

Л.М. Ковалевська
 О.В. Юрченко
 С.В. Міхалап
 Л.М. Шлапацька
 Г.Г. Бердова
 Е.М. Алексик
 С.П. Сидоренко

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

ДУ «Національний інститут раку», Київ, Україна

Ключові слова: дифузні крупноклітинні В-клітинні лімфоми, маркери диференціювання В-клітин, протеїнкіназа D2, імуногістохімічні дослідження.

ЕКСПРЕСІЯ ТА АУТОФОСФОРИЛЮВАННЯ ПРОТЕЇНКІНАЗИ D2 В ДИФУЗНИХ В-КРУПНОКЛІТИННИХ ЛІМФОМАХ

Резюме. Була проведена напівкількісна імуногістохімічна оцінка експресії та аутофосфорилування протеїнкінази D2 (PKD2) при дифузних крупноклітинних В-клітинних лімфомах (ДКВЛ). Виявлена гетерогенність ДКВЛ по внутрішньоклітинній локалізації, рівню експресії і аутофосфорилування PKD2. По характеру експресії і аутофосфорилування PKD2 виділені 3 групи ДКВЛ, що відрізняються за рівнем диференціювання злякисно трансформованих клітин. При ДКВЛ з найнижчим рівнем диференціювання встановили низький рівень експресії та аутофосфорилування PKD2, а у випадках ДКВЛ з високим рівнем диференціювання (позитивні за інтерферон регуляторним фактором-4 (IRF-4) та негативні за білком Vcl-6) спостерігали високий рівень експресії та аутофосфорилування PKD2.

ВСТУП

Дифузні крупноклітинні В-клітинні лімфоми (ДКВЛ) є найпоширенішим гістологічним варіантом неходжкінських злякисних лімфом (НЗЛ) у дорослих і складають до 40% всіх НЗЛ [1–4]. У той же час ДКВЛ є гетерогенною групою лімфом, що відрізняються за біологічними і морфологічними властивостями, клінічним проявом та перебігом захворювання [5, 6]. Нещодавнє впровадження ДНК-мікроарейних технологій дозволило краще зрозуміти біологію ДКВЛ та розробити нові підходи для удосконалення існуючих методів прогнозу перебігу захворювання [7, 8]. Комплексний аналіз профілю експресії генів дозволив виділити 3 відмінних варіанта ДКВЛ. Перший варіант характеризується профілем експресії генів, характерним для В-клітин зародкових центрів лімфоїдних фолікулів (ЗЦ ДКВЛ) і чутливістю до хіміотерапії. При другому варіанті, що має несприятливий перебіг захворювання, профіль експресії генів у злякисно трансформованих лімфоцитів подібний до активованих В-клітин (АВК ДКВЛ). Третій варіант є гетерогенним та потребує подальшого проведення дослідження. Він включає медіастинальні ДКВЛ та інші не охарактеризовані ДКВЛ [7–10]. Стратегія пошуку маркерів прогресії та прогнозу перебігу ДКВЛ базується на комплексному вивченні експресії генів, генетичних порушень та функціональних тестів для створення повного молекулярного профілю пухлин, який залежить від низки сигнальних шляхів і вибору мінімальних комплексів маркерів, застосування яких можливо впровадити в клінічну практику.

Кількісна оцінка активності генів на рівні експресії мРНК за допомогою мікроарейної технології або полімеразної ланцюгової реакції в реально-

му часі потребує використання нативних чи заморожених у рідкому азоті пухлин, чим значно обмежує впровадження цих підходів у практику. Альтернативою цього є напівкількісна імуногістохімічна оцінка експресії генів на рівні білка з використанням парафінових зрізів. Крім того, використання імуногістохімічних методів дозволяє виявляти посттрансляційні модифікації білків та їх внутрішньоклітинну локалізацію. Особлива увага приділяється ключовим маркерам, які характеризують сигнальні каскади і демонструють гетерогенність їх експресії при ДКВЛ.

Серин-треонін кінази родини PKD є медіаторами зв'язків між різними сигнальними системами в В-клітинах [11–13]. З'ясовано, що в лімфоцитах людини експресована протеїнкіназа D2 (PKD2), яка може активуватися через антигенрозпізнавальні рецептори лімфоцитів [14, 15]. Кінази родини PKD можуть бути локалізовані в різних органелах клітин: цитоплазмі, апараті Гольджі, мітохондріях і ядрі [16]. Це дозволяє їм регулювати процеси, пов'язані із залученням інтегринів до клітинної адгезії, формування, відшнуровування і транспорту везикул від апарату Гольджі, організації хроматину та епігеномною регуляцією роботи генів [11, 17]. У попередніх дослідженнях нами була виявлена гетерогенність НЗЛ за рівнем експресії PKD2 та її аутофосфорилування, яка корелювала з рівнем диференціювання злякисно трансформованих клітин [14]. Серед різних варіантів НЗЛ найвищий рівень експресії PKD2 був характерний для ДКВЛ, але нами була відзначена гетерогенність по аутофосфорилуванню цієї кінази. Метою цієї роботи було з'ясування особливостей внутрішньоклітинної локалізації та аутофосфорилування/активації PKD2 при ДКВЛ у порівнянні

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

з ключовими маркерами, які використовують для прогнозу перебігу захворювання та визначення рівня диференціювання злоякісно трансформованих клітин при ДКВЛ.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження були проведені на зрізах біопсійного матеріалу ДКВЛ у 18 пацієнтів, які проходили лікування в ДУ «Національний інститут раку» МОЗ України. Для імуногістохімічних досліджень були використані специфічні сироватки проти PKD2 («Calbiochem», США) та pPKD2 Ser876 («Upstate», США), актину, PKCβII, IRF4, Vcl-6 («Santa Cruz», СА, США).

З біоптатів лімфатичних вузлів були виготовлені парафінові блоки за стандартною гістологічною методикою. Патогістологічний діагноз ДКВЛ був встановлений при морфологічному дослідженні зрізів, забарвлених гематоксилін-еозином. З метою уточнення діагнозу використовували імуногістохімічні методи дослідження із застосуванням панелі моноклональних антитіл (МкАТ), проти антигенів: CD3, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD38, CD68, CD150 (ІЕПОР НАНУ). Імуногістохімічні реакції проводили за стандартною методикою з використанням сироватки крові осла проти козячого IgG, кон'югованої з пероксидазою хрину («Santa Cruz Biotechnology», США) та системи EnVision («Dako Cytomation», США) в якості вторинних реагентів. Для візуалізації активності пероксидази використовували DAB («Sigma-Aldrich», США) [14]. Рівень експресії білків оцінювали за допомогою імуногістохімічних балів (H-score), які підраховували за формулою $H\text{-score} = 1 \times \text{СЛ} + 2 \times \text{ПОМ} + 3 \times \text{СИЛ}$, де СЛ — відсоток клітин із забарвленням слабкої інтенсивності; ПОМ — відсоток клітин із забарвленням помірної інтенсивності, СИЛ — відсоток клітин із забарвленням сильної інтенсивності. Ступінь експресії визначали як негативний, якщо число балів було в діапазоні від 0 до 50; низький — від 51 до 100; помірний — від 101 до 200; високий — 201 та вище [18].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експресія PKD2 була виявлена у всіх досліджених ДКВЛ (таблиця). Інтенсивність реакції у злоякісно трансформованих клітинах коливалася від помірної до високої. Відмічена значна неоднорідність по внутрішньоклітинній локалізації PKD2. У 8 випадках специфічна реакція на PKD2 спостерігалась тільки в цитоплазмі клітин, у 8 випадках — інтенсивна реакція як у цитоплазмі, так і в ядрах клітин, а в 2 випадках помірна реакція в цитоплазмі поєднувалася з поодинокими гранулами продукту реакції по периферії ядра (див. таблицю). Слід зазначити, що експресія PKD2 не була виявлена в ядерцях. При дослідженні рівня аутофосфорильованого PKD2, що відображає рівень активації кінази, спостерігалися значні відмінності між окремими дослідженими випадками. Інтенсивність реакції

була від слабкої до високої (див. таблицю). Аутофосфорильовану PKD2 виявляли в цитоплазмі і в ядрах клітин, що відповідає раніше зазначеній локалізації PKD2 (див. таблицю).

Таблиця

Рівень експресії PKD2 та її аутофосфорильованої форми, PKCβ і маркерів диференціювання В-клітин у ДКВЛ

Група	№ зразка	Рівень експресії, бали (H-score):				
		PKD2	pPKD2	PKCβ	IRF4	Vcl-6
I	5	104 ¹	68 ¹	14	245 ¹	232
I	101	123 ¹	55 ¹	21	234 ¹	225
I	102	167 ¹	78 ¹	16	265 ¹	254
I	117	95 ²	62 ²	18	221 ¹	238
I	181	156 ²	67 ²	22	258 ¹	247
I	189	129 ¹	102 ¹	19	198 ¹	211
I	207	161 ¹	63 ¹	11	218 ³	21
II	17	132 ¹	123 ¹	143	59	141
II	104	168 ³	156 ³	129	67 ⁴	124
II	143	123 ¹	129 ¹	163	42	85
II	147	131 ¹	138 ¹	112	26	151
II	160	164 ³	179 ³	181	24	128
III	2	261 ³	211 ³	224	145 ⁴	24
III	4	254 ³	247 ³	251	206 ⁴	31
III	46	271 ³	262 ³	263	219 ⁴	42
III	103	262 ³	258 ³	242	225 ⁴	59
III	105	253 ³	246 ³	257	156 ⁴	14
III	172	249 ³	271 ³	249	218 ⁴	31

¹ цитоплазматична імуногістохімічна реакція; ² імуногістохімічна реакція локалізована переважно в цитоплазмі, але спостерігається і по периферії ядра; ³ імуногістохімічна реакція спостерігається як у ядрі, так і в цитоплазмі на однаковому рівні; ⁴ імуногістохімічна реакція спостерігається в ядрі.

Усі проаналізовані нами випадки ДКВЛ були розділені на 3 групи за внутрішньоклітинною локалізацією PKD2 та за рівнем її аутофосфорильовання (див. таблицю). У першій групі (7 випадків) у 5 хворих PKD2 була локалізована виключно в цитоплазмі, а рівень її аутофосфорильовання був низьким. У 2 пацієнтів разом з цитоплазматичною реакцією відзначали і ядерну (див. таблицю). Друга група включала 5 випадків з помірним рівнем експресії аутофосфорильованої PKD2, але з наявністю реакції переважно в цитоплазмі (див. таблицю). Для третьої групи (6 випадків) характерним був високий рівень експресії та аутофосфорильовання PKD2 в абсолютній більшості клітин. Імуногістохімічна реакція спостерігалася як в цитоплазмі, так і в ядрі (див. таблицю). Виникає запитання, з чим може бути пов'язана гетерогенність ДКВЛ по рівню експресії та аутофосфорильовання PKD2? Для відповіді на це запитання ми провели аналіз експресії факторів транскрипції Vcl-6 та IRF-4, які дозволяють визначити рівень диференціювання клітин при ДКВЛ, а також PKCβII, що використовують у якості прогностичного маркеру ДКВЛ [19]. У першій групі випадків відзначено високий рівень експресії як IRF-4, так і Vcl-6 (6 із 7 випадків) у цитоплазмі пухлинних клітин. Один випадок, що відрізнявся високим рівнем плазматизації клітин, був негативним на Vcl-6, при одночасному виявленні помірної цитоплазматичної та ядерної реакції на IRF-4. Нещодавні дослідження свідчать, що коекспресія факторів транскрипції IRF-4 та Vcl-6 є характерною ознакою клітин, що утворюють зародкові центри лімфоїдних фолікулів [20]. З іншого боку, коекспресія IRF-4 та Vcl-6 може виникати за рахунок порушення регуляції експресії Vcl-6 [4, 21]. Таким чином, злоякісно трансформовані клітини біль-

шості хворих першої групи швидше за все знаходяться на стадії диференціювання клітин, що утворюють зародкові центри лімфоїдних фолікулів.

Для другої групи хворих була характерна позитивна реакція в клітинах на Bcl-6 (помірний ступінь експресії) поряд з відсутністю експресії IRF-4. Такі випадки диференціюють як ДКВЛ, що походять із клітин зародкових центрів [22]. У третій групі не виявлено експресії Bcl-6, проте виявлялася виключно ядерна інтенсивна реакція на IRF-4, що є типовим для АВК ДКВЛ (див. таблицю) [23].

Аналіз експресії РКСВІІ у зразках ДКВЛ виявив кореляцію рівня експресії цієї кінази у виділених нами групах. На сьогодні в міжнародній практиці експресію РКСВІІ використовують у якості прогностичного маркера при ДКВЛ [24]. Показано, що першій групі ДКВЛ властива негативна або низька реакція на РКСВІІ. Друга та третя групи були позитивні на РКСВІІ, але відрізнялися за інтенсивністю імуногістохімічної реакції. Якщо зразки другої групи за бальною шкалою інтенсивності характеризувалися помірним рівнем експресії РКСВІІ, то в третій групі відзначено високий рівень експресії РКСВІІ.

Таким чином аналіз рівня експресії маркерів диференціювання В-клітин (IRF-4, Bcl-6) та РКСВІІ у виділених нами групах ДКВЛ вказує на те, що по мірі диференціювання В-клітин підвищується рівень експресії та аутофосфорилування PKD2, а фермент релокалізується з цитоплазми до ядра. Крім того, рівень експресії РКСВІІ також залежить від ступеню диференціювання В-клітин.

Оскільки маркери диференціювання клітин та прогресії пухлин є потенційними мішенями для таргетної та індивідуалізованої терапії при злоякісних новоутвореннях, виявлення нових потенційних молекулярних маркерів прогресії ДКВЛ має не тільки прогностичну цінність, але також дозволить запропонувати нові підходи до протипухлинної терапії.

ВИСНОВКИ

1. Виявлена гетерогенність ДКВЛ за внутрішньоклітинною локалізацією та рівнем експресії і аутофосфорилування PKD2.

2. За характером експресії і аутофосфорилування PKD2 виділені 3 групи ДКВЛ, що відрізняються рівнем диференціювання злоякісно трансформованих клітин.

3. Рівень експресії і аутофосфорилування PKD2 корелює з рівнем експресії РКСВІІ, Bcl-6 та IRF-4.

Робота виконана згідно з планом науково-дослідної роботи ІЕПОР, номер Державної реєстрації № 0105U005557.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, *et al.* Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; **198** (6): 851–62.

2. Kupperts R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; **5** (4): 251–62.

3. Rui L, Goodnow C. Lymphoma and the control of B cell growth and differentiation. *Curr Mol Med* 2006; **6** (3): 291–308.

4. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008; **8** (1): 22–33.

5. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; **103** (1): 275–82.

6. van Imhoff G, Boerma E, van der Holt B, *et al.* Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; **24** (25): 4135–42.

7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403** (6769): 503–11.

8. Staudt L, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 2005; **87**: 163–208.

9. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, *et al.* The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; **102** (12): 3871–9.

10. Rosenwald A, Staudt L. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003; **44** (Suppl 3): S41–7.

11. Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, *et al.* Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 2002; **12** (4): 193–200.

12. Rykx A, De Kimpe L, Mikhlap S, *et al.* Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett* 2003; **546** (1): 81–6.

13. Rozenfurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* 2005; **8**: 8.

14. Kovalevska LM, Yurchenko OV, Shlapatska LM, *et al.* Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas. *Exp Oncol* 2006; **28** (3): 225–30.

15. Irie A, Harada K, Tsukamoto H, *et al.* Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *Int Immunol* 2006; **18** (12): 1737–47.

16. Rey O, Yuan J, Young SH, *et al.* Protein kinase C nu/protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. *J Biol Chem* 2003; **278** (26): 23773–85.

17. Auer A, von Blume J, Sturany S, *et al.* Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling. *Mol Biol Cell* 2005; **16** (9): 4375–85.

18. Упоров АВ, Семиглазов ВФ, Пожариский КМ. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации. *Арх патологии* 2000; **62** (2): 26–30.

19. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, *et al.* Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005; **18** (10): 1377–84.

20. Cattoretti G, Shakhovich R, Smith PM, *et al.* Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *J Immunol* 2006; **177** (10): 6930–9.

21. Saito M, Gao J, Basso K, *et al.* A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2007; **12** (3): 280–92.

22. Prakash SH. Nodal aggressive B-cell lymphomas: a diagnostic approach. *J Clin Pathol* 2007; **60** (10): 1076–85.

23. Polo J, Juszczynski P, Monti S, *et al.* Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA 2007; **104** (9): 3207–12.

24. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, *et al.* Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2003; **101** (1): 78–84.

**PROTEIN KINASE D2 EXPRESSION
AND AUTOPHOSPHORYLATION
IN THE DIFFUSE LARGE B-CELL
LYMPHOMAS**

*L.M. Kovalevska, O.V. Yurchenko, S.V. Mikhalap,
L.M. Shlapatska, G.G. Berdova, E.M. Aleksik,
S.P. Sydorenko*

Summary. *Using semiquantitative immunohistochemistry the level of expression and autophosphorylation of protein kinase D2 (PKD2) was evaluated in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL). The heterogeneity of DLBCL in expression, intracellular localization, and autophosphorylation of PKD2 was demonstrated.*

According to the character of PKD2 expression and autophosphorylation DLBCL were separated into three groups, which have different level of tumor cell differentiation. DLBCL with lower level of cell differentiation were characterized by low level of PKD2 expression and autophosphorylation, while cases with high level of differentiation (IFR-4 positive and Bcl-6 negative) showed the high level of PKD2 expression and autophosphorylation.

Key Words: diffuse large B-cell lymphomas, marker differentiation B-cells, protein kinase D2, immunohistochemistry.

Адреса для листування:

Сидоренко С.П.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: svetasad@onconet.kiev.ua