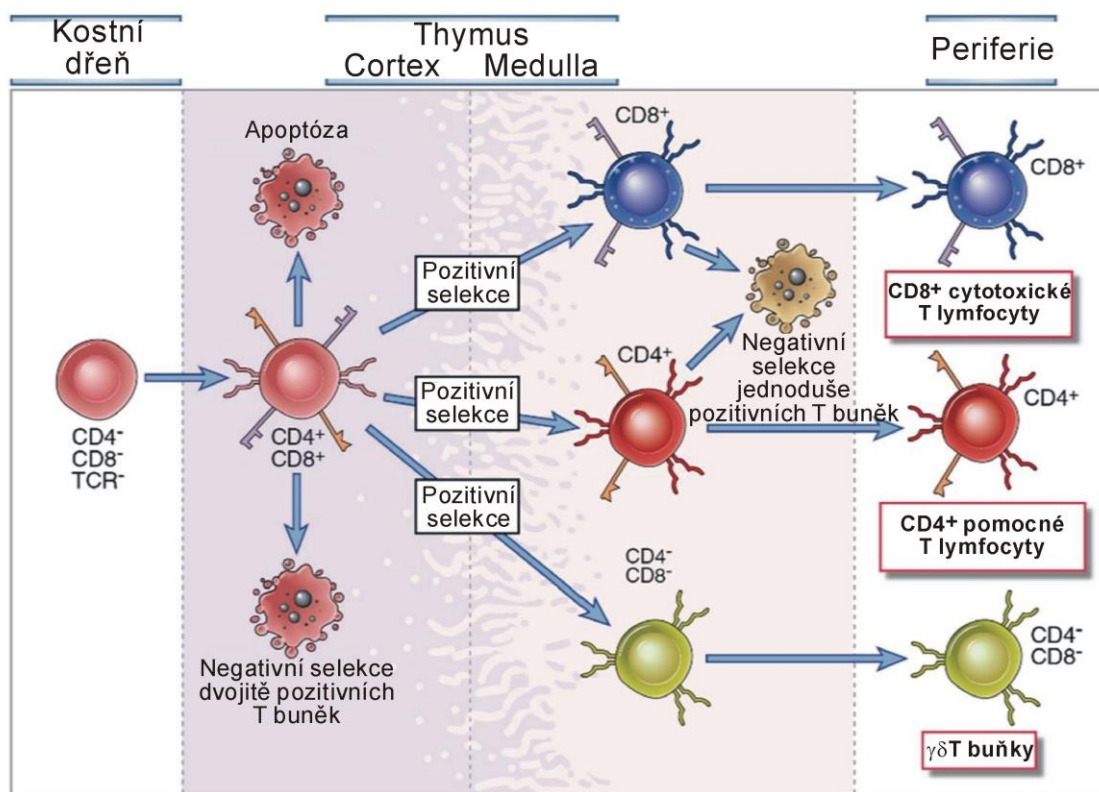


Obr. 7: Aktivace signálních kaskád B-buněčného receptorového komplexu (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.3. T lymfocyty

1.3.1. Pro-T lymfocyty

T buňky vznikají z pluripotentních kmenových buněk diferenciací na multipotentní progenitorové lymfoidní buňky, které se v období gestace nacházejí v játrech, během vývoje přecházejí do kostní dřeně, hlavního zdroje T buněčných progenitorů. Krví pak migrují do brzlíku, orgánu bohatého na stromální buňky. Tyto stromální buňky exprimují ligandy aktivující signalizaci receptoru Notch na progenitorových buňkách a indukuje T-buněčnou diferenciaci. Nejčasnějším markerem, který se exprimuje na povrchu progenitorů v kostní dřeni je, stejně jako u B buněk, CD7. Některé CD7⁺ buňky také exprimují CD34, marker HSC a raných B-, T-lymfoidních a myeloidních progenitorů. Podobně jako u B lymfocytů je vývoj T lymfocytů řízen přeskupováním subgenů a transkripcí genů, vzniklých z tohoto přeskupování (viz kap. 1.4.). Proces začíná v pro-T a končí v pre-T stadiu (Gerber et al., 2004) (Obr. 8).



Obr. 8: Vývoj a diferenciacie T lymfocytů (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.3.2. Pre-T lymfocyty

Během vývoje T buněk v brzlíku hrají důležitou roli vysoce specializované typy epiteliálních buněk, jejichž interakce s vyvíjejícími se thymocyty zprostředkovávají specifické membránové ligandy a sekretované faktory, cytokiny (IL-7, interleukin produkovaný epiteliálními buňkami brzlíku a účastníci se raných fází vývoje T buněk) a specifické hormony, thymopoeitin (zahazuje vývoj T buněk, vývoj B buněk inhibuje), thymosiny (skupina proteinů podporujících T buněčnou diferenciaci) a thymulin (peptid, jehož hlavní funkcí je zrání T lymfocytů a stimulace imunitního systému). Během vývojové fáze ve dřeni brzlíku dochází k rychlé proliferaci T-buněčných progenitorů a vznikají malé klidové lymfocyty, z nichž asi 95% umírá apoptózou během selektivního procesu a pouze 5% dosahuje stádia zralých T lymfocytů. Ze společného prekurzoru vznikají dva funkčně odlišné T buněčné podtypy, které exprimují heterodimery $TCR\alpha\beta$ nebo $TCR\gamma\delta$. Tato populace, označována jako $CD4^+CD8^-$ (DN, dvojnásobně negativní), neexprimuje CD3-TCR komplex a na základě exprese povrchových molekul CD25 (α řetězec receptoru pro IL-2) a CD44 (receptor hyaluronové kyseliny a ligand pro E-selektin) se tato trojnásobně negativní populace dělí na další podtypy, které korelují s různými vývojovými stádii (Gerber et al., 2004). T buňky exprimují RAG1/RAG2 DNA rekombinázy, účastníci se přeskupení $TCR\beta$ genů, které, pokud je úspěšné a produktivní, dává vzniknout $TCR\beta$ řetězci v komplexu pre- $TCR\alpha$. Syntéza pre-TCR (náhražkový pre-T receptor) spolu s komplexem CD3 spouští diferenciaci DN buněk na $CD4^+CD8^+$ thymocyty (DP, dvojnásobně pozitivní pro koreceptory CD4 a CD8), alelickou exkluzi lokusu genu pro $TCR\beta$ řetězec, přeskupení subgenů pro $TCR\alpha$ a proliferaci (Anderson et al., 2000).

Thymocyty, u kterých došlo k úspěšnému přeskupení α subgenů a spojení α a β řetězců, exprimují na svém povrchu $TCR\alpha\beta$ CD3 receptorový komplex (viz kap. 1.3.5.). Normální zralé buňky exprimují buď CD4 nebo CD8 molekuly. Na základě svého fenotypu a funkce se lymfocyty dělí na dvě definované podskupiny: $CD4^+$ lymfocyty (Th lymfocyty, pomocné T lymfocyty), které exprimují na svém povrchu TCR receptor, molekulu CD3

a koreceptor CD4. Transmembránový glykoprotein CD4 je členem Ig superrodiny a je nezbytný pro interakci s buňkami nabízejícími antigen (APC, antigen presenting cell), které jsou sdruženy s MHC molekulami II. třídy (MHC, hlavní histokompatibilní systém). MHCII exprimuje pouze několik buněčných typů (makrofágy, dendritické buňky, B buňky), specializujících se na prezentaci antigenu (Masopust et al., 2003). $CD8^+$ lymfocyty (Tc lymfocyty, cytotoxické T lymfocyty) exprimují na svém povrchu TCR receptor, molekulu CD3 a koreceptor CD8. Koreceptor CD8 je nezbytný k T-buněčné interakci s buňkami exprimujícími MHC molekuly I. třídy, což jsou téměř všechny jaderné buňky organismu (Abbas et al., 2012).

1.3.3. Zralé T lymfocyty

Funkčně kompetentní, jednoduše pozitivní $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty (SP, single-positive) opouštějí brzlík a migrují jako klidové buňky ve fázi G_0 buněčného cyklu do krve, sekundárních lymfoidních orgánů a lymfy. Opakovanou cirkulací se zvyšuje pravděpodobnost kontaktu zralého T lymfocytu s buňkou nabízející antigen. Po interakci Th lymfocytů s příslušným komplexem antigen-MHCII se lymfocyty aktivují, prolifерují a diferencují do efektorových buněk Th1, Th2, Th17 a „indukovaných“ regulačních T lymfocytů (Treg), rozpoznatelných podle cytokinů, které produkují (Zhou et al., 2009). Několik dní po antigenní expozici jsou některé aktivované T_H buňky po kontaktu s aktivovanými B buňkami diferencovány na T_{FH} buňky (T_{FH} , folikulární pomocné T buňky), které exprimují vysokou hladinu chemokinového receptoru CXCR5 a jsou přitahovány ligandy CXCL13 na folikulárních dendritických buňkách (FDC, follicular dendritic cell) do lymfoidních folikulů. Kromě cytokinu IL-21, který přispívá k vývoji GC a produkci plazmatických buněk, sekretují T_{FH} i cytokiny IFN- γ a IL-4, které se účastní izotypového přesmyku Ig tříd.

Odlišnou funkci zastávají Tc lymfocyty. Po rozeznání komplexu antigen-MHCI se aktivují a diferencují do efektorových cytotoxických T lymfocytů, které likvidují buňky, exprimující cizí nebo nežádoucí antigeny a zajišťují tak odstranění infikovaných

a nádorových buněk, případně buněk transplantovaných tkání apoptózou přes protein FasL nebo systémem granzym B/perforin.

Do skupiny CD4⁺ patří i tzv. regulační T lymfocyty (Treg), které potlačují rozvinutí autoimunitních chorob udržováním tolerance vůči tělu vlastním tkáním. Inhibují autoreaktivní lymfocyty, které unikly centrální toleranci v thymu a nastolují tak periferní toleranci. Prvním mechanismem působení Treg je suprese pomocí inhibičních cytokinů, což jsou IL-10, TGF-β a IL-35. Molekulárním markerem je jaderný protein FoxP3 (transkripční faktor), jehož mutace vede k multiorgánovému selhání. Treg exprimují povrchové molekuly CD25, CD28, CD69, ligand CD40, MHC II a CD45. „Běžný antigen lymfocytů“, jak se také CD45 nazývá, je transmembránový protein tyrosinofosfatáza, který hraje klíčovou roli v aktivaci T buněk. Existuje několik různých izoform CD45 v závislosti na subpopulaci buněk, jejich stupni maturace a zda byly vystaveny antigenu (Altin a Sloan, 1997). Naivní T buňky exprimují izoformu CD45RA, aktivované a paměťové CD45RO a posledně jmenované stejně jako paměťové B buňky i CD27. Poměr zastoupení naivní versus aktivované nebo paměťové T buňky má klinický význam v diagnostice autoimunitních, zánětlivých a imunodeficitních onemocněních.

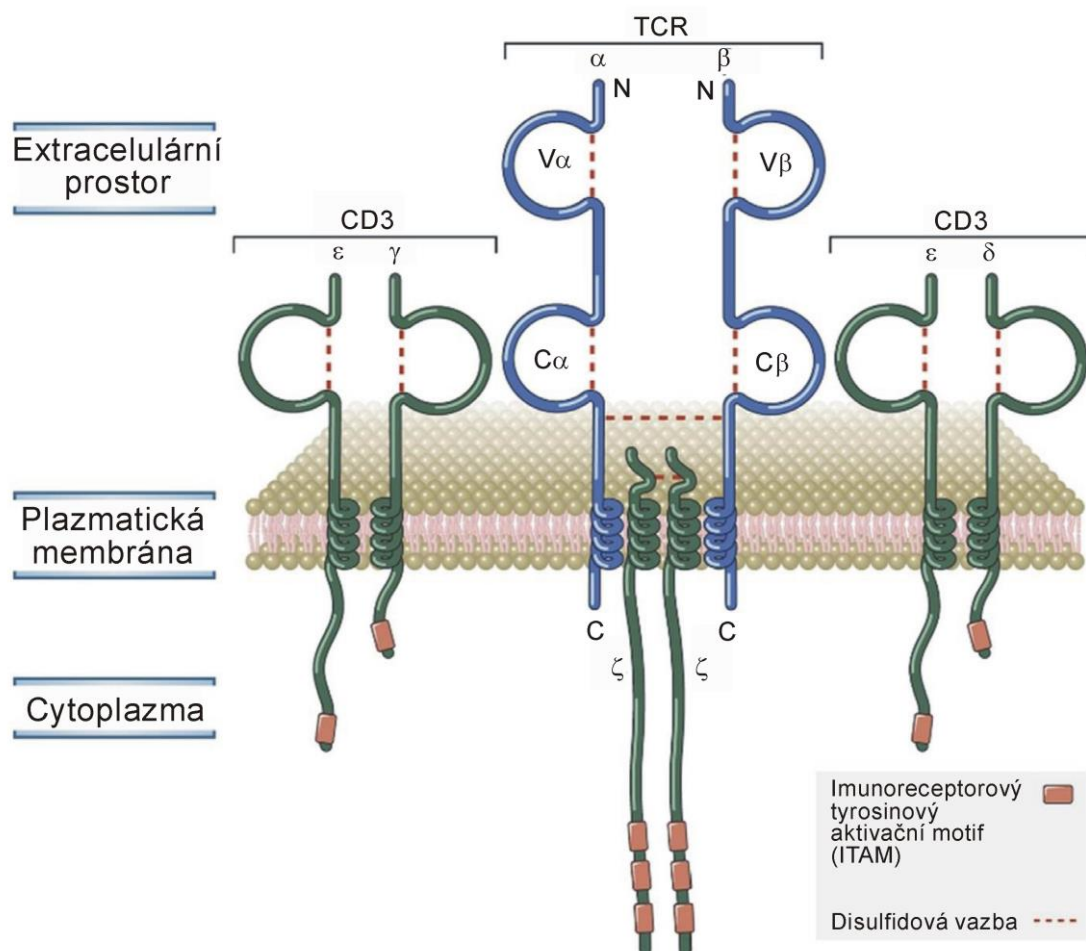
1.3.4. Paměťové T buňky

Paměťové T buňky vykazují heterogenitu exprese adhezivních molekul a chemokinových receptorů a mají schopnost migrovat do různých tkání. Byly identifikovány subpopulace centrálních a efektorových paměťových T buněk na základě jejich rozdílné exprese CCR7 a L-selektinu. Centrální paměťové T buňky jsou definovány jako lidské CD45RO⁺ krevní T buňky, exprimující vysokou hladinu CCR7 a L-selektinu, osidlující sekundární lymfoidní orgány, zatímco efektorové paměťové T buňky osidlují periferní tkáně, exprimují nízkou hladinu CCR7 a L-selektinu, ale exprimují další chemokinové receptory, které váží zánětlivé chemokiny. Efektorové paměťové T buňky tak odpovídají na antigenní stimulaci v periferních tkáních rychlou produkcí efektorových cytokinů, zatímco centrální

paměťové T buňky v lymfoidních tkáních více proliferují a poskytují pomoc B buňkám (Abbas et al., 2012).

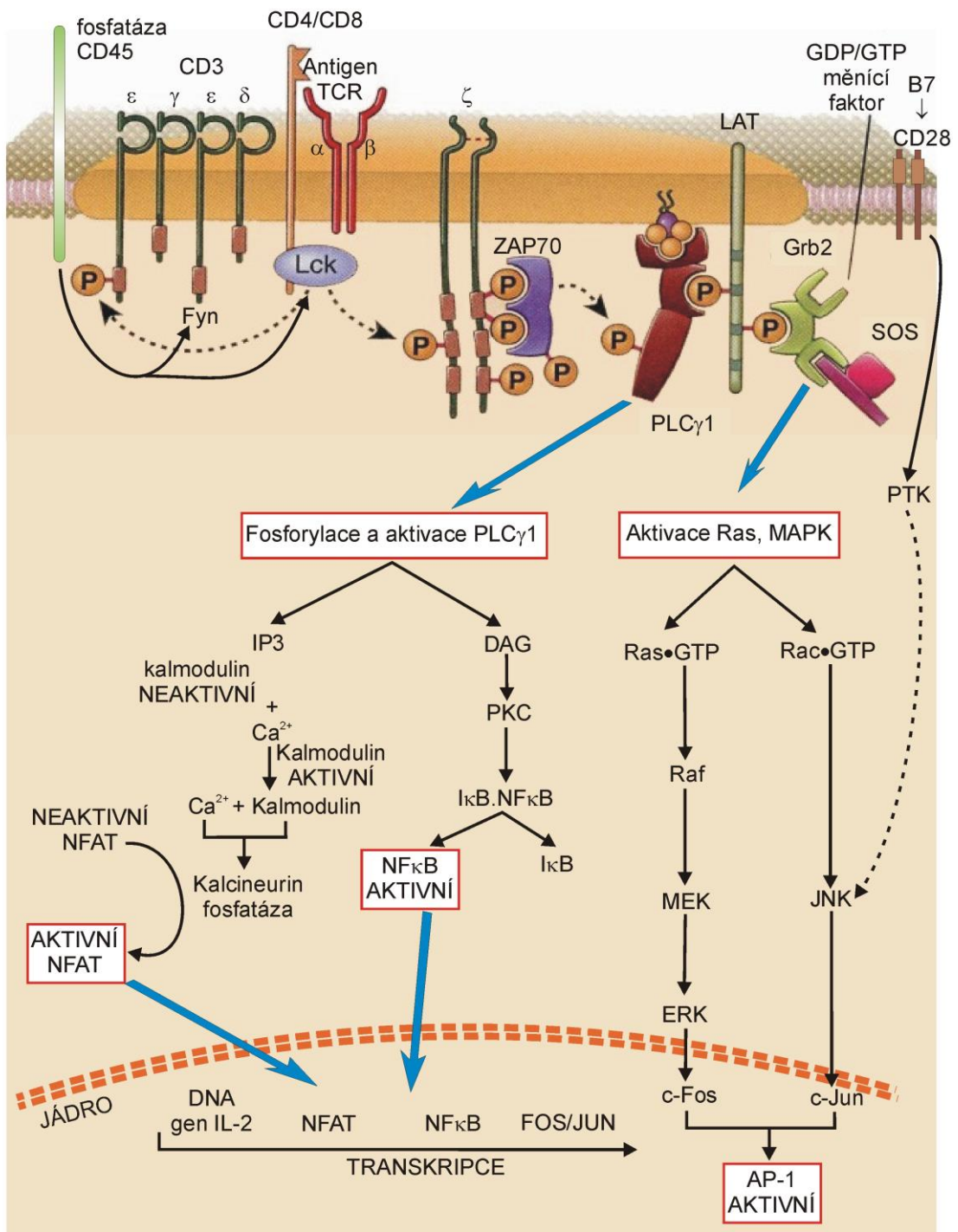
1.3.5. T-buněčný receptor

T-buněčný receptor (TCR) byl objeven v 80. letech 20. století, přibližně ve stejné době, kdy byla definována struktura MHC (Abbas et al., 2012). TCR je molekula, nacházející se na povrchu T lymfocytů, kde spolu s dalšími asociovanými molekulami CD3 komplexu a koreceptory vytváří T-buněčný receptorový komplex (Obr. 9), jehož úlohou je rozpoznat antigeny asociované s molekulami MHC, prezentovanými APC buňkami. Antigenní stimulace vazbou na TCR pak vede k aktivaci T buňky a odpovědi imunitního systému na příslušný ligand.



Obr. 9: Schéma T-buněčného receptorového komplexu (upraveno dle Abbas et al., 2012).

Doménová struktura TCR jej řadí do velké imunoglobulinové rodiny. TCR je molekula tvořená heterodimerem, složeným z transmembránových $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ polypeptidových řetězců, navzájem kovalentně spojených disulfidovou vazbou. Populace T-buněk v lidské krvi je z 90-95% tvořena T lymfocyty nesoucími $\alpha\beta$ TCR. Každý $\alpha\beta$ řetězec se skládá ze dvou imunoglobulinových extracelulárních domén, hydrofobní transmembránové a krátké intracelulární (cytoplazmatické) oblasti. Extracelulární část je strukturálně podobná Fab fragmentu Ig molekuly a stejně jako Ig se dělí na N-terminální, vysoce sekvenčně variabilní (V) oblast a oblast konstantní (C), vyznačující se konzervativní sekvencí aminokyselin. Variabilní oblast je tvořena třemi hypervariabilními úseky CDR1-3, zodpovědnými za interakci TCR s MHC. Řetězec β má v oblasti V domény navíc hypervariabilní úsek, který pravděpodobně neparticipuje na rozpoznávání antigenu, ale slouží jako vazebné místo pro mikrobiální produkty označované jako superantigeny. Na C oblast navazuje krátká spojovací oblast, ve které jsou oba řetězce spojeny disulfidickou vazbou mezi extracelulárními cysteinovými zbytky. Do membrány buňky je pak řetězec zanořen hydrofobní transmembránovou oblastí, která je charakteristická přítomností pozitivně nabitých zbytků aminokyselin, lysinu u řetězce α , lysinu a argininu u řetězce β , které interagují s negativně nabitými zbytky kyseliny asparagové ostatních transmembránových polypeptidů (CD3 a ζ), tvořících součást TCR komplexu (Tab. 1). Navazující karboxylová cytoplazmatická část α a β řetězců, tvořená 5 až 12 aminokyselinami, je stejně jako u imunoglobulinu B buněk natolik krátká, že je pro přenos signálu nutná přítomnost specifických signálních molekul. Jsou to proteiny CD3 a ζ , které jsou s heterodimerem $\alpha\beta$ TCR spojeny nekovalentní vazbou a po rozpoznání antigenu TCR receptorem přenáší signál dále do cytoplazmy a jádra, kde aktivují T buňky k imunitní odpovědi. Komplexy CD3 jsou tvořeny řetězci $\epsilon\gamma$ a $\epsilon\delta$, z nichž každý nese v extracelulární N-terminální oblasti jednu imunoglobulinu podobnou doménu, která řadí tyto proteiny do imunoglobulinové superrodiny. Transdukce signálu je zajištěna fosforylací zbytků tyrozinu motivu ITAM, přítomného na těchto signálních receptorových podjednotkách (Cantrell, 2002; Lin a Weiss, 2001) (Obr. 10).



Obr. 10: Aktivace signálních kaskád T-buněčného receptorového komplexu (upraveno dle Abbas et al., 2012).

Tab. 1: Srovnání vlastností lymfocytárních antigenních receptorů: TCR a Ig. CDR, Complementarity Determining Region; (upraveno dle Abbas et al., 2012).

	T-buněčný receptor (TCR)	Imunoglobulin (Ig)
Komponenty	α a β řetězce	Těžký a lehký řetězec
Počet Ig domén	Jedna V a jedna C doména pro každý řetězec	Pro IgH: jedna V a 3 nebo čtyři domény C Pro IgL: jedna V a jedna C doména
Počet CDR	Tři pro každý řetězec s antigenním vazebným místem	Tři pro každý řetězec
Asociované signální molekuly	CD3 a ζ	Ig α a Ig β
Změny po buněčné aktivaci:		
Produkce sekretované formy	Ne	Ano
Izotypový přesmyk	Ne	Ano
Somatická mutace	Ne	Ano

Primárním zdrojem diverzity TCR je kombinace různých genových segmentů, vznikající během V(D)J rekombinace a zvyšuje se náhodnou inzercí N-nukleotidů enzymem TdT. Dalším zdrojem rozmanitosti je alelický polymorfismus V β segmentů (Abbas et al., 2012).

1.4. V(D)J rekombinace

Jednu z klíčových rolí v imunitním systému člověka hraje V(D)J rekombinace, unikátní přeskupení genových segmentů, které je nezbytné pro vytvoření funkčních genů, kódujících obrovský repertoár antigenních receptorů na povrchu B a T buněk a sekretovanou formu protilátek B buněk (Sadofsky, 2001) (Obr. 11).

První analýzy sekvence aminokyselin imunoglobulinu přinesly první náhled na objasnění, jak se mohou tvořit milióny různých antigenních receptorů z omezeného množství kódující DNA. Hypotézu Tatuma a Beadleho z roku 1941 „jeden gen - jeden polypeptid“ vyvrátili v roce 1961 Dreyer a Bennett, kteří postulovali, že každý řetězec protilátky je kódován nejméně dvěma geny, jedním variabilním a konstantním a tyto jsou kombinovány na úrovni DNA nebo mRNA a tvoří funkční proteiny imunoglobulinů (Tonegawa, 1983). Japonský imunolog Susumu Tonegawa, který v roce 1987 získal Nobelovu cenu za objasnění genetického řízení tvorby protilátek, demonstroval, že struktura Ig genů v buňkách myelomu nebo plazmacytomu je odlišná od buněk zárodečných tkání a k ligaci DNA segmentů v lokusu, kódujícím lehké a těžké imunoglobulinové řetězce, dochází pouze ve vyvíjejících se B a T lymfocytech a v žádných jiných tkáních či buňkách.

1.4.1. Organizace zárodečných Ig a TCR genů

Zárodečná organizace lokusů Ig a TCR je v podstatě podobná. Charakteristická je prostorová segregace mnohočetných sekvencí, kódujících variabilní a konstantní domény receptorových proteinů. Ig jsou kódovány třemi samostatnými lokusy na třech různých chromozomech. IgH na chromozomu 14, Ig κ a Ig λ na chromozomech 2, respektive 22. Genové segmenty, kódující řetězce TCR β a TCR γ se nachází na chromozomu 7 v oddělených lokusech, TCR α a TCR δ na chromozomu 14, přičemž TCR δ lokus se nachází uvnitř TCR α lokusu. Zárodečné uspořádání Ig a TCR lokusů se vyskytuje ve všech buněčných typech, ale jak už bylo zmíněno, funkční antigenní receptory se tvoří pouze ve vyvíjejících se lymfocytech až po procesu rekombinace, kdy jsou náhodně vybrané V, (D) a J genové segmenty spojeny V(D)J rekombinací.

Tento proces zahrnuje naštěpení dvouřetězcové DNA lymfoidně-specifickým proteinovým komplexem rekombinázových aktivačních genů RAG1 a RAG2 (RAG, recombinase-activating gene) (Schatz et al., 1989; Nakase et al., 2003; Inlay a Xu, 2003), které rozpoznávají vysoce konzervované rekombinační signální sekvence RSS

(recombination signal sequences), nacházející se po obou stranách přeskupujících se genových segmentů: variabilních (V), diverzity (D) a spojovacích (J) (Tonegawa, 1983; Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990; Angelin-Duclos a Calame, 1998). V(D)J rekombinace je kontrolována několika způsoby:

(a) V(D)J rekombinace je specifický proces, ke kterému dochází pouze u buněk lymfoidní linie, tzn. pouze ve vyvíjejících se B a T lymfocytech (Bassing et al., 2002);

(b) přeskupení je vývojově specifické, tzn. probíhá pouze v určitých fázích lymfocytární diferenciaci;

(c) proces přeskupení genových segmentů a sestavování funkčních genů probíhá podle určité hierarchie, kdy např. přeskupení IgH předchází přeskupení IgL a podobně TCR β předchází TCR α (Angelin-Duclos a Calame 1998; Bassing et al., 2002);

(d) regulace zpětnou vazbou, kdy produktivní V(D)J přeskupení jedné alely inhibuje přeskupení alely druhé, fenomén nazývaný alelická exkluze (Angelin-Duclos a Calame, 1998; Inlay a Xu, 2003).

V(D)J rekombinace antigenních receptorů je regulována rozdílnou dostupností příslušných genových lokusů pro V(D)J rekombinační komplex. Konfigurace chromatinu každého antigenního receptorového lokusu se zpočátku nachází v „uzavřeném“ stavu bránícím vazbě V(D)J rekombinázy na RSS. V okamžiku, kdy lymfocyty dosáhnou odpovídajícího stupně vývoje, chromatin se „otevívá“ a stává se přístupným procesu rekombinace (Inlay a Xu, 2003; Nakase et al., 2003). Liniově a vývojově specifické alterace, remodelace a modifikace chromatinu zahrnují procesy demetylce DNA, acetylce a metylce histonů a změny senzitivity enzymu DNázy. V(D)J rekombinace tedy vyžaduje minimálně dvě rozdílné úrovně remodelace chromatinu. Kromě změny ve vysoce organizované struktuře chromatinu, také přesná remodelace nukleozómů umožní štěpení RSS produkty rekombinačních aktivačních genů Rag1 a Rag2, specifickými rekombinázami RAG1 a 2 (Bolland et al., 2004).

1.4.2. RAG1 a RAG2

Jak již bylo zmíněno, RAG geny se exprimují pouze v lymfoidních buňkách, ve kterých probíhá přeskupení genových segmentů antigenních receptorů a tato exprese je během lymfocytární diferenciace vývojově regulována (Kitagawa et al., 1996). Mombaerts et al. (1992) izolovali V(D)J rekombinační aktivační gen RAG1 na základě jeho schopnosti aktivovat V(D)J rekombinaci na umělém substrátu ve fibroblastech. Tato vlastnost a obraz exprese ve tkáních i buněčných liniích ukázaly, že RAG1 buď aktivuje, nebo katalyzuje V(D)J rekombinace Ig a TCR a je tedy naprosto nezbytný, což bylo prokázáno úplným zablokováním vývoje B a T buněk v progenitorovém stádiu u RAG1-deficientních myši. Stejně tak i ztráta funkce RAG2 způsobuje totální neschopnost iniciace V(D)J přeskupení (Shinkai et al., 1992). Myši s mutacemi RAG genů mají malé lymfoidní orgány, nezralé B a T lymfocyty a vykazují SCID fenotyp (SCID, severe combined immune deficiency) (Sadofsky, 2001).

Mutace lidských RAG genů vedou buď k úplné imunodeficienci nebo v případě mutace, ponechávající alespoň nízkou hladinu aktivity proteinů, k imunodeficienci, označované jako Omenn syndrom (OS) (Sadofsky, 2001; Bassing et al., 2002). OS je onemocnění vyznačující se absencí cirkulujících B buněk a infiltrací kůže a střev aktivovanými oligoklonálními T lymfocyty (Corneo et al., 2001). Pacienti s OS vykazují zvýšenou citlivost k infekcím. Oettinger et al. (1990) transfekovali fibroblasty nejprve rekombinačním aktivačním genem RAG1, který neefektivně indukoval V(D)J rekombinázovou aktivitu, ale kotransfekcí genem RAG2 se frekvence rekombinace více než tisícinásobně zvýšila, což dokazuje nezbytnou součinnost genů RAG1 a RAG2. Hladina exprese proteinových komplexů RAG1 a RAG2, se během různých fází sestavování B- a T-buněčných antigenních receptorů liší. Kitagawa et al. (1996) ukázal, že genová exprese RAG je indukována v lidských progenitorových lymfoidních liniích signály, vycházejícími ze stromálních buněk kostní dřeně a interleukiny IL-3, IL-6 a IL-7. Lymfocyty exprimují RAG aktivně v časných stádiích vývoje až do iniciační fáze přeskupení genových segmentů a následně se exprese během proliferace vypíná. Ukončením fáze buněčného dělení až do

konečné fáze přeskupení subgenů se exprese RAG znovu aktivuje. U nezralých B buněk, pokud nejsou autoreaktivní, produkce RAG proteinů klesá, ale nezastaví se, dokud B buňky nedosáhnou zralosti. Tímto mechanismem se zajistí udržování alelické exkluze. V případě autoreaktivních B buněk produkce RAG proteinů pokračuje a dokud jsou k dispozici genové segmenty V a J, pokračuje i jejich přeskupování.

1.4.3. Rekombinační signální sekvence

Důležitými faktory, které zprostředkovávají V(D)J rekombinaci, jsou rekombinační signální sekvence (RSS), lokalizované na 3' konci všech V genových segmentů, na 5' konci J segmentů a ležící po obou stranách D segmentů (Olaru et al., 2005). Těžké řetězce imunoglobulinů (IgH) a T-buněčné receptory β a δ (TCR β a TCR δ) jsou sestavovány ze zárodečných V, D a J genových segmentů, zatímco lehké řetězce imunoglobulinů κ a λ (Ig κ a Ig λ) a TCR α a TCR γ pouze ze segmentů V a J (Bassing et al., 2002). Všechny tyto genové segmenty jsou obklopeny rekombinačními signálními sekvencemi, které jsou tvořeny vysoce konzervovanými palindromatickými heptamery, 5'-CACAGTG-3' a na AT nukleotidy bohatými nonamery, 5'-ACAAAAACC-3' nebo jejich komplementárními sekvencemi (Tonegawa, 1983; Messier et al., 2003). Heptamery a nonamery jsou od sebe odděleny nekonzervovanými mezerníky o délce 12 a 23 bp, první označovaný jako jednozávitový (odpovídá délce jednoho závitů chromozomální DNA) a druhý dvouzávitový (odpovídá délce dvou závitů DNA) (Bassing et al., 2002). V(D)J rekombinace může proběhnout pouze dodržením striktního pravidla 12/23, tedy pouze mezi rekombinačními signálními sekvencemi, obsahujícími 12 a 23 bp, čímž je zajištěno, že se nemohou spojit např. dva V genové segmenty, ale pouze V-J, D-J nebo V-D-J (Sadofsky, 2001; Olaru et al., 2005).

1.4.4. Mechanismus V(D)J rekombinace

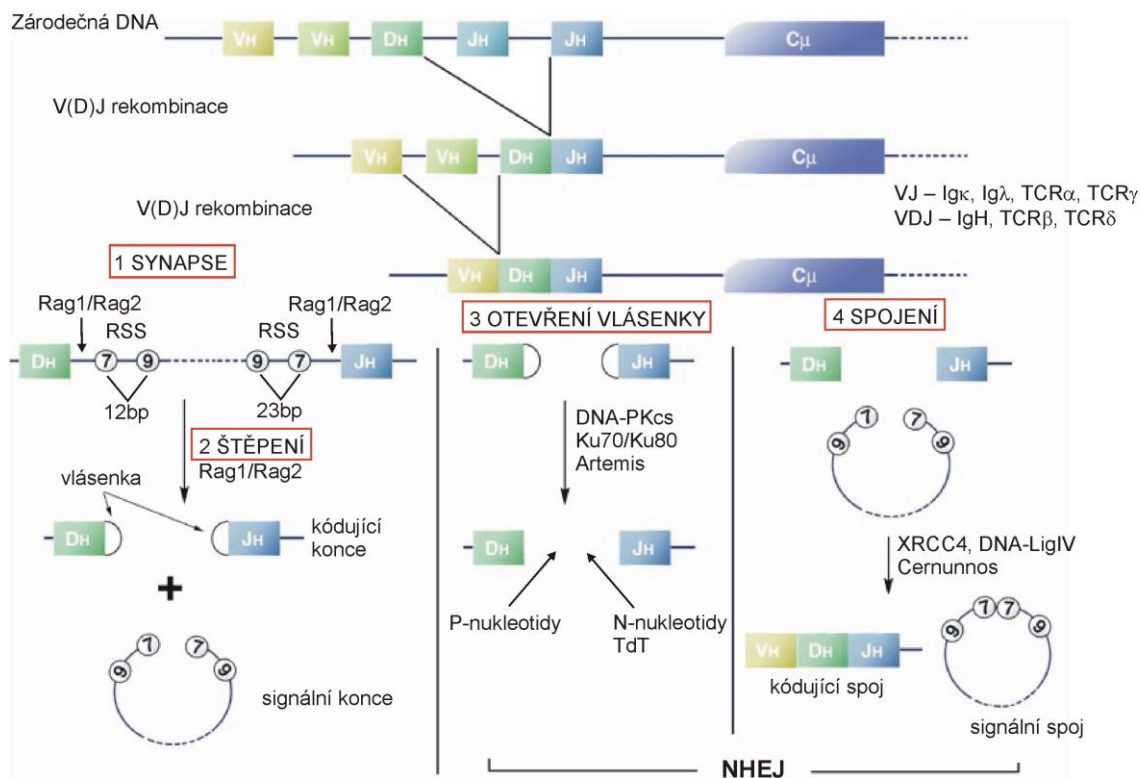
Proces V(D)J rekombinace (viz Obr. 11) je možné rozdělit do čtyř základních, na sebe navazujících kroků:

(a) *Synapse*. Části chromozomů, na kterých jsou antigenní receptorové geny lokalizovány, se stávají dostupnými pro rekombinační proces, tzn., že kódující segmenty a jejich RSS se dostávají do blízkosti vytvořením chromozomální smyčky.

(b) *Štěpení*. V(D)J rekombinace je iniciována rozpoznáním a štěpením DNA komplexem RAG enzymů za vzniku dvouřetězcových zlomů (DSBs, double-strand breaks) mezi dvěma participujícími genovými segmenty a jejich RSS za vzniku terminální vlásenky na kódujících koncích a vznikem tupých 5'-fosforylovaných signálních konců, obsahujících kompletní RSS (Gu et al., 1997; Sadovsky, 2001). Spojením signálních konců (konce obsahující heptamer a zbytek RSS) se vytváří buď extra-chromozomální kruhová molekula DNA, která se ztrácí z buňky během buněčného dělení (Messier et al., 2003) nebo fúzované RSS elementy, které zůstávají začleněny v chromozomu a zajišťují chromozomální integritu (Cortes et al., 1996; Sadofsky, 2001, Abbas et al., 2012).

RSS jsou unikátní pro Ig a TCR geny a proto i V(D)J rekombinace se účastní výhradně antigenní receptorové geny. V důsledku této rekombinace se promotory, lokalizované bezprostředně na 5' konci V genů, dostávají do blízkosti zesilovačů v intronech J a C, případně v 3' C oblasti, čímž zesilovače maximalizují transkripční aktivitu promotorů V genů. Protože jsou Ig a TCR geny B a T buněk po mnohočetné rekombinaci transkripčně aktivními místy, geny z jiných lokusů, které jsou abnormálně translokovány do těchto míst, jsou aberantně transkribovány. Tyto chromozomální translokace protoonkogenů do lokusů Ig nebo TCR genů jsou často spojeny se zvýšenou transkripcí onkogenů, což je jeden ze spouštěcích mechanismů neoplazií z B a T lymfocytů.

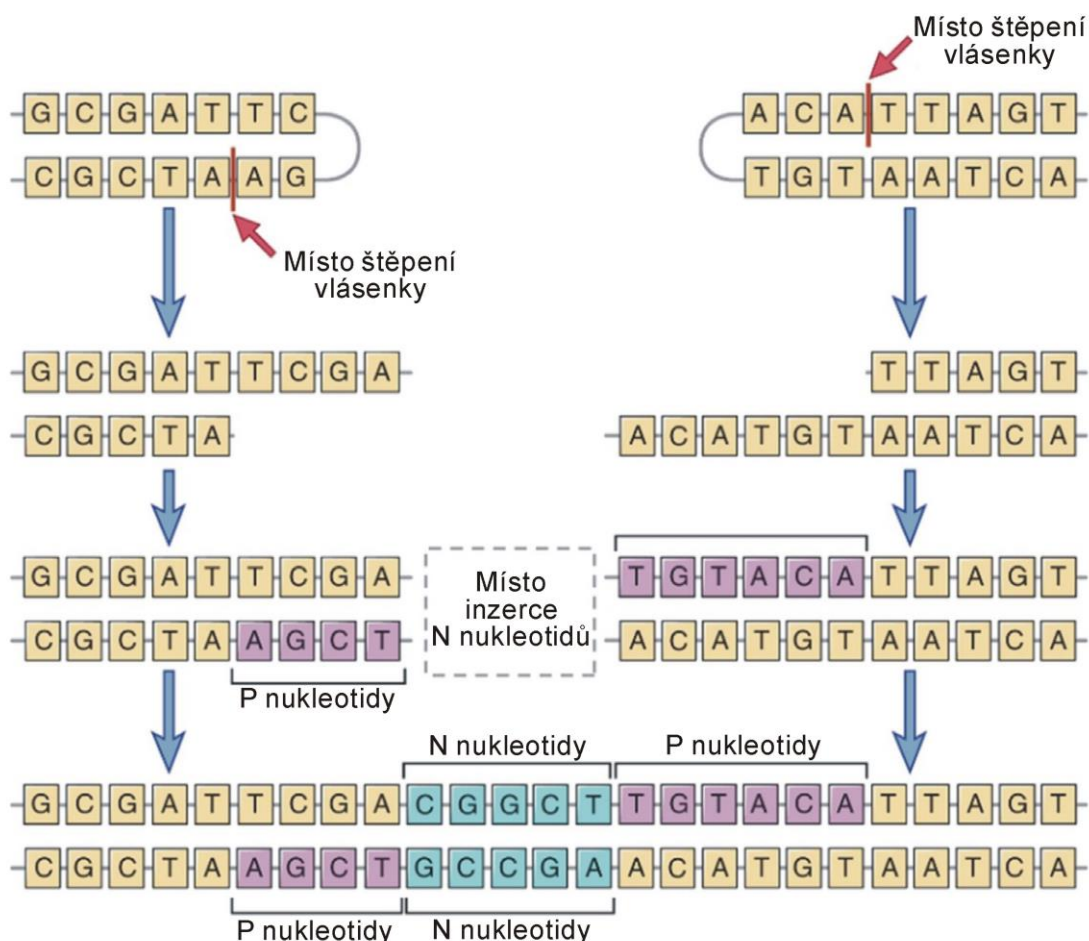
(c) *Otevření vlásenky a zpracování konců*. Na rozdíl od precizních signálních spojů je tvorba kódujících spojů nepřesná. Volné komplementární konce řetězců přeskupujících se genových segmentů, které vznikly asymetrickým štěpením vlásenky endonukleázou Artemis (Bassing et al., 2002; Ma et al., 2002), jsou různě dlouhé a slouží jako matrice pro komplementární zaplnění P-nukleotidy (P, palindromic) a ligací tvoří palindromické oblasti (Lewis, 1994; Chu, 1997). Termín „P-nukleotid“ byl vytvořen k popisu inzercí nukleotidů, kterými je vytvořené kratší vlákno prodlužováno komplementárně s vláknem delším. Inzerce



Obr. 11: V(D)J rekombinace a NHEJ oprava (upraveno dle Soulas-Sprauel et al., 2007).

P-nukleotidů je ovlivněna sekvencí spojovaných konců DNA (Meier a Lewis, 1992) a předchází fázi ligace dvou segmentů. Konce DNA jsou následně modifikovány odštěpením různého počtu nukleotidů exonukleázou a přidáním náhodné sekvence N-nukleotidů, jejichž inserce do kódujících spojů je katalyzována enzymem TdT (TdT, terminální deoxynukleotidyl-transferáza), (Komori et al., 1993; Chu, 1997; Bassing, 2002) (Obr. 11 a 12). TdT se exprimuje pouze v lymfatické tkáni a vyskytuje se v lymfocytech, ve kterých probíhá přeskupování subgenů. Enzym TdT katalyzuje kondenzaci deoxyribonukleotidů na 3'-hydroxylovém konci DNA řetězce a díky náhodnému zařazování N-nukleotidů tak přispívá k variabilitě kódujících spojů a diverzifikaci antigenních receptorů během V(D)J rekombinace (Boulé et al, 2001). Inzerce P- a N-nukleotidů (Obr. 12) v místě rekombinace však může mít za následek i přerušení čtecího rámce, např. vytvořením terminačního kodónu, čímž se přeskupování subgenů stává neproduktivním a tyto geny nemohou produkovat funkční proteiny (Rosypal, 2000; Abbas et al., 2012).

(d) *Spojování*. Během V(D)J rekombinace vznikají dvouřetězcové zlomy DNA (signální i kódující konce), které jsou pak opraveny pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ, nonhomologous DNA end joining) (Obr. 11).



Obr. 12: Vznik diverzity B a T buněk (upraveno dle Abbas et al., 2012).

1.4.5. NHEJ oprava

Dvouřetězcové zlomy DNA (DSBs, double-strand breaks) jsou běžnou formou poškození DNA a opravy DSBs jsou základním mechanismem zajišťujícím ochranu genomu. DSBs jsou v podstatě cytotoxické léze, vznikající buď přímo působením radiace, různých chemikálií, mechanickým stresem nebo nepřímo, kdy se DNA replikační vidlice setká s jinými lézemi, jako jsou jednořetězcové zlomy DNA (Karran, 2000; Ahnesorg, 2006). DSBs se ale také objevují za normálních fyziologických podmínek během rekombinace, kam patří

i přeskupení T-buněčných receptorových a imunoglobulinových genů během vývoje lymfocytů a adaptivního imunitního systému (Labhart, 1999; Ahnesorg et al., 2006). Termín „non-homologous end joining“ (NHEJ, nonhomologous DNA end joining) použili poprvé v roce 1996 Moore a Haber. Tato dráha je hlavním reparačním mechanismem opravy dvouřetězcových zlomů DNA v savčích buňkách (Chu, 1997; Karran, 2000). Nehomologní spojování konců, označované také jako nelegitimní rekombinace (Labhart, 1999; Karran, 2000), probíhá přímým spojením zlomů DNA bez překrytí, případně s minimálním překrytím a za absence homologie mezi dvěma rekombinantními molekulami DNA (Labhart, 1999).

Proces NHEJ sestává ze tří základních kroků: rozpoznání zlomu, odstranění nekompatibilních struktur, které by mohly bránit navázání proteinů a vlastní spojení konců DNA. V savčích buňkách se jej účastní sedm hlavních proteinů: KU70, KU80, DNA-PKcs (DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), nukleáza Artemis, XRCC4 (XRCC4, X-ray cross-complementing 4), DNA Ligáza IV a XLF (XLF, XRCC4-like faktor, Cernunnos) (Ahnesorg, 2006).

Zahájení procesu NHEJ je iniciováno rozpoznáním nově vzniklého DSB pomocí heterodimeru KU70/KU80, který stabilizuje a chrání volné konce DNA před působením nukleáz a umožňuje navázání katalytické podjednotky DNA-dependentní protein kinázy (DNA-PKcs) (Gu et al., 1997; Khanna a Jackson, 2001; Yano et al., 2009; Boboila et al., 2010). Gu et al. (1997) ve své práci ukázal, že Ku70-deficientní myši dorůstaly 50% velikosti kontrolních myší, jejich fibroblasty byly radiosenzitivní a vykazovaly předčasné stárnutí spojené s kumulací nedělících se buněk. Ku70-deficientní myši dále postrádaly zralé B buňky a byl u nich zaznamenán signifikantní výskyt lymfomů thymu. V in vitro studii demonstroval Ma et al. (2002), že DNA-PKcs vytváří komplex s proteinem Artemis a jeho fosforylací aktivuje jeho endonukleázovou aktivitu a následné štěpení přečnávajících 5' a 3' konců, jakož i vlásenky, vytvořené RAG proteiny. Závěrečná ligace je katalyzována proteinovým komplexem DNA Ligázy IV a XRCC4 (Boboila et al., 2010). Na tomto kroku se také podílí regulační XLF (Cernunnos), který přímo interaguje s komplexem DNA Ligázy IV / XRCC4 (Gu et al., 1997; Ahnesorg et al., 2006; Yano et al., 2009; Boboila et al., 2010) (Obr. 11).

Výhodou NHEJ je rychlost a operativnost, nevýhodou pak nepřesnost při ligaci, která může vést ke ztrátě genetické informace nukleolytickým štěpením a k defektům, které jsou spojeny s radiosenzitivitou, predispozicí k rakovině a imunodeficientním syndromům (Labhart et al., 1999; Karran, 2000). Všechny NHEJ defekty jsou obvykle spojeny s defektní V(D)J rekombinací, vedoucí k zástavě vývoje jak B tak T lymfocytů a/nebo s přesmykem imunoglobulinových tříd (Boboila et al., 2010), způsobující výše zmiňované SCID nebo jiné související imunodeficiencie a syndromy (Corneo et al., 2001; Ahnesorg, 2006).

1.5. Lymfoproliferativní onemocnění

1.5.1. Klasifikace lymfoproliferativních onemocnění

Vývoj klasifikace maligních lymfoproliferativních nemocí kopíruje vývoj poznání a rozšiřování informací o imunitním systému, jeho fyziologii i patologii a souvisí s rozvojem laboratorních technik, umožňujících přesnější popis a rozdělení nemocí. Klasifikace je tedy založena na morfologickém obraze, histologickém vyšetření u lymfomů nebo cytologickém v případě leukemií.

Poprvé se pokusili o ucelený popis lymfatických nádorů v roce 1942 Gall a Mallory, kteří však vycházeli pouze z morfologie onemocnění. Rappaportova klasifikace z roku 1956 a 1966 již představovala první klinicky relevantní histologickou klasifikaci non-hodgkinských lymfomů (Papajík et al., 2005). Na základě možnosti určit fenotyp B a T lymfocytů a zjištění, že lymfoproliferativní onemocnění odrážejí morfologii i fyziologii normálního vývoje lymfoidních buněk, vznikla přibližně ve stejnou dobu v Americe Lukes-Collinsova klasifikace (rok 1974) a v Evropě Lennert se spoluautory zavedl Kielskou klasifikaci (1973, 1975; název podle místa vzniku). Tato klasifikace byla několikrát upravována a poslední změny byly publikovány v roce 1997 (Adam et al., 2004; Papajík et al., 2005). Na původní Rappaportovu terminologii navázala v roce 1982 americká klasifikace nazvaná „Working Formulation for Clinical Use“ (WF), která byla poměrně široce v USA akceptována, ale v Evropě se příliš nerozšířila.

V roce 1991 založila skupina devatenácti hematopatologů z Evropy a USA pracovní skupinu nazvanou „International lymphoma study group“ a vytvořila novou klasifikaci lymfoidních nádorů. První návrh byl diskutován na konferenci v Berlíně v roce 1993 a definitivní verze byla publikována v časopise Blood v září 1994 jako Revidovaná evropsko-americká klasifikace lymfoidních nádorů (REAL). Do této klasifikace bylo inkorporováno mnoho nově popsanych entit, rozpoznanych na základě vývoje a aplikace fenotypizace, cytogenetických a molekulárně-genetických metod. Filozofii a strukturu REAL klasifikace převzala nová WHO (The World Health Organization) klasifikace nádorových chorob hematopoetické a lymfoidní tkáně, která byla publikována v roce 2001 a v roce 2008 revidována (Swerdlow et al., 2008). Skupina třiceti kliniků a vědců z celého světa byla oslovena díky své odbornosti v oblasti myeloidních neoplazií a akutních leukemií a stali se členy výboru „*Myeloid and Acute Leukemia Clinical Advisory Committee*“ (CAC). Spolu se skupinou patologů inkorporovali nové informace a doporučení v revidovaném 4. vydání (Vardiman et al., 2009). Hlavním principem klasifikace je rozpoznání různých onemocnění na základě kombinace morfologických, imunofenotypových, genetických, molekulárních a klinických vlastností. Jednotlivé entity jsou stratifikované na základě buněčné linie a dále jejího odvození od prekurzorových a zralých lymfoidních buněk (Campo et al., 2011). Současná klasifikace zahrnuje všechny jednotky, tedy jak leukémie, lymfomy, myelom, tak i některé vzácnější entity (Tab. 2). Prekurzorové B i T lymfoproliferace nejsou v Tabulce 2 zahrnuty, nicméně jsou součástí WHO klasifikace (Swerdlow et al., 2008) a jsou komentovány níže.

Tab. 2: WHO klasifikace tumorů hematopoetických a lymfoidních tkání (převzato z Campo et al., 2011).

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable*
Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*
Hairy cell leukemia variant*
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Heavy chain diseases
α Heavy chain disease
γ Heavy chain disease
μ Heavy chain disease
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
Pediatric nodal marginal zone lymphoma*
Follicular lymphoma
Pediatric follicular lymphoma*
Primary cutaneous follicle centre lymphoma
Mantle cell lymphoma
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV-positive DLBCL of the elderly*
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK-positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
Primary effusion lymphoma
Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma
Mature T-cell and NK-cell neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells*
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV-positive T-cell lymphoproliferative disease of childhood
Hydroa vacciniforme-like lymphoma
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30 ⁺ T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma
Primary cutaneous CD8 ⁺ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma*
Primary cutaneous CD4 ⁺ small/medium T-cell lymphoma*
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative*

NOS indicates not otherwise specified; ALK, anaplastic lymphoma kinase; HHV8, human herpesvirus 8; and NK, natural killer.

*These histologic types are provisional entities for which the WHO Working Group felt there was insufficient evidence to recognize as distinct diseases at this time.

†These lesions are classified according to the leukemia or lymphoma to which they correspond.

Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma
Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Intermediate dendritic cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Posttransplantation lymphoproliferative disorders (PTLDs)
Early lesions
Plasmacytic hyperplasia
Infectious mononucleosis-like PTLD
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T/NK-cell types)†
Classical Hodgkin lymphoma type PTLD†

NOS indicates not otherwise specified; ALK, anaplastic lymphoma kinase; HHV8, human herpesvirus 8; and NK, natural killer.

*These histologic types are provisional entities for which the WHO Working Group felt there was insufficient evidence to recognize as distinct diseases at this time.

†These lesions are classified according to the leukemia or lymphoma to which they correspond.

1.5.2. Stručná charakteristika vybraných lymfoproliferativních onemocnění

Lymfoproliferativní nádory jsou nejčastější skupinou hematologických malignit, jejichž incidence v České republice je odhadována na více než 25 nových případů na 100 000 obyvatel a rok. Nejvyšší je incidence non-Hodgkinových lymfomů (NHL) s 15 novými případy, následována chronickou lymfatickou leukémií (CLL) se 4-5 případy, mnohočetným myelomem (MM) se 3-4 případy na rok a Hodgkinovým lymfomem (HL) se 3 případy. Zatímco u západní populace je více než 90% případů tvořeno lymfoproliferacemi vycházejícími z B lymfocytů, podíl nemocných s T lymfoproliferacemi je výrazně vyšší u asijské populace (Češka et al., 2010).

Nádorová lymfoproliferativní onemocnění jsou heterogenní skupinou nádorů vycházejících z různých vývojových stadií B a T lymfocytů, případně NK buněk (Medeiros a Carr, 1999). Vznikají klonální expanzí původně jedné maligně transformované buňky (Langerak et al., 2007). Zahrnují leukémie a lymfomy. Leukémie vznikají z hematopoetických kmenových buněk nebo v různých stádiích myeloidní nebo erytroidní diferenciace. Neoplazie postihuje kostní dřeň a často, nikoliv však vždy, periferní krev. Lymfomy, které vznikají jako ohraničená tkáňová masa, jsou zhoubné nádory mízních uzlin a lymfatické tkáně

(např. v okolí sleziny, jater, střev, velkých krevních cév nebo extranodálních tkání). Další důležitou skupinou lymfoidních tumorů, vznikajících většinou v kostní dřeni, méně často pak v lymfatických uzlinách a postihujících terminálně diferencované buňky, jsou neoplazie z plazmatických buněk.

Kategorizace vzhledem k heterogenitě onemocnění je velice složitá a určení, zda tedy bude konkrétní neoplazie zařazena jako leukémie nebo lymfom, závisí na obvyklé distribuci v tkáni. Entity, formálně klasifikovány jako lymfomy, se mohou prezentovat jako leukémie nebo se vyvíjet jako leukémie a podobně tumory, zařazené jako leukémie, mohou příležitostně vznikat z měkkých tkání bez postižení kostní dřene (Mitchell et al., 2011). WHO klasifikace člení lymfoidní neoplazie do pěti kategorií na základě klinických projevů, morfologie, imunofenotypu a genotypu (Mitchell et al., 2011):

1.5.2.1. Prekursorové B-buněčné neoplazie z nezralých B buněk

Prekursorové B-buněčné neoplazie představují vysoce agresivní onemocnění, způsobené chromozomálními aberacemi, které vedou k dysregulaci exprese nebo funkce většinou transkripčních faktorů, které kontrolují vývoj B buněk a vedou k zástavě maturace na různých stupních diferenciaci. Výsledkem jsou nezralé, hromadící se blasty, které postihují kostní dřeň nebo jsou vyplavovány do periferní krve. Nejčastějšími genetickými aberacemi, které se vyskytují u neoplazií z B-buněčných prekursorů, jsou změny v počtu chromozomů. Většinou se jedná o zvýšený počet (hyperploidie), méně často se vyskytuje snížený počet (hypoploidie). Častou genetickou aberací jsou také translokace a vznik fúzních genů, které deregulují transkripční faktory (TF). Výjimku tvoří derivovaný chromozom 22, označovaný jako Philadelphský (Ph chromozom). Translokací vzniká fúzní gen, jehož exprese vede ke konstitutivní aktivaci buněčné tyrozinkinázy Bcr-Abl. Zvýšenou fosforylací pak tato tyrozinkináza dereguluje signální kaskády v buňce, které vedou ke zvýšení proliferace, snížení apoptózy a inhibici opravných mechanismů DNA.

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)/lymfoblastický lymfom (LL) je neoplazie z prekursorových buněk (lymfoblastů), nasměrovaných do B-buněčné linie. Postihuje kostní

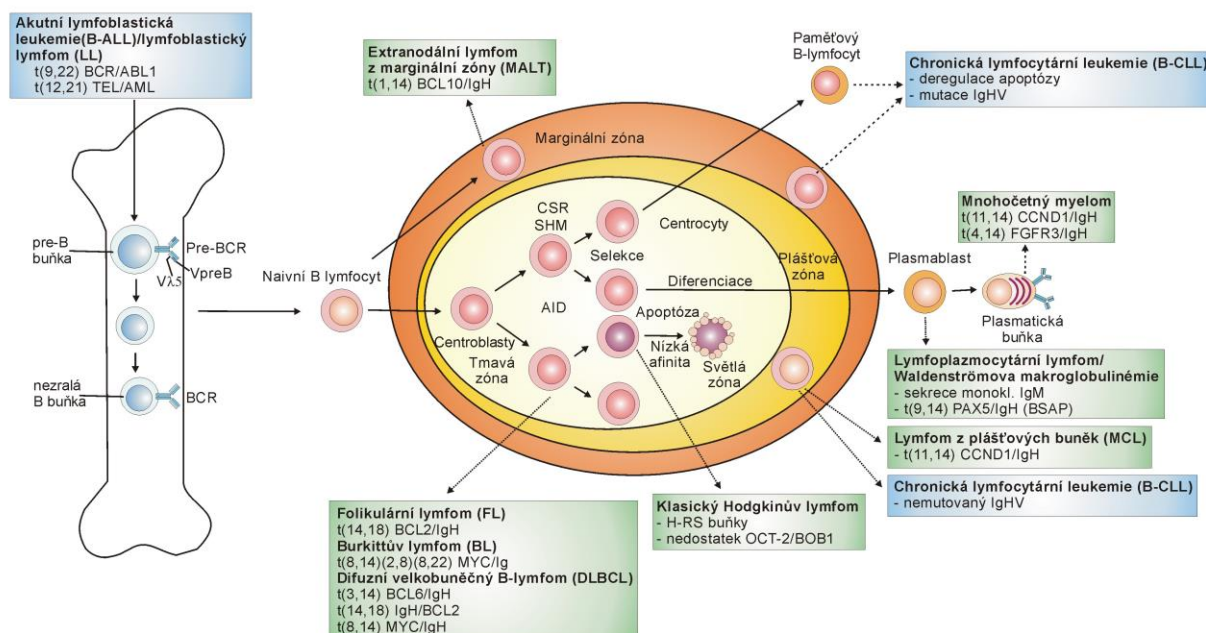
dřeň a krev (akutní lymfoblastická leukemie) a příležitostně se prezentuje primárním postižením nodálních či extranodálních míst (lymfoblastický lymfom). Jako lymfomy se označují případy s ohraničenými lézemi bez postižení krve a kostní dřeně nebo s minimálním postižením (Borowitz a Chan, 2008). Hromadí se blasty v kostní dřeni utlačují původní krvetvorbu (Pospíšilová et al., 2013) (Obr. 13).

1.5.2.2. Periferní B-buněčné neoplazie ze zralých B buněk

Neoplazie ze zralých B lymfocytů představují většinu (téměř 95%) všech hematologických malignit (Jaffe et al., 2008). Jsou odvozeny z různých vývojových stadií zralých B lymfocytů. Vznikají neoplastickou transformací během diferenciaci v imunokompetentní buňky a selháním kontroly procesů, které probíhají v germinálních centrech lymfatických orgánů po antigenní stimulaci. Zcela zásadní roli v B-buněčné tumorigenezi hrají chromozomální translokace v oblastech lokusu imunoglobulinu. Těmito mutacemi jsou spuštěny procesy aktivace protoonkogenů, inaktivace tumor-supresorových genů a dysfunkce genů, regulujících proces buněčného cyklu a apoptózy. Neustálá antigenní stimulace může být podnětem pro transformaci polyklonální populace normálních lymfocytů na monoklonální proliferaci. Postgerminální lymfomy zahrnují neoplazie z terminálně diferencovaných plazmatických buněk, produkujících patologický imunoglobulin, vznikajících většinou v kostní dřeni, méně často pak v lymfatických uzlinách.

Chronická lymfocytární leukémie (CLL)/malobuněčný lymfom (SLL) je nejčastější neoplazie dospělého věku s incidencí 6 případů na 100 000 obyvatel (Pospíšilová et al., 2013). Jde o nevléčitelné onemocnění, při kterém dochází k patologickému hromadění morfologicky zralých malých B lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni, slezině a lymfatických uzlinách. Obě jednotky, CLL a SLL nejsou morfologicky, fenotypicky ani genotypicky rozlišitelné, liší se pouze stupněm lymfocytózy v periferní krvi (Mitchell et al., 2011). Chromozomální translokace jsou vzácné, nejčastěji jsou pozorovány delece 13q12-14, delece 11q nebo 17p a trizomie 12q. U některých forem tohoto lymfomu jsou mutovány variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinového genu (IgVH) a podle toho se dělí na

dva zcela prognosticky odlišné subtypy CLL/SLL. Pre-germinální subtyp s nemutovaným IgVH, který vzniká z naivních B buněk, je agresivnější, se špatnou prognózou a kratší dobou přežití. CLL/SLL se somatickou hypermutací v IgVH lokusu vzniká z post-germinálních paměťových B buněk a vykazuje podstatně lepší prognózu s delší dobou přežití (Mitchell et al., 2011).



Obr. 13: Prekurzorové a periferní B-buněčné neoplazie (upraveno dle Focosi, 2012).

Extranodální lymfom z B buněk marginální zóny MALT typu (MALT lymfom) představuje samostatný podtyp non-Hodgkinova lymfomu (NHL), odlišný od nodálního lymfomu marginální zóny a od primárně splenického lymfomu marginální zóny, postihujícího slezinu a kostní dřeň. MALT lymfom vychází z různých extranodálních míst, nejčastěji ze slizniční lymfatické tkáně (mucosa-associated lymphoid tissue). Může postihnout i sliznice zažívacího ústrojí, dýchacích cest, kůži, slinné žlázy a další orgány a je spojený s chronickými zánětlivými změnami, způsobenými bakteriální infekcí *Helicobacter pylori*. U většiny pacientů se nejprve rozvíjí polyklonální onemocnění, léčitelné antibiotiky. V mnoha případech je výsledkem chronického zánětu akumulace extranodální lymfoidní tkáně, která je místem pro vytvoření substrátu pro vývoj lymfomu (Isaacson et al., 2008). Nejčastější

translokací je t(11, 18), kterou se inhibitor apoptózy (API-2) dostává pod kontrolu regulačních genů např. MALT-1, případně s nimi fúzuje a dochází k inhibici apoptózy.

Lymfom z pláštových buněk (MCL, mantle cell lymphoma) představuje 3-10% všech NHL. Vzniká z B lymfocytů, kumulovaných v oblasti pláštové zóny primárního folikulu lymfatických uzlin, které mají ukončenou přestavbu IgH a na svém povrchu exprimují IgM, IgD a typické povrchové B-buněčné antigeny. Pro více než 90% případů MCL je typická translokace t(11,14), která vede k nadměrné expresi cyklinu D1, který je zodpovědný za uvedení buněk do buněčného cyklu. Spouští tak přechod z fáze G₀ buněčného cyklu do fáze G₁, nekontrolovatelné dělení a množení mutovaného klonu lymfocytů (Češka et al., 2010; Pospíšilová et al., 2013). Stejně jako u CLL, IGVH je u MCL v zárodečné konfiguraci (nemutovaný Ig), kterou nalézáme u naivních buněk nebo obsahuje somatické mutace (mutovaný Ig), což indikuje reakci na antigen. Na rozdíl od CLL, prognostická role IGVH mutačního statusu nebyla potvrzena. Předpokládalo se, že MCL jsou odvozeny z naivních, pre-germinálních center, nicméně několik pozorování dokázalo, že ne všechny případy. Až 40% vykazuje somatické hypermutace IgVH a dále, téměř polovina případů exprimuje nejméně jeden imunohistochemický marker, charakteristický pro GC nebo post-GC fenotyp (Peréz-Galán et al., 2011).

Folikulární lymfom (FL) je nejčastějším typem nízce maligního B-buněčného NHL. Podle WHO klasifikace je definován jako neoplazie vycházející z buněk germinálního centra. Jde o populaci malých a středně velkých lymfocytů (centrocytů a centroblastů), exprimující Bcl-2 a CD10. FL jsou dány monoklonální expanzí zralých B buněk, které jsou z 99% v klidové fázi G₀ buněčného cyklu. Dominuje tedy defekt v apoptóze, nikoliv zvýšený proliferační potenciál. Růst nádoru je relativně pomalý, doprovázený hromaděním buněk s defektem apoptózy, který je způsoben nadměrnou expresí antiapoptotického onkoproteinu Bcl-2. Podstatou je pro FL typická chromozomální translokace t(14,18), ke které dochází náhodnou chybou během přestaveb genů pro IgH ve stadiu pre-B buňky v kostní dřeni. Protoonkogen Bcl-2 se přesunuje z chromozomu 18 pod řídicí vliv regulátoru pro IgH řetězce na chromozomu 14. Buňky FL jsou díky zvýšené expresi Bcl-2 rezistentní na apoptózu a jsou

tedy považovány za nesmrtelné. Pro svoji existenci vyžadují podporu ostatních buněčných populací GC (Pospíšilová et al., 2013).

Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) je typ lymfomu s nejvyšší incidencí. Představuje asi 30-40% všech lymfomů, v ČR zhruba 45% lymfomů (Češka et al., 2010). Patogeneticky se na základě genové exprese dělí DLBCL do dvou základních podskupin. DLBCL vycházející z germinálního centra – GCB (germinal center B cell) a vycházející z aktivovaných B lymfocytů – ABC (activated B-cell) (Češka et al., 2010; Jaffe a Pittaluga, 2011). Pro DLBCL je typická chromozomální translokace genu Bcl-6 (B cell lymphoma gene 6), ležícího na chromozomu 3 do oblasti genu pro IgH. Produktem genu Bcl-6 je DNA vazebný TF, který se účastní procesů diferenciace B buněk v GC, vazby protilátek a imunitní odpovědi. Bcl-6 je důležitý pro vývoj B buněk v GC, v pozdějších stádiích diferenciace dochází k útlumu jeho exprese, což umožní zrání lymfocytů do stádia plazmatických buněk (Abbas et al., 2012). V důsledku ztráty kontroly exprese Bcl-6 genu dochází k maligní transformaci B buněk GC. Časté jsou translokace typické i pro folikulární a Burkittův lymfom, tedy t(14,18) a t(8,14) (Pospíšilová et al., 2013) (Obr. 13).

Burkittův lymfom (BL) představuje vysoce agresivní B-buněčnou neoplazii, vycházející z GC a prezentující se třemi klinicky odlišnými variantami: (a) *endemickou*, spojenou s infekcí EBV (Epstein Barr virus) (výskyt v oblastech s nízkým socioekonomickým statusem, pozitivita v 50-70% případů) (Jaffe a Pittaluga, 2011); (b) *sporadickou* formou BL, která je rozšířena po celém světě a (c) *asociovanou s imunodeficitou* (výskyt u HIV pacientů). Všechny tři formy postihují převážně extranodální lymfatické tkáně a často i nervový systém. Burkittův lymfom charakterizují chromozomální translokace genu c-MYC, lokalizovaného na chromozomu 8 do oblasti IgH genu na chromozomu 14, případně IgL κ a λ na chromozomu 2, respektive 22. Tímto se gen c-Myc dostává pod kontrolu promotorů genů pro imunoglobuliny a je konstitutivně exprimován. C-Myc je transkripční regulátor, který ovlivňuje celou řadu procesů v buňce a jeho zvýšená exprese má za následek nekontrolované buněčné dělení a maligní transformaci buňky.

Lymfoplazmocytní lymfom (LPL)/Waldenströмова makroglobulinémie (WM) je lymfoproliferativní onemocnění s charakteristickou lymfoplazmocytní klonální expanzí a chromozomální translokací t(9,14), při které dochází k deregulaci genu PAX5, který kóduje B-buněčný specifický TF (BSAP), který v normálních buňkách kontroluje B-buněčnou proliferaci a diferenciaci.

Mnohočetný (plazmocelulární) myelom (MM) představuje onemocnění, charakteristické nádorovou expanzí zralých, terminálně diferencovaných plazmatických B buněk, produkujících patologický imunoglobulin. Typické jsou infiltrace kostní dřeně nádorovými plazmocyty, průkaz paraproteinu v séru nebo moči a osteolytická ložiska skeletu, vznikající na základě série genetických změn v buňce. Časté jsou translokace genu IgH s genem pro receptor FGFR3 a s geny pro regulátory buněčného cyklu D1 a D3. Ty vedou k nádorové transformaci, změnám mikroprostředí kostní dřeně, podporující růst nádoru a selhání imunitního systému. Ig geny vykazují somatické hypermutace, čímž potvrzují původ z buněk post-germinálního centra, které migrovaly do kostní dřeně a diferencovaly v plazmatické buňky (Mitchell et al., 2011) (Obr. 13).

1.5.2.3. Prekursorové T-buněčné neoplazie z nezralých T buněk

Prekursorové T-buněčné neoplazie vznikají z lymfocytárních prekurzorů. Vývoj T buněk je zastaven v různých raných intra-thymických fázích diferenciaci, což je způsobeno dysregulací exprese transkripčních faktorů translokacemi.

Akutní lymfoblastová leukémie (ALL)/lymfoblastový lymfom (LL) vykazují časté chromozomální aberace, především translokace, kterými se geny TF dostávají pod vliv genu kódujícího TCR buněk. Jsou tak ovlivněny TF, které v normálních buňkách kontrolují vývoj a zrání T buněk. Nejfrekventovanější je mutace v genu NOTCH1, které nalézáme u více než poloviny pacientů. NOTCH je klíčový pro nasměrování lymfoidního progenitoru do T-buněčné linie, podporuje proliferaci, diferenciaci a přežívání T prekurzorů. Mutace genu vedou ke konstitutivní aktivaci NOTCH1, jejímž důsledkem je maligní zvrát T-buněčných prekurzorů (Abbas et al., 2012; Pospíšilová et al., 2013). T-ALL/LL vykazují téměř vždy klonální

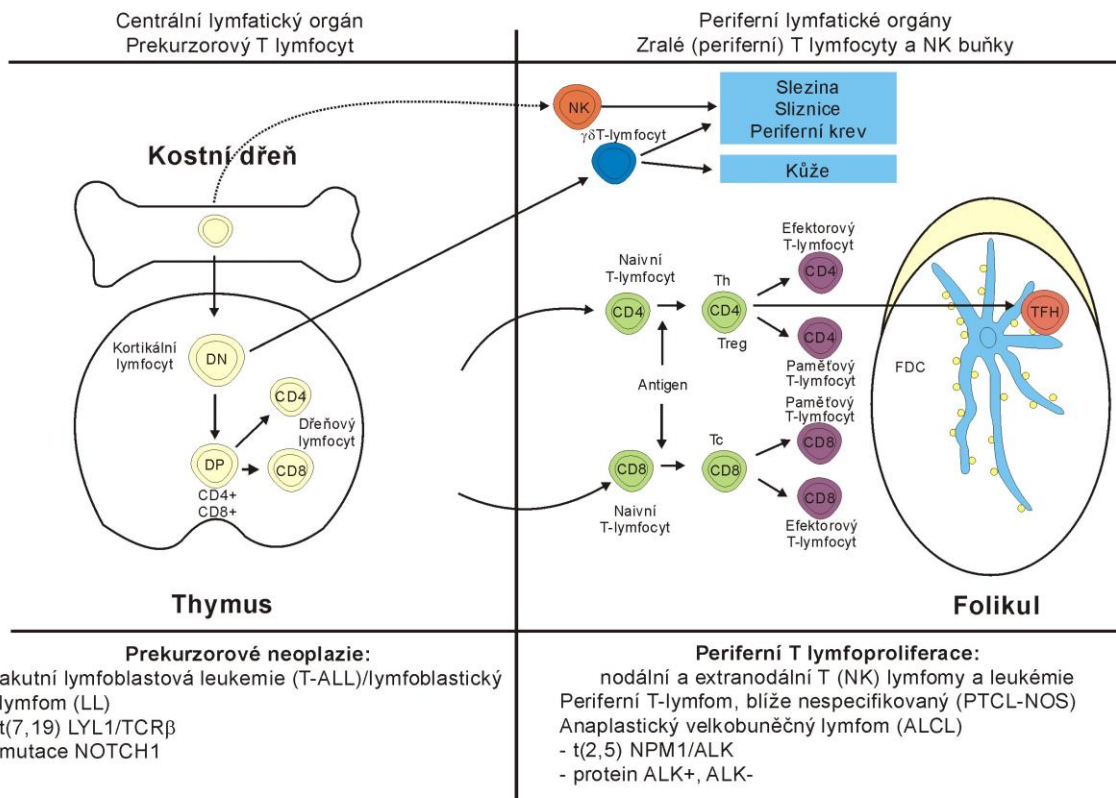
přeskupení genů TCR, ale současně až v 20% případů prezentují přeskupení genu IgH (Borowitz a Chan, 2008) (Obr. 14).

1.5.2.4. Periferní T-buněčné a NK-buněčné neoplazie ze zralých T a NK buněk

Periferní T- a NK-buněčné neoplazie jsou heterogenní skupinou nádorů, představující poměrně vzácná onemocnění, jež tvoří asi 12% všech NHL (Jaffe et al., 2008) v západních zemích a 30% v oblastech východní Asie. Antigenní stimulace bakteriálními či virovými patogeny může být podnětem pro transformaci polyklonální populace normálních lymfocytů na monoklonální proliferace. Lymfomy vykazují imunofenotyp zralých, post-thymických lymfocytů. Klasifikace je založena hlavně na klinických projevech, často doprovázených výrazným zánětlivým infiltrátem, což někdy ztěžuje průkaz klonality a může obraz lymfomu překrývat. Nevyskytují se zde specifické mutace.

Výjimku představuje *Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL)*, který je tvořen jednak kožní variantou a jednak systémovým typem ALCL, postihujícím primárně uzliny. Charakteristickou translokací, která se vyskytuje u části ALCL je t(2;5), při které se ALK kináza dostává pod vliv promotoru genu pro nukleofosmin. Vzniká tak fúzní protein, který se chová jako konstitutivně aktivní tyrosinkináza. Rozlišují se dvě biologicky a prognosticky odlišné skupiny, definovány jako ALK+ ALCL a ALK- ALCL. První skupina je tvořena mladšími pacienty s dobrou prognózou a delší dobou přežití. Naproti tomu druhá skupina s ALK- se vyskytuje u pacientů staršího věku, často se manifestuje extranodálním postižením s horší prognózou a kratší dobou přežití (Češka et al., 2010; Pospíšilová et al., 2013). Přibližně 90% případů ALCL ALK+ vykazuje klonální přestavbu genu TCR.

Periferní T-buněčné lymfomy, blíže nespecifikované (PTCL NOS), jsou nejčastěji se vyskytující typem zralých T lymfomů (Jaffe et al., 2008). Představují heterogenní skupinu primárně nodálních lymfomů, která zahrnuje 5 – 20% všech NHL v různých částech světa a které zatím není možné dostupnými metodami, používanými ve WHO klasifikaci, zařadit do přesněji definovaných jednotek (Weisenburger et al., 2011).



Obř. 14: Prekurzorové a periferní T-buněčné neoplazie (upraveno dle Jaffe et al., 2008).

Mezi méně časté T lymfomy se řadí *Angioimmunoblastický T lymfom (AITL)*, který často manifestuje celkovými příznaky, horečkami. Často dochází k dysregulaci imunitních reakcí a vzniká v souvislosti s infekcí EBV.

T leukémie/lymfom dospělých (ATLL) je T-buněčná neoplazie spojená s infekcí HTLV-1 (Human T cell lymphoma/leukaemia virus type 1), který je integrován do genomu transformovaných T buněk (Jaffe et al., 2008). Onemocnění se vyskytuje v karibské oblasti a východní Asii, především v Japonsku, a je charakteristické vysoce agresivním průběhem (Češka et al., 2010; Soo et al., 2011). T-buněčné receptorové geny vykazují klonální přestavbu (Ohshima et al., 2008).

Mezi extranodální T lymfomy se řadí *Extranodální NK/T lymfom, nazální typ (ENKTCL)*, což je vzácnější forma lymfomů, nejčastěji se vyskytující v asijské oblasti, který je etiologicky spojen s EBV infekcí. Postihuje nos, nasofarynx, měkké tkáně a nádorový infiltrát je doprovázen výraznými nekrózami (Soo et al., 2011). Nejčtenějšími extranodálními

lymfomy jsou heterogenní kožní T lymfomy. Nejčastější je výskyt *Mycosis fungoides (MF)* a jeho vzácné formy Sézaryho syndromu. Druhou nejčastější skupinou kožních lymfomů je *Lymfomatoidní papulóza (LyP)* (Češka et al., 2010) (Obr. 14).

1.5.2.5. Hodgkinův lymfom (neoplazie z buněk Reedové-Sternberga)

Klasický Hodgkinův lymfom je nádorové monoklonální onemocnění, které představuje asi 30% všech lymfomů (Pospíšilová et al., 2013), které vychází z B buněk germinálního a post-germinálního centra. Unikátní buněčná kompozice HL (Hodgkinův lymfom) je tvořena minoritní populací neoplastických buněk, mononukleárních Hodgkinových buněk (H buňky) a polynukleárních buněk Reedové-Sternberga (RS buňky). Ty uvolňují faktory, které indukují akumulaci reaktivních lymfocytů, makrofágů a granulocytů a vytváří tak zánětlivé pozadí (Mitchell et al., 2011). Na základě složení okolních nemaligních buněk se HL člení do čtyř histologických podtypů: (a) bohatý na lymfocyty, (b) chudý na lymfocyty, (c) nodulární skleróza a (d) smíšená buněčnost. H-RS buňky obsahují z 98% monoklonální přestavbu genu pro Ig a jen v ojedinělých případech monoklonální přestavbu genu T buněčného receptoru (Stein et al., 2008; Pospíšilová et al., 2013). U naprosté většiny případů podstupují Ig geny RS buněk jak V(D)J rekombinaci, tak somatickou hypermutaci, což potvrzuje původ buněk z germinálního a post-germinálního centra. Nicméně zatím neexistuje vysvětlení, proč u RS buněk klasického HL selhává exprese většiny specifických B buněčných genů, včetně Ig (Češka et al., 2010; Mitchell et al., 2011) (Obr. 14).

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- 2.1.** Cílem této práce bylo v první řadě zavedení a optimalizace molekulárně-biologické metody PCR v diagnostice lymfoproliferativních onemocnění. Součástí optimalizací bylo vedle zavedení vlastní PCR, heteroduplexní analýzy a způsobu separace produktů a vizualizace výsledků i testování typu fixace na kvalitu izolované DNA.
- 2.2.** Hlavním cílem práce bylo využití zavedené metody pro vlastní diagnostiku lymfoproliferativních onemocnění, a to zvláště v případech, kdy jsou morfologická a imunohistochemická stanovení nejednoznačná. Stanovení správné diagnózy je nezbytným předpokladem k zahájení léčby pacientů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Příprava tkání, izolace a kvantifikace DNA

3.1.1. Zpracování bioptického materiálu

Téměř všechny vzorky tkání byly získány z biopsií (parafínových bločků), tedy tkání fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (FFPE, formalin fixed, paraffin-embedded tissue), vyšetřovaných na Ústavu klinické a molekulární patologie Fakultní nemocnice (ÚKMP) v Olomouci a ze vzorků, zaslaných na ÚKMP k tzv. druhému čtení z jiných nemocničních zařízení v regionu. Pouze ve výjimečných a ojedinělých případech byla vyšetřována tkáň nativní, případně zmražená.

Genomová DNA (gDNA) byla standardně extrahována z parafínových bločků za použití Puregene® DNA isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Vzhledem k tomu, že výtěžnost DNA extrakce je vyšší, provádí-li se z malých fragmentů, z každého bločku bylo na mikrotomu sterilně nařezáno přibližně 5 řezů (počet byl stanoven podle velikosti tkáně) 5 µm silných, které byly umístěny do sterilních mikrozkušavek Eppendorf (EP). Příliš mnoho zpracovávané tkáně v EP může paradoxně vést k nižší výtěžnosti extrahované DNA (Hunt, 2007).

3.1.2. Odparafínování tkáně

Do 1,5 ml EP s tkáňovými řezy bylo přidáno 300 µl xylenu k rozpuštění parafínu. EP byly zvortexovány a inkubovány po dobu 15 min při pokojové teplotě za stálého protřepávání na rotátoru (Bio Rotator RS-Multi, BOECO, Německo). Následovalo stočení EP na minicentrifuze (MiniSpin, Eppendorf, Německo) při 9000 g po dobu 5 min za vytvoření pelety. Poté byl z EP opatrně odpipetován supernatant a celý proces byl zopakován ještě dvakrát, aby byl vzorek tkáně dokonale zbaven parafínu. K peletám pak bylo přidáno 300 µl 96% etanolu, EP byly vortexovány a po krátké inkubaci byly centrifugovány při 9000 g po dobu 5 min. Pro dokonalé promytí a odstranění zbytku xylenu byl tento proces ještě jednou

zopakován. Etanol byl z EP opatrně odpipetován a zbytky etanolu se odpařily ponecháním otevřených EP po dobu 5 až 10 min při pokojové teplotě.

3.1.3. Izolace genomové DNA

Do mikrozkušavek s odparafinovanou tkání bylo přidáno 300 μ l lyzačního pufru z izolačního kitu a 1,5 μ l proteinázy K (zásobní roztok 20 mg/ml; Gentra Systems, Minneapolis, MN). EP byly umístěny do termobloku (Thermo-Shaker, Biosan, Litva) a za stálého třepání inkubovány přes noc při 56°C. V případě nedokonalé homogenity byla do vzorku přidána proteináza K a doba inkubace byla prodloužena. Délka digesce je závislá na mnoha faktorech, především teplotě, pH pufru a v neposlední řadě na typu vyšetřovaného vzorku. Řada studií dokládá nutnost dostatečného natrávení tkáně, které tak zvyšuje kvalitu vyšetřované DNA (Hunt, 2007).

Z homogenního lyzátu byla kontaminující RNA odstraněna přidáním 1,5 μ l RNazy A (zásobní roztok 4 mg/ml; Gentra Systems, Minneapolis, MN) a důkladným promícháním obracením EP přibližně 50 \times . Po inkubaci při 37°C po dobu 15 min byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a do EP bylo přidáno 100 μ l protein-precipitačního pufru. Jednotlivé EP byly důkladně vortexovány po dobu 20 sekund a inkubovány na ledu 1 min. Poté byly vzorky centrifugovány při 9000 g po dobu 3 min za vytvoření pelety, obsahující kontaminující proteiny.

Supernatant obsahující DNA byl velice opatrně přepipetován do nových, sterilních EP, obsahujících 300 μ l izopropylalkoholu. Několikanásobným obracením EP došlo k vysrážení gDNA. Po centrifugaci při 9000 g po dobu 3 min byl opatrně odstraněn supernatant a vytvořená peleta, obsahující gDNA, byla promyta přidáním 300 μ l 70% etanolu a převrácením EP. Poté byly EP znovu centrifugovány při 9000 g po dobu 1 min, etanol opatrně odstraněn vylitím tak, aby nedošlo ke ztrátě pelety a zbytky etanolu byly odstraněny ponecháním otevřených EP při pokojové teplotě po dobu 10 min.

Do každé EP bylo napipetováno 20 μ l hydratačního pufru a gDNA byla hydratována inkubací v termobloku při 65°C po dobu 60 min. Takto extrahovaná gDNA byla uložena v lednici při 4°C a připravena k dalšímu použití. Pro dlouhodobější uchování byly vzorky zamraženy a uchovávány při -20°C nebo -80°C.

3.1.4. Měření koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Z každého vzorku byl odebrán 1 μ l hydratované DNA a přenesen do nových sterilních EP s 24 μ l hydratačního pufru. Po promíchání bylo 20 μ l roztoku každého vzorku přeneseno do 384jamkového panelu spolu s referenčním vzorkem (blankem) o stejném objemu. Na spektrofotometru POWER Wave XS (BIOTEK®Instruments) byla změřena absorbance UV-záření při vlnových délkách 260 a 280 nm. Aromatické struktury bází DNA specificky absorbují světlo při 260 nm, což odpovídá koncentraci a tedy kvantitě nukleových kyselin v roztoku (OD_{260nm}), zatímco kontaminující proteiny absorbují světlo při 280 nm (Bielawski et al., 2001; Sambrook et al., 1989; Hunt 2007). Poměr absorbance (OD_{260nm}/OD_{280nm}) je mírou čistoty DNA. Ideální poměr absorbancí je 1,8–2,0 hodnoty nižší než 1,75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin, hodnoty nad 2 jsou známkou přítomnosti RNA. Kontrola extrahované DNA byla provedena rovněž použitím kontrolní multiplex PCR (kap. 3.2.2.).

3.2. Vyšetření klonality IgH a TCR

3.2.1. Polymerázová řetězová reakce

Metodu polymerázové řetězové reakce (PCR) koncipoval v roce 1983 Dr. Kary B. Mullis, který byl za tento objev v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou za chemii. Nejdůležitějším objevem, který předcházel navržení metody PCR, byl objev vlastností enzymu DNA polymerázy (Taq), získaného z bakterií *Thermus aquaticus* (organismus žijící při extrémně vysokých teplotách) (Hunt, 2007). PCR využívá dva uměle syntetizované primery (oligonukleotidy), které jsou komplementární s hledanou cílovou sekvencí na obou vláčknech DNA. Primery jsou krátké oligonukleotidové sekvence o délce 15 - 22 bp, které jsou

navrženy tak, aby obklopovaly sledovanou sekvenci na DNA, jejíž počet se např. při 30 PCR cyklech znásobí 10^6 až 10^9 krát. Objev metody PCR zahájil explozi zavádění molekulárně-biologických aplikací, vedoucích k analýze vzorků, které nebylo možné do té doby vyšetřit. PCR nahradila metody Southern a Northern přenosu, které byly časově náročné a vyžadovaly pro analýzu velké množství vysoce kvalitních nukleových kyselin (Hunt, 2007).

3.2.2. Kontrola integrity DNA pomocí kontrolní multiplex PCR

Pro správné stanovení klonality a vyloučení chybné interpretace výsledků je zcela zásadní testování kvality DNA, zvláště v případě vyšetření FFPE tkání. Špatná kvalita DNA extrahované z FFPE tkání tak může zabránit amplifikaci IgH a TCR genů a vést k falešně negativním výsledkům (Groenen et al., 2008). Pro kontrolu integrity a amplifikovatelnosti DNA, izolované z bioptických bločků, byla použita speciální multiplex PCR kontrolních genů (Tab. 3), vytvářejících žebřík fragmentů o délce 100, 200, 300, 400 a 600 bp (van Dongen et al., 2003). I když byly kontrolní primery (Biomed-2) navrženy a validovány pro klonální analýzu DNA z nativních a mražených tkání, jsou akceptovány mnoha laboratořemi i pro FFPE tkáně (Groenen et al., 2008). Pro vlastní PCR o objemu 25 μ l s 200 ng vyšetřované DNA byla použita Thermo-Start Taq DNA Polymeráza podle pokynů výrobce (Thermo Scientific) a cykler T-personal Combi (Biometra, Německo) nebo Mastercycler gradient (Eppendorf, Německo) (preaktivace 95°C 15 min, 35 cyklů denaturace 95°C 20 s – annealing 56°C 30 s – elongace 72°C 1 min, finální elongace 72°C 5 min a zchlazení na 4°C).

3.2.3. Multiplexní PCR a heteroduplexní analýza pro IgH a TCR geny

Všechny vzorky DNA, určené k detekci klonality IgH, uvedené v této práci, byly analyzovány pomocí *multiplex PCR dle Biomed-2* (van Dongen et al., 2003). I když pro analýzu klonálního přeskupení IgH B buněk byla testována i odstupňovaná (nested) PCR dle prací Wan et al. (1990), Diss et al. (1994), Aubin et al. (1995) a Elenitoba-Johnson et al. (2000), tato metodika zde není detailněji popisována.

Pro stanovení kompletního přeskupení IgH genů byla vyšetřovaná DNA amplifikována pomocí tří sérií primerů VH1, VH2, VH3, komplementárních k sekvenci variabilních oblastí FR1, FR2, FR3 a reverzním primerem JH, komplementárním k oblasti J (van Dongen et al., 2003). Konzervované úseky FR1 – FR3 (Framework 1 – 3) jsou situovány mezi hyper-variabilními úseky CDR1 – CDR3 (Complementarity-determining region) (Trainor et al., 1990; Mitha a McGlennen, 2001; Nikiforova et al., 2007; Campo et al., 2011). Sekvence primerů a velikosti výsledných PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 3. Pro vlastní PCR o objemu 50 μ l s 200 ng vyšetřované DNA byla použita Thermo-Start Taq DNA Polymeráza podle pokynů výrobce (Thermo Scientific) a cykler T-personal Combi (Biometra, Německo) nebo Mastercycler gradient (Eppendorf, Německo) (preaktivace 95°C 15 min, 35 cyklů denaturace 95°C 45 s – annealing 60°C 60 s – elongace 72°C 90 s, finální elongace 72°C 10 min a zchlazení na 4°C).

Pro analýzu klonálního přeskupení TCR T buněk byla rutinně využívána metodika a primery dle Mitha a McGlennen (2001). Byly testovány a zavedeny tři páry primerů. Pro řetězec TCR γ pár V γ -J γ a pro řetězec TCR β páry T β D1-J2 a T β D2-J2. Sekvence primerů a velikosti výsledných PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 3. Pro vlastní PCR o objemu 25 μ l s 200 ng vyšetřované DNA byla použita IMMOLASETM DNA Polymeráza podle pokynů výrobce (Bioline) a cykler T-personal Combi (Biometra, Německo) nebo Mastercycler gradient (Eppendorf, Německo) (preaktivace 95°C 10 min, 35 cyklů denaturace 95°C 20 s – annealing 58°C 20 s – elongace 72°C 15 s, finální elongace 72°C 10 min a zchlazení na 4°C).

K detekci klonality, založené na metodě PCR, je nutná následná analýza PCR produktu, vedoucí k rozlišení monoklonálních a polyklonálních buněčných populací a vyloučení případných falešně pozitivních výsledků. Ty mohou vzniknout v důsledku amplifikace i jen několika málo polyklonálních reaktivních buněk ve vyšetřované tkáni (Langerak et al., 1997; Langerak et al., 2007).

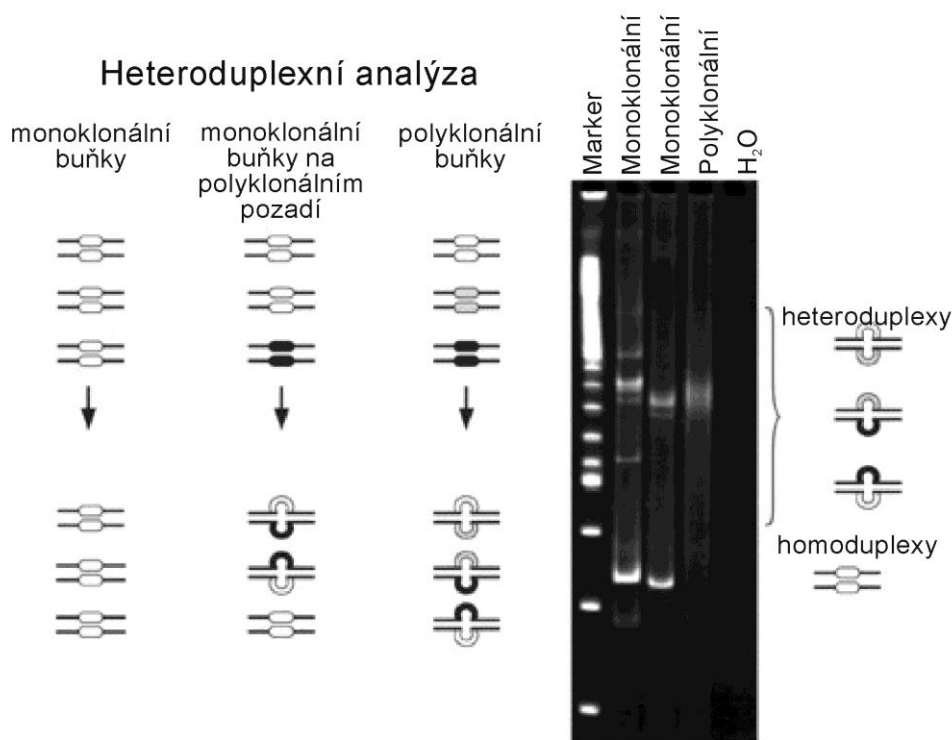
Tab. 3: Sekvence primerů a velikosti PCR produktů

IgH geny	Sekvence
VH1-FR1	5' GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG 3'
VH2-FR1	5' GTCTGGTCCTACGCTGGTCAAACCC 3'
VH3-FR1	5' CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG 3'
VH4-FR1	5' CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG 3'
VH5-FR1	5' CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT 3'
VH6-FR1	5' TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG 3'
VH1-FR2	5' CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA 3'
VH2-FR2	5' TGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGG 3'
VH3-FR2	5' GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA 3'
VH4-FR2	5' TGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGG 3'
VH5-FR2	5' GGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGG 3'
VH6-FR2	5' TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG 3'
VH7-FR2	5' TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA 3'
VH1-FR3	5' TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA 3'
VH2-FR3	5' CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA 3'
VH3-FR3	5' TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC 3'
VH4-FR3	5' GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG 3'
VH5-FR3	5' CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC 3'
VH6-FR3	5' GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG 3'
VH7-FR3	5' CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG 3'
JH cons	5' CTTACCTGAGGAGACGGTGACC 3'
Velikost PCR produktů	
VH FR1 - JH	310-360 bp
VH FR2 - JH	250-295 bp
VH FR3 - JH	100-170 bp
TCR geny	Sekvence
V γ 11	5' TCT GG(AG) GTC TAT TAC TGT GC 3'
J γ 11	5' CAA GTC TTG TTC CAC TGC C 3'
T β D1	5' CAA AGC TGT AAC ATT GTG GGG AC 3'
T β D2	5' TCA TGG TGT AAC ATT GTG GGG AC 3'
T β J2	5' AGC AC(GCT) GTG AGC C(GT)G GTG CC 3'
Velikost PCR produktů	
V γ 11 - J γ 11	70-110 bp
T β D1 - T β J2	55-100 bp
T β D2 - T β J2	55-100 bp
Kontrolní geny*	Sekvence
100A	5' GCCCGACATTCTGCAAGTCC 3'
100B	5' GGTGTTGCCGGGAAGGGTT 3'
200A	5' TGTTGACTCGATCCACCCCA 3'
200B	5' TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA 3'
300A	5' TGCGATGTGGTCATCATGGTG 3'
300B	5' CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC 3'
400A	5' CCGCAGCAAGCAACGAACC 3'
400B	5' GCTTTCCTCTGGCGGCTCC 3'
600A	5' GGAGCAGCATTCCATCCAGC 3'
600B	5' AATACAGGCCGGGTACCTAC 3'

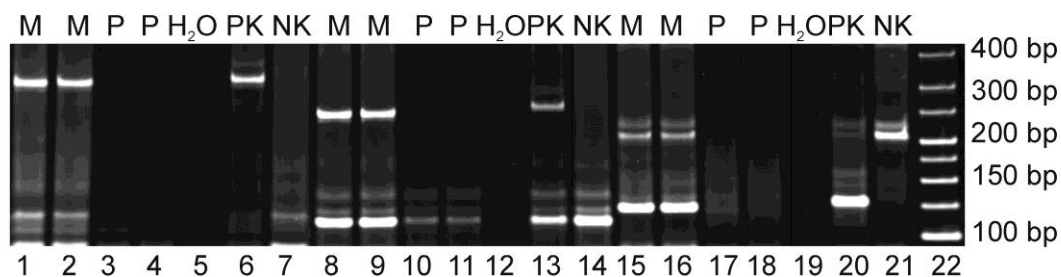
* V kontrolní PCR byly amplifikovány geny TBXAS1(exon 9, produkt 100 bp), RAG1 (exon 2, produkt 200 bp), PLZF (exon 1, produkt 300 bp), AF4 (exon 11, produkt 400 bp) a AF4 (exon 3, produkt 600 bp). Všechny primery byly dodány firmou Generi Biotech.

Heteroduplexní analýza je rychlá, jednoduchá metoda, která se využívá pro rozlišení monoklonálních lymfoidních buněk s identickými spojovacími oblastmi (označované též jako oblast CDR3) od polyklonálních lymfoidních buněk s vysoce odlišnými spojovacími oblastmi (Groenen et al., 2008) (Obr. 15).

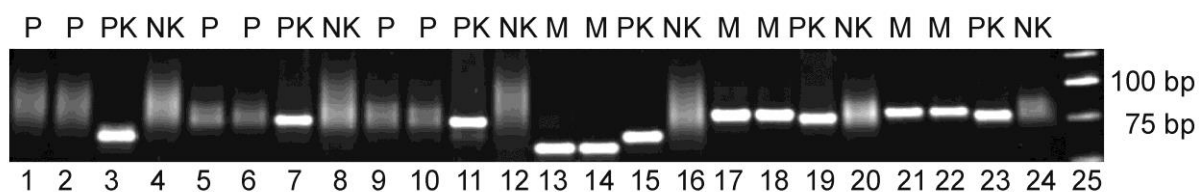
Produkty PCR jsou v termocycleru denaturovány při teplotě 95°C po dobu 5 min a následným rychlým ochlazením na 4°C po dobu 1 hodiny se vytvoří duplexní formace (homoduplexy nebo heteroduplexy) (Olaru et al., 2005; Langerak et al., 2012). Vzorky složené z klonálních lymfoidních buněk s přestavbou genů vytváří po denaturaci a následné renaturaci homoduplexy s identickou rychlostí migrace v gelu během elektroforézy (viz kap. 3.2.4.) a tvoří jeden band v očekávané oblasti. Naproti tomu vzorky, které obsahují polyklonální lymfoidní buněčnou populaci s jednořetězovými fragmenty tvoří heteroduplexy, které se na gelu zobrazují jako smear pomalu migrujících fragmentů (González et al., 1999; van Dongen et al., 2003; Langerak et al., 2007; Groenen et al., 2008). Obrázky 16 a 17 zobrazují výsledky PCR reakce (přeskupení IgH a TCR) po heteroduplexní analýze.



Obr. 15: Schematický diagram heteroduplexní analýzy (převzato z BIOMED-2).



Obr. 16: PCR analýza přeskupení IgH genů pomocí tří sérií primerů (VHFR1, dráha 1-7; VHFR2, dráha 8-14; VHFR3, dráha 15-21). PK, pozitivní kontrola (B lymfom); NK, negativní kontrola (reaktivní lymfatická uzlina); dráha 5, 12, 19: H₂O, negativní kontrola bez templátové DNA; dráha M, vzorek s monoklonálním přeskupením; dráha P, polyklonální vzorek; dráha 22, DNA marker. Vzorky pacientů byly analyzovány v duplikátu.



Obr. 17: PCR analýza přeskupení TCR genů pomocí tří párů primerů (V γ -J γ , dráha 1-4 a 13-16; T β D1-J2, dráha 5-8 a 17-20; T β D2-J2, dráha 9-12 a 21-24). PK, pozitivní kontrola (T lymfom); NK, negativní kontrola (reaktivní lymfatická uzlina); M, vzorek s monoklonálním přeskupením; P, polyklonální vzorek; dráha 25, DNA marker. Vzorky pacientů byly analyzovány duplicitně.

3.2.4. Elektroforéza v agarózovém a polyakrylamidovém gelu

PCR produkty byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy, která patří k nejpoužívanějším a nejjednodušším separačním technikám. Principem metody je pohyb molekul DNA (produktů PCR) v elektrickém poli směrem k anodě a to díky záporně nabitým fosfátovým skupinám nukleových kyselin. Pomocí gelové elektroforézy jsou separovány molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí pohybu fragmentů DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné jejich velikosti (počtu párů bází). Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, v tomto případě gelu, který vytváří síť polymerních molekul s póry, kterými různě velké fragmenty DNA prochází různou rychlostí, tzn. že malé fragmenty snáze prochází gelem, pohybují se rychleji a doputují na gelu dále.

Během optimalizace vyšetření IgH a TCR klonality byla použita elektroforéza v 3% agarózového gelu (Serva), obsahujícího ethidium bromid (Amresco). PCR produktu byly

smíchaný s nanášecím pufrém [10× zásobní roztok 40% sacharózy (Sigma) a 0,25% bromfenolové modři (Sigma) v 50 mM EDTA (pH 8,0, Sigma)], napipetovány do jamek a separovány při konstantním proudu 90 příp. 120 V v závislosti na velikosti elektroforetické vany (volena podle počtu nanášených vzorků). Jako elektrolyt byl použit 0,5× TBE pufr [5× zásobní roztok 1,1 M TRIS-báze (Sigma), 900 mM kyselina boritá (Sigma), 25 mM EDTA (Sigma), pH 8,3], obsahující také ethidium bromid. Pro určení velikosti PCR produktů byly naneseny 3 μ l markeru HyperLadder V[®] (Bioline).

Z důvodu kvalitnější separace a vizualizace amplifikovaných produktů PCR (VHFR - JH pro IgH, V γ 11-J γ 11, T β D1-T β J2, T β D2-T β J2 pro TCR a kontrolní PCR), byla agarózová elektroforéza nahrazena vertikální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Do jamek standardně připraveného 6% gelu [zásobní 40% polyakrylamid (Fluka), 20% bisakrylamid (Promega); 5× TBE (Tris Borátový EDTA pufr); 10% persíran amonný (Sigma); TEMED (Promega)] byly pipetovány vzorky smíchané s nanášecím pufrém (viz výše) o celkovém objemu 15 μ l a do poslední jamky byly naneseny 3 μ l DNA markeru HyperLadder V[®] (Bioline). Separace byla prováděna v 0,5× TBE pufru při konstantním proudu 140 V za stálého chlazení pomocí chladících podušek v elektroforetické vaně o velikosti 2 × 24 jamky (Clever Scientific Ltd, UK).

3.2.5. Zpevnění, barvení a snímání gelu CCD kamerou

Agarózové i polyakrylamidové gely byly původně barveny ethidium bromidem. Detekce spočívá v ozáření gelu ultrafialovým zářením, pod kterým ethidium bromid, navázaný na DNA, emituje světlo. Ethidium bromid se do DNA váže interkalací, vmezeřením mezi jednotlivé báze. Vzhledem k tomu, že se však jedná o silný mutagen a teratogen, byl nahrazen fluorescenčním barvicím roztokem GelRed. Výhodou tohoto barvení není jen bezpečnost, ale také vyšší detekční schopnost barvicího roztoku GelRed (viz kap. 4.1.3.).

Při použití velké elektroforetické vany bylo nutné polyakrylamidové gely před další manipulací zpevnit promýváním ve zpevňovacím roztoku (150 ml: 52,5 ml etanol; 7,5 ml

glycerol; 90 ml ddH₂O) po dobu 40 min. Standardně byly pak gely barveny promýváním ve fluorescenčním barvicím roztoku GelRed[®] (Bioline, USA) [45 ml ddH₂O, 5 ml 1M NaCl₂, 15 µl GelRed[®] (10 000× zásobní roztok)] po dobu 40 min. Poté byly gely přeneseny do misky s ddH₂O a připraveny k focení.

PCR produkty na značených agarózových a polyakrylamidových gelech byly vizualizovány pod UV světlem (GBox HR-Imaging System, Syngene). Po optimálním nastavení zoomu, časovače a zaostření byly gely snímány pomocí CCD kamery. Snímky byly zpracovány na PC v programu Microsoft Photo Editor (Microsoft).

3.3. Imunohistochemické barvení

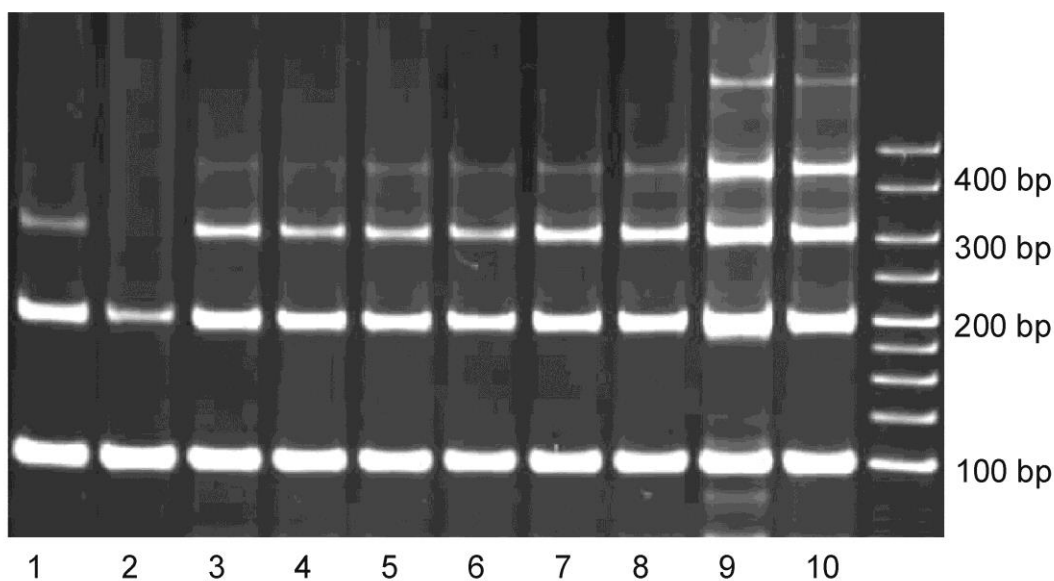
Součástí dizertace je prezentace deseti komplikovaných případů, které byly vybrány ve spolupráci s MUDr. Patrikem Flodrem. Řezy z formalín-fixovaných tkání o tloušťce 4 µm byly nabarveny hematoxylin eosinem, PAS (Periodic Acid Schiff) nebo byly použity pro imunohistochemii. Následující monoklonální protilátky byly použity po odhalení antigenů pomocí mikrovlnné trouby Multifunctional Microwave Histoprocessor (Milestone): Bcl-2 (klon 100; Biogenex), PAX5 (klon 1EW; Leica), CD20 (klon L26; DAKO), CD79a (klon JCB117; DAKO), Ki67 (klon MIB1; DAKO) a polyklonální protilátka proti antigen CD3 (# A0452; DAKO). Pro monoklonální protilátku CD21 (klon 1F8; DAKO) bylo použito odhalení antigenu pomocí proteinázy K. EnVision[™]+Dual Link (DAKO) s diaminobenzidinem (Liquid DAB+Substrate Chromogen System, DAKO) byl použit pro vizualizaci. Barvení CD30 (clone Ber-H2; DAKO) a pan-cytokeratin protilátkou (clone AE1/AE3; Biogenex) bylo provedeno v automatu Ventana BenchMark (Ventana Medical Systems).

4. VÝSLEDKY

4.1. Zavedení metody analýzy klonality IgH a TCR

4.1.1. Extrakce genomické DNA z bioptických vzorků a význam rozdílné fixace tkání

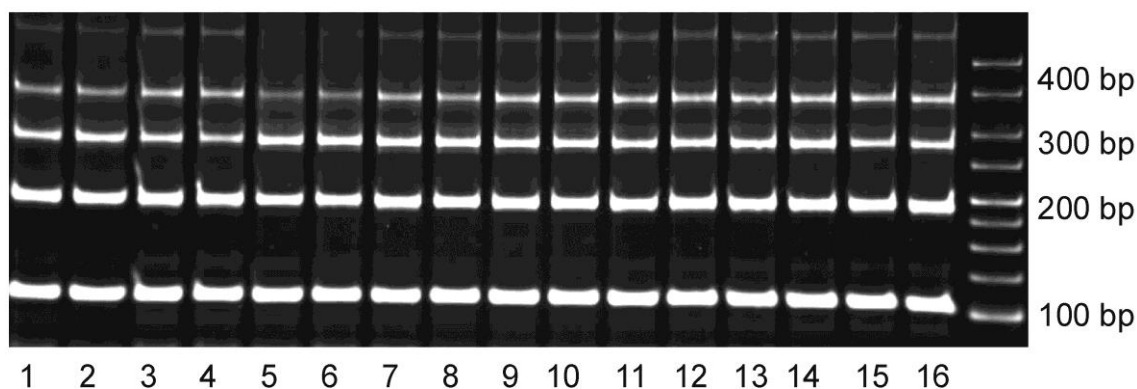
Všechny analyzované klinické vzorky DNA byly získány z biopsií, vyšetřovaných na Ústavu klinické a molekulární patologie Fakultní nemocnice v Olomouci. Analyzovaná DNA byla extrahována z celkového počtu 957 biopsií, z toho bylo 393 mízních uzlin, 128 vzorků kůže, 40 kostní dřeně, 29 mediastina, 28 biopsií žaludku, 21 střev, 20 průšních žláz, 20 vzorků ústní dutiny, 20 hltanu a také několik biopsií nosohltanu, mandlí, sleziny, štítné žlázy, spojivky, očních víček, prsu, prostaty, mesenteria, dvanáctníku, slepého střeva, plic, jater a konečníku. Extrakce DNA byla úspěšná v 897 případech, kdy se podařilo izolovat DNA různé kvality v závislosti na typu, množství a způsobu fixace vyšetřované tkáně. V 60 případech, tj. 6,3% celkového počtu biopsií, byla extrahovaná DNA degradovaná a tudíž nehodnotitelná.



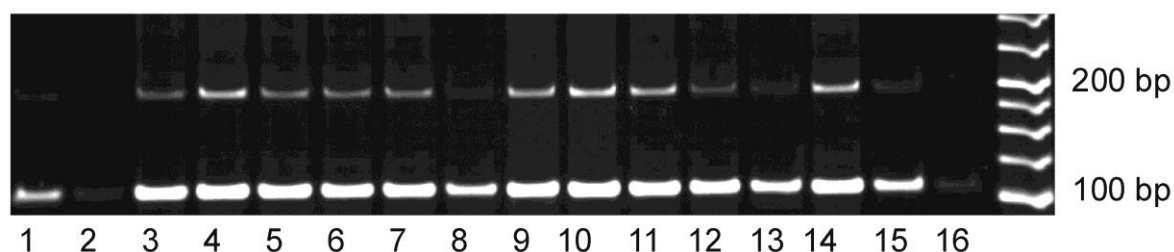
Obr. 18: PCR analýza kontrolních genů z tkání lymfatické uzliny, fixované různými činidly (dráha 1-2, formalín; dráha 3-4, Fine Fix (Bamed, CZ); dráha 5-6, chlorid sodný; dráha 7-8, etanol) a z uzliny zmražené (dráha 9-10). DNA z tkáně fixované formalínem vykazuje částečnou degradaci a amplifikace je úspěšná pouze u kratších fragmentů.

Obrázek 18 ukazuje analýzu kontrolních genů DNA, extrahované z parafínových bločků za použití různých fixačních činidel a ze zmražené tkáně. Snímek dokumentuje patrný rozdíl ve velikostech fragmentů DNA izolované z tkáně fixované formalínem (dráha 1-2), která vykazuje částečnou degradaci, a DNA, extrahované ze zmražené tkáně (dráha 9-10).

V laboratořích se molekulárně-biologické stanovení klonality provádí téměř výlučně z FFPE tkání. Proto když se naskytla možnost vyzkoušet fixaci tkání vakuem (Tissue SAFE, Milestone), byly pomocí kontrolní PCR testovány DNA extrahované z různých vakuově fixovaných nekroptických tkání (Obr. 19). Výsledná kvalita DNA byla porovnána s kvalitou DNA, paralelně extrahovanou ze stejných tkání, ale klasicky fixovanou formalínem (Obr. 20). Amplifikované fragmenty DNA vakuovaných vzorků dosahovaly délky 600 bp a více, oproti maximální délce 200 bp u formalín-fixovaných vzorků.



Obr. 19: Kontrolní PCR testující integritu DNA z nekroptických tkání fixovaných vakuem. Tkáně: dráha 1-2, plíce; 3-4, lymfatická uzlina; 5-6, játra; 7-8, myokard; 9-10, ledvina; 11-12, mamma; 13-14, prostata; 15-16, lymfatická uzlina.



Obr. 20: Kontrolní PCR testující integritu DNA z nekroptických tkání fixovaných formalínem. Tkáně: dráha 1-2, plíce; 3-4, lymfatická uzlina; 5-6, játra; 7-8, myokard; 9-10, ledvina; 11-12, mamma; 13-14, prostata; 15-16, lymfatická uzlina.

4.1.2. Zavedení a optimalizace metody PCR k detekci klonality B a T buněk

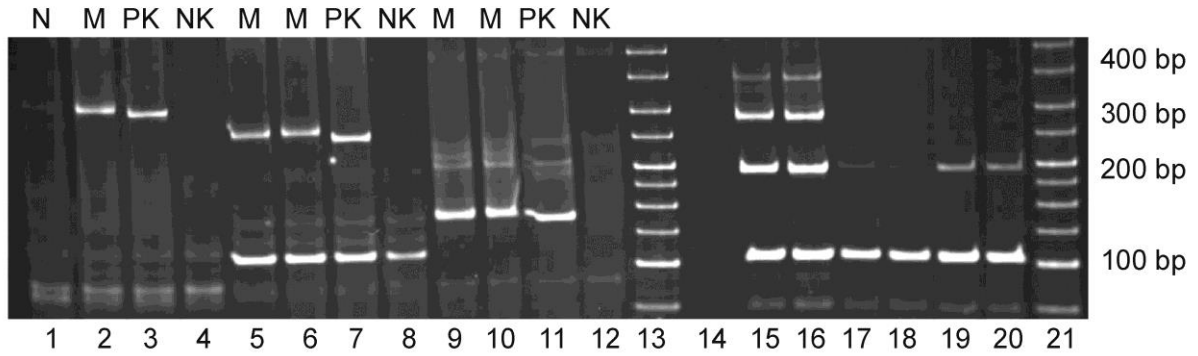
Pro analýzu klonálního přeskupení IgH B buněk byla testována odstupňovaná (nested) PCR dle metodiky publikované v pracích Wan et al. (1990), Diss et al. (1994), Aubin et al. (1995) a Elenitoba-Johnson et al. (2000). Klonální přeskupení IgH u všech vyšetřovaných vzorků (celkem 544) bylo nakonec analyzováno dle mezinárodně uznávaného protokolu BIOMED-2 (van Dongen et al., 2003) a pomocí tří sérií primerů: VHFR1, VHFR2 a VHFR3 (Tab. 3).

Klonální přeskupení TCR u všech vyšetřovaných vzorků (celkem 413) bylo provedeno dle metodiky Mitha a McGlennen (2001) a analyzováno pomocí tří párů primerů: V γ -J γ , T β D1-J2 a T β D2-J2 (Tab. 3).

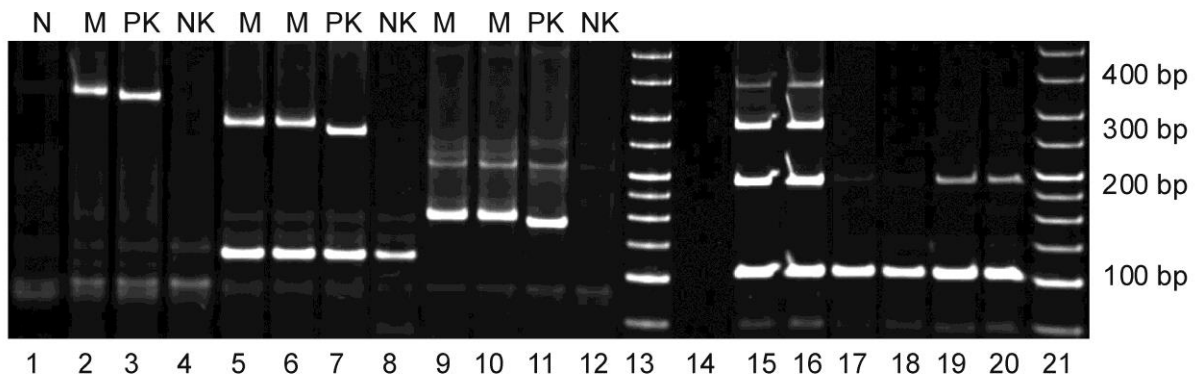
4.1.3. Optimalizace elektroforézy a vizualizace gelů

Po testování a srovnání byl zpočátku používaný 3% agarózový gel nahrazen polyakrylamidovým z důvodu lepších rozlišovacích schopností, vedoucích k detekci dominantních bandů na pozadí smearu (Diss et al., 1994). Použití polyakrylamidového gelu k analýze produktu PCR je upřednostňováno i v jiných pracích (González et al., 1999 a Tai a Peh, 2003). Při analýze klonality IgH a TCR je třeba paralelně vyšetřovat řadu vzorků od stejného pacienta, a proto byla vybrána vysokokapacitní elektroforetická vana (velikost 2 × 24 jamek). Vzhledem k tomu, že při manipulaci s takto velkým polyakrylamidovým gelem o relativně nízké hustotě (6%) hrozí poškození, byl po vyjmutí z elektroforetické vany před barvením promýván ve zpevňovacím roztoku (viz Kap. 3.2.5.).

K barvení polyakrylamidových gelů byl nejprve používán ethidium bromid (Obr. 21). Byl však nahrazen jednak z důvodu bezpečnosti a v neposlední řadě i z důvodu kvalitnější a snažší detekce, netoxickým fluorescenčním barvicím roztokem GelRed (Obr. 22).



Obr. 21: Barvení polyakrylamidového gelu ethidium bromidem. Dráha 1-12, vzorky B lymfomu s klonálním přeskupením; dráha 15-20, kontrolní PCR náhodně vybraných vzorků; dráha 13 a 21, DNA marker.



Obr. 22: Barvení polyakrylamidového gelu fluorescenčním barvicím roztokem GelRed. Dráha 1-12, vzorky B lymfomu s klonálním přeskupením; dráha 15-20, kontrolní PCR náhodně vybraných vzorků; dráha 13 a 21, DNA marker.

4.2. Využití PCR analýzy v rutinní diagnostice lymfoproliferativních onemocnění

4.2.1. Přehled všech vyšetření a klonální přeskupení u non-neoplastických lézí

Z celkového počtu 957 biotických vzorků, bez stanovené definitivní diagnózy, bylo metodou PCR vyšetřeno 544 případů z B buněk (Tab. 4) a 413 z T buněk (Tab. 5). Souběžné vyšetření IgH a TCR bylo provedeno u 240 vzorků. Monoklonalita byla zjištěna u 437 vzorků (295 z B buněk a 142 z T buněk), zatímco 316 vzorků bylo definováno jako non-neoplastické léze, z velké části reaktivního typu (180 z B buněk a 136 z T buněk). V osmi případech non-neoplastických vzorků byl klonální band detekován u B buněk (4,4%) a ve třech případech (2,2%) u T buněk. Zvláštní skupinu tvoří kompozitní lymfom, kde ve

čtyřech vyšetřovaných případech byla klonalita detekována u B i T buněk současně. V případě histiocytického sarkomu byla klonalita definována pouze v jednom z pěti vyšetřovaných případů.

Tab. 4: Výsledky stanovení klonality IgH u vyšetřovaných entit.

Zkratky	Entity	IgH+	IgH-	n/a*	Testováno
B-ALL/LBL	B-akutní lymfoblastická leukémie/lymfoblastický lymfom	2		1	3
CLL/SLL	Chronická lymfocytární leukemie/malobuněčný lymfom	8	1		9
LPL	Lymfoplazmocytární lymfom	3			3
SMZL	Lymfom z marginální zóny splenický	2			2
NMZL	Lymfom z marginální zóny nodální	4			4
MALT	Lymfom z marginální zóny extranodální	54	2	3	59
PCL	Plasmocelulární/mnohočetný myelom	5	1		6
FL	Folikulární lymfom	46	6	4	56
MCL	Lymfom z plášťových buněk	4			4
DLBCL	Difuzní velkobuněčný B lymfom	51	14	3	68
PBL	Plasmablastický lymfom	1			1
THRLBCL	DLBCL bohatý na T buňky/histiocyty	4	4		8
BL	Burkittův lymfom	2			2
LyG	Lymfomatoidní granulomatóza	1			1
LB-NS	B-buněčný lymfom NS	35	2	2	39
cHL	Klasický Hodgkinův lymfom	13	16	1	30
		235	46	14	295
CL	Kompozitní lymfom [#]	4			4
HS	Histiocytický sarkom	1	1		2
	T-buněčné neoplazie		61	2	63
	Non-neoplastické léze	8	159	13	180
		248	267	29	544

* nehodnotitelné, žádný PCR produkt

[#] kompozitní lymfom, pozitivita pro klonální IgH i TCR (viz Tab. 5)

Tab. 5: Výsledky stanovení klonality TCR u vyšetřovaných entit.

Zkratky	Entity	TCR+	TCR-	n/a*	Testováno
T-LBL	T-lymfoblastická leukemie/lymfoblastický lymfom	2		1	3
ANKL	Agresivní NK leukemie		1		1
ENKTCL	Extranodální NK/T lymfom, nazální typ	3	1		4
EATL	T-lymfom spojený s enteropatií		1		1
MF	Mycosis fungoides	13	8	5	26
ALCL ALK+	Anaplastický velkobuněčný lymfom ALK pozitivní	11	2	1	14
ALCL ALK-	Anaplastický velkobuněčný lymfom ALK negativní	1	1		2
PTCLU	Periferní T lymfom, blíže nespecifikovaný	46	9	7	62
AITL	Angioimunoblastický T lymfom	3	4	1	8
TL	T lymfoproliferace, NOS	8	3		11
LyP	Lymfomatoidní papulóza	1	6	1	8
PCSM-TCL	Primární kožní CD4+ T lymfom z malých/středních T buněk	1			1
T-LGL	T-velkobuněčná granulární leukemie	1			1
		90	36	16	142
CL	Kompozitní lymfom [#]	4			4
HS	Histiocytický sarkom		3		3
	B-buněčné neoplazie	6 ^x	119	3	128
	Non-neoplastická léze	3	121	12	136
		103	279	31	413

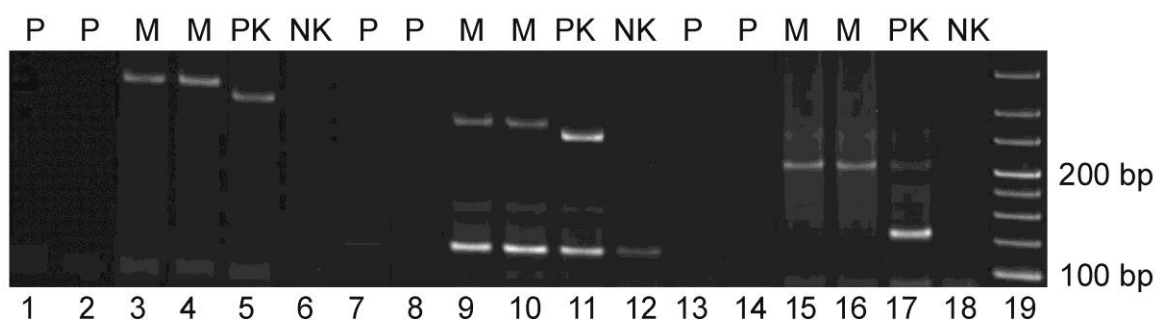
* nehodnotitelné, žádný PCR produkt

[#] kompozitní lymfom, pozitivní pro přeskupení IgH i TCR (viz Tab. 4)

^x DLBCL bohatý na T buňky/histiocyty a klasický Hodgkinův lymfom, každý po třech vzorcích klonálně pozitivních TCR

4.2.2. Analýza klonálního přeskupení IgH B buněk

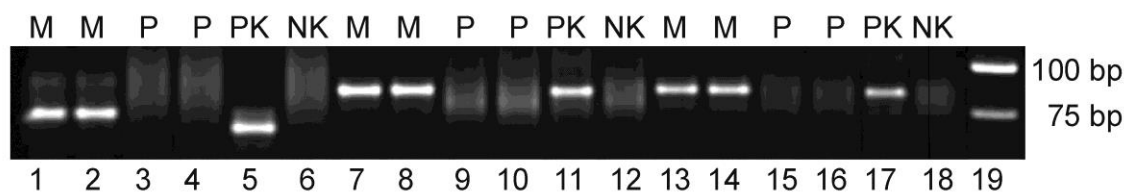
B lymfomy byly rozděleny podle WHO klasifikace do šestnácti skupin (Tab. 4, Obr. 23). Z celkového počtu 295 diagnostikovaných maligních lymfomů bylo klonální přeskupení detekováno ve 235 případech (79,7%). Čtrnáct maligních případů bylo nehodnotitelných z důvodu nevytvoření PCR produktu, což představuje 4,7%stanovení. (viz Tab. 4). Ze 128 vzorků současně vyšetřovaných na klonalitu T buněk byl monoklonální band detekován u klasického Hodgkinova lymfomu a u difuzního velkobuněčného B lymfomu bohatého na T buňky/histiocyty (tři případy u obou entit).



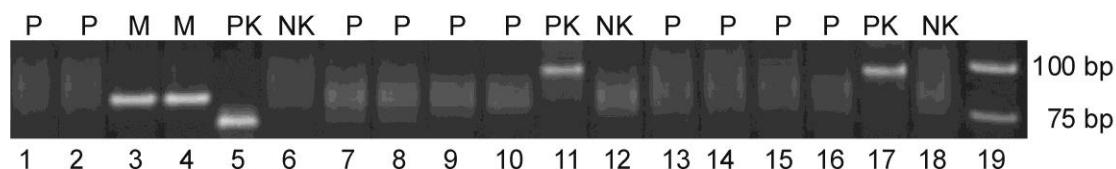
Obr. 23: PCR analýza přeskupení IgH genů pomocí tří sérií primerů (VHFR1, dráha 1-6; VHFR2, dráha 7-12; VHFR3, dráha 13-18). PK, pozitivní kontrola (B lymfom); NK, negativní kontrola (reaktivní lymfatická uzlina); dráha 1, 2, 7, 8, 13, 14: Antigenní stimulace (tkáň tlusté střevo); dráha 3, 4, 9, 10: Lymfom z B buněk marginální zóny MALT-typu (tkáň plíce); dráha 19, DNA marker. Vzorky pacientů byly analyzovány v duplikátu.

4.2.3. Analýza klonálního přeskupení TCR T buněk

Ve skupině T lymfomů bylo vyšetřeno třináct typů (Tab. 5, Obr. 24 a 25). Ze 142 případů maligních lymfomů bylo klonální přeskupení detekováno u 90 z nich (63,4%). Šestnáct případů bylo nehodnotitelných, což představuje 11,3% (viz Tab. 5). Žádný z vyšetřovaných T lymfomů nebyl pozitivní na IgH klonalitu.



Obr. 24: PCR analýza přeskupení TCR genů pomocí tří párů primerů ($V\gamma$ - $J\gamma$, dráha 1-6; $T\beta$ D1-J2, dráha 7-12; $T\beta$ D2-J2, dráha 13-18). PK, pozitivní kontrola (T lymfom); NK, negativní kontrola (reaktivní lymfatická uzlina); dráha 1, 2, 7, 8, 13, 14: Periferní T lymfom, NOS (tkáň lymfatická uzlina), pozitivita gama i beta řetězců TCR; dráha 3, 4, 9, 10, 15, 16: Hyperplazie. Antigenní stimulace (tkáň - lymfatická uzlina); dráha 19, DNA marker. Vzorky pacientů byly analyzovány v duplikátu.



Obr. 25: PCR analýza přeskupení TCR genů pomocí tří párů primerů ($V\gamma$ - $J\gamma$, dráha 1-6; $T\beta$ D1-J2, dráha 7-12; $T\beta$ D2-J2, dráha 13-18). PK, pozitivní kontrola (T lymfom); NK, negativní kontrola (reaktivní lymfatická uzlina); dráha 1, 2, 7, 8, 13, 14: Pseudolymfom T (tkáň kůže); dráha 3, 4, 9, 10, 15, 16: Lymfom maligní T řady (tkáň plíce), pozitivita gama řetězců TCR; dráha 19, DNA marker. Vzorky pacientů byly analyzovány v duplikátu.

4.3. Histologická a molekulární analýza problematických případů

Rozlišení mezi reaktivními, atypickými a neoplastickými lymfoproliferacemi je často problematické. Každý konkrétní případ by měl být hodnocen v klinickém, patomorfologickém a imunofenotypickém kontextu (imunohistochemie a/nebo imunoflowcytometrie) a v případě potřeby také s pomocí molekulární analýzy. V následující části je popsáno 10 náročných případů, kdy analýza přeskupení IgH a TCR genů metodou PCR významně přispěla ke stanovení správné diagnózy (Obr. 26, Obr. 27).

Případ 1. Atypická folikulární hyperplazie lymfatické uzliny

Mladý muž ve věku 26 let byl vyšetřován pro zvětšené lymfatické uzliny. V histologickém vyšetření byla patrná dominantní hyperplazie kortexu se splývajícími nepolarizovanými folikuly a vysoká denzita makrofágů s Flemmingovými tělísky, bez známek

transformace zárodečných center. Zárodečná centra vykazovala negativitu Bcl-2 a expanzi i alteraci sítě folikulárně-dendritických buněk (CD21 a CD23 pozitivní) (Obr. 26a-b). Byla detekována klonální přestavba IgH (VHFR1-3). Atypická folikulární hyperplazie s průkazem klonální přestavby IgH je spojena s vyšším relativním rizikem rozvoje non-Hodgkinského lymfomu.

Případ č. 2. Hyperplazie parakortexu lymfatické uzliny

Mladý muž (23 let) s lymfadenopatií. Ve vyšetřené lymfatické uzlině byla vyjádřena dominující expanze parakortexu (viz speciální barvení PAS) včetně CD3 pozitivních T lymfocytů, histiocytů a interdigitujících dendritických buněk bez tvorby epiteloidních granulomů (Obr. 26c-d). Sekundární lymfatické folikuly byly polarizované, bez jakýchkoliv morfologických známek alterace. Analýza TCR genů pomocí PCR neprokázala klonální přestavbu.

Případ č. 3. Lymfomatoidní granulomatóza

Histologické vyšetření kožního tumoru 55letého muže ukázalo velmi denzní lymfoidní infiltraci s akcentovanou vaskularizací a disperzně přítomnými buňkami, připomínajícími Hodgkinovy a Reed-Sternbergovy buňky (HRS-like buňky), které neměly tendenci k seskupování. Morfologický obraz typický pro extranodální lymfom z B buněk marginální zóny nebyl vyjádřen, přičemž přítomné HRS-like buňky byly pozitivní CD20, PAX5, CD30 a Ki67 (Obr. 27a-d). Průkaz klonální přestavby IgH (VHFR1, VHFR2, VHF3) potvrdil diagnózu lymfomatoidní granulomatózy.

Případ č. 4. Extranodální lymfom z B buněk marginální zóny MALT typu (MALT lymfom)

Malé množství dodaného materiálu bylo v tomto případě zásadním limitujícím faktorem pro stanovení správné diagnózy. Biopsický materiál muže (53 let) se suspekci na zánět žaludeční sliznice obsahoval denzní infiltraci centrocytoidní a monocytoidní morfologie, která exprimovala CD20, PAX5 (Obr. 26e-f), CD43 a v malé míře Ki-67 (cca 5-10% nádorových buněk). Pouze v jediném sekundárním lymfatickém folikulu byla patrná iniciální kolonizace. Pro korektní diagnózu byla v tomto případě krucální právě klonální přestavba IgH (VHFR1, VHFR2, VHF3).

Případ č. 5. Současný výskyt prostatického adenokarcinomu a MALT lymfomu

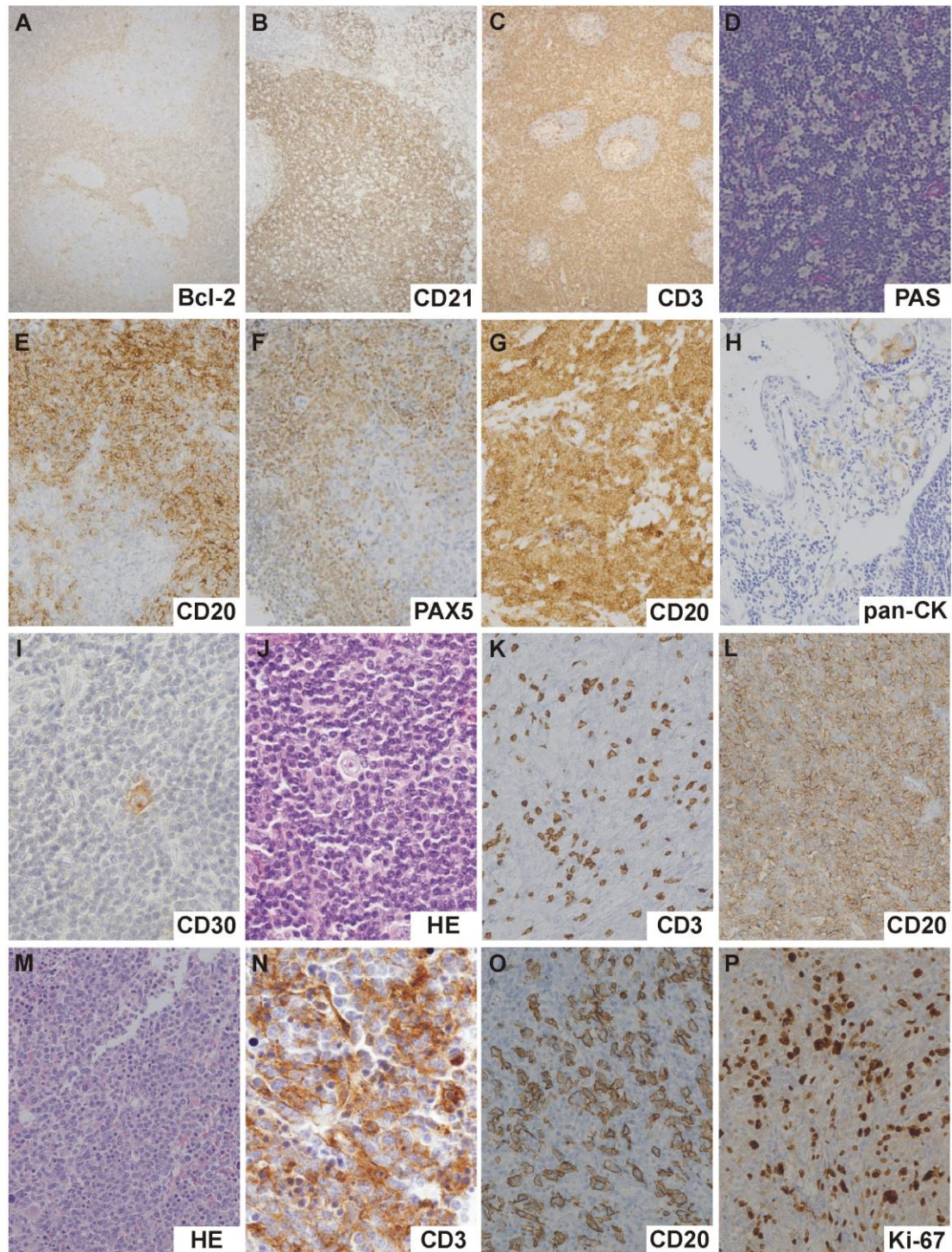
Doprovodná lymfoidní infiltrace je běžným „reaktivním“ jevem, který doprovází téměř všechny invazivní epitelové neoplazie, avšak v případě velmi vysoké denzity je na místě vyloučit přítomnost lymfomu. V prostatické tkáni 68letého muže byla zjištěna CD20 pozitivní (Obr. 26g) a PAX5 pozitivní téměř monomorfní lymfoidní infiltrace s predominantní centrocytoïdní a monocytoïdní morfologií, která byla zastižena spolu s acinárním adenokarcinomem Gleason grade 5 (průkaz pancytokeratinu, Obr. 26h). Neoplastická B-lymfoidní populace vykazovala šíření mezi žlázkami prostatického karcinomu (bez jejich infiltrace/destrukce). Proliferační index Ki-67 byl velmi nízký (cca 5% nádorových lymfoidních buněk). Průkaz klonální přestavby IgH (VHFR1, VHFR2, VHF3) podpořil diagnózu koexistence MALT lymfomu.

Případ č. 6. Klasický Hodgkinův lymfom bohatý na lymfocyty (cHL)

Předmětem vyšetření byla zvětšená lymfatická uzlina u 49letého muže. Při malém zvětšení měla uzlina vágně nodulární strukturu, s dominujícími malými lymfoidními buňkami, četnými polarizovanými B folikuly a expanzí parakortexu. Pouze disperzně byly přítomny velké buňky HRS morfologie, které byly CD30 (Obr. 26i-j) a PAX5 pozitivní a vykazovaly nepřesvědčivou pozitivitu CD15 a negativitu LMP1. Byla zvažována nenádorová antigenní stimulace, avšak monoklonální přestavba IgH potvrdila správnou diagnózu klasického Hodgkinova lymfomu bohatého na lymfocyty (cHL).

Případ č. 7. Difuzní velkobuněčný B lymfom s TCR „crosslineage infidelity“

76letému muži byl chirurgicky odstraněn objemný tumor tenkého střeva. Nádorová tkáň byla tvořena zejména imunoblasty (CD20, PAX5 a MUM1/IRF4 pozitivní) a pouze disperzně malými T buňkami, které byly CD3, CD5, CD4, CD8 a CD56 pozitivní (Obr. 26k-l). Proliferační index Ki-67 v B-neoplastické populaci přesahoval 80%. Morfologický vzhled neodpovídal kompozitnímu lymfomu a histologický nále z byl uzavřen jako DLBCL NOS non-GCB-like. Protože byla detekována klonální přestavba jak IgH (VHFR1, VHFR2, VHF3), tak TCR β (T β D1-T β J2 a T β D2-T β J2), byla součástí konečné diagnózy informace o pseudo-klonalitě a „crosslineage infidelity“.



Obr. 26: Morfologické a imunohistochemické znaky vybraných problematických případů. a-b) případ 1 - atypická folikulární hyperplazie lymfatické uzliny; c-d) případ 2 - hyperplazie parakorteksu lymfatické uzliny; e-f) případ 4 - extranodální lymfom z B buněk marginální zóny MALT typu; g-h) případ 5 - současný výskyt prostatického adenokarcinomu a MALT lymfomu; i-j) případ 6 - klasický Hodgkinův lymfom bohatý na lymfocyty; k-l) případ 7 - difuzní velkobuněčný B lymfom s TCR „crosslineage infidelity“; m-n) případ 8 - agresivní leukemie z NK buněk; o-p) případ 10 - velkobuněčný B lymfom bohatý na T lymfocyty a histiocyty. HE, hematoxylin a eosin; pan-CK, pan-cytokeratin. Zvětšení 40× (a-c), 200× (d, g, h, k, l, m, o, p) nebo 400× (e, f, i, j, n).

Případ č. 8. Agresivní leukemie z NK buněk

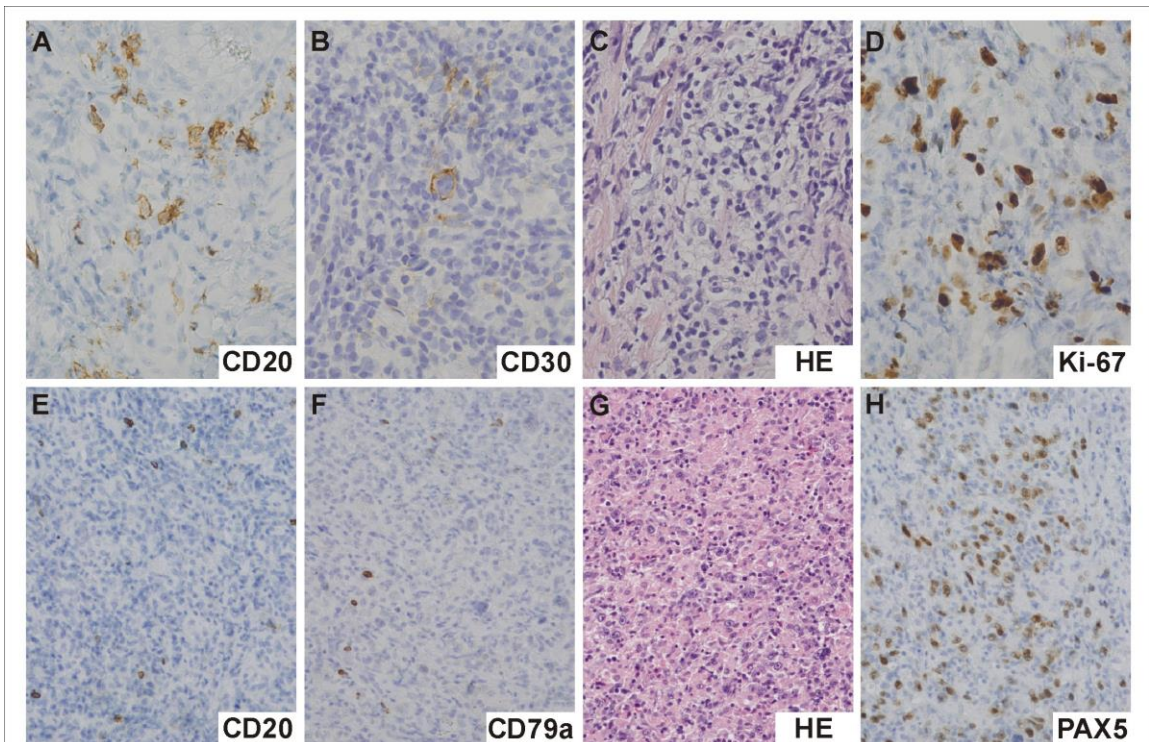
36letý muž se suspektním hematologickým onemocněním podstoupil trepano-bioptický odběr. Kostní dřeň vykazovala morfolologii „packed-marrow“ s difuzní infiltrací středně velkými a velkými lymfoidními buňkami, které vykazovaly pozitivitu pouze CD3 (cytoplazmaticky) (Obr. 26m-n) a CD56 (membránově) a negativitu CD5, CD7, CD4, CD8, CD10, CD30, CD57, TIA-1, granzym B a perforin. Přestavba TCR ($V\gamma 11$ - $J\gamma 11$, $T\beta D1$ - $T\beta J2$ a $T\beta D2$ - $T\beta J2$) nebyla prokázána, což podpořilo „germline“ konfiguraci TCR genů u agresivní leukemie z NK-buněk.

Případ č. 9. CD20 a CD79a negativní difuzní velkobuněčný B lymfom

Histologickým vyšetřením tumoru jater u muže (69 let) byla zjištěna velmi denzní lymfoidní infiltrace s frakcí velkých lymfoidních buněk. Tato velká lymfoidní populace byla CD30, MUM1/IRF4 a pouze v jediném řadově specifickém markeru PAX5 pozitivní. Markery CD20 i CD79a byly negativní, stejně jako všechny T-specifické znaky. Ki-67 bylo pozitivní ve více než 90% nádorových buněk (Obr. 27e-h). Klonalita TCR nebyla přítomna, avšak monoklonalita přestavby IgH potvrdila diagnózu DLBCL.

Případ č. 10. Velkobuněčný B lymfom bohatý na T lymfocyty a histiocyty (THRLBCL)

72letému muži byl diagnostikován objemný tumor plic. Nádorová tkáň obsahovala dominující populaci malých lymfoidních T buněk (CD3 a CD5 pozitivních) s příměsí histiocyty (CD68 pozitivní) a pouze disperzně jednotlivé velké lymfoidní buňky bez tendence ke shlukování. Tyto velké lymfoidní buňky nabývaly zejména centroblastického vzhledu a pouze malá část vykazovala aneu- a polyploidní morfolologii jader. Velké B buňky byly CD20, Ki-67 (Obr. 26o-p), PAX5 a MUM1/IRF4 pozitivní. Monoklonální přestavba IgH podpořila diagnózu velkobuněčného B lymfomu bohatého na T lymfocyty a histiocyty.



Obr. 27: Morfologické a imunohistochemické znaky lymfomatoidní granulomatózy (a-d; případ 3) a CD20/CD79a negativního difuzního velkobuněčného B lymfomu (e-h; případ 9). HE, hematoxylin a eosin. Zvětšení 200× (g) nebo 400× (a-f, h).

5. DISKUZE

Většina hemato-onkologických případů, vyšetřovaných v Laboratoři klinické a molekulární patologie, byly vzorky bioptické. FFPE tkáně představují hlavní zdroj pro analýzu klonality IgH a TCR i přes to, že formalín způsobuje fragmentaci DNA (Miettinen a Lasota, 1997; Ramasami et al., 1992; Zhou et al., 1999; Srinivasan et al., 2002; Kusic et al., 2003, Gurbity et al., 2003) a extrakce z nativní či mražené tkáně vykazuje kvalitnější DNA i vyšší výtěžnost (Vanasse et al., 1999; Gleissner et al., 2000; Child et al., 2001). Naopak výhodou FFPE tkáně je možnost dlouhodobé archivace a opakovaného vyšetření. Integrita DNA extrahované z parafinových bločků a její amplifikovatelnost pomocí PCR je ovlivněna celou řadou faktorů, jako je tloušťka tkáně, typ fixačního činidla, čas fixace, délka archivace před analýzou, použitá metoda pro extrakci DNA a vliv inhibitorů PCR (Alaibac et al., 1997; Sato et al., 2001; van Dongen et al., 2003). U vzorků, určených k detekci klonality IgH, kde je DNA fragmentována a vykazuje amplifikaci pouze 200 nebo dokonce 100 bp a 100 bp v případě detekce klonality TCR genů, nemusí dojít k amplifikaci cílových sekvencí, což může potenciálně vést k falešně negativnímu výsledku. Z toho důvodu je nezbytně nutné ověřit kvalitu, integritu a amplifikovatelnost fragmentů DNA extrahovaných z FFPE užitím mnohočetné PCR kontrolních genů (van Dongen et al., 2003; Olaru et al., 2005; Venkatraman et al., 2006; Langerak et al., 2007; Burack et al., 2010; Langerak et al., 2012). Burack et al. (2010) ve své práci uvádí výsledky vyšetření folikulárního lymfomu z FFPE s úspěšností asi 50% na rozdíl od analýzy folikulárního lymfomu z nativní tkáně, kde bylo dosaženo 90% úspěšnosti. V práci Nikiforova et al. (2007) byl porovnáván záchyt detekce pomocí PCR u mražených tkání a tkání FFPE s úspěšností 78%, respektive 66%. Z celkového počtu 957 biopsií, analyzovaných v této práci, byla DNA zcela degradována v 60 případech (6.3%), a proto nebyl získán žádný produkt PCR. Zajímavou variantou fixace pro krátkodobé uchování struktury tkání i kvality nukleových kyselin je použití vakua. V našich testovaných nekroptických vzorcích nebyla kvalita DNA u žádné z vakuově stabilizovaných tkání kompromitována, na rozdíl od klasického způsobu fixace formalínem.

Dalším důvodem, proč není možné dosáhnout 100% úspěšnosti detekce klonality IgH a TCR genů je heterogenita cílové DNA sekvence. K dosažení co nejvyšší homologie se využívá PCR reakce se sérií primerů (van Dongen et al., 2003). Negativní výsledky mohou být také způsobeny aberantní konfigurací IgH genů, která vzniká částečným nebo nekompletním přeskupením genových segmentů (Segal et al., 1994; Bassing et al., 2002) a chromozomálními translokacemi, zahrnujícími zárodečné genové segmenty JH na chromozomu 14 (Venkatraman et al., 2006; Nikiforova et al., 2007). Chromozomální translokace, které zamezí přenesení V a J segmentů do takové vzdálenosti, aby mohla být DNA amplifikována, vedou k falešně negativním výsledkům, podobně jako částečné přeskupení DJ segmentů (Mederois a Carr, 1999).

Úspěšnost detekce přeskupení IgH je ovlivněna typem maligního lymfomu a původem buněk, z nichž tyto lymfomy vycházejí (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Messier et al., 2003). Nejvyšší procento úspěšnosti detekce metodou PCR bylo dosaženo v případě maligních lymfomů odvozených z naivních lymfocytů (např. lymfomu z plášťových buněk), označovaných jako naivní B buňky pre-germinálního centra (Evans et al., 2007). Tyto buňky exprimují nemutované variabilní oblasti genů (Küppers et al., 1999; Thériault et al., 2000), případně vykazují nízkou hladinu mutace (Mederois a Carr, 1999). V případě lymfomu z plášťových buněk byla úspěšnost naší detekce 100%, stejné výsledky uvádí v práci Segal et al. (1994) a Nikiforova et al. (2007) (100%, respektive 95%). Téměř z 90% byla u nás úspěšná detekce chronické lymfatické leukemie/malobuněčného lymfomu, podobně jako ve výše zmiňovaných pracích (90%, respektive 100%).

Přeskupení genových segmentů slouží jako marker B a T buněčné klonality, na základě kterého je možné rozlišit reaktivní a neoplastickou proliferaci (Lorenzen et al., 1994; Benhattar et al., 1995). Přeskupení je proces, který předchází neoplastické transformaci, proto všechny dceřinné buňky mají identickou rekombinaci Ig a TCR genových subgenů (Medeiros a Carr, 1999; Groenen et al., 2008). Nicméně přeskupení nemusí vždy znamenat malignitu a naopak, absence přeskupení nemusí vždy znamenat benigní proces. Příkladem jsou lymfomy, které vznikají z lymfocytů v raných fázích maturace před procesem

rekombinace, a které nemají ještě přeskupené Ig a TCR geny. To vysvětluje, proč nelze detekovat přeskupení genových segmentů u některých skupin maligních lymfomů, např. u anaplastického velkobuněčného lymfomu (Mederois a Carr, 1999; Langerak et al., 2007). Na druhou stranu monoklonální přeskupení může být detekováno u pacientů s narušeným imunitním systémem (např. při posttransplantačních stavech a v případech získaného imunodeficientního syndromu) (Locker a Nalesnik, 1989). V práci Thériault et al. (2000) je prezentována detekce klonálního přeskupení IgH ve 3% a přeskupení TCR v 9% případů v lymfoidních infiltrátech klinicky a imunohistologicky reaktivních. Většinou se jednalo o pacienty s imunodeficientním onemocněním.

Další skupinou jsou neoplazie, vycházející z paměťových buněk, diferencovaných v germinálních centrech folikulů sekundárních lymfoidních orgánů (Küppers et al., 1999) a které vykazují somatické hypermutace variabilních oblastí genů (GC a post-GC paměťové B buňky) (Segal et al., 1994; Inlay a Xu, 2003; Gurbity et al., 2003). Tyto neoplazie vykazují nižší úspěšnost detekce klonality metodou PCR v důsledku chybného nasedání primerů (Thériault et al., 2000; van Dongen et al., 2003; Messier et al., 2003; Olaru et al., 2005). Příčinou stanovení falešně negativního výsledku může být přítomnost zmiňovaných somatických mutací JH oblasti genu (Aubin et al., 1995; Child et al., 2001).

Ve skupině lymfomů GC byla v případě folikulárního lymfomu úspěšnost naší detekce 82%, což je srovnatelné s pracemi Nikiforova et al. (2007), kde je uvedena 78% úspěšnost, dále Bagg et al. (2002) uvádí 67%, Tai a Peh (2003) 60,7% a Segal et al. (1994) 82%. U difuzního velkobuněčného B lymfomu bylo dosaženo nižšího procenta detekce (75%), ovšem Nikiforova et al. (2007) uvádí ještě nižší hodnotu 31% a Tai a Peh (2003) 54,3%. Ve skupině difuzního velkobuněčného B lymfomu, bohatého na T buňky/histiocyty byla úspěšnost detekce 50%. Příčinou může být jednak klonální přeskupení Ig genů, nesoucích vysoký počet somatických mutací, tak intraklonální diverzita buněk germinálního centra (Kanzler et al., 1996).

Limitujícím faktorem úspěšné analýzy může být také malý počet rozptýlených B buněk na pozadí velkého množství polyklonálních reaktivních buněk, které mohou

překrývat monoklonální populaci (Segal et al., 1994; Seitz et al., 2000; Child et al., 2001; Venkatraman et al., 2006; Hebeda et al., 2009). Senzitivita detekce klonality byla nejnižší (43,3%) v případě Hodgkinova lymfomu. Důvodem je výskyt malého množství rozptýlených neoplastických buněk, osídlujících oblast s hojným zastoupením nemaligních buněk různých typů, které vytváří pozadí polyklonálního signálu a také z důvodu vysokého počtu somatických mutací variabilních oblastí genů. Tímto se zvyšuje pravděpodobnost, že jedno nebo i více vazebných míst primerů je natolik změněno, že je PCR neproduktivní (Medeiros a Carr, 1999; Evans et al., 2007; Burack et al., 2010). To vysvětluje, proč pokusy detekovat klonální přeskupení antigenních receptorů DNA, extrahované z celkové tkáně, selhává ve více než 50% případů Hodgkinova lymfomu. Důležitým krokem analýzy Hodgkinova lymfomu je využití heteroduplexní analýzy, jak ve své práci uvádí Burack et al. (2010), která redukuje interferenci na pozadí polyklonálních buněk a umožňuje detekovat méně než 5% klonální populace.

Ve skupině B-buněčných lymfomů bylo detekováno přeskupení TCR u 6 případů (4,7%) z celkového počtu 128 vzorků, vyšetřovaných na B a T klonalitu. Přítomnost přeskupení TCR genů v B-buněčných lymfomech a přeskupení IgH v T-buněčných lymfomech je označováno jako „lineage infidelity“. Tyto případy se častěji vyskytují u neoplazií, odvozených z prekurzorových B a T buněk a méně často u neoplazií ze zralých lymfoidních buněk (Medeiros a Carr, 1999; Bagg, 2006). Předpokládá se, že nezralé prekurzory leukemií/lymfomů jsou neoplasticky transformovány v raných vývojových stádiích, kdy jsou aktivní rekombinační komplexy, podílející se na rekombinaci antigenních receptorů, včetně RAG (Bagg, 2006). Tuto hypotézu podporuje existence podobných strukturálních konfigurací a společných rekombinázových enzymů, účastnících se aberantně přeskupení IgH a TCR genů ve stejné buňce (Tai a Peh, 2003; Tai a Peh, 2003).

Nejvyšší úspěšnosti detekce amplifikace metodou PCR ve skupině T-buněčných lymfomů bylo dosaženo u anaplastického velkobuněčného lymfomu ALK⁺ (téměř 80%), v případě periferního lymfomu, blíže nespecifikovaného 74% a T lymfoproliferace, blíže nespecifikované téměř 73%. Záchyt klonality u Mycosis fungoides byl pouze 50%

a pravděpodobně závisí na počtu maligních buněk ve vyšetřované tkáni. Nejnižší počet klonálních přeskupení (12,5%) byl detekován v případě lymfomatoidní papulosisy. Lymfomatoidní papulóza představuje neobvyklé kožní T-buněčné proliferace s klinickým benigním průběhem, ale s histologickými rysy připomínajícími maligní lymfomy (Whittaker et al., 1991; Steinhoff et al., 2002). Je známo, že některé klinicky benigní proliferace mohou mít klonální původ, jako v mnoha případech CD8+ T-buněčné lymfocytosisy, benigní monoklonální gamapatie nebo benigní kožní T-buněčné lymfoproliferace (van Dongen et al., 2003). Selhání detekce dominantního klonu nemusí v mnoha případech odrážet absenci klonálního onemocnění, ale může být způsobeno biologickými a/nebo technickými příčinami (Steinhoff et al., 2002). Lymfomy kožních buněk velice často obsahují velké množství polyklonálních reaktivních buněk a jen malé množství atypických lymfoidních buněk, což může redukovat intenzitu signálu monoklonálního přeskupení v T-buněčné populaci a velmi malé klony mohou být pod hladinou detekovatelnosti (Trainor et al., 1991; Thériault et al., 2000; Child et al., 2001; Steinhoff et al., 2002). Některé genetické aberace, jako jsou delece přeskupených TCR genů, a nebo klonální expanze, k níž došlo před TCR přeskupením, mohou vysvětlovat absenci dominantních TCR (Chott et al., 1996).

Díky extrémně vysoké senzitivě metody PCR se mohou detekovat i malé klonální populace v non-neoplastických infiltrátech, což je interpretováno jako pseudoklonalita v případě benigní proliferace (Elenitoba-Johnson et al., 2000; Bagg, 2006). Ve velké a různorodé skupině nodálních a extranodálních lymfoproliferativních lézí s většinou reaktivními změnami bylo detekováno klonální přeskupení v 11 případech (3,2%). S cílem snížení rizika této falešné positivity se pro rozlišení monoklonálních, oligoklonálních nebo polyklonálních PCR produktů, které mohou vzniknout v důsledku amplifikace i jen několika málo polyklonálních reaktivních buněk ve vyšetřované tkáni, využívá heteroduplexní analýza (Langerak et al., 1997; van Dongen et al., 2003; Langerak et al., 2007). Použitím heteroduplexní analýzy se zvyšuje možnost záchytu a zobrazení malých buněčných klonů na pozadí silného polyklonálního signálu (Burack et al., 2010).

V recentní studii předkládá Hartmann et al. (2013) výsledky retrospektivní analýzy velkého souboru případů, 1862 vyšetření lokusu IgH a 1527 vyšetření T-buněčného receptorového lokusu gama. Studie potvrdila význam použití protokolu Biomed-2 pro vyšetření FFPE tkání a je srovnatelná s výsledky předkládané dizertační práce. B-buněčné lymfomy ze zralých B buněk vykazovaly klonální přeskupení v 83% hodnotitelných vzorků a nejvyšší frekvence byla detekována u lymfomu z plášťových buněk a Burkittova lymfomu. Klonální přeskupení u buněk vycházejících z germinálního nebo post-germinálního centra (folikulární lymfom a difuzní velkobuněčný B lymfom) bylo pozitivní v 83% případů. Monoklonální přeskupení bylo detekováno u 85-95% dalších nízké maligních lymfomů (lymfocytický lymfom/leukemie, lymfom z marginální zóny, lymfoplazmocytární lymfom). Tak jako v našich stanoveních (3 případy), bylo detekováno klonální přeskupení TCR gama lokusu u difuzního velkobuněčného B lymfomu (36%). V různorodé skupině T buněčných lymfomů detekoval Hartmann et al. (2013) klonální přeskupení ve většině případů. V případě angioimunoblastického lymfomu a mycosis fungoides byla úspěšnost detekce klonality nejvyšší (94%), u periferního T buněčného lymfomu byla klonalita detekována v 88%.

Tato dizertační práce předkládá výsledky vyšetření 957 případů suspektních lymfomů, dle WHO klasifikovaných B- a T-buněčných neoplazií. Dokládá význam analýzy klonálního přeskupení IgH B buněk a TCR T buněk metodou PCR, která velkou měrou přispívá ke stanovení definitivní diagnózy složitých, morfologicky či imunohistochemicky nejednoznačných případů. Analýza klonality dle zavedených protokolů se rutinně využívá jednak pro stanovení buněčné linie, z které je neoplazie odvozena, tak také pro potvrzení maligního procesu za využití FFPE tkání.

6. SOUHRN

Ke stanovení správné diagnózy maligních lymfomů je důležité rozlišení mezi reaktivní a neoplastickou proliferací. Metoda PCR slouží k detekci klonálních přestaveb genů těžkého řetězce imunoglobulinu a T-buněčného receptoru u lymfoidních malignit ze vzorků DNA, extrahované z formalínem fixované a do parafinu zalité tkáně (FFPE). Ve většině případů lymfoproliferativních onemocnění dochází k neoplastické transformaci po přeskupení genových segmentů, a proto všechny dceřinné buňky vykazují identický profil přeskupení. Tohoto markeru se využívá právě k detekci klonality u lymfoproliferativních onemocnění.

Prvním cílem této dizertační práce byla optimalizace metody PCR a také dalších souvisejících metod vyšetření, včetně extrakce DNA z FFPE, optimalizace kontrolní PCR, hetroduplexní analýzy, elektroforetické separace PCR produktu a barvicí techniky. V neposlední řadě pak byla důležitá správná interpretace výsledků.

Hlavním cílem práce bylo využití zavedené metody pro vlastní diagnostiku lymfoproliferativních onemocnění v naší laboratoři. Metodou PCR bylo vyšetřeno celkem 957 bioptických vzorků. Nejpočetnější skupinu představovala vyšetření 393 mízních uzlin a 218 vzorků kůže. Další vyšetření byla provedena z početně různě zastoupených vzorků tkání: kostní dřeň, mediastina, žaludku, střev, příušních žláz, dutiny ústní, nosohltanu, mandlí, sleziny, štítné žlázy, spojivky, mammy, prostaty, plic, jatek a konečníku.

Z celkového počtu 957 bioptických vzorků, bylo vyšetřeno 544 případů z B buněk a 413 z T buněk. Souběžné vyšetření IgH a TCR bylo provedeno u 240 vzorků. Monoklonalita byla zjištěna u 437 vzorků (295 z B buněk a 142 z T buněk), zatímco 316 vzorků bylo definováno jako non-neoplastické léze, z velké části reaktivního typu (180 z B buněk a 136 z T buněk).

B lymfomy byly rozděleny podle WHO klasifikace do šestnácti skupin. Z celkového počtu 295 diagnostikovaných maligních lymfomů bylo klonální přeskupení prokázáno ve 235 případech (79,7%). Ve skupině T lymfomů bylo vyšetřeno třináct typů. Ze 142 případů maligních lymfomů bylo klonální přeskupení detekováno u 90 z nich (63,4%).

Z výsledků této dizertační práce vyplývá, že PCR detekce přeskupení IgH a TCR genů je vhodnou metodou pro analýzu klonality B a T buněk z FFPE tkáně. Napomáhá patologům k přesnějšimu stanovení správné diagnózy lymfoproliferativních onemocnění, kdy jsou morfologická a imunohistochemická vyšetření nejednoznačná. Správná diagnóza je nezbytným předpokladem k úspěšnému zahájení léčby pacientů.

7. SUMMARY

Distinction of reactive proliferations from neoplastic transformation is very critical for diagnosis of malignant lymphomas. The PCR method is used for detection of clonal rearrangements of the immunoglobulin heavy chain (IgH) and T-cell receptor (TCR) genes in lymphoid malignancies from DNA samples extracted from formalin-fixed, paraffin embedded tissues (FFPE). In the majority of cases, lymphoproliferative disorders are characterized by gene rearrangements after neoplastic transformation. All daughter cells then show an identical rearrangement profile. This marker is often used for clonality detection in lymphoproliferative disorders.

The first aim of the doctoral thesis was optimization of PCR and another related methods, such as DNA extraction from FFPE, control PCR for assessment of DNA integrity, heteroduplex analysis, electrophoresis of PCR products and staining techniques. Of course, very important is correct clinical interpretation of the obtained results.

The main goal of the thesis was implementation of the optimized PCR method for diagnosis of lymphoproliferative disorders in our laboratory. A large cohort of 957 samples was analyzed. The cohort consisted of 393 lymph nodes, 218 skin samples and lesser number of other tissues such as bone marrow; mediastinum, stomach, intestine, parotid glands, mouth cavity, nasopharynx, tonsils, spleen, thyroid glands, conjunctiva, breast, prostate, lung, liver and rectum.

From a total of 957 FFPE tissues with no definite diagnosis examined by PCR methods 544 were from B-cells and 413 from T-cells. Both IgH and TCR analyses were performed simultaneously on 240 samples. Malignant diseases were represented by 437 samples (295 from B-cells and 142 from T-cells) while 316 samples were defined as non-neoplastic lesions of a largely inflammatory and reactive type (180 from B-cells and 136 from T-cells).

In conclusion, the results of this study confirm that PCR amplification of IgH and TCR rearrangement genes is a reliable method for detection of B- and T-cell clonality from FFPE

tissue. In particular, molecular methods significantly improve the ability of pathologists to more accurately determine the correct diagnosis of lymphoid neoplasia in specimens in which histological and immunophenotypic studies are inconclusive. The correct diagnosis is a prerequisite for successful initiation of the patient treatment patient.

8. SEZNAM ZKRATEK

AITL	angioimunoblastický T lymfom
ALCL	anaplastický velkobuněčný lymfom (anaplastic large cell lymphoma)
ALCL ALK+	anaplastický velkobuněčný lymfom ALK pozitivní
ALCL ALK-	anaplastický velkobuněčný lymfom ALK negativní
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
ALK	anaplastická lymfomová kináza (anaplastic lymphoma kinase)
ANKL	agresivní NK leukemie
APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
AID	enzym cytidindeamináza
ATLL	T leukémie/lymfom
B-ALL/LBL	B-akutní lymfoblastická leukémie/lymfoblastický lymfom
BALT	bronchial-associated lymphoid tissue
BCR	B-buněčný receptor
BL	Burkittův lymfom (Burkitt lymphoma)
BL-CAM	B-lymfocytární buněčná adhezivní molekula
CAC	Komise pro klinické záležitosti (Clinical Advisory Committee)
C3	komplementový fragment
CCR7	chemokinový receptor
cDNA	komplementární DNA
CD	diferenční skupina (clusters of differentiation)
CD3 TCR	T buněčný receptorový komplex
CD4 ⁺	pomocné T buňky
CD8 ⁺	cytotoxické T buňky
CDR1-3	oblasti určující komplementaritu (complementarity determining regions)
cHL	klasický Hodgkinův lymfom
CL	kompozitní lymfom
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CLP	common lymphoid progenitor
CLL/SLL	chronická lymfocytární leukemie/malobuněčný lymfom
CML	chronická myeloidní leukémie
CR2	komplementový receptor
CSR	přesmyk tříd (class-switch recombination)
CXCR5	chemokinový receptor
DLBCL	difuzní velkobuněčný B lymfom (diffuse large B-cell lymphoma)
DSBs	dvouřetězcové zlomy DNA (double-strand breaks)
dsDNA	dvouřetězcová DNA (double strand DNA)
DNA-PK	DNA-dependentní proteinkináza
EATL	T lymfom spojený s enteropatií
ENKTCL	extranodální NK/T lymfom, nazální typ
FAS	receptor smrti (CD95)
FDC	folikulární dendritická buňka
FFPE	formalínem fixovaná tkáň zalitá do parafinu (formalin-fixed paraffin embeded)
FL	folikulární lymfom (folicular lymphoma)
FR1-FR4	framework 1-4

GALT	gut-associated lymphoid tissue
GC	zárodečné centrum (germinal center)
gDNA	genomová DNA
HCL	leukemie z vlasatých buněk (hairy cell leukemia)
HL	Hodgkinův lymfom
HLA	antigeny lidských leukocytů (human leukocyte antigens)
HS	histiocytický sarkom
HSC	hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell)
Ig	imunoglobulin
IgH	těžký řetězec imunoglobulinu
IgL	lehký řetězec imunoglobulinu
IgM	imunoglobulin třídy IgM
IgVH	variabilní oblast těžkého imunoglobulinového řetězce
IRF	interferonem regulovaný faktor (interferon regulatory factor)
ITAMs	imunoreceptorové tyrozinové aktivační motivy (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs)
Ki-67	proliferační marker
LB-NS	B-buněčný lymfom NS
LIN	liniově-specifické markery
LL	lymfoblastický lymfom
LMP	latent membrane protein
LPL	lymfoplazmocytmární lymfom
LyG	lymfomatoidní granulomatóza
LyP	Lymfomatoidní papulóza
MALT	extranodální lymfom z marginální zóny
MCL	lymfom z buněk plášťové zóny (mantle cell lymphoma)
MF	Mycosis fungoides
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MM	mnohočetný myelom (multiple myeloma)
nonMZL	lymfom z marginální zóny (marginal zone lymphoma)
NF-κB	transkripční faktor
NHEJ	nehomologní spojování konců (non-homologous end joining)
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NK	„přirozený zabíječ“ (natural killer)
NMZL	lymfom z marginální zóny nodální
OCT-2	transkripční faktor
OS	Omenn syndrom
PAX5	transkripční faktor
PBL	plasmablastický lymfom
PCL	plasmocelulární/mnohočetný myelom
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PCSM-TCL	primární kožní CD4+ T lymfom z malých/středních T buněk
pre-BCR	prekurzor receptoru B buněk
PTCLU	periferní T lymfom, blíže nespecifikovaný
RAG1/RAG2	rekombinační aktivační gen 1 a 2
REAL	Revidovaná evropsko-americká klasifikace lymfoidních nádorů

RSS	rekombinační signální sekvence
SCF	faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiencie (severe combined immune deficiency)
SHM	somatická hypermutace (somatic hypermutation)
SMZL	lymfom z marginální zóny splenický
TCR	receptor T buňky
TdT	terminální deoxyribonukleotidyltransferáza
TF	transkripční faktor
T _{FH}	folikulární pomocná T buňka
T _H	pomocná T buňka
THRLBCL	DLBCL bohatý na T buňky/histiocyty
TL	T lymfoproliferace, NOS
T-LGL	T-velkobuněčná granulární leukemie
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis faktor)
TNFSRF	receptorová TNF superrodina
V(D)J	V(D)J rekombinace
T-LBL	T-lymfoblastická leukemie/lymfoblastický lymfom
WHO	Světová zdravotnická organizace (The World Health Organization)
WM	Waldenströмова makroglobulinémie

9. SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ

Publikace související s tématem dizertace:

1. **Šváchová M.**, Tichý M., Flodr P., Steigerová J., Kolář Z., Bouchal J. Polymerase chain reaction based gene rearrangement in the diagnosis of lymphoproliferative disorders in biopsy samples. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014. (přijato do tisku)
2. Flodr P., Látalová P., Tichý M., Kubová Z., Papajík T., **Šváchová M.**, Vrzalíková K., Radová L., Jarošová M., Murray P. Diffuse large B-cell lymphoma: The history, current view and new perspectives. Neoplasma. 2014;61:491-504
3. Tichý M., Tichá V., Scudla V., **Šváchová M.**, Zapletalová J. [Analysis of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma]. Cesk Patol. 2010;46:15-9.
4. **Šváchová M.**, Tichý M. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain and TCR gene rearrangements in diagnosis of lymphoproliferative disorders on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Neoplasma. 2008;55:36-41.

Prezentace souvisejících s tématem dizertace:

1. **Šváchová M.**, Lukášová A. M. Molekulárně biologická analýza klonální přestavby IgH B-buněk a TCR T-buněk metodou PCR. The 6th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, 23.-24.4.2010, Olomouc, ISBN 978-80-87327-07-4.
2. **Šváchová M.**, Tichý M.: PCR analysis of IgH and TCR gene rearrangements in diagnosis of lymphoproliferative disorders on FFPE tissues. 15.sjezd českých a slovenských patologů s mezinárodní účastí. Rožnov pod Radhoštěm, 2007, ISBN 978-80-7368-331-3.
3. **Šváchová M.** Naše zkušenosti s hodnocením klonality lymfoidních elementů PCR metodou u maligních lymfomů a nenádorových lézí z materiálů zalitých do parafínu. Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy, Prostějov, listopad 2006.
4. **Šváchová M.** Detekce klonality IgH B lymfocytů a TCR T lymfocytů u lymfomů. Mezuregionální mezioborový seminář patologů v rámci aktivit české sekce International Academy of Pathology, Slezská universita, říjen 2006.

Publikace nesouvisející s tématem dizertace:

1. Steigerová J., Rárová L., Oklešťková J., Křížová K., Levková M., **Sváchová M.**, Kolář Z., Strnad M. Mechanisms of natural brassinosteroid-induced apoptosis of prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:4068-76.
2. Hlobilková A., Knillová J., **Šváchová M.**, Skypalová P., Kryštof V., Kolář Z. Tumour suppressor PTEN regulates cell cycle and protein kinase B/Akt pathway in breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2006;26:1015-22.
3. Bouchal J., Baumforth K.R., **Šváchová M.**, Murray P.G., von Angerer E., Kolář Z. Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57:83-92.

Prezentace nesouvisejících s tématem dizertace:

1. Steigerová J., Rárová L., Křížová K., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Kolář Z., Strnad M. Molecular mechanisms of brassinosteroid action and receptor interactions in human carcinoma cells. In: Abstracts of lectures and posters Trends in natural products research: a young scientists meeting of PSE and ÖPhG, University Centre Oberurgl/Tyrol, Austria, 2013, 77. ISBN-13-978-0-9565472-3-1. (Poster vyhrál cenu za nejlepší poster)
2. Steigerová J., Rárová L., Křížová K., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Levková M., Kolář Z., Strnad M. Effects of cholestane brassinosteroid derivatives on hormone-in/sensitive breast and prostate cancer cell lines. In: Program and book of abstracts International conference Analytical cytometry VII, Mikulov, 2013, 122. ISBN 978-80-905449-2-5.
3. Steigerová J., Rárová L., Oklešťková J., Křížová K., **Šváchová M.**, Kolář Z. a Strnad M. Studium interakce rostlinných steroidů s receptory pro steroidní hormony u nádorů prsu a prostaty. VIII. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 29.-30.11.2012, Olomouc; *Onkologie 2012*, 6 (Suppl. B), s. 38; ISSN 1803-5922.
4. Steigerová J., Rárová L., Křížová K., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Kolář Z. and Strnad M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids in human carcinoma cells. 1st International Brassinosteroid Conference; June 27-29, 2012, Barcelona, Spain (In: Abstract book, p.33).

5. Steigerová J., Rárová L., Křížová K., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Kolář Z. and Strnad M. Nuclear receptors for steroid hormones in breast and prostate cancer cell lines after treatment with plant hormone derivatives. *Natural Anticancer Drugs*, June 30-July 4, 2012, Olomouc; Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub; 2012, 156 (Suppl. 1), 573. IF 0,990. ISSN 1213-8118.
6. Steigerová J., Rárová L., Křížová K., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Kolář Z. a Strnad M. Jaderné receptory pro steroidní hormony u buněčných linií odvozených od karcinomu prsu a prostaty po ovlivnění deriváty rostlinných hormonů. XXXVI. Brněnské onkologické dny s XXVI. Konferencí pro sestry a laboranty s mezinárodní účastí; 19.-21. dubna 2012, Brno; ISBN 978-80-86793-23-8, s. 292.
7. Křížová K., Steigerová J., Rárová L., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Kolář Z., Strnad M. Účinek cholestanových derivátů na buněčné linie odvozené od karcinomu prsu; XXXV. Brněnské onkologické dny; Brno; 21.-23. dubna 2011; edukační sborník ISBN 978-80-86793-17-7, s. 333.
8. Steigerová J., Křížová K., Rárová L., Oklešťková J., **Šváchová M.**, Kolář Z., Strnad M. Studium účinku derivátů odvozených od cholestanu na prsní nádorové buněčné linie; VII. Dny diagnostické, prediktivní, a experimentální onkologie, XIX. Sjezd českých a slovenských patologů, XCVII. Diagnostický seminář České divize IAP, XIX. Sjezd české společnosti histologických laborantů; Olomouc; 9.-11. listopadu 2011; *Onkologie* 2011, 5 (Suppl. B), s. 49-50; ISSN 1802-4475.
9. Hlobilková A., Maliková J., Sedláková E., Ehrmann J., **Svachova M.**, Straková N., Fiurasková M., Brychtová S., and Kolar Z. Immunohistochemical analysis of proteins involved in the PI3 K/PKB/Akt signaling pathway and cell cycle regulation in astroglial tumours. 2nd International Symposium on Cancer: New Trends in Cancer for the 21st Century, Valencia, 2005.
10. Hlobilková A., Sedláková E., Ehrmann J., **Šváchová M.**, Straková N., Fiurášková M., Malíková J., Brychtová S. Význam analýzy exprese vybraných proteinů regulujících signální dráhu fosfatidylinositol-3-kinázy/protein-kinázy B/Akt a buněčný cyklus u astroglálních nádorů. 13. sjezd českých a slovenských patologů s mezinárodní účastí společně s 13.sjezdem České společnosti histologických laborantů, Rožnov pod Radhoštěm, 2005, ISBN80-7368-070-X.
11. Hlobilková A., Malíková J., Sedláková E., Ehrmann J., **Šváchová M.**, Straková N., Fiurášková M., Brychtová S., Kolář Z. Analysis of protein expression regulating the PI3-

K/Akt signaling pathway in regulation to astrocytoma pathogenesis. Virchows Arch. 447: 540, 20th European Congress of Pathology, Paris, September 3-8 2005, ISSN: 0945-6317

12. Hlobilkova A., Malikova J., Sedlakova E., Ehrmann J., **Svachova M.**, Strakova N., Fiuraskova M., Brychtova S., Kolar Z. Analysis of protein expression regulating the PI3-K/Akt signaling pathway in regulation to astrocytoma pathogenesis. Virchows Arch 2005;447:540. (IF 2,224), 20th European Congress of Pathology, Paris, 2005, ISSN: 0945-6317.
13. Bouchal J., Baumforth K., **Šváchová M.**, Knillová J., Murray P., Kolář Z. Analýza genové odpovědi na bicalutamid v prostatických buněčných liniích LNCap a DU 145 s přihlédnutím k telomerázové aktivitě. Edukační sborník XXVII. Brněnských onkologických dnů: 87, 2003.
14. Bouchal J., Baumforth K., **Šváchová M.**, Knillová J., Murray P., Kolář Z. Gene response to bicalutamide in prostate carcinoma cell lines LNCaP and DU-145 with respect to telomerase activity. Virchows Arch. 443: 358, 2003 - 19th European Congress of Pathology, Ljubljana 6.–11. 11. 2003.

10. LITERATURA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Elsevier Inc. Saunders 2012; 7th ed. ISBN 978-1-4377-1528-6.
2. Adam Z, Vorlíček J, Vaníček J a kol. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Grada 2004; ISBN: 8024708965, 2. vydání.
3. Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF Interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 2006; 124: 201-13.
4. Alaibac M, Filotico R, Giannella C, Paradiso A, Labriola A, Marzullo F. The effect of fixation type on DNA extracted from paraffin-embedded tissue for PCR studies in dermatopathology. *Dermatology* 1997; 195: 105-107.
5. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 1997; 75: 430-45.
6. Anderson G, Harman BC, Hare KJ, Jenkinson EJ. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol* 2000; 12: 457-64.
7. Angelin-Duclos C, Calame K. Evidence that immunoglobulin VH-DJ recombination does not require germ line transcription of the recombining variable gene segment. *Mol and Cell Biol* 1998; 18: 6253-64.
8. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357: 80-2.
9. Aubin J, Davi F, Nguyen-Salomon F, Leboeuf D, Debert C, Taher M, et al. Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 1995; 9: 471-9.
10. Azulay-Debby H, Melamed D. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Front Biosci* 2007; 12: 2136-47.
11. Bagg A, Braziel RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas. *J Mol Diagn* 2002; 4: 81-89.
12. Bagg A. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements: minding your B's and T's in assessing lineage and clonality in neoplastic lymphoproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2006; 8: 466-75.
13. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 2002; 109: S45-S55.
14. Benhattar J, Delacretaz F, Martin P, Chaubert P, Costa J. Improved polymerase chain reaction detection of clonal T-cell lymphoid neoplasms. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4: 108-12.
15. Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, Dybikowska A, Kowalska A, Falkiewicz B. The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int J Mol Med* 2001; 8: 573-8.
16. Boboila C, Yan C, Wesemann DR, Jankovic M, Wang JH, Manis J, Nussenzweig A, Nussenzweig M, Alt FW. Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J Exp Med* 2010; 207: 417-27.
17. Bolland DJ, Wood AL, Johnston CM, Bunting SF, Morgan G, Chakalova L, Fraser PJ, Corcoran AE. Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat Immunol* 2004; 5: 630-7.
18. Borowitz MJ, Chan JKC. B lymphoblastic leukemia/lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, et al., editors. World health organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press 2008; 168–170.
19. Borowitz MJ, Chan JKC. T lymphoblastic leukemia/lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Geneva: IARC Press 2008; 176–8.

20. Boulé JB, Rougeon F, Papanicolaou C. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Indiscriminately Incorporates Ribonucleotides and Deoxyribonucleotides. *J Biol Chem* 2001; 276: 31388-93.
21. Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, et al. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97: 1562-84.
22. Burack WR, Laughlin TS, Friedberg JW, Spence JM, Rothberg PG. PCR assays detect B-lymphocyte clonality in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of classical hodgkin lymphoma without microdissection. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 104-11.
23. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Fileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; 117: 5019-32.
24. Cantrell DA. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunol* 2002; 105: 369-74.
25. Cobb RM, Oestreich KJ, Osipovich OA, Oltz EM. Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv Immunol* 2006; 91: 45-109.
26. Corneo B, Moshous D, Güngör T, Wulffraat N, Philippet P, Le Deist F, Fischer A, de Villartay JP. Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood* 2001; 97: 2772-6.
27. Cortes P, Weis-Garcia F, Misulovin Z, Nussenzweig A, Lai JS, Li G, Nussenzweig MC, Baltimore D. In vitro V(D)J recombination: Signal joint formation. *Immunol* 1996; 93: 14008-13.
28. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8: 140-74.
29. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941-67.
30. Češka R, Tesař V, Dítě P, Štulc T a kol. *Interna*. 1. Vydání, Praha: Triton, 2010: ISBN 978-80-7387-423-0.
31. Diss TC, Molina TJ, Cabecadas J, Langerak AW. Molecular diagnostics in lymphoma: Why, when and how to apply. *Diagn Histopathol* 2012; 18(2): 53-63.
32. Diss TC, Pan L, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG. Sources of DNA for detecting B cell monoclonality using PCR. *J Clin Pathol* 1994; 47: 493-6.
33. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol today* 1994; 15: 406-11.
34. Elenitoba-Johnson KSJ, Bohling SD, Mitchell RS, Brown MS, Robetorye RS. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diag* 2000; 2: 92-96.
35. Evans PAS, Pott Ch, Groenen PJTA, Salles G, Davi F, Berger F, Garcia JF, van Krieken JHJM, Pals S, Kluin Ph, Schuurin E, Spaargaren M, Boone E, Gonzáles D, Martinez D, Villuendas R, Gameiro P, Diss TC, Mills K, Morgan GJ, Carter GI, Milner BJ, Pearson D, Hummel M, Jung W, Ott M, Canioni D, Beldjord K, Bastard C, Delfau-Larue MH, van Dongen JJM, Molina TJ, Cabecadas J. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21: 207-14.
36. Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 2006; 177: 3728-36.
37. Ferenčík M, Rovenský J, Shoenfeld Y, Mařha V. *Imunitní systém – informace pro každého*. GRADA Publishing 2005; IBSN 80-247-1196-6.
38. Fischer M, Küppers R. Human IgA- and IgM-secreting intestinal plasma cells carry heavily mutated VH region genes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2971-7.
39. Focosi 2012 webová stránka http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/pathohomotissue_blood_WBCneoplasm.html.
40. Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* 2002; 31; 296: 1641-2.

41. Gerber D, Boucontet L, Pereira P. Early expression of a functional TCR β chain inhibits TCR γ gene rearrangements without altering the frequency of TCR $\gamma\delta$ lineage cells. *J Immunol* 2004; 173: 2516-23.
42. Gleißner B, Maurer J, Thiel E. Detection of immunoglobulin heavy chain genes rearrangements in B-cell leukemias, lymphomas, multiple myelomas, monoclonal and polyclonal gammopathies. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 39: 151-5.
43. González M, González D, López-Pérez R, García-Sanz R, Chillón MC, Balanzategui A, Mateos MV, Alaejos I, Langerak AW, Orfão A, van Dongen JJM, San Miguel JF. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 1999; 84: 779-84.
44. Groenen PJTA, Langerak AW, van Dongen JJM, van Krieken JHJM. Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematopathol* 2008; 1: 97-109.
45. Gu Y, Seidl KJ, Rathbun GA, Zhu C, Manis JP, van der Stoep N, Davidson L, Cheng HL, Sekiguchi JM, Frank K, Stanhope-Baker P, Schlissel MS, Roth DB, Alt FW. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 1997; 7: 653-65.
46. Gurbity TP, Bagdi E, Groen NA, Budel LM, Abbou M, Krenacs L, Dinjens WNM. Increased sensitivity of B-cell clonality analysis in formalin-fixed and paraffin-embedded B-cell lymphoma samples using an enzyme blend with both 5'→3' DNA polymerase and 3'→5' exonuclease activity. *Virchows Arch* 2003; 443: 643-8.
47. Hartmann S, Helling A, Döring C, Renné Ch. Clonality testing of malignant lymphomas with the BIOMED-2 primers in a large cohort of 1969 primary and consultant biopsies. *Pathology – Research and Practice* 2013; 209: 495-502.
48. Hebeda KM, Van Altena MC, Rombout P, Van Krieken JH, Groenen PJ. PCR clonality detection in Hodgkin lymphoma. *J Hematop* 2009; 2: 34-41.
49. Hess J, Laumen H, Müller KB, Wirth T. Molecular genetics of the germinal center reaction. *J Cell Physiol* 1998; 177: 525-34.
50. Hunt JL. Molecular Pathology in Anatomic Pathology Practise: A Review of Basic Principles. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 132: 248-60.
51. Child FJ, Woolford AJ, Calonje E, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Molecular analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in the diagnosis of primary cutaneous B cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 984-9.
52. Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Miao NN, Balk SP, Kadin ME. The same dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 696-700.
53. Chu G. Double Strand Break Repair. *J Biol Chem* 1997; 272: 24097-100.
54. Inlay M, Xu Y. Epigenetic regulation of antigen receptor rearrangement. *Clinical Immunology* 2003; 109: 29-36.
55. Isaacson PG, Chott A, Nakamura S, Muller-Hermelink HK, Harris NL, Swerdlow SH. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press 2008; 214-7.
56. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon IARC Press 2008; 158-166.
57. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Am Soc Hematol* 2011; 2011: 506-14.
58. Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996; 184: 1495-505.
59. Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 144-150.

60. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27: 247-54.
61. Kitagawa T, Mori K, Kishi H, Tagoh H, Nagata T, Kurioka H, Muraguchi A. Chromatin structure and transcriptional regulation of human RAG-1 gene. *Blood* 1996; 88: 3785-91.
62. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin IgM+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188: 1679-89.
63. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Küppers R. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev.* 1998; 162: 261-80.
64. Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 1993; 27: 1171-5.
65. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *The New England J of Med* 1999; 20: 1520-27.
66. Kusic B, Dominis M, Dzebro S, Antica M. Molecular insight into the diagnosis of lymphoma. *Int J Mol Med* 2003; 12: 667-71.
67. Labhart P. Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. *Eur J Biochem* 1999; 265: 849-61.
68. Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997; 90: 1073-83.
69. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue M-H, Diss T, Evans PAS, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Håkansson Å, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuurin E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJM. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012; 26: 2159-71.
70. Langerak AW, Groenen PJTA, van Krieken JHJM, van Dongen JJM. Immunoglobulin/T-cell receptor clonality diagnostics. *Expert Opin Med Diagn* 2007; 1: 451-61.
71. Langerak AW, Szczepański T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997; 11: 2192-99.
72. Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 1994; 56: 127-149.
73. Lin J, Weiss A. T cell receptor signalling. *J Cell Sci* 2001; 114: 243-4.
74. Locker J, Nalesnik M. Molecular genetic analysis of lymphoid tumors arising after organ transplantation. *Am J Pathol* 1989; 135: 977-87.
75. Lorenzen J, Jux G, Zhao-Höhn M, Klöckner A, Fischer R, Hansmann ML. Detection of T-cell clonality in paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 93-99.
76. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by a Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 2002; 108: 781-94.
77. Masopust J, Bartůňková J, Goetz P, Chromý V, Jabor A, Jirásek JE, Mareš J, Palička V, Pelouch V, Průša R, Štern P, Zima T. *Patobiochemie buňky*. 2003; ISBN: 80-239-1011-0.
78. Matsushita K, Margulies I, Onda M, Nagata S, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. Soluble CD22 as a tumor marker for hairy cell leukemia. *Blood* 2008; 112: 2272-7.
79. Medeiros LJ, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1189-1207.
80. Meier JT, Lewis SM. P Nucleotides in V(D)J Recombination: A Fine-Structure Analysis. *Mol and Cell Biol* 1993; 13: 1078-92.
81. Messier TL, O'Neill JP, Hou SM, Nicklas JA, Finette BA. In vivo transposition mediated by V(D)J recombinase in human T lymphocytes. *The EMBO Journal* 2003; 22: 1381-88.

82. Miettinen M, Lasota J. Polymerase chain reaction based gene rearrangement studies in the diagnosis of follicular lymphoma-performance in formaldehyde-fixed tissue and application in clinical problem cases. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 9-19.
83. Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME. Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J Clin Invest* 1999; 104: 1115-21.
84. Mitha N, McGlennen RC. Methods to detect clonal gene rearrangements in lymphomas and leukemias. In: Killeen AA, editor. *Methods in molecular medicine*. Humana Press Inc., Totowa, NJ 2001: 189-209.
85. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Pocket Companion to Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition 2011; ISBN-13: 978-1-4160-5454-2.
86. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; 68: 869-877.
87. Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2164-73.
88. Nakase H, Takahama Y, Akamatsu Y. Effect of CpG methylation on RAG1/RAG2 reactivity: implications of direct and indirect mechanisms for controlling V(D)J cleavage. *EMBO Rep*. 2003; 4(8): 774-780.
89. Nera KP, Lassila O. Pax5 – a critical inhibitor of plasma cell fate. *Scand J Immunol* 2006; 64: 190-9.
90. Nikiforova MN, Hsi ED, Braziel RM, Gulley ML, Leonard DG, Nowak JA, et al. Detection of clonal IGH gene rearrangements: summary of molecular oncology surveys of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 185-9.
91. Nuñez C, Nishimoto N, Gartland GL, Billips LG, Burrows PD, Kubagawa H, Cooper MD. B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol* 1996; 156: 866-72.
92. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990; 248: 1517-23.
93. Ohshima K, Jaffe ES, Kikuchi M. Adult T-cell leukemia/lymphoma. In: Jaff ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon, France: IARC Press 2008; 281-4.
94. Olaru A, Petrie HT, Livák F. Beyond the 12/23 rule of VDJ recombination independent of the Rag proteins. *J Immunol* 2005; 174: 6220-6.
95. Papajík T, Raida L, Indrák K. REAL/WHO klasifikace nádorů lymfatické tkáně: 10 let fungování společného jazyka z pohledu klinické praxe. *Vnitř Lék* 2005; 51: 690-8.
96. Peng HZ, Du MQ, Koulis A, Aiello A, Dogan A, Pan LX, Isaacson PG. Nonimmunoglobulin Gene Hypermutation in Germinal Center B Cells. *Blood* 1999; 93: 2167-72.
97. Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011; 117: 26-38.
98. Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J a kol. *Molekulární hematologie*. Galén 2013; 1. vydání ISBN 978-80-7262-942-8.
99. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381: 751-8.
100. Ramasamy I, Brisco M, Morley AA. Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992; 45: 770-5.
101. Rosypal S. Úvod do molekulární biologie. Díl druhý. *Molekulární biologie eukaryot*. 2000; ISBN 80-902562-1-X. 3. vydání.
102. Sadofsky MJ. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 1399-1409.
103. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: *Molecular cloning. A Laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

104. Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 265-271.
105. Segal GH, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas. *Hum Pathol* 1994; 25: 1276-82.
106. Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* 2000; 95: 3020-4.
107. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992; 68: 855-67.
108. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989; 59: 1035-48.
109. Soo KL, Shustik D, Mohd Yusoff LZ, Tan L, Tan SY. An algorithmic approach to the diagnosis of NK and T cell lymphomas. *Pathology* 2011; 43: 673-81.
110. Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, Revy P, de Villartay JP. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 2007; 26: 7780-91.
111. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161: 1961-71.
112. Stein H, Delsol G, Pileri SA, Weiss L, Poppema S, Jaffe ES. Classical Hodgkin lymphoma. In: Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press 2008; 326-9.
113. Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I, Kaudewitz P, Seitz V, Assaf Ch, Sander Ch, Stein H. Single-cell analysis of CD30⁺ cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal T-cell origin. *Blood* 2002; 100: 578-84.
114. Stoolman LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989; 56: 907-10.
115. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2008; 4th edition.
116. Tai YC, Peh SC. Feasibility of T-cell receptor γ (TCR γ) gene rearrangement on formalin-fixed, paraffin embedded tissues by PCR assays. *Singapore Med J* 2003; 44: 250-5.
117. Tai YC, Peh SC. Immunoglobulin gene rearrangement of lymphoid malignancies: application of the PCR technique to formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Clin. Exp Hematopathol* 2003; 43: 11-19.
118. Takahashi Y, Ohta H, Takemori T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 2001; 14: 181-92.
119. Thériault C, Galoin S, Valmary S, Selves J, Lamant L, Roda D, et al. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TCR- γ chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: result of a study of 525 cases. *Mod Pathol* 2000; 13: 1269-79.
120. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581.
121. Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 1990; 75: 2220-22.
122. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene Rearrangement in B- and T-Lymphoproliferative Disease Detected by the Polymerase Chain Reaction. *Blood* 1991; 78: 192-6.
123. Van Dongen JJM et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-2317.
124. Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DM. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 1999; 12: 3997-4010.

125. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-51.
126. Venkatraman L, Catherwood MA, Patterson A, Lioe TF, McCluggage WG, Anderson NH. Role of polymerase chain reaction and immunocytochemistry in the cytological assessment of lymphoid proliferations. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1160-65.
127. Wan JH, Trainor KJ, Brisco MJ, Morley AA. Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1990; 43: 888-90.
128. Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, Gascoyne RD, Jaffe ES, MacLennan KA, Rüdiger T, Pileri S, Nakamura S, Nathwani B, Campo E, Berger F, Coiffier B, Kim WS, Holte H, Federico M, Au WY, Tobinai K, Armitage JO, Vose JM. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood* 2011; 117: 3402-8.
129. Whittaker S, Smith N, Jones RR, Luzzatto L. Analysis of beta, gamma a delta T-cell Receptor Genes in Lymphomatoid Papulosis: Cellular Basis of Two Distinct Histologic Subsets. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 786-791.
130. Yanoa K, Morotomi-Yanoa K, Akiyama H. Cernunnos/XLF: A new player in DNA double-strand break repair. *IJBCB* 2009; 41: 1237-40.
131. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; 30: 646-55.
132. Zhou X-G, Sandvej K, Gregersen N, Hamilton-Dutoit SJ. Detection of clonal B cells in micro-dissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1999; 52: 104-10.