

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program Biochemie



**Bc. Daniela Černá**

Validace metody nové multiplexní sady protilátek a její využití pro stanovení prognostických  
znaků dětských akutních leukemií

Novel Antibody array validation and application to determine prognostic markers of  
childhood acute leukemia

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Školitel – konzultant: MUDr. Tomáš Kalina, PhD.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2011

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala především Mgr. Veronice Kanderové za její trpělivé a obětavé vedení při experimentální práci i během vlastního sepisování diplomové práce, cenné rady, připomínky a stále milý přístup. Dále bych ráda poděkovala svému školiteli-konzultantovi MUDr. Tomášovi Kalinovi, PhD. a vedoucímu práce doc. RNDr. Miroslavovi Šulcovi, PhD., za vytvoření příjemného pracovního prostředí, zadání tématu diplomové práce, její vedení a pomoc při vlastním sepisování.

Dále bych ráda poděkovala kolektivu laboratoře CLIP cytometrie a CLIP molekulární genetiky, pod níž jsem tuto diplomovou práci vypracovala, především Mgr. Karlu Fišerovi, PhD., dále Mgr. Janu Stuchlému, doc. MUDr. Ondřeji Hrušákovi, PhD., MUDr. Janě Volejníkové, MUDr. Evě Froňkové, PhD., Danielovi Thürnerovi, Pavlovi Semerákovi, Ing. Kateřině Mužíkové, Aleně Hrdličkové a Pavle Luknárové za pomoc a příjemné prostředí. Nakonec bych ráda poděkovala Dr. Fridtjofovi Lund-Johansenovi za vedení celého projektu protilátkové array.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Pavlovi a mé rodině za podporu.

## Seznam použitých zkratk

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
APC	fluorochrom allofykokyanin
B-ALL	B-lymfoblastická leukemie
BC	krevní preparát (z angl. <i>buffy coat</i> )
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. <i>Bicinchoninic acid</i> )
BCP-ALL	prekurzorová B-lymfoblastická leukemie (z angl. <i>B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia</i> )
BCR	B-lymfocytární receptor (z angl. <i>B-cell receptor</i> )
BCR	region, kde se sdružují zlomy (z angl. <i>Breakpoint cluster region</i> )
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i> )
CD	diferenční skupina (z angl. <i>cluster of differentiation</i> )
CLIP	výzkum dětských leukemií Praha (z angl. <i>Childhood leukemia investigation Prague</i> )
CLL	chronická lymfoblastická leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CRLF2	faktor 2 podobný cytokinovému receptoru (z angl. <i>cytokine receptor like factor 2</i> )
DMSO	dimethylsulfoxid
E	escin
ECL	zesílená chemiluminescence (z angl. <i>Enhanced chemiluminescence</i> )
EGIL	evropská skupina pro imunologickou charakterizaci leukemií (z angl. <i>European Group for the immunological characterization of leukemias</i> )
FAB systém	Franouzsko-americko-britský systém
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. <i>Fetal bovine serum</i> )
FC	průtoková cytometrie (z angl. <i>Flow cytometry</i> )
FCS	rozptyl světla v malém úhlu (z angl. <i>Forward scatter</i> )
FITC	fluorochrom fluorescein isothiokyanát
FPLC	rychlá kapalinová chromatografie proteinů (z angl. <i>Fast protein liquid chromatography</i> )

HRP	křenová peroxidasa (z angl. <i>Horse-radish peroxidase</i> )
Ig	imunoglobulin
IKZF1	protein 1 rodiny Ikaros obsahující zinkové prsty (z angl. <i>Ikaros family zinc finger protein 1</i> )
IP	imunoprecipitace
IRF	regulační faktor interferonu (z angl. <i>Interferon regulatory factor</i> )
KD	kostní dřeň
LM	laurylmaltosid
LOH	ztráta heterozygosity (z angl. <i>Loss of heterozygosity</i> )
LPS	lipopolysacharid
MAPK	proteinová kinasa aktivovaná mitogeny (z angl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
MFI	medián intensity fluorescence
MLL	smíšený typ leukemie (z angl. <i>Mixed lineage leukemia</i> )
MPO	myeloperoxidasa
MRN	minimální reziduální nemoc
NC	nitrocelulosa
NP-40	nonidet-P40
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z ang. <i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i> )
PB	fluorochrom pacific blue
PE	fluorochrom fykoerythrin
PI	propidium jodid
PI3- kinasa	fosfatidylinositol3 kinasa
PerCP	fluorochrom peridinin chlorfyl protein
Ph chromosom	filadelfský chromosom (z angl. <i>Philadelphia chromosom</i> )
PK	periferní krev
PML	promyelocytární leukemický gen
PO	fluorochrom pacific orange
PS	fosfatidylserin
RAG	protein aktivující V(D)J rekombinaci (z angl. <i>V(D)J recombination-activating protein</i> )
RAR $\alpha$	receptor $\alpha$ kyseliny retinoové (z angl. <i>Retinoic acid receptor <math>\alpha</math></i> )
SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. <i>Sodium dodecylsulphate</i> )

SLP65	protein o velikosti 65kDa, který obsahuje SH2 doménu a vyskytuje se u leukocytů (z angl. <i>SH2-domain-containing leukocyte protein of 65kDa</i> )
SLP76	protein o velikosti 76kDa, který obsahuje SH2 doménu a vyskytuje se u leukocytů (z angl. <i>SH2-domain-containing leukocyte protein of 76kDa</i> )
SNP	polymorfismus jednoho nukleotidu (z angl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
SSC	rozptyl světla v úhlu 90° (z angl. <i>Side scatter</i> )
T-ALL	T-lymfoblastická akutní leukemie
TCR	T-lymfocytární receptor (z angl. <i>T-cell receptor</i> )
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferasa
TLB	lyzační pufr s Tween20 (z angl. <i>Tween20 lysis buffer</i> )
T <sub>reg</sub>	regulační T-lymfocyty

## **Abstrakt v anglickém jazyce**

Leukemia is the most common malignant childhood disease, which occurs in Czech Republic every year in about 100 cases. That's why has been devoted over the last 5 decades much attention and funding to this research and the children with leukemia have a high chance for achieving complete remission. Nevertheless, for about 10% of patients leukemia still remains lethal and these cases are subjects of current studies. Leukemia is a complex disease in its pathology involving lots of aberrations, which pathologically manifest at the DNA, mRNA and protein level. Nevertheless some symptoms of this disease are only at the protein grade (and not DNA or mRNA). Since a broad part of the protein profile in leukemic cell changes, it is necessary to develop newer, more sensitive and especially more efficient methods, which are able to follow up changes in large sets of proteins and detect prognostic and diagnostic markers.

Within diploma study a new method - multiplex antibody array - has been tested. Our laboratory tests this method in collaboration with a Norwegian laboratory (Rikshospitalet University Hospital, University of Oslo) under leading by Dr. Lund-Johansen, who is the author of this method. Antibody array presents a set of 1152 latex bead populations labeled with fluorescent dyes in different concentrations with antibodies against different antigens that are expected to be associated with childhood leukemias.

The result of my diploma study is an optimized and validated protocol through the comparison of classical flow cytometric immunophenotyping of 11 leukemic cell lines. In the next step of protocol validation the protein profile changes on 4 cell lines with or without presence of drug imatinib mesylate (Glivec) were determined.

The last step of the diploma study is research and validation of new prognostic markers, for example the Ikaros protein on cell lines NALM-6 and SUP-B15, because its monalelic deletions on DNA grade dramatically increase risk of relapse. (In Czech)

## Abstrakt v českém jazyce

Leukemie je nejčastější nádorové onemocnění u dětí, které se ročně vyskytuje v České republice přibližně ve 100 případech. Proto se tomuto výzkumu posledních 50 let věnuje na celém světě tolik pozornosti a financí a dětští pacienti s leukemií mají obrovskou naději na úplné vyléčení. Pro cca 10% pacientů však leukemie stále zůstává smrtelná a právě na tyto případy se zaměřují současné studie. Leukemie je komplexní onemocnění projevující se patologicky na úrovni DNA, mRNA i proteinů. Nicméně některé patologické projevy této nemoci jsou pouze na úrovni proteinů (a ne DNA či mRNA). Vzhledem k tomu, že se u leukemických buněk mění i značná část proteinového profilu, je třeba vyvíjet novější, citlivější a především účinnější metody, které jsou schopny sledovat změny u velkých souborů proteinů a tak detekovat prognostické a diagnostické znaky.

V diplomové práci byla testována nová metoda, multiplexní sada protilátek. Ve spolupráci naší laboratoře s norským pracovištěm (Rikshospitalet University Hospital, University of Oslo) testujeme tuto metodu pod vedením dr. Lund-Johansena, který je autorem této metody. Sada protilátek představuje soubor 1152 populací latexových kuliček označených fluorescenčními barvičkami v různých koncentracích s navázanými protilátkami proti různým antigenům, u nichž se předpokládá asociace s dětskou leukemií.

Výsledkem diplomové práce je optimalizovaný a validovaný protokol ve srovnání s klasickou imunofenotypizací 11-ti leukemických buněčných linií na průtokovém cytometru. Dalším krokem validace metody bylo studium změn proteinových profilů na 4 buněčných liniích po a bez použití léčiva imatinib mesylátu (Glivecu).

Posledním krokem diplomové práce je zkoumání a validace nových prognostických proteinů, např. proteinu Ikaros na buněčných liniích NALM-6 a SUP-B15, protože přítomnost jeho monoalelických delecí na úrovni DNA výrazně zvyšuje riziko relapsu leukémie.



# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1. Základní charakteristika dětských leukemií.....	1
1.1.1. Genetické abnormality .....	3
1.1.2. Imunofenotypová identifikace leukemických buněk .....	4
1.2. Akutní myeloidní leukemie (AML) .....	4
1.2.1. Genetické abnormality .....	5
1.2.3. Imunofenotyp akutních myeloidních leukemií (AML).....	5
1.2.4. Prognóza akutní myeloidní leukemie (AML) .....	6
1.2.5. Příčiny akutní myeloidní leukémie (AML).....	6
1.3. Akutní lymfoblastická leukemie (ALL).....	7
1.3.1. Genetické abnormality .....	7
1.3.2. Imunofenotyp akutních lymfoblastických leukemií (ALL) .....	10
1.3.3. Prognóza akutních lymfoblastických leukemií (ALL).....	13
1.3.4. Nové potenciálně prognostické znaky.....	14
1.3.5. Příčiny akutních lymfoblastických leukemií (ALL) .....	17
1.4. Proteomické profilování buněk akutních leukemií .....	17
<b>2. Cíl práce</b> .....	20
<b>3. Materiál a metody</b> .....	21
3.1. Zpracování buněk.....	21
3.1.1. Buněčné kultury .....	21
3.1.2. Kultivace buněk.....	22
3.1.3. Izolace lymfocytů ze vzorku periferní krve (PK), kostní dřeně (KD) nebo krevního preparátu („buffy coat“, BC) pomocí centrifugace s využitím hustotního gradientu Ficoll-Hypaque.....	23
3.2. Průtoková cytometrie a cytometrická analýza.....	24
3.3. Multiplexní sada protilátek.....	25
3.3.1. Schéma multiplexní sady protilátek .....	25
3.3.2. Příprava buněčných lyzátů .....	26
3.3.3. Předčištění buněčných lyzátů pomocí proteinu G.....	28
3.3.4. Měření koncentrace proteinů pomocí BCA sady .....	28
3.3.5. Biotinylace proteinů .....	29

3.3.6. Frakcionace proteinů na FPLC (fast protein liquid chromatography, ÄKTA, GE Healthcare Bio-Sciences) .....	30
3.3.7. Imunoprecipitace sady protilátek s frakcemi z FPLC, značení streptavidinem a měření na průtokovém cytometru .....	30
3.3.8. Analýza dat pomocí softwaru R-workspace.....	31
3.4. Inhibice buněk imatinib mesylátem .....	34
3.5. Měření apoptosy .....	35
3.6. Imunofenotypizace leukemických linií .....	36
3.7. Detekce transkripčního faktoru Ikaros u leukemických linií NALM-6 a SUP-B15 pomocí elektropřenosu na membránu (Western blot) .....	38
3.7.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) ...	38
3.7.2. Přenos proteinů na nitrocelulóзовé (NC) membrány (Western Blot).....	40
3.7.3. Imunodetekce a vyvolání signálů (zesílená chemiluminescence - ECL-enhanced chemiluminescence) .....	41
3.8. Detekce transkripčního faktoru Ikaros u leukemických linií NALM-6 a SUP-B15 pomocí SDS-PAGE, Western blotu a hmotnostní spektrometrie .....	41
3.8.1. Elektroforéza v prostředí SDS a Western blot .....	41
3.8.2. Obarvení gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 a odbarvení gelu .....	42
3.9. Materiál .....	42
3.9.1. Složení roztoky.....	42
3.9.2. Protilátky .....	44
3.9.3. Přehled použitých chemikálií a jejich výrobců .....	44
<b>4. Výsledky</b> .....	47
4.1. Optimalizace přípravy buněčných lyzátů pro multiplexní sadu protilátek.....	47
4.1.1. Rozdělení buněčného proteomu na 2 subcelulární frakce.....	47
4.1.2. Rozdělení proteomu na 4 subcelulární frakce s použitím detergentů Escin, Nonidet P-40 a Laurylmaltosid .....	52
4.2. Validace multiplexní sady protilátek.....	53
4.2.1. Porovnání imunofenotypu stanoveným průtokovou cytometrií (FC) a multiplexní sadou protilátek .....	54
4.2.2. Inhibice <i>BCR-ABL1</i> pozitivních buněk imatinib mesylátem (Glivecem) .....	59
4.3. Rozlišení typů leukemií pomocí multiplexní sady protilátek.....	64
4.4. Detekce proteinu Ikaros .....	66
<b>5. Diskuze</b> .....	69

<b>6. Závěr</b> .....	74
<b>7. Seznam použité literatury</b> .....	76

# 1. Úvod

## 1.1. Základní charakteristika dětských leukemií

Leukemie je nejčastější nádorové onemocnění u dětí, tvoří asi třetinu dětských nádorů.<sup>1</sup> Pojem leukemie pochází z řeckého „leukos haima“ (což v překladu znamená bílá krev) a označuje nádory krvetvorných neboli hematopoetických tkání. Hematopoetický systém u zdravého jedince je tvořen nediferenciovanými pluripotentními kmenovými buňkami v kostní dřeni, které proliferují, diferencují a zrají do dvou buněčných linií: myeloidní a lymfoidní. Myeloidní buňky diferencují a zrají do červených krvinek, monocytů, granulocytů a krevních destiček. Lymfoidní buňky diferencují a zrají do B-lymfocytů a T-lymfocytů. U leukemií je poškozena normální hematopoéza, leukemické buňky jsou zablokovány v určitém vývojovém stádiu a mohou se rozšířit do krve, lymfatických uzlin, sleziny, jater, centrálního nervového systému i do jiných orgánů.<sup>2</sup> Takové buňky jsou charakterizované, podobně jako jiné nádorové buňky, abnormální aktivací intracelulárních signálních drah, aberantní regulací buněčného cyklu a utlumením apoptosy.<sup>3</sup> Leukemie je heterogenní onemocnění, dělí se na mnoho typů a podtypů, jejichž klasifikace je založena na typu buněk, u kterých došlo ke zvratu na nádor, a na stupni jejich diferenciaci.<sup>1,2</sup> Základní rozdělení je podle průběhu onemocnění na akutní a chronické a podle typů krvetvorných buněk, ve kterých došlo k nádorovému zvratu, na lymfoblastické a myeloidní. Akutní leukemie, což je onemocnění, na které se v diplomové práci zaměřuji, je rychle postupující onemocnění, které postihuje především nezralé, nediferenciované buňky, které pak nejsou schopny plnit svoji funkci.<sup>2</sup> Chronická leukemie je pomaleji postupující onemocnění, které postihuje zralé a více diferenciované buňky, které jsou schopny plnit některé své funkce, u dětí však tvoří pouze cca 4% diagnostikovaných leukemií.<sup>1,2</sup> Akutní myeloidní (AML) a akutní lymfoblastické leukemie (ALL) se dělí dále na několik podtypů podle chromosomálních translokací (vznik fuzních genů), změn počtu chromosomů a bodových mutací a delecí.<sup>1</sup> Francouzsko-Americko-Britský (FAB) systém z roku 1976 rozděluje leukemie na základě mikroskopického obrazu: akutní myeloidní leukemie (AML), které zahrnují pouze 15-17% diagnos u bílé populace, na osm podtypů (M0-M7) a většinové akutní lymfoblastické leukemie (ALL) na tři podtypy (L1-L3) (viz Tabulka 1.1., str.2).<sup>1,4,5</sup>

Tabulka 1.1. Rozdělení akutních lymfoblastických leukemií (ALL) a akutních myeloidních leukemií (AML) podle buněk, u kterých došlo k malignímu zvratu podle systému FAB, převzato z Pui, 2006<sup>6</sup>

Podtyp ALL	Typ buněk	Podtyp AML	Typ buněk	Podtyp AML	Typ buněk
L1	Malé lymfoblasty, nejčastěji odvozené od B-prekurzorů	M0	Nezralé myeloblasty	M4	Myelomonocyty
L2	Větší lymfoblasty, nejčastěji T-lymfoblasty	M1	Nezralé myeloblasty	M5	Monocyty
L3	Velké lymfoblasty, obvykle zralé B-lymfocyty	M2	Zralé myeloblasty	M6	Erytrocyty
		M3	Promyelocyty	M7	Megakaryocyty

Dětské akutní leukemie se velmi liší od dospělých leukemií, dospělé leukemie mají výrazně horší prognózu. Tento jev je vysvětlován různě: (i) do vývoje léčebných protokolů a podpůrné péče se dětským pacientům věnuje výrazně více pozornosti než je tomu u dospělých pacientů, (ii) leukemie u dětí je obvykle diagnostikovaná v časném stádiu nemoci a léčba je tedy výrazně účinnější, (iii) děti se lépe vyrovnávají, pravděpodobně díky své lepší vitální regenerační kapacitě tkání, s toxickými vedlejšími účinky terapie.<sup>7</sup> Kromě toho jsou subtypy leukemií u dětí jiné než u dospělých (např. fuzní gen *TEL/AML1* se vyskytuje výhradně u dětí, *BCR-ABL1* naopak mnohem více u dospělých).<sup>8</sup>

V době diagnózy mohou mít děti s leukemií až  $10^{12}$  leukemických buněk v jednom mililitru krve (normální počet bílých krvinek je do  $10^7$ /ml krve).<sup>8</sup> Důležitým znakem pro predikci možného relapsu (t.j. návratu onemocnění) a určení optimální léčby je sledování tzv. minimální reziduální nemoci (MRN), která představuje počet maligních leukemických buněk, které jsou detekované v periferní krvi nebo v kostní dřeni v průběhu léčby nebo při remisi (t.j. ústupu onemocnění).<sup>9</sup> Označení MRN negativní znamená, že v kostní dřeni bylo detekováno méně leukemických buněk než je citlivost metody (obvykle méně než 0,01%). Negativní MRN naznačuje vysokou chemosenzitivitu leukemického klonu a je spojovaná s dobrou prognózou.<sup>10</sup> Stanovení MRN je velmi důležité pro pacienty s dobrou prognózou, kde je možné zmenšit expozici toxickým chemoterapeutickým látkám, stejně jako pro pacienty s horší prognózou, kde je stanovení MRN důležité pro načasování transplantace kostní dřeně.<sup>9,10</sup>

### 1.1.1. Genetické abnormality

Genetické abnormality dětských AL mohou být dvojího typu – numerické a strukturální.<sup>11</sup>

### 1.1.1.1. Numerické chromosomální abnormality

Numerické chromosomální abnormality zahrnují hyperdiploidii (více než 50 chromosomů na buňku), hypodiploidii (méně než 45 chromosomů na buňku) a ztrátu heterozygosity (LOH z angl. loss-of-heterozygosity). LOH může být dvojího typu – deleční a kopie-neutrální. Deleční LOH spočívá v jednoduché delecii jednoho chromosomu. Kopie-neutrální LOH vzniká delecí a následnou reduplikací nedeletovaného chromosomu (tzv. získaná uniparentální disomie).<sup>11</sup>

Hyperdiploidie působí jako pozitivní prognostický faktor, pravděpodobně proto, že zvyšuje senzitivitu leukemických buněk k DNA-cílené chemoterapii. Mezi pozitivní prognostické faktory patří např. trisomie chromosomů 4, 10, 17 nebo 18.<sup>12</sup>

### 1.1.1.2. Strukturální chromosomální abnormality

Strukturální abnormality dávají za vznik nepřírozeným (aberantním) genům, což následně vede k expresi změněných proteinů a nekontrolovatelné buněčné proliferaci. K tomuto jevu může dojít dvěma cestami:

- a) fúzí genů (spojením exonů dvou normálně odlišných genů)
- b) juxtapozicí buněčného onkogenu s promotorem genu specifickým pro určitý buněčný typ (B nebo T buněčný)<sup>13</sup>

Samotný vznik takovýchto genů a transkriptů nemusí nutně iniciovat vznik leukemie a může být pozorován již několik let před jejím vznikem. Např. frekvence detekovaného transkriptu *TEL-AML1* při narození je 100x vyšší než frekvence *ALL* s *TEL-AML1*. Na experimentálních modelech bylo dokázáno, že pro vznik leukemie je kromě vzniku aberantních transkriptů nutné i určité kooperativní poškození (například nespecifická sekundární mutageneze).<sup>11</sup>

## 1.1.2. Imunofenotypová identifikace leukemických buněk

Vyšetření povrchových i intracelulárních antigenů buněk krve a kostní dřeně pomocí průtokové cytometrie (imunofenotypizace) patří společně s morfoloogickým a cytochemickým vyšetřením mezi základní vyšetření při diagnóze leukemie.<sup>2</sup> K detekci jednotlivých povrchových a cytoplasmatických proteinů pomocí průtokové cytometrie se používají monoklonální protilátky konjugované s fluorescenčními značkami.<sup>14</sup>

Leukemické buňky jsou však charakterizovány kombinací povrchových a intracelulárních znaků, které jsou zčásti typické pro určité stádium vyvíjejícího se blastu a během zrání se

mění, ale navíc nesou znaky, jež jsou přítomné jen na buňkách maligně změněných (aberantní znaky) a tudíž se liší od zdravých buněk krve nebo kostní dřeně.<sup>5,15</sup> V některých případech jsou na leukemických blastech přítomny znaky nepříslušné blastu v odpovídajícím stádiu vývoje (asynchronní znaky). Imunofenotypizace umožňuje identifikaci leukemické buněčné linie (myeloidní nebo lymfoidní) a úroveň zralosti buněk.<sup>2</sup> Rozdělení leukemií podle imunofenotypu bylo stanoveno skupinou EGIL. Toto rozdělení se používá i v České republice v rámci BFM (Berlin – Frankfurt – Münster) léčebných protokolů.<sup>14,16</sup>

## 1.2. Akutní myeloidní leukemie (AML)

AML je charakterizována nekontrolovaným růstem myeloidních nediferenciovaných buněk (myeloblastů), což je způsobeno především zablokováním diferenciací dráhy myeloidních prekurzorů nebo časných progenitorů, a zahrnuje cca 20% akutních leukemií u dětí.<sup>2,12</sup> Molekulární mechanismus vedoucí k zablokování diferenciací je většinou neznámý, příkladem popsaného mechanismu může být typ AML-M3, který je způsoben translokací mezi chromosomy 15 a 17 (t(15;17)) a následnou tvorbou fuzního proteinu PML-RAR $\alpha$ .<sup>2</sup> Tento fuzní protein narušuje normální funkci PML (promyelocytární leukemický gen), která je nutná pro správný buněčný vývoj a indukcí apoptosy a interaguje s jadernými korepresory a s deacetylasami histonů, což vede k inhibici transkripce.<sup>17</sup>

Incidence této formy je 1/150000 během dětství, kdy se nemění, a dospívání, kdy dosahuje vrcholu.<sup>12</sup> U novorozenců je AML častější než ALL, narozdíl od ALL, AML postihuje stejně obě pohlaví.<sup>2</sup>

### **1.2.1. Genetické abnormality**

Cytogenetické vyšetření buněk krve a kostní dřeně patří mezi základní vyšetření při diagnóze leukemie a je velmi důležité pro určení odpovídající terapie a prognózy.<sup>12,13</sup> Genetické abnormality ovlivňují klíčové regulační procesy, mají vliv na kontrolu normální proliferace, vedou k zablokování diferenciací a ke vzniku rezistence na apoptotické signály. Některá genetická poškození mají pouze jeden efekt, jiná vykazují více efektů.<sup>18</sup> Narozdíl od CML, kde všechny případy začínají se stejnou chromosomální abnormalitou (*BCR-ABL1*), AML vykazuje řadu různých genetických aberací.<sup>3</sup> Mezi nejčastější abnormality patří t(8;21), t(15;17) inverze 16, translokace 11q23 a trisomie chromosomu 8.<sup>2,19</sup>

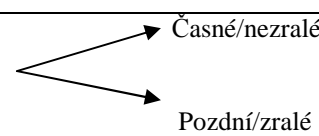
### 1.2.3. Imunofenotyp akutních myeloidních leukemií (AML)

AML je imunofenotypově definovaná expresí dvou nebo více uvedených myelomonocytárních znaků: MPO (myeloperoxidasa), CD13 (z angl. cluster of differentiation, což znamená diferenciací skupina), CD33, CD65 a CD117 (Tabulka 1.2.). Klasifikace podle fenotypu leukemických blastů zjištěného průtokovou cytometrií (tzv. EGIL - European Group for the Immunological Characterization of Leukemias - klasifikace) byla navržena tak, aby odpovídala systému FAB (Tabulka 1.3., str. 6).<sup>16</sup>

Tabulka 1.2. Přehled imunofenotypových znaků akutní myeloidní leukémie (AML)

Antigen	Znak čeho? / Funkce	Výskyt	Reference
MPO (myeloperoxidasa)	- znak myeloidních buněk	většina myeloidních buněk	20
CD13	- ektopeptidasa	myeloidní buňky	20, 21
CD14	- vazba lipopolysacharidů - interakce s toll-like receptory - indukce aktivace buněk, fagocytosy a sekrece zánětlivých cytokinů	obvykle monocyty	21
CD15	- vazba různých proteinů	neutrofilly	21
CD33	- adhezivní molekula v interakcích buňka-buňka	myeloidní buňky	20, 21
CD65	- vazba různých proteinů	neutrofilly	21
CD117	- receptor faktoru kmenových buněk - patří mezi imunoglobuliny	granulocyty, monocyty) a žírné buňky	20, 21,22

Tabulka 1.3. Přehled podtypů akutní myeloidní leukémie (AML) podle skupiny EGIL. Převzato z Bene et al, 1995<sup>16</sup>

Podtyp AML	Expresí antigenu
myelomonocytární	MPO
Erythroidní, M6 	Neklasifikovatelná imunologickými znaky glykoforin A
Megakaryocytární, M7	CD41 a nebo CD61 (cyto/mem)
Časná myeloidní, M0	Fenotyp stejný jako ostatní myelomonocytární AML, ale



	negativní cytochemie (fuzní geny) a lymfoidně specifické znaky: CD3, CD79a, CD22
TdT <sup>+</sup> AML	TdT
Ly <sup>+</sup> AML	

AML – akutní myeloidní leukemie Ly<sup>+</sup> AML - AML s expresí lymfoidních antigenů, MPO – myeloperoxidasa, cyto - cytoplasmatická exprese, mem - membránová exprese, TdT – terminální deoxynukleotidyl transferasa,

#### 1.2.4. Prognóza akutní myeloidní leukemie (AML)

Jako nejúspěšnější léčba AML se ukazuje transplantace kostní dřeně od histokompatibilního dárce. Mezi častější příčiny smrti po transplantaci patří spíše reakce štěpu proti hostiteli nebo rozptýlená intersticiální pneumonitida než relaps vlastní leukemie.<sup>2</sup> Speciální skupinu pacientů s AML tvoří pacienti s Downovým syndromem, který je považován za jednu z nejčastějších chromosomálních abnormalit v USA, tyto pacienti mají největší predispozici k vývoji akutní leukemie ze všech skupin pacientů, kteří nemají predispozici pro pevné nádory. Riziko vzniku akutní leukemie je u pacientů s Downovým syndromem 20krát vyšší než u zbytku populace a nejčastější forma je právě AML.<sup>23</sup>

#### 1.2.5. Příčiny akutní myeloidní leukémie (AML)

Dětská AML byla studována mnohem méně než ALL, přesto je známo více faktorů, které mohou zvýšit riziko vzniku AML.<sup>24</sup> Ve většině případů však není známá přímá příčina způsobující tuto formu onemocnění.<sup>12</sup> Mezi známé faktory zvyšující riziko AML patří expozice DNA alkylujícími chemoterapeutikům, benzenu, epipodophyllotoxinu, pesticidům a , ionizujícímu záření.<sup>10,24</sup> Přestože nebyl podán jasný důkaz, existují studie, které nastiňují spojitost mezi konzumací alkoholu matky v těhotenství a výskytem AML.<sup>24</sup> S výskytem AML je spojováno mnoho onemocnění např. Downův syndrom, výskyt monosomie 7 v rodině a příslušnost k Hispánské populaci.<sup>2,12</sup>

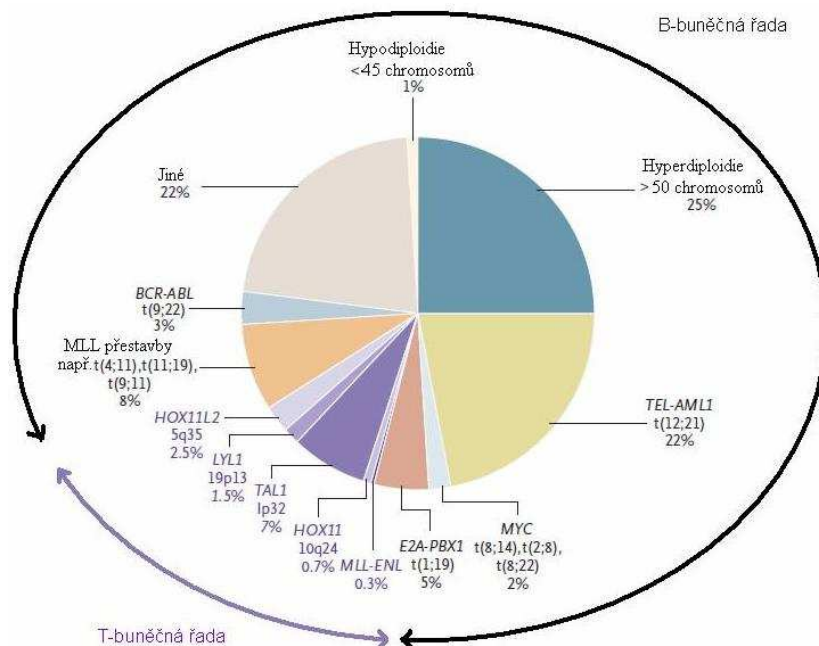
### 1.3. Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)

Nejčastější formou leukémie u dětí je ALL (postihuje kolem 80 % všech pacientů s leukemií).<sup>25</sup> Tato forma leukemie je charakterizována klonální proliferací a akumulací nezralých lymfoblastů v kostní dřeni a periferní krvi.<sup>26</sup> Může se jednat o T-lymfocyty (T-

ALL) i o B-lymfocyty (B-ALL).<sup>25</sup> Obě formy ALL se dále dělí podle EGIL, viz dále Tabulka 1.5. (str.11) a Tabulka 1.7. (str.12)

### 1.3.1. Genetické abnormality

Přibližně jedna čtvrtina dětských ALL nevykazuje žádné genetické abnormality a molekulární základ těchto případů je neznámý.<sup>11</sup> Následující seznam ilustruje příklady, kdy byla popsána asociace s genetickou abnormalitou.



Obr. 1.1. Výskyt chromosomálních abnormalit u B- a T-ALL, převzato z Pui et al, 2004<sup>18</sup> Abnormality vyskytující se pouze u T-ALL jsou označeny fialově. Abnormality, které se vyskytují převážně nebo výhradně u B-ALL jsou označeny černě.

#### Fuzní gen *TEL-AML1*

Translokace mezi chromosomy 12 a 21 (t(12;21)) vede ke vzniku fuzního genu *TEL-AML1*, což je nejčastější fuzní gen dětských B-prekurzorových ALL (BCP-ALL).<sup>17,18</sup> Oba proteiny (TEL i AML1) jsou důležité regulační faktory, které jsou odpovědné za formování a migraci hematopoetické progenitorové buňky do kostní dřeně.<sup>18</sup> Fuzní gen *TEL-AML1* je spojen s dobrou odpovědí na léčbu.<sup>10</sup> Leukemické lymfoblasty často exprimují antigeny asociované s myeloidní linií (CD13 a CD33).<sup>27</sup>

přestavby genu *MLL* (*mixed lineage leukemia*)

Translokace chromosomu 11q23 se objevují u cca 75% novorozeneckých leukemií a u cca 5% ALL u starších dětí. Označení „MLL přestavby“ zahrnuje vznik více jak 25 známých fuzních genů, např. *MLL-AF4*, *MLL-ENL* nebo *MLL-AF9*.<sup>17</sup> Leukemické buňky, které mají MLL přestavby, exprimují, podobně jako *TEL-AML1* pozitivní buňky, antigeny asociované s myeloidní linií – tedy CD15, CD33 a CD65. Předpokládá se, že *MLL* je účinný onkogen, který vyžaduje jen velmi málo kooperativních mutací, aby mohlo dojít k maligní transformaci buněk. Vzhledem k tomu, že MLL přestavby se často vyskytují u novorozenců a že u identických dvojčat byla objevena téměř 100% shoda v MLL přestavbách, dá se předpokládat, že k leukemogenezí dochází již *in utero* a metastase mohou procházet přes placentu od jednoho plodu k druhému.<sup>27</sup>

#### Fuzní gen *MLL-AF4*

Translokace t(4;11)(q21;q23) je nejčastější ze všech MLL přestaveb, vyskytuje se u cca 5% všech dětských ALL a u 70% novorozeneckých ALL.<sup>8</sup> Vede ke vzniku fuzního genu *MLL-AF4*, který je asociován většinou s BCP-ALL.<sup>8,17</sup> Vznik fuzního proteinu MLL-AF4 indikuje horší odpověď na léčbu.<sup>10</sup>

#### Fuzní gen *E2A-PBX1*

Translokace t(1;19)(q23;p13.3) vede ke vzniku chimerického fuzního genu *E2A-PBX1*, který se vyskytuje u 25% pre-B ALL (5% z BCP-ALL). Vznik tohoto fuzního proteinu má pravděpodobně za následek nepřiměřenou expresi v lymfoidních buňkách a pozměněnou transkripční aktivitu *PBX1*.<sup>17</sup> Vznik fuzního proteinu E2A-PBX1 indikuje dobrou odpověď na léčbu.<sup>10</sup>

#### Fuzní gen *BCR-ABL1*

V roce 1960 popsali P.C.Nowell a D.Hungerford translokaci chromosomu 9 a 22, která vede ke vzniku tzv. Filadelfského (Ph) chromosomu. Byl to první gen, u kterého bylo zjištěno, že přímo způsobuje rakovinu.<sup>12</sup> Ph chromosom vzniká u některých ALL a CML a je způsoben translokací (9;22)(q34;q11).<sup>28</sup> Část chromosomu 9 se spojí s chromosomem 22 za vzniku chromosomu *der22* (= Ph chromosom), zatímco zbytek chromosomu 22 se spojí s chromosomem 9 za vzniku chromosomu *der9*.<sup>29</sup> Ph chromosom, který je méně obvyklý u dětských (3-5%) než u dospělých ALL (25%), následně kóduje aberantně exprimovanou tyrosinovou kinasu BCR-ABL1 (BCR = breakpoint cluster region).<sup>17,28,30</sup> 5' konec *bcr* úseku DNA na chromosomu 22q11 je spojen s *c-Abl* sekvencí na chromosomu 9q34 za vzniku chimerického transkriptu.<sup>17</sup> Na chromosomu 22 se nachází lokus genu *bcr*, u něhož může dojít

ke zlomu dvěma způsoby: majoritní *M-bcr* mezi exony 12 a 16 a minoritní *m-bcr* v prvním intronu *bcr*. Zlom na chromosomu 9 se nachází pouze v intronu 1 lokusu genu *abl*.<sup>29</sup> Pokud dojde ke zlomu *M-bcr*, vzniká protein o velikosti 210kDa (p210), který je charakteristický pro CML a některé ALL u dospělých pacientů.<sup>17,29</sup> Zlomem *m-bcr* vzniká protein o velikosti 190kDa (p190), u některých buněčných linií vzniká protein o velikosti 185kDa (p185), oba tyto proteiny se výjimečně nachází u CML, jsou však charakteristické pro ALL.<sup>29</sup> Všechny tři aberantně exprimované proteiny mají zvýšenou tyrosin-kinasovou aktivitu v porovnání k samotné ABL1 a transformují hematopoetické prekurzory *in vitro*, p185 má však vyšší transformující kapacitu.<sup>8,17</sup> Ve zdravých buňkách je aktivita ABL1 kinasy regulovaná v závislosti na růstových faktorech a jiných stimulech. Spojením s BCR se ABL1 stává konstitučně aktivní, aktivuje intracelulární signální dráhy např. Ras/MAPK, Jak/Stat a PI-3 kinasovou dráhu. Inhibice konstitučně aktivní ABL specifickými kinasovými inhibitory jako je imatinib, nilotinib a dasatinib vede k zastavení onkogenního potenciálu BCR-ABL1. Méně známý a prozkoumaný je vznik recipročního fuzního proteinu ABL1-BCR, který je kódován chromosomem *der9*. Opět mohou vzniknout 2 proteiny o různé velikosti, p40 a p96. p40 byl detekovaný v 65% pacientů s CML, p96 byl detekovaný ve 100% vyšetřovaných pacientů s *m-bcr* ALL. Zatímco při vzniku BCR-ABL1 dochází ke změně v aktivitě ABL, při vzniku ABL1-BCR dochází ke změně aktivity BCR. BCR je negativní regulátor proliferace a onkogenní transformace. ABL1-BCR je schopný, stejně jako BCR-ABL1, vyvolat leukemický fenotyp *in vitro*.<sup>29</sup>

V porovnání se zdravými buňkami kostní dřeně exprimují *BCR-ABL1* pozitivní leukemické buňky méně B-lymfoidních (*IKZF1*, *E2A*, *IL7R $\alpha$* , *RAG1*, *RAG2* a *TdT*) a více myeloidních (např. *MLF1*, *AML1*, *CD4*, *CD11A* atd.) specifických znaků.<sup>31</sup> Vznik fuzního proteinu BCR-ABL1 indikuje horší odpověď na léčbu a je spojován se vznikem pre-B ALL.<sup>10,17</sup> Data z myšího modelu ukazují, že samotná exprese *BCR-ABL1* v hematopoetických kmenových buňkách indukuje myeloproliferativní onemocnění podobné CML. Ke vzniku vlastní leukemie je ovšem zapotřebí i jiné onkogenní změny.<sup>28</sup> V současné době se mnoho skupin zabývá otázkou, které další onkogenní změny se mohou vyskytovat u Ph pozitivních ALL. Byly objeveny časté mutace genů kódujících transkripční regulátory vývoje B lymfocytů, jako jsou *PAX5*, *EBF1* nebo *IKZF1*.<sup>32</sup> Právě delece posledního zmíněného genu *IKZF1* se vyskytují u více než 80% Ph pozitivních ALL.<sup>28</sup> Proto se ve své diplomové práci zabývám mimo jiné i expresí transkripčního faktoru Ikaros, který je kódován genem *IKZF1*, v leukemických liniích.

### 1.3.2. Imunofenotyp akutních lymfoblastických leukemií (ALL)

Imunofenotyp ALL velmi podobá fenotypu normálních lymfoidních progenitorů.<sup>33</sup>

#### 1.3.2.1. Imunofenotyp T-lymfoblastických akutních leukemií (T-ALL)

T-ALL sestává z nezralých T-lymfocytů, které se ve zdravém organismu vyskytují pouze v thymu.<sup>33</sup> Prekurzory T-lymfocytů jako jediné dozrávají v thymu, prekurzory ostatních krevních buněk dozrávají v kostní dřeni.<sup>14</sup> Identifikace leukemických T-lymfocytů spočívá tedy v identifikaci nezralých T-lymfocytů v kostní dřeni nebo periferní krvi. Nejčastěji aplikovaná kombinace antigenů pro identifikaci leukemických T-lymfocytů je koexprese CD3 a TdT (terminální deoxynukleotidyl transferasa) nebo CD5 a TdT (funkce jednotlivých antigenů viz Tabulka 1.4., str.11).<sup>33</sup> Podle klasifikace EGIL je T-ALL definovaná expresí CD3 v cytoplasmě nebo v membráně (viz Tabulka 1.5., str.11).<sup>16</sup>

Tabulka 1.4 Přehled imunofenotypových znaků T-lymfoblastických akutních leukemií (T-ALL)

Antigen	Znak čeho? / Funkce	Výskyt	Reference
CD2	- znak zralejších T-lymfocytů	T-lymfocyty, myelocyty	<sup>20</sup>
CD3	- nejčasnější diferenciační znak T-lymfocytů - pohyb T-buněčného receptoru na povrch zralého T-lymfocytu	T-lymfocyty	<sup>20</sup>
CD5	- znak časně diferenciací T-lymfocytů	T-lymfocyty	<sup>20</sup>
CD7	- znak zralejších T-lymfocytů	T-lymfocyty, myelocyty	<sup>20</sup>

Tabulka 1.5. Přehled podtypů T-lymfoblastických akutních leukemií (T-ALL) podle skupiny EGIL. Převzato z Bene et al, 1995 <sup>16</sup>

Podtyp T-ALL	Vývojové stádium leukemických buněk	Expresí antigenu
--------------	-------------------------------------	------------------

Všechny T-ALL	Cyto/mem CD3	
I	Pro-T-lymfocyty	CD7
II	Pre-T-lymfocyty	CD2 a/nebo CD5 a/nebo CD8
III	Kortikální T-lymfocyty	CD1a
IV	Zralé -T-lymfocyty	Mem CD3
a	$\alpha/\beta$ -T-lymfocyty	Anti-TCR $\alpha/\beta$
b	$\gamma/\delta$ -T-lymfocyty	Anti-TCR $\gamma/\delta$

cyto - cytoplasmatická exprese, mem - membránová exprese, TCR - T-buněčný receptor

### 1.3.2.2. Imunofenotyp B-prekursorových akutních leukemií (BCP-ALL)

Nejčastějšími formami leukemických B-lymfocytů jsou B-lymfocytární progenitory (B-cell progenitor, BCP), které se ve zdravém organismu vyskytují v kostní dřeni. Takové nemaligní progenitory se hojně vyskytují ve vzorcích kostní dřene malých dětí, nebo v kostní dřeni, která aktivně proliferuje po chemoterapii nebo transplantaci a mohou se vyskytovat v malých množstvích i v periferní krvi.<sup>33</sup> Imunofenotyp BCP-ALL připomíná imunofenotyp nemaligních BCP.<sup>14</sup> Identifikace leukemických B-lymfocytů je tedy výrazně složitější oproti identifikaci T-lymfocytů, opírá se zejména o molekuly, u kterých selhává regulace, popř. aberantní expresi během leukemogeneze. Aberantním znakem bývá například molekula CD66c, která je exprimována u jedné třetiny BCP-ALL.<sup>33,34</sup> Dalšími znaky umožňujícími identifikaci BCP-ALL jsou CD45RA, CD11a, CD44, koexprese CD21, CD19 a CD34, vyšší exprese CD19, CD10, CD34 a nižší exprese CD45 a CD38 (viz Tabulka 1.6.). V diagnostických laboratořích se používá více tzv. panelů kombinujících uvedené i další antigeny pro diagnostiku B-ALL. Při monitorování MRN je nutné změřit více těchto kombinací, protože imunofenotyp leukemických buněk se může změnit během léčby a při postupu nemoci.<sup>33</sup> Skupina EGIL definuje příslušnost k B-ALL expresí minimálně dvou z těchto tří časných B-buněčných znaků: CD19, CD79a nebo CD22 (viz Tabulka 1.7., str. 12).<sup>16</sup>

Tabulka 1.6. Přehled imunofenotypových znaků B-lymfoblastických akutních leukemií (B-ALL)

Antigen	Znak čeho? / Funkce	Výskyt	Reference
HLA DR	- znak kmenových buněk - HLA antigen II. třídy	B-lymfocyty, myeloidní buňky, aktivované T-lymfocyty	20
IgM těžký řetězec	- cytoplasmatická vs membránová	B-lymfocyty	14

	exprese důležitým kritériem pro zařazení BCP-ALL		
TdT (terminální deoxynukleotidyl transferasa)	- oprava DNA	BCP, prekurzory T-lymfocytů, některé myeloidní buňky	14,20
CD10	- znak nezralých B-lymfocytů	B-lymfocyty, některé T-lymfocyty	14,20
CD19	- časný diferenciační znak B-lymfocytů	B-lymfocyty, některé myeloidní buňky	14,20
CD20	- aktivace a proliferace B-lymfocytů	B-lymfocyty	14
CD22	- časný diferenciační znak B-lymfocytů	B-lymfocyty, některé basofily, dendritické a žírné buňky	14,20
CD34	- znak nezralosti	Kmenové buňky (B-, T-lymfocyty, myeloidní buňky)	14,20
CD58	- interakce buňka-buňka	B-lymfocyty, T-lymfocyty	14
CD79 $\alpha$	- časný diferenciační znak B-lymfocytů - pohyb B-buněčného receptoru na povrch B-lymfocytu	B-lymfocyty, někdy T-lymfocyty	14,20

Tabulka 1.7. Přehled podtypů B-lymfoblastických akutních leukemií (B-ALL) podle skupiny EGIL. Převzato z Bene et al, 1995 <sup>16</sup>

Podtyp B-ALL	Vývojové stádium leukemických buněk	Exprese antigenu
Všechny B-ALL	Exprese min. dvou z těchto antigenů: CD19, CD79a a CD22	
I	pro-B-lymfocyty	X
II	common B-lymfocyty	CD10
III	pre-B-lymfocyty	Cyto IgM
IV	zralé B-lymfocyty	Cyto nebo mem kappa nebo lambda

cyto.... cytoplasmatická exprese, mem.... membránová exprese, x... žádný další antigen

### 1.3.3. Prognóza akutních lymfoblastických leukemií (ALL)

Za posledních 60 let se výrazně zvýšila úspěšnost léčby dětí s ALL. V 50. letech byly děti s leukemií prakticky odsouzeny k smrti.<sup>25</sup> Na počátku tohoto tisíciletí dosáhne remise (t.j. ústupu nemoci) kolem 90% pacientů.<sup>35</sup> Úplného vyléčení dosáhne více než 80% pacientů.<sup>11</sup> Intenzita léčby by měla být úměrná riziku relapsu a proto je pro úspěšnou léčbu nutné správně

zařazení pacienta do léčebné skupiny.<sup>33,35</sup> V České republice jsou děti s ALL léčeny podle mezinárodního léčebného protokolu BFM. Podle tohoto protokolu jsou pacienti stratifikováni do 3 skupin (low-risk, intermediate, high-risk) podle rizika vzniku relapsu. Pravděpodobnost přežití pacienta bez jakékoli události (např. relaps, smrt, druhá leukemie atd.) je asi 72% a pravděpodobnost celkového přežití 80%.<sup>36</sup> Ve více studiích za posledních 15 let bylo dokázáno, že přítomnost nebo absence genetických abnormalit má přímý efekt na prognózu pacienta.<sup>12</sup> Některé abnormality jsou spojovány s dobrou, jiné naopak s horší prognózou.<sup>10</sup> V současné době se mnoho skupin zabývá hledáním nových prognostických znaků – ať už na úrovni expresního profilování DNA či RNA nebo na úrovni proteinové. Bylo nalezeno více než 50 znaků B-ALL, jejichž mutace ovlivňuje vývoj B-lymfoidní řady a leukemogenesi. Mezi ně patří např. regulátory lymfoidního vývoje (*PAX5*, *IKZF1* a *EBF1*), transkripční faktory (*TEL*, *ERG*), lymfoidní signální molekuly (*BTLA*, *CD200*, *BLNK*, *VPREB1*), regulátory buněčného cyklu a tumor supresorové geny (*CDK2NA/CDKN2B*, *ATM*, *RBI*, *PTEN*) atd. Obvykle se jedná o mutaci pouze jedné alely.<sup>37</sup>

### 1.3.4. Nové potenciálně prognostické znaky

#### 1.3.4.1. *Pax5*

*Pax5* je jedním z nejčastěji modifikovaných genů u BCP-ALL. Byly objeveny delecce, intragenní amplifikace, mnohočetné translokace a mutace sekvence, které ovlivňují klíčové části DNA vazebné i transkripčně-regulační domény proteinu Pax5. Mnohé studie naznačují, že modifikace *Pax5* hraje důležitou roli v samotné leukemogenesi. Avšak v odpovědi na léčbu se zdá, že mutace *Pax5* nehraje významnou roli.

#### 1.3.4.2. *CRLF2*

Mutace genu *CRLF2* se vyskytují až u 7% B-ALL. Tento gen kóduje faktor 2 podobný cytokinovému receptoru (*CRLF2* z angl. cytokine receptor like factor 2), který vytváří heterodimer s receptorem  $\alpha$  interleukinu 7.<sup>37</sup> Přestavby genu *CRLF2* jsou spojovány především s Hispánskou populací a mohou vést ke zvýšené expresi nebo naopak delecii *CRLF2*.<sup>38,39</sup> Zvýšená exprese *CRLF2* je pozorovaná s různou frekvencí u B-ALL v závislosti na podtypu. Nebyla zatím nalezena u jiných lymfoidních malignit.<sup>39</sup>

#### 1.3.4.3. *IKZF1* (Ikaros Zinc finger-1)



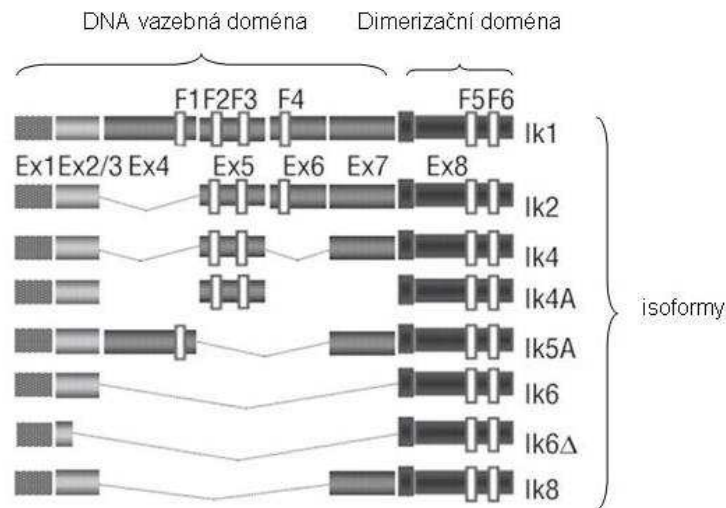
Pro imunitní systém je velmi důležitá přítomnost rodiny transkripčních faktorů Ikaros, které jsou produktem genů *IKZF*.<sup>40</sup> Modifikace genu *IKZF1* je asociovaná s velmi špatnou prognózou Ph pozitivních a dokonce i Ph negativních dětských BCP-ALL.<sup>37</sup> Přibližně 25% BCP-ALL má delece nebo sekvenční mutace genu *IKZF1*, které vedou k aberantní expresi různých isoformů proteinu Ikaros (např. IK6), které sice obsahují dimerizační doménu, ale postrádají zinkové prsty, které umožňují vazbu na DNA (obr. 1.2., str. 16).<sup>41</sup> Exprese takových isoformů proteinu Ikaros, které stále mohou dimerizovat s ostatními členy rodiny Ikaros, ale na DNA se již vázat nemohou, má dramatičtější vliv na vývoj hematopoetických buněk než kompletní delece *IKZF1*.<sup>35</sup> Ikaros je exprimovaný v hematopoetických kmenových buňkách, ve všech lymfoidních a v některých myeloidních buňkách a je důležitý v mnoha vývojových procesech během hematopoézy.<sup>35,43</sup>

Ikaros se váže k DNA v podobě homo- nebo heterodimeru.<sup>43</sup> Ikaros zastavuje buněčný cyklus a tím zabraňuje dělení a proliferaci buněk, které následně mohou diferencovat.<sup>41</sup> Strukturně podobné proteiny rodiny Ikaros (Ikaros, Aiolos, Hélios) ovlivňují, regulací BCR, resp. TCR, diferenciaci B-lymfocytů do folikulárních buněk marginální zóny a diferenciaci T-lymfocytů z CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dvojitě pozitivních buněk do CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> buněk.<sup>35,44</sup> Zatím je známo pouze malé množství genů, které Ikaros přímo reguluje.<sup>35</sup> Mezi možné mechanismy regulace patří kompetice s aktivátory transkripce, aktivace modifikátorů chromatinu a prostorová kompartmentace v rámci jádra.<sup>35</sup>

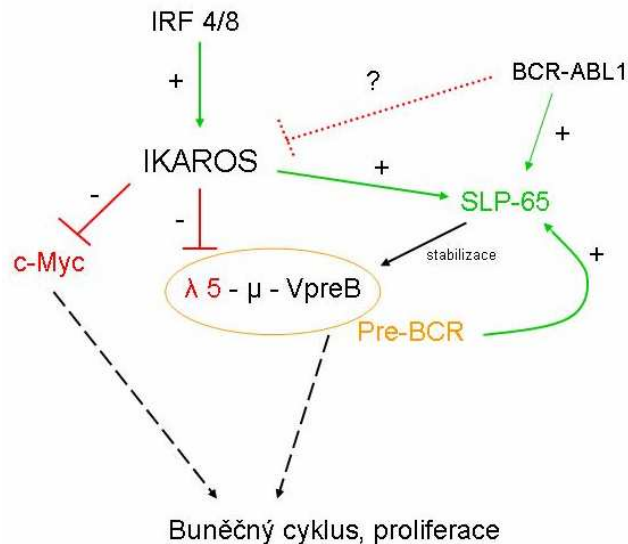
#### *Ikaros v prekurzorech B-lymfocytů*

Signalizace přes pre-B buněčný receptor (pre-BCR) potlačuje proliferaci Ph pozitivních BCP-ALL buněk díky zvýšení aktivity proteinu Ikaros a následného zastavení buněčného cyklu (viz Obr. 1.3., str.16). Pre-BCR se skládá s těžkého řetězce imunoglobulinu IgM ( $\mu$  řetězec), který je spojen s náhradními lehkými řetězci složenými z proteinů VpreB a  $\lambda 5$ . Aby byl exprimován funkční  $\mu$  řetězec, který je spojen s transmembránovými signálními řetězci Ig $\alpha$  a Ig $\beta$ , musí dojít k přestavbě genů pro imunoglobuliny  $V_H$  a  $DJ_H$ . Tyto komponenty stabilizuje protein SLP65 (název SLP65 pochází z angl. SH2-domain-containing leukocyte protein of 65kDa, tedy protein o velikosti 65kDa, který obsahuje SH2 doménu a vyskytuje se u leukocytů), jehož absence způsobuje zastavení vývoje na úrovni pre-B lymfocytů. Aktivace SLP65 (fosforylace na Y96) může být spuštěna signalizací přes pre-BCR nebo kinasou BCR-ABL1.<sup>41</sup> SLP65 může být aktivován i proteinem Ikaros, mechanismus aktivace však dosud není známý.<sup>35</sup> Ve všech případech SLP65 inhibuje STAT5-JAK3 signální dráhu a zastavuje buněčný cyklus.<sup>41</sup> Ikaros a Aiolos (vážící se ke stejné sekvenci DNA jako Ikaros),

přímo tlumí expresi genu  $\lambda 5$ , což vede ke snížení exprese pre-BCR. Exprese pre-BCR spouští a reguluje proliferaci, která je závislá na regulátorech buněčného cyklu – na cyklinu D3 a c-Myc. Bylo dokázáno, že se Ikaros a Aiolos přímo váží k promotoru c-Myc a tím inhibují jeho expresi, což je klíčový krok pro inhibici buněčného cyklu (pro indukci p27 a snížení exprese cyklinu D3). Exprese proteinu c-Myc je asociována s pre-B lymfocyty, u kterých aktivně probíhá buněčný cyklus, zatímco snížení jeho exprese se vyskytuje u klidových pre-B lymfocytů. Dalšími klíčovými hráči vývoje B-lymfocytů jsou regulační faktory interferonu 4 a 8 (IRF4 a IRF8). IRF4 a IRF8 jsou transkripční faktory specifické pro imunitní systém, které jsou nutné pro správný vývoj a funkci B-lymfocytů, T-lymfocytů i myeloidních buněk.<sup>40</sup> IRF4 a IRF8 indukují expresi proteinů Ikaros a Aiolos čímž negativně regulují proliferaci pre-B lymfocytů, a zprostředkují signál mezi SLP65 a proteinem Aiolos.<sup>35,40</sup>



Obr. 1.2. Jednotlivé isoformy proteinu Ikaros. Převzato z Iacobucci et al, 2008<sup>45</sup> Vlevo DNA vazebná doména skládající se u dlouhé isoformy (Ik1) ze čtyř zinkových prstů (F1-F4), které mohou chybět u kratších isofořem (Ik2-Ik8). Vpravo dimerizační doména vyskytující se v nezměněné podobě u všech uvedených isofořem proteinu Ikaros. Isoforma Ik1 je tvořena osmi exony (Ex1 – Ex8)



Obr. 1.3. Schéma signalizace proteinu Ikaros v prekurzorech B-lymfocytů. Vytvořeno podle publikací <sup>31,35,40,41</sup>. Dráhy aktivace zeleně (+), dráhy inhibice červeně (-). Dráha označená červenou tečkovanou linií s otazníkem byla nalezena pouze v jedné studii <sup>31</sup>, zatím však nebyla potvrzena. Přerušovanou linií naznačena dráha, která je inhibicí zastavena. IRF4/8 = regulační faktory interferonu 4 popř. interferonu 8, pre-BCR = pre B-buněčný receptor, SLP-65 = protein o velikosti 65kDa, který obsahuje SH2 doménu a vyskytuje se u leukocytů, BCR-ABL1 = aberantně exprimovaná kinasa, λ5, μ a VpreB = komponenty pre-BCR

### 1.3.5. Příčiny akutních lymfoblastických leukemií (ALL)

Příčiny dětských leukemií nejsou stále přesně známy. Mezi známé faktory patří ionizující záření (*in utero* nebo v postnatálním období) a s ním související genetické alterace, ale tyto faktory jsou odpovědné pouze za 5-10% dětských nádorů. Výskyt dětských ALL je obecně spojován s vyšším socioekonomickým statutem. Nejvyšší výskyt ALL, o 20 až 30 % vyšší než ve vyspělých zemích (mezi které se řadí i ČR), se nachází např. v Costa Rice. Byl zaznamenán vzrůst výskytu ALL, který probíhal současně s růstem ekonomiky.<sup>24</sup> V ČR se zvýšila incidence ALL během 80. a 90.let u dětí mezi jedním a čtyřmi roky 1,5krát, tento vzrůst byl markantní především u dívek.<sup>46</sup> Mnohé studie se zabývaly různými druhy patogenních organismů a virů (varicella, H. influenza, Epstein-Barr virus) jako možnými faktory napomáhající vzniku ALL, ale žádná spojitost zde nebyla nalezena.<sup>24</sup> Naproti tomu existuje teorie, že ALL vzniká díky nadměrné odpovědi imunitního systému na běžnou infekci. Tato teorie předpokládá, že díky stále se zvyšující úrovni osobní hygieny a odklonu

od krmení novorozenců mateřským mlékem snižuje vystavení novorozenců běžným infekcím v raném věku a jejich imunitní systém tedy není modulován v daném čase. Nemodulovaný imunitní systém jedince, který může mít určité genetické predispozice nebo náchylnost, může přehnaně reagovat na běžnou infekci a tím zvýší riziko pro vznik leukemie.<sup>47</sup> Obecné faktory spojované s vyšším výskytem ALL jsou: mužské pohlaví, věk mezi dvěma a pěti lety, vysoký socioekonomický status, příslušnost k „bílé populaci“, expozice X paprskům *in utero*, postnatální terapeutická radiace a Downův syndrom.<sup>2</sup>

#### 1.4. Proteomické profilování buněk akutních leukemií

V posledních letech se stále více přistupuje k proteomické analýze diagnostických vzorků akutních leukemií, protože pouze analýza buněčného proteomu je schopna reflektovat skutečný fyziologický stav buněk.<sup>48</sup> Úroveň mRNA nemusí vždy korelovat s úrovní exprimovaných proteinů a různě exprimované geny nemusí být vždy zahrnuty v patogenezi onemocnění. Navíc expresní profilování na úrovni DNA či mRNA nedokáže postihnout posttranslační modifikace a aktivace proteinů.<sup>3</sup> Proteomika porovnává úroveň exprese proteinů i stav aktivace, což může pomoci vyvinout cílenou terapii pacientů s rakovinou. Pro vlastní realizaci tohoto přístupu je však zapotřebí nových, vysoce výkonných technologií, které budou schopny analyzovat a následně i interpretovat velké soubory proteinů u patientských vzorků.<sup>49</sup> Dnes se v diagnostických laboratořích hojně využívají 2 techniky analýzy proteinů pomocí tzv. „microarrays“: planární „microarray“ a „array“ na mikrokuličkách (tzv. bead-based arrays). Planární „mikroarray“ jsou výborné pro sledování velkého množství cílových proteinů, ale tato aplikace je limitovaná nízkou rychlostí a nízkým počtem měřených vzorků.<sup>48</sup> Kornblau a kol. však vyvinuli novou metodu planární „microarray“, tzv. „Reverse Phase Protein Microarray“, kterou jsou schopni rychle analyzovat velké množství proteinů u velkého množství primárních vzorků. Identifikovali takto 50 proteinů a jejich fosforylovaných forem, které jsou asociované s buněčným cyklem a apoptosou u AML.<sup>3</sup> Velmi zajímavou alternativou se jeví analýza proteinů pomocí mikročástic, obzvláště v případech, kdy stanovujeme menší množství proteinů.<sup>48</sup> Tato metoda má své kořeny v 70. letech minulého století, kdy bylo objeveno, že mikročástice, na které je navázán antigen, může sloužit jako pevná podpora při vychytávání protilátek z krve. Současně lze detekovat více analytů, pokud jsou použity mikročástice o různých velikostech, které jsou od sebe odlišitelné podle rozptylu světla. V 80. a 90. letech se tato aplikace rozšířila na

mikročástice s navázanými protilátkami, DNA a lipidy.<sup>50</sup> Nejčastěji se používají opticky kódované kuličky - fluorescenční, infra-červené, nebo světlo rozptylující kuličky. Na takové kuličky lze kovalentně navázat proteiny, např. protilátky, způsoby této vazby mohou být různé. Častým přístupem je tzv. „sandwichové“ uspořádání, kde se na kuličku váže monoklonální protilátka proti cílovému proteinu a po přidání analyzovaného vzorku se do směsi přidává detekční protilátka proti jinému epitopu stejného detekovaného antigenu.<sup>48</sup> Takto např. Weerkamp a kol. stanovovali expresi proteinu BCR-ABL1 v Ph pozitivních ALL a CML.<sup>51</sup> Detekční protilátka je obvykle biotinylovaná a detekce probíhá pomocí streptavidinu, který je konjugovaný s fluorescenčním phycoerythrinem (PE).<sup>48</sup> Současné protilátkové sady (komerčně dostupné od firem Luminex, Illumina, BenderMedSystems, BD Biosciences,...) jsou schopny detekovat max. 100 různých antigenů (cytokinů, hormonů, signalizačních molekul, znaků malignity,...), kdy početní limitace je dána především nutností vývoje párů detekčních protilátek. Protilátkové technologie samozřejmě nejsou vhodné pro odhalování nových molekul, protože je vždy potřeba specifické protilátky proti zkoumanému antigenu.<sup>52</sup> K odhalování nových molekul je vhodné použít jinou metodu, např. hmotnostní spektrometrii. Hofmann a kol. takto identifikovali více jak 300 nových povrchových molekul na AML buněčných liniích.<sup>52</sup> Přesto se, díky velkému rozšíření průtokové cytometrie v diagnostických laboratořích, protilátkové „bead-based arrays“ – tedy sady protilátek kotvených na kuličkách - zdají být slibnou technologií pro komplexnější stanovení imunofenotypu leukemických buněk. V laboratoři dr. Lund-Johansena vyvinuli novou cytometrickou sadu protilátek, kterou jsou schopni detekovat až 1728 různých proteinů v jednom vzorku směsi buněk (např. periferní krve, kostní dřeň) bez nutnosti používat páry detekčních protilátek (viz kapitola 3.3. Multiplexní sada protilátek). Jedním z cílů předkládané diplomové práce bylo validovat tuto sadu protilátek v imunofenotypizaci buněk dětských akutních leukemií a porovnat tuto metodu s klasickým v klinické praxi standardně užívaným stanovením imunofenotypu průtokovou cytometrií.

## 2. Cíl práce

Cíle diplomové práce byly:

- 1) Optimalizovat protokol přípravy buněčných lyzátů pro multiplexní sadu protilátek
- 2) Validovat zvolenou multiplexní sadu protilátek na 11-ti buněčných liniích  
→ Porovnáním standardní imunofenotypizace s multiplexní sadou protilátek
- 3) Stanovit proteinový profil použitím 1152 protilátek  
→ Validace metody na 4 buněčných liniích po a bez přidání léčiva imatinib mesylátu (Glivec)  
→ Proteinový profil primárních leukemických vzorků odebraných při diagnóze onemocnění
- 4) Detekovat protein Ikaros klasickými proteomickými metodami

## **3. Materiál a metody**

### **3.1. Zpracování buněk**

Uvedené postupy této podkapitoly, kromě centrifugování a zahřívání ve vodní lázni, je potřeba provádět ve sterilním mikrobiologickém boxu, aby nedošlo ke kontaminaci buněk mikroorganismy z prostředí.

#### **3.1.1. Buněčné kultury**

B-ALL linie:

- NALM-6 (chromosomální translokace *TEL-PDGFRB*)
- REH (chromosomální translokace *TEL-AML1*)
- NALM-24 (chromosomální translokace *BCR-ABL1*)
- SUP-B15 (chromosomální translokace *BCR-ABL1*)
- TOM-1 (chromosomální translokace *BCR-ABL1*)
- RS4,11 (chromosomální translokace *MLL-AF4*)

T-ALL linie:

- Jurkat
- CEM

AML linie:

- NB-4 (chromosomální translokace *PML-RAR $\alpha$* )
- MV4,11 (chromosomální translokace *MLL-AF4*)
- Kasumi-1 (chromosomální translokace *AML1-ETO*)

CML linie:

- K562 (chromosomální translokace *BCR-ABL1*),
- BV-173 (CML v blastické krizi B-ALL, chromosomální translokace *BCR-ABL1*)

Linie NALM-24 pochází z Fujisaki Cell Center (Japonsko), ostatní linie jsme získali z German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ, SRN).

### **3.1.2. Kultivace buněk**

Buňky kultivujeme v 12ml média v kultivačních lahvích (TPP, Švýcarsko) v inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

#### **3.1.2.1. Příprava média pro buněčné kultury**

Kultivační médium mícháme v následujícím poměru:

500ml RPMI-1640 s L-Glutaminem a 25mM HEPES

5ml směsi penicilinu (konečná koncentrace 100 µg/ml) a streptomycinu (konečná koncentrace 100µg/ml)

50ml inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS,)

#### **3.1.2.2. Inaktivace fetálního hovězího séra ( FBS)**

Zásobní FBS nejprve rozpustíme ve vodní lázni (37°C), inaktivujeme při 56°C po dobu 30min, rozdělíme po 50ml a skladujeme v mrazáku při teplotě -20°C.

#### **3.1.2.3. Rozmražení buněk**

Buňky rozmrazíme ve vodní lázni (37°C), smísíme s 10ml média, centrifugujeme (243g, 5min, 25°C, centrifuga Universal 320R, rotor 1619, Hettich, SRN), supernatant odstraníme, sediment resuspendujeme ve 12ml média a přemístíme do kultivačních lahví o objemu 75ml (TPP).



#### 3.1.2.4. Pasážování buněk

Během kultivace je potřeba dodat čerstvé médium a odstranit použité médium s mrtvými buňkami. Tomuto procesu se říká pasážování a mělo by být prováděno přibližně 2x týdně. Buňky centrifugujeme (243g, 5min, 25°C), vzniklý sediment resuspendujeme ve 12ml média a buňky umístíme zpět do inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### 3.1.2.5. Skladování buněk

Sediment, tvořený přibližně počtem 10 milionů buněk, resuspendujeme v 1ml čerstvě připraveného 10% dimethylsulfoxidu (DMSO) v inaktivovaném FBS mediu. Vzhledem k toxicitě DMSO přemístíme zamrazovací zkumavky ihned na led. Poté je vložíme v nádobě Mr. Frosty (Wessington Cryogenics, Velká Británie) do teploty -80°C a po 24h zkumavky přemístíme do boxů s tekutým dusíkem pro dlouhodobé skladování.

### **3.1.3. Izolace lymfocytů ze vzorku periferní krve (PK), kostní dřeně (KD) nebo krevního preparátu („buffy coat“, BC) pomocí centrifugace s využitím hustotního gradientu Ficoll-Hypaque**

V naší laboratoři izolujeme lymfocyty z PK, KD nebo BC dvěma způsoby. Při prvním způsobu izolujeme ze vzorku všechny druhy lymfocytů a monocytů. Při druhém způsobu, s využitím sady RossetteSep, můžeme izolovat pouze CD19 pozitivní B-lymfocyty nebo CD3 pozitivní T-lymfocyty. Ficoll-Hypaque je cukerný roztok, který odděluje jednotlivé složky krve na základě jejich hustoty v sestupném pořadí v centrifugační zkumavce: (i) plasma, (ii) prstenec lymfocytů a monocytů, (iii) roztok Ficollu a (iv) sediment ostatních složek krve.

#### 3.1.3.1. Izolace lymfocytů a monocytů

Vzorek PK nebo KD je třeba naředit 1:1 s PBS (fosfátový pufr, pH 7,4), BC ředíme 1:2 s PBS. Naředěný vzorek navrstvíme na 20ml roztoku Ficoll a centrifugujeme (675g, 20min, 25°C, nulová brzdící rychlost). Prstenec lymfocytů odebíráme opatrně pomocí Pasteurovy pipety do 20ml PBS a znovu centrifugujeme (1000g, 5min, 25°C). K důkladnému odstranění granulocytů a erythocytů celý postup izolace přes Ficoll opakujeme 2x. Po odstranění supernatantu sediment resuspendujeme v 9ml lyzačního roztoku na erythrocyty a inkubujeme 5min při 25°C na výkyvné plošině. Směs poté opět centrifugujeme (1000g, 5min, 25°C) a

sediment promyjeme ve 20ml PBS. Na závěr změříme na průtokovém cytometru podíl granulocytů, který by ideálně neměl přesahovat 5 %.

### 3.1.3.2. Izolace B-lymfocytů nebo T-lymfocytů pomocí RosetteSep sady

Roztoky RosetteSep obsahují protilátky vázající buňky krve, které je potřeba při izolaci lymfocytů odstranit. Nežádoucí buňky jsou těmito protilátkami zesíťovány a při centrifugaci sedimentují na dno zkumavky.

Do 1ml neředěného vzorku nejprve přidáme 50 $\mu$ l příslušného roztoku RosetteSep (CD19+ nebo CD3+), vzorek řádně promícháme a inkubujeme 20min při 25°C na výkyvné plošině. Poté vzorek naředíme 1:1 (v případě BC 1:2) s PBS a nanese na 20ml roztoku Ficoll. Další postup je identický s postupem uvedený v předchozí kapitole.

## 3.2. Průtoková cytometrie a cytometrická analýza

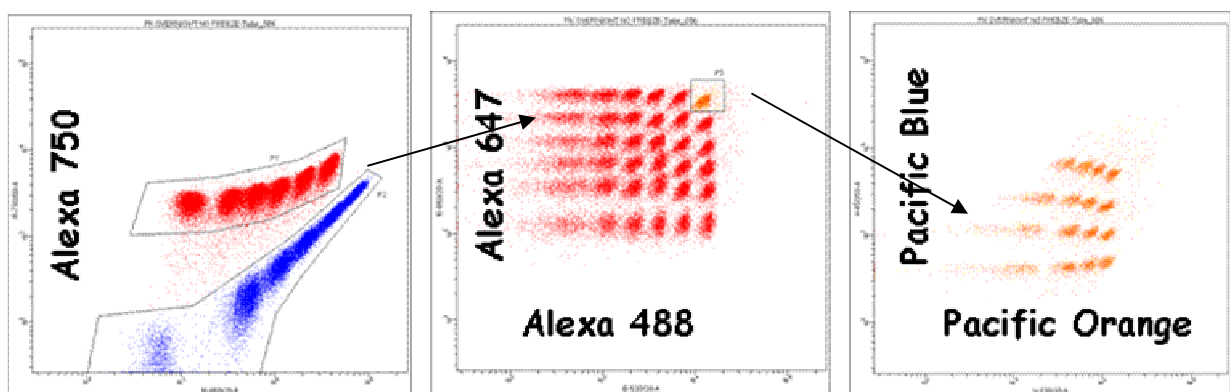
Průtoková cytometrie je hojně využívaná laboratorní metoda, která umožňuje měření mnoha parametrů zároveň na velkém množství částic.<sup>53</sup> Její výhodou je velké množství sledovaných parametrů – jako je odražené světlo v pravém úhlu (optické vlastnosti), fluorescence atd. Další výhodou je rychlost analýzy – obvykle se jedná o 10 000 a více buněk za minutu.<sup>33</sup> Nejčastěji využívanými parametry jsou rozptyl světla v přímém úhlu, tzv. Forward Scatter (FSC), který je přímo úměrný velikosti buněk, rozptyl světla v úhlu 90°, tzv. Side Scatter (SSC), který je ovlivněn komplexitou membrán uvnitř částic a dále fluorescence různých vlnových délek. Měřené částice (suspenze buněk označených protilátkami konjugovanými s fluorescenční značkou, tzv. fluorochromem, nebo fluorescenčními próbami) jsou unášeny laminárním proudem nosné kapaliny velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou proudí nosná tekutina. To usměrní částice do tenkého proudu. Jedna za druhou postupují průtokovou komůrkou, v níž protínají laserový paprsek. Laserový paprsek excituje na buňkách navázané konjugáty protilátka-fluorochrom nebo samotné fluorescenční próby, které emitují světelné signály o vlnové délce určené typem fluorochromu, které jsou převedené na elektrické impulsy fotonásobičem.<sup>53</sup> Průtokový cytometr BD LSRII nám umožňuje zapojením 4 laserů excitovat až 13 různých fluorescenčních značek zároveň. Ke grafické analýze zaznamenaných Flow Cytometry Standard (FCS) dat používáme software FlowJo (TreeStar, USA), v němž se provádí výběr („gating“) podskupin buněk na základě přítomnosti určitého znaku a který

umožňuje hledání vztahu mezi libovolnými naměřenými parametry a četností jednotlivých typů buněk pro následné statické zpracování.

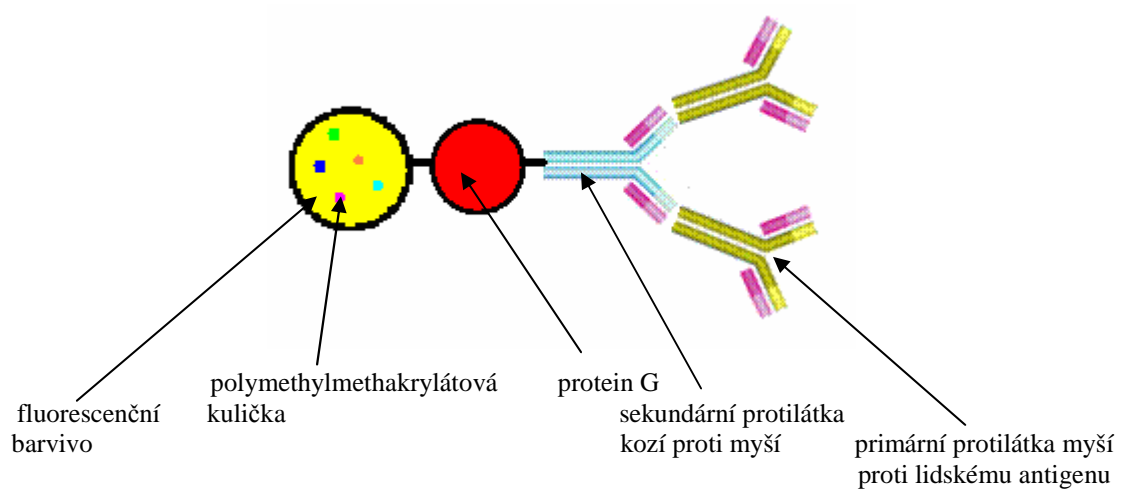
### 3.3. Multiplexní sada protilátek

#### **3.3.1. Schéma multiplexní sady protilátek**

Multiplexní sada protilátek je tvořena souborem polymethylmethakrylátových kuliček o průměru 6 $\mu$ m, z nichž každá populace je jednoznačně charakterizována 5-ti fluorescenčními barvami v různých koncentracích. Toto označení nám umožňuje vytvořit kombinaci s více než tisíci různých fluorescenčních populací (obr. 3.1). Na každé populaci je připojen 1 typ protilátky proti lidským proteinům (obr. 3.2., str. 26), můžeme tedy najednou detekovat více než tisíc různých proteinů. V této diplomové práci byl použit soubor 1152 fluorescenčních populací kuliček, na kterých jsou navázány protilátky proti znakům asociovaným s dětskou akutní leukemií.<sup>54</sup>



Obr. 3.1. Rozdělení kuliček podle fluorochromů Alexa 750, Alexa 488, Alexa 647, Pacific Blue a Pacific Orange.



Obr. 3.2. Schéma jedné fluorescenční populace kuliček a navázanými protilátkami.

Připravené sady skladujeme v roztoku PBS s 50% (v/v) trehalosou a roztokem neimmuních myších a kozích gamma globulinů o koncentraci 40 mg/ml v PBS v  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2. Příprava buněčných lyzátů

Pro přípravu buněčných lyzátů používáme několik postupů s využitím různých detergentů o různých koncentracích. Buňky nejprve dvakrát resuspendujeme ve studeném PBS s následnou centrifugací (243g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )

Mezi jednotlivými kroky udržujeme buňky, popř. buněčné lyzáty na ledu.

#### 3.3.2.1. Celkový lyzát s použitím detergentu Tween 20 o cílové koncentraci 0,1% (v/v) a laurylmaltosidu (LM) o výsledné koncentraci 1% (w/v)

Sediment promytých buněk (obvykle 10-30 milionů) resuspendujeme ve 300 $\mu\text{l}$  lyzačního pufru (TLB) s detergentem Tween 20 o koncentraci 0,1% (w/v), okamžitě zamrazíme na suchém ledu a přemístíme do  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po rychlém rozmrazení ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ ) přidáme do suspenze 30 $\mu\text{l}$  roztoku 10% (w/v) LM, 15 $\mu\text{l}$  2.8M NaCl a sonikujeme po dobu 10s ve 4 cyklech (300W, amplituda 30, model 150V/T, Biologics, USA). Po inkubaci 10min na ledu získáme bezbuněčný lyzát v supernatantu po centrifugaci (21255g, 10min,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

3.3.2.2. Lyzát rozdělený na membránovou (a DNA vazebnou) a cytosolární frakci s použitím detergentu Tween 20 o finální koncentraci 0,1% (v/v) a LM o cílové koncentraci 1% (w/v)

Buněčný sediment resuspendujeme ve 300 $\mu$ l TLB, okamžitě zamrazíme na suchém ledu a přemístíme do -80°C. Po rychlém rozmražení buňky centrifugujeme (21255g, 5min, 4°C). Odebraný supernatant znovu centrifugujeme (21255g, 1min, 4°C). Takto připravený supernatant obsahuje cytosolární proteiny (CYTO frakce). Oba sedimenty buněk spojíme resuspendováním v 1ml TLB a dvakrát promyjeme pomocí centrifugace (21255g, 1min, 4°C) v TLB. Buňky v sedimentu resuspendujeme ve 350 $\mu$ l TLB s 1% LM a 280mM NaCl a sonikujeme v cyklech 4x10s (300W, amplituda 30). Po 10min inkubaci na ledu lyzát centrifugujeme (21255g, 10min, 4°C), vytvořený supernatant obsahuje membránové a DNA vazebné proteiny (MEM frakce).

3.3.2.3. Lyzát rozdělený na 4 frakce s použitím detergentu Escin o výsledné koncentraci 0,03% (w/v) a 0,1% (w/v), detergentu Nonidet-P40 (NP-40) o finální koncentraci 0,02% (w/v) a LM o cílové koncentraci 1% (w/v)

Buněčný sediment resuspendujeme ve 350 $\mu$ l lyzačního pufru (pufr A) s Escinem o koncentraci 0,03%. Směs inkubujeme 10min na ledu, každé 2min buňky jemně resuspendujeme a po inkubaci centrifugujeme (500g, 5min, 4°C). Supernatant odebereme jako frakci Escin 1 (E1). Sediment resuspendujeme ve 350 $\mu$ l lyzačního pufru A s escinem o koncentraci 0,1%. Směs inkubujeme 10min na ledu, každé 2min jemně resuspendujeme a nakonec připravíme centrifugací (500g, 5min, 4°C) supernatant označený jako frakci Escin 2 (E2). Získaný sediment dvakrát promyjeme v lyzačním pufru A (bez detergentu) a následně ho resuspendujeme ve 350 $\mu$ l lyzačního pufru A s detergentem NP-40 o koncentraci 0,2%. Směs inkubujeme 5min na ledu, každou minutu jemně resuspendujeme, centrifugací (500g, 5min, 4°C) připravíme supernatant označený jako frakce NP-40 (NP). Sediment promyjeme v 500 $\mu$ l lyzačního pufru A s 0,2% NP-40 a resuspendujeme ve 350 $\mu$ l lyzačního pufru A s 1% LM a 280mM NaCl a sonikujeme v cyklech 4x10s (300W, amplituda 30). Poté směs centrifugujeme (500g, 5min, 4°C) a supernatant odebereme jako frakci LM. Přehled obsahu jednotlivých frakcí je uveden v Tabulce 3.1.(str.28)

Tabulka 3.1. Rozdělení proteinů do frakcí E1-LM.

označení frakce	obsah frakce
Escin 1 (E1)	cytosolární proteiny
Escin 2 (E2)	cytosolární proteiny a proteiny z organel (mitochondrie, Golgiho aparát atd.)
NP-40 (NP)	proteiny vnitřních membrán
LM	proteiny vnějších membrán a DNA vazebné proteiny

### 3.3.3. Předčištění buněčných lyzátů pomocí proteinu G

Protein G selektivně váže Fc konec všech podtříd imunglobulinů G<sup>55</sup>, které v tomto kroku odstraníme z lyzátu buněk.

100μl nosiče Sepharose-Protein G promyjeme dvakrát v 1ml příslušného lyzačního pufru (pro lyzaci 3.3.2.1. a 3.3.2.2. v TLB, pro lyzaci 3.3.2.3. v lyzačním pufru A) a následně resuspendujeme ve 30μl tohoto lyzačního pufru. Do buněčného lyzátu přidáme 30μl promytého nosiče a směs inkubujeme na rotačním inkubátoru (Labroller II, Labnet, USA) při 4°C. Po 15-ti minutách směs centrifugujeme (21255g, 1min, 4°C) a supernatant uskladníme na ledu

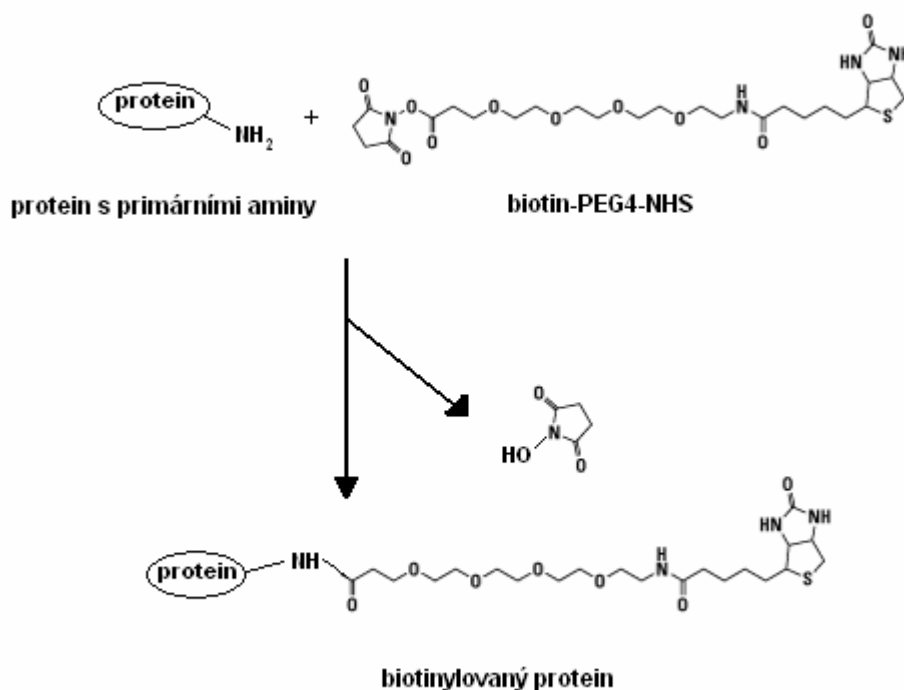
### 3.3.4. Měření koncentrace proteinů pomocí BCA sady

Každý vzorek je třeba charakterizovat stanovením koncentrace celkových proteinů. K tomu používáme komerčně dostupnou BCA sadu. Tato sada obsahuje roztok A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, (HO<sub>2</sub>CC<sub>9</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>2</sub>, bicinchoninová kyselina - BCA, Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> – tartrát sodný v 0,1M NaOH) a roztok B (4% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), které smícháme v poměru A/B = 1/50 (v/v). Tato metoda kombinuje redukci Cu<sup>2+</sup> na Cu<sup>+</sup> v alkalickém prostředí pomocí proteinů a detekci Cu<sup>+</sup> pomocí BCA.<sup>56</sup> Cu<sup>+</sup> chelatuje 2 molekuly BCA za vzniku fialově zbarveného komplexu, který silně absorbuje světlo o vlnové délce 562nm.<sup>56</sup>

Vzorek či standard ředíme činidlem 10-krát do 96-ti jamkové destičky. Ke kalibraci použijeme jednotkovou ředící řadu s počáteční koncentrací BSA 2mg/ml a konečnou koncentrací 0,031 mg/ml. Jako slepý vzorek použijeme samotné činidlo. Po inkubaci 10 min při teplotě 37°C stanovíme koncentraci spektrofotometricky na přístroji ELISA-READER (Molecular Device, USA).

### 3.3.5. Biotinylace proteinů

Biotin je vázán na  $\epsilon$ -aminoskupinu lysinu, popř. na N-terminální aminokyseliny proteinů.<sup>57,58</sup> Schéma reakce proteinů s komerčně dostupným biotin-(polyethylen glykol)<sub>4</sub>-N-hydroxysukcinimid esterem (biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS) je uvedeno na Obr. 3.3



Obr. 3.3: Schéma reakce primárních aminů proteinů s použitým biotin-(polyethylen glykol)<sub>4</sub>-N-hydroxysukcinimid esterem (biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS). Převzato a upraveno podle <sup>58</sup>.

K lyzátu buněk o koncentraci celkových proteinů 1mg/ml a více přidáme biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS o finální koncentraci 1mg/ml. V případě, že je koncentrace celkových proteinů nižší než 1mg/ml, přidáme biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS o cílové koncentraci 0,5mg/ml. Po inkubaci 30min na ledu vzorky centrifugujeme (5314g, 5min, 4°C) ve zkumavkách eppendorf s 0,22 $\mu$ m filtrem (Millipore, USA) a přefiltrované biotinylované lyzáty přemístíme do zkumavek FACS-micronic (Micronic, Nizozemsko).

### **3.3.6. Frakcionace proteinů na FPLC (fast protein liquid chromatography, ÄKTA, GE Healthcare Bio-Sciences)**

Vzorky frakcionujeme na koloně s nosičem Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences) isokratickou elucí, mobilní fází (PBS s 0,05% (v/v) Tween 20 a 1mM EDTA), s průtokem 0,5ml/min, detekcí absorbance při 280nm a nanáškou 280μl. Každý vzorek je rozdělen na 24 frakcí (přibližně odpovídající velikosti proteinů v rozsahu 700kDa - 10kDa) sbíraných do 96-ti jamkové destičky. Na kolonu nanášíme množství vzorku odpovídající 0,42 mg proteinu (CYTO frakce) nebo 0,14 mg proteinu (MEM frakce) a získané frakce uskladníme v -80°C nebo přímo použijeme k imunoprecipitaci.

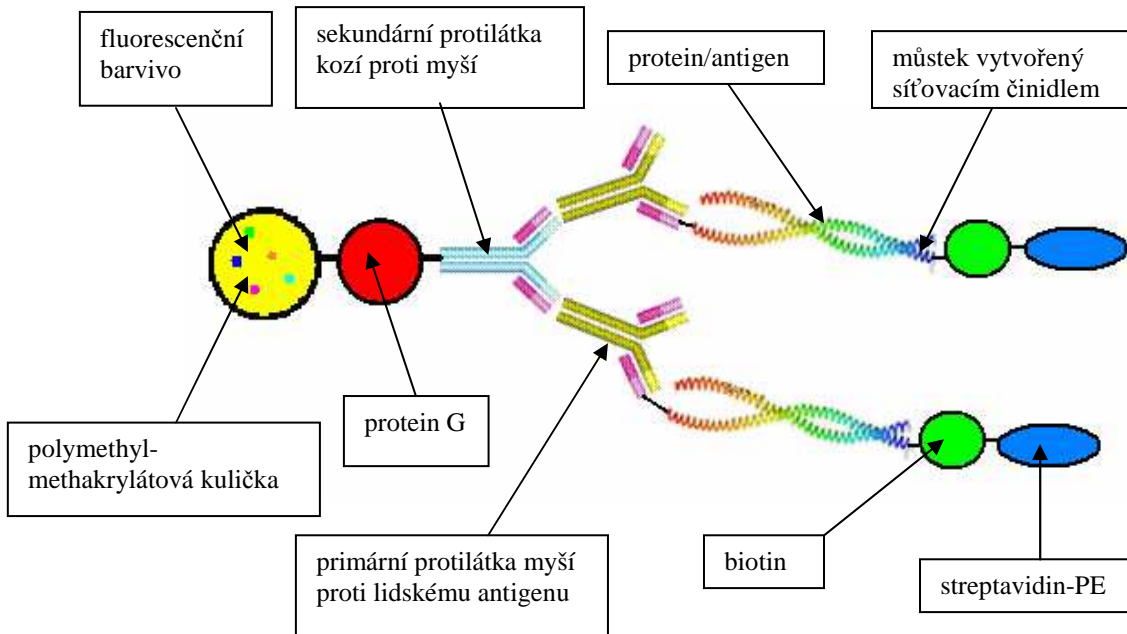
### **3.3.7. Imunoprecipitace sady protilátek s frakcemi z FPLC, značení streptavidinem a měření na průtokovém cytometru**

Aliquot připravené sady protilátek vyjmeme z -80°C, promyjeme v promývacím roztoku (PBS, 1% Tween 20, 1mM EDTA) centrifugací (1177g, 2min, 4°C), resuspendujeme v 1ml kaseinového blokačního pufru s 18,2 μg/ml neimuních myších a kozích gamma globulinů inkubujeme na rotačním inkubátoru 1h při 4°C. Do 96 jamkové destičky odebereme 30μl od každé z 24 FPLC frakcí, přidáme 10μl sady protilátek v blokačním pufru a 150μl promývacího roztoku, destičku opatříme víčky a inkubujeme na rotačním inkubátoru přes noc při 4°C. Biotinylované proteiny se váží na protilátky, které jsou vázány na fluorescenčních kuličkách. Po inkubaci centrifugujeme (1177g, 2min, 4°C) a supernatant odstraníme. Sediment 2x promyjeme v promývacím roztoku s následnou centrifugací (1177g, 2min, 4°C). Do každé jamky přidáme 10μl fluorescenčně značeného streptavidinu (finální koncentrace 2 μg/ml) (Streptavidin-PE), promícháme a inkubujeme 20min při 4°C. Každých 5min směs promícháme, aby došlo k homogennímu značení biotinylovaných proteinů streptavidinem (obr. 3.4., str. 31). Směs 2x promyjeme promývacím roztokem s následnou centrifugací (1177g, 2min, 4°C), sediment resuspendujeme ve 120μl promývacího roztoku a měříme na průtokovém cytometru BD LSR II modulem HTS (high throughput screening, BD Biosciences, USA).

Streptavidin je protein pocházející z bakterie *Streptomyces avidinii* a je homologní s avidinem.<sup>59</sup> Streptavidin tvoří β-barel, do kterého se váže biotin a tím dojde ke konformační změně streptavidinu a vytvoření silné vazby charakterizované disociační konstantou  $4 \times 10^{-14}$  M.<sup>59,60</sup>



Průtokový cytometr zaznamenává pozice jednotlivých populací kuliček v 5-ti fluorescenčních parametrech a zároveň signál z fluorescenčně značeného streptavidinu, který určuje kvantitu navázaného proteinu.



Obr. 3.4. Schéma značení kuliček s navázanými biotinylovanými proteiny fluorescenčně konjugovaným streptavidinem.

### 3.3.8. Analýza dat pomocí softwaru R-workspace

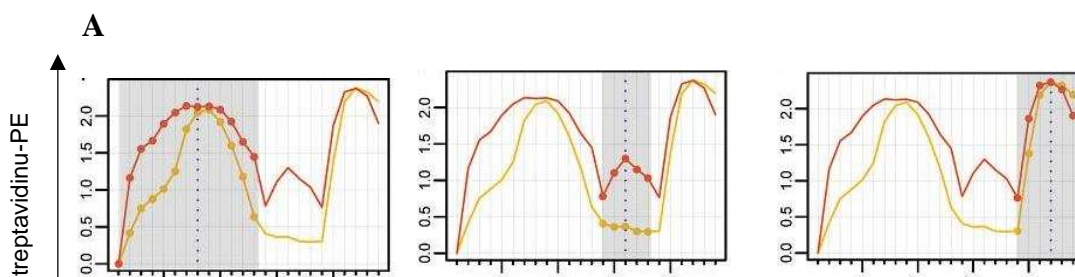
Vzhledem k velkému množství dat, která získáme společně s každým experimentem, bylo nutné vyvinout nové přístupy k vlastní analýze dat (Stuchlý, nepublikováno). Software R-workspace Bead-Analysis importuje data z průtokového cytometru, nachází barevně kódované kuličky a odečítá fluorescenční signál PE, jež odpovídá množství imunoprecipitovaného proteinu a automaticky vytváří tabulky (tabulka 3.2., str. 32) a čárové grafy (obr. 3.5., str. 33), jak je ukázáno na příkladu  $\beta$ 2-mikroglobulinu (B2M).

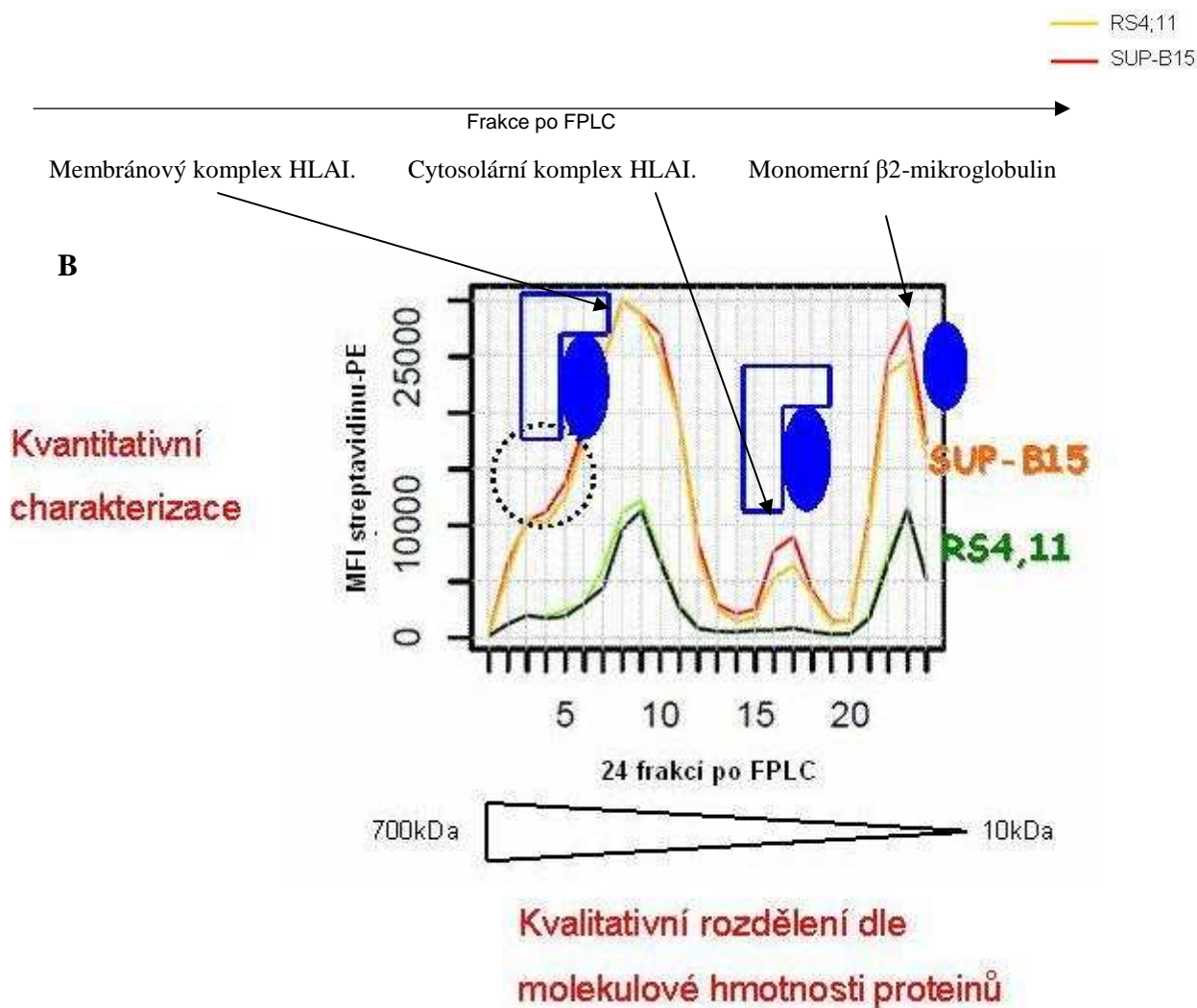
Tabulka 3.2. Tabulka znázorňuje mediány intesity fluorescence (MFI) ze streptavidinu-PE, který kvantifikuje  $\beta$ 2-mikroglobulinu (B2M) pro jednotlivé FPLC frakce u dvou buněčných linií (SUP-B15 a RS4;11)

Hodnoty MFI streptavidinu-PE												
FPLC frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
populace	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B2M-01(SUP-B15)	400	6642	10384	11190	13775	18702	24628	30008	28734	266992	19419	8350
	404	5893	10572	10183	12454	17702	24706	30071	28792	24898	19670	7327
B2M-01(RS4,11)	181	1219	1965	1888	2439	3017	6161	11100	12265	7223	3035	886
	177	1230	1977	1689	1893	3030	4446	9644	11301	6766	2640	800

↑  
populace fluorescenčních kuliček s navázaným proteinem  $\beta$ 2-mikroglobulinem

↑  
MFI streptavidinu-PE pro frakci F18 buněčné linie RS4;11





Obr. 3.5. Čárový graf zobrazuje různé formy výskytu  $\beta$ 2-mikroglobulinu (membránový komplex HLA antigenu I. třídy, cytosolární komplex HLA antigenu I. třídy a monomerní  $\beta$ 2-mikroglobulin) imunoprecipitovaného z buněčných linií SUP-B15 (A - červeně, B - oranžově a žlutě,) a RS4;11 (A - žlutě, B - zeleně a černě). Na ose x FPLC frakce 1-24, na ose y log medián intenzity fluorescence (MFI) streptavidinu-PE (A) popř. MFI streptavidinu-PE (B). Algoritmus poloautomatické detekce proteinových forem (tzv. píků), který je součástí softwaru R-workspace Bead-Analysis, detekoval tři píky (nahore – pík 1, pík 2 a pík 3), které odpovídají jednotlivým formám tohoto proteinu v liniích

Data můžeme pro lepší vizualizaci zobrazit i ve formě tzv. „heat-maps“ (obr. 3.6.) softwarem MEV (MEV, USA).



Obr. 3.6. Ukázka tzv. „heat-map“ neboli „kobercového grafu“ zobrazující mediány intenzity fluorescence (MFI) ze streptavidinu-PE navázaného na  $\beta$ 2-mikroglobulin (B2M), který byl imunoprecipitován z FPLC frakcí (1-24) buněčných linií SUP-B15 a RS4;11, každá je uvedena v duplikátu. Červeně nejvyšší hodnota MFI, černě střední hodnota MFI, zeleně nejnižší hodnota MFI streptavidinu-PE.

Autory analyzačního softwaru jsou Karel Fišer (bioinformatik v laboratoři CLIP) a Jan Stuchlý (postgraduální student 2.LF UK a MFF UK). K následné analýze dat ze sady protilátek využíváme výhody rozdělení směsi proteinů podle jejich molekulové hmotnosti (24 frakcí z FPLC). Vynesení hodnot množství proteinu (tedy MFI streptavidinu-PE) ve všech FPLC frakcích vede k vytvoření profilu pro každý z detekovaných proteinů. Vrcholy na křivce takového profilu odpovídají proteinovým formám (isoformy, monomery, komplexy, obr. 3.5., str. 40). Tyto vrcholy jsou pak definovatelné jako výčet FPLC frakcí, kterými jsou tvořeny a součet hodnot z těchto FPLC frakcí je úměrný celkovému množství dané formy proteinu (a odpovídá ploše pod křivkou daného vrcholu). Můžeme tak porovnávat expresi jednotlivých proteinů, respektive forem proteinů, mezi jednotlivými vzorky.

### 3.4. Inhibice buněk imatinib mesylátem

Imatinib mesylát (Glivec) je používané antileukemické léčivo, které inhibuje aberantně aktivovanou kinasu BCR-ABL1.<sup>61</sup> Fuzní protein BCR-ABL1 vzniká chromosomální translokací mezi chromosomy 9 a 22, která následně indukuje leukemogenesi.<sup>62</sup> Inhibicí BCR-ABL1 specifickým inhibitorem (jako je např. imatinib mesylát) dochází k defosforylaci a inhibici kinasové aktivity BCR-ABL1 a k apoptose leukemických buněk.<sup>61</sup>

Pro přípravu vzorku na sadu protilátek vezmeme 2 ml čisté buněčné kultury, obsahující 20 milionů buněk, rozdělíme do 2 jamek 24 jamkové destičky. Do jednoho vzorku, kontrolního (ctrl), přidáme 3  $\mu$  sterilního DMSO, do druhého vzorku přidáme 3  $\mu$ l 10mM



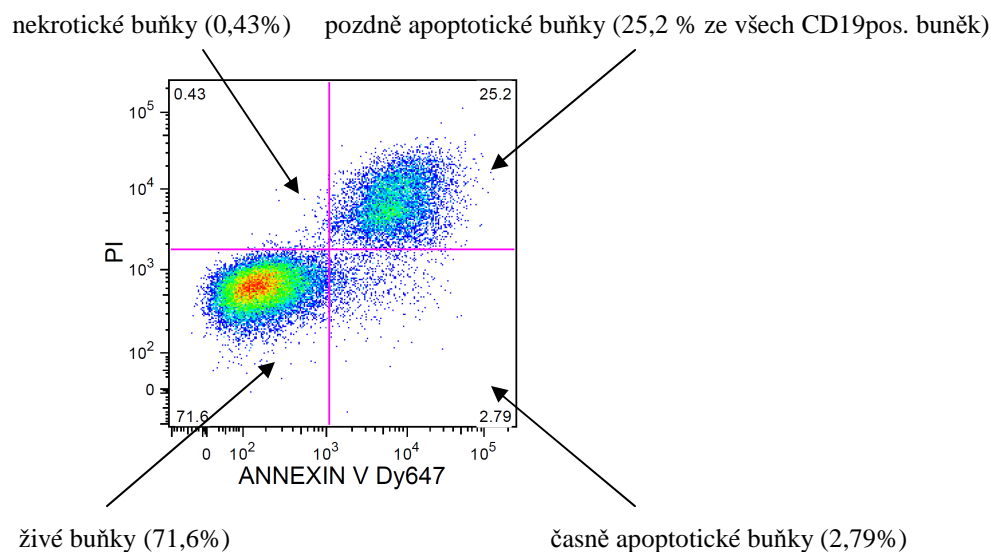
roztoku imatinib mesylátu v DMSO (výsledná koncentrace imatinib mesylátu je 10 $\mu$ M). Po 24hod kultivace ve sterilním inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> buňky 2x promyjeme ve studeném (4°C) PBS, resuspendujeme v 300 $\mu$ l TLB, rychle zamrazíme na suchém ledu a přemístíme do -80°C. Po rozmražení postupujeme podle návodu viz 3.3.2.1. Celkový lyzát s použitím detergentu Tween 20 o cílové koncentraci 0,1% (v/v) a laurylmaltosidu (LM) o výsledné koncentraci 1% (w/v).

Pro přípravu vzorku na měření apoptosy vezmeme 500 $\mu$ l čisté buněčné kultury, obsahující 4 miliony buněk, do 2 jamek 24 jamkové destičky. Do jednoho vzorku, kontrolního (ctrl), přidáme 0,25 $\mu$ l sterilního DMSO, do druhého vzorku přidáme 0,25 $\mu$ l 10mM roztoku imatinib mesylátu v DMSO (výsledná koncentrace imatinib mesylátu je 10 $\mu$ M). Po 24hod kultivace ve sterilním inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> buňky promyjeme ve studeném (4°C) annexinovém pufru (0,1M HEPES, 1,4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) a měříme apoptosu (návod uveden níže, viz 3.5. Měření apoptosy).

### 3.5. Měření apoptosy

Apoptosa (programovaná buněčná smrt) je fyziologický proces charakterizovaný ztrátou mezibuněčných spojení, ztrátou asymetrie buněčné membrány, kondenzací cytoplasmy a jádra. Jedním z prvních znaků apoptosy je translokace membránového fosfolipidu fosfatidylserinu (PS) z vnitřní na vnější stranu buněčné membrány, který je tzv. „eat-me“ signálem pro makrofágy. Antikoagulant Annexin V (zde konjugovaný s fluorochromem) se váže na záporně nabitě fosfolipidy, jako je PS apoptotických buněk, což umožňuje jejich identifikaci na průtokovém cytometru.<sup>63</sup> Annexin V používáme v kombinaci s DNA vazebnou fluorescenční próbou - propidium jodidem (PI), který prochází do buněk až po porušení membránové integrity a tudíž je znakem pozdně apoptotických a mrtvých buněk.<sup>64</sup>

Buněčný sediment (obsahující přibližně 4 miliony buněk) po promytí ve studeném annexinovém pufru (0,1M HEPES, 1,4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4), resuspendujeme ve 100 $\mu$ l annexinového pufru a přidáme 5 $\mu$ l Annexinu V-Dy647, 5 $\mu$ l PI a 5 $\mu$ l anti-CD19-FITC protilátky (klon J3-119). Po inkubaci 30min ve tmě při 4°C odmyjeme nadbytečné proteiny, protilátky či barviva (523g, 5min, 25 °C) a po resuspendování ve 250 $\mu$ l annexinového pufru měříme na průtokovém cytometru BD LSR II. Rozdělení buněk do stádií apoptosy podle značení AnnexinemV a PI je znázorněno na obr. 3.7 na příkladu TOM-1 buněk po inhibici Glivecem po dobu 24h.



Obr. 3.7. Rozdělení buněk TOM-1 po 24h inhibici Glivecem podle značení Annexinem V a PI do různých stádií apoptosy, procento z celkové populace buněk je uvedeno v závorce. Na ose x medián intenzity fluorescence (MFI) Annexinu V – Dy647, na ose y MFI propidium jodidu.

### 3.6. Imunofenotypizace leukemických linií

Buněčný sediment (cca 200 tisíc buněk) resuspendujeme ve 3ml PBS s přidavkem 0,5% (w/v) BSA a centrifugujeme (295g, 5min, 25°C). Odstraníme 2,9ml supernantu a do zbývajícího roztoku přidáme sedm různých kombinací fluorescenčně značených protilátek dle doporučení výrobce (do každé zkumavky specifickou kombinaci dle Tabulky 3.3. (str.37) a krátce promícháme. Ve směsích protilátek nejsou v tomto kroku přidány v Tabulce 3.3.(str.37) tučně zvýrazněné protilátky (t.j. protilátky proti cytoplasmatickým antigenům), protože tyto protilátky jsou přidány až po fixaci a permeaci buněk

Tabulka 3.3. Přehled fluorescenčně konjugovaných protilátek přidávaných do jednotlivých (1 až T-ALL) zkumavek. PB, PO atd. jsou jednotlivé fluorochromy.

Fluorochromy Zkumavky	PB	PO	FITC	PE	PerCp(Cy5,5)	PE-Cy7	APC	Alexa700	APC H7
1	CD20		CD58	CD66c		CD45RA	CD10		
2	CD27	CD45	<b>cyMPO</b>	CD33	CD34		CD7		
3	CD9		<b>cyTdT</b>	CD13			CD117		CD24
4	CD21		CD15	NG2			CD123		CD81
5	CD44		CD56	CD99	DR		IgM		CD38
6	KAPPA		<b>cyIgM</b>	<b>cyCD79a</b>		CD19	CD22		LAMBDA
7	CD8		CD5	CD2			CD1a	CD3	CD4

cy – protilátka proti cytoplasmatickému antigenu

Zkumavky inkubujeme 15min ve tmě při teplotě 25°C. Do zkumavek, které obsahují protilátky pouze proti povrchovým antigenům, přidáme 3ml PBS a centrifugujeme (5min, 295g, 25°C). Sediment resuspendujeme v 250µl PBS a měříme na průtokovém cytometru BD LSR II. Do zkumavek č. 2, 3 a 6, ve kterých budou stanoveny cytoplasmatické antigeny, přidáme 100µl roztoku FIX A (z FIX-PERM sady). Po inkubaci 15min ve tmě při 25°C přidáme 3 ml PBS a centrifugujeme (523g, 5min, 25°C). Sediment resuspendujeme v 50µl roztoku PERM B a přidáme protilátky proti cytoplasmatickým antigenům dle doporučení výrobce. Po inkubaci 30min ve tmě při 25°C přidáme 3ml PBS a centrifugujeme (523g, 5min, 25°C). Sediment resuspendujeme v 250µl PBS a měříme na průtokovém cytometru BD LSR II.

### 3.7. Detekce transkripčního faktoru Ikaros u leukemických linií NALM-6 a SUP-B15 pomocí elektropřenosu na membránu (Western blot)

#### **3.7.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS- PAGE)**

Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků provádíme na plochých polyakrylamidových gelech v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) v elektroforetické soustavě firmy Bio-Rad. Koncentrace polyakrylamidu v dělicím gelu je 10 % a rozměry gelů 83 x 50 x 0,75 mm.

##### 3.7.1.1. Příprava gelů

Nejprve připravíme 10% gel (složení viz Tabulka 3.4., str.39) a ihned ho nalijeme mezi 2 ethanolem odmaštěná skla v aparatuře na elektroforézu tak, aby gel sahal do výšky cca 2 cm pod okraj skel. Po převrstvení destilovanou vodou necháme gel 45 min polymerovat. Po zpolymerování gelů dokonale odstraníme vodu. Zaostřovacím gelem vyplníme jím zbývající prostor mezi skly a zasuneme hřebínek pro vytvoření 10 vzorkových jamek. Gel po 25 min polymerace lze ihned použít.



Tabulka 3.4. Složení 10% a zaostřovacího polyakrylamidového gelu

Chemikálie	Objem [ml]	
	10% gel	Zaostřovací gel
Destilovaná H <sub>2</sub> O	4	2,7
30% (w/v) akrylamid	3,3	0,67
Tris-base	(1,5 M, pH 8,8) 2,5	(0,5 M, pH 6,8) 0,5
10% (w/v) SDS	0,1	0,04
10% (w/v) APS	0,1	0,04
TEMED	0,004	0,004

TEMED...tetramethylethyldiamin ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

### 3.7.1.2. Příprava vzorků na SDS-elektroforézu

Buněčný lyzát připravíme podle uvedeného postupu 3.3.2.1. Celkový lyzát s použitím detergentu Tween 20 o cílové koncentraci 0,1% (v/v) a laurylmaltosidu (LM) o výsledné koncentraci 1% (w/v).

Ke 100μl vzorku lyzátu přidáme ekvivalentní množství redukujícího (Laemmlí) nebo neredukujícího vzorkového pufru, 5 min povaříme ve vodní lázni při 100°C a zchladíme při pokojové teplotě. Takto připravený lyzát můžeme nanést na připravený 10% gel nebo skladovat při teplotě -20°C.

#### *Příprava IP kuliček*

120μl nosiče Sepharose-Protein G promyjeme v PBS s 0,05% Tween 20 (v/v), k sedimentu přidáme 2μg protilátky anti-Ikaros (klon H-100) a inkubujeme 1 hod v rotačním inkubátoru Labroller II při 4°C. Kuličky následně promyjeme centrifugací v PBS s 0,05% Tween 20 a sediment resuspendujeme ve 120μl PBS s 0,05% Tween 20.

#### *Imunoprecipitace IP kuliček se vzorkem*

Ke 400μl vzorku buněčného lyzátu přidáme 20μl připravených IP kuliček a inkubujeme přes noc v rotačním inkubátoru Labroller II při 4°C. Poté vzorek 4x promyjeme centrifugací v PBS s 0,05% Tween 20 (v/v) (500g, 1min, 25°C). Ke vzniklému sedimentu přidáme 60μl PBS

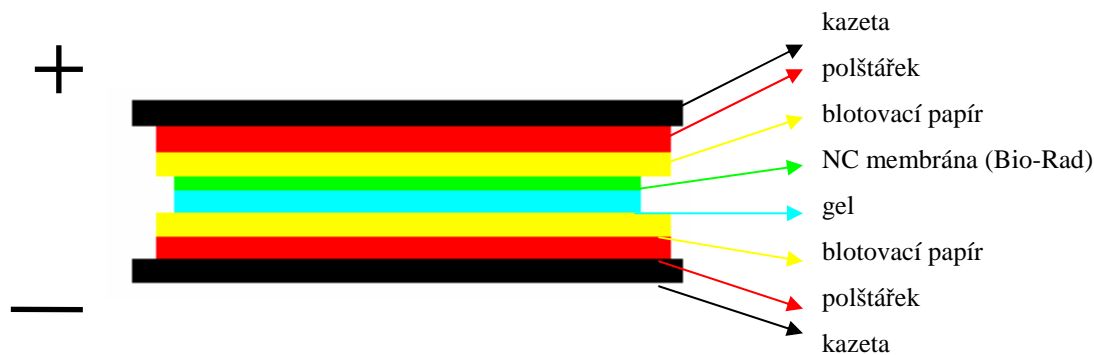
s 0,05% Tween 20 a ekvivalentní množství redukujícího vzorkového pufru (Laemmli) nebo neredukujícího vzorkového pufru a 5min povaříme ve vodní lázni při 100°C. Vzorek centrifugujeme (5590g, 1min, 4°C), supernatant nanese na připravený 10% gel.

Do každé jamky na připraveném 10% gelu nanese 10 µl vzorku, do poslední volné jamky nanese 4µl standardu (Page Ruler Prestained Protein Ladder). Elektroforéza probíhala po dobu 80-ti minut při nastaveném omezujícím napětí 120V

### 3.7.2. Přenos proteinů na nitrocelulóзовé (NC) membrány (Western Blot)

Po skončení elektroforézy skla s gelem vyjmeme, skla odstraníme, odřízneme zaostřovací gel a ponecháme si jen gel separační. Poté sestavíme sendvič pro elektropřenos (obr. 3.8.), sendvič musí být neustále navlhčen v blotovacím pufru. Sendviče zasuneme do vany pro elektropřenos (stejná jako pro elektroforézu) společně s ledem a zalijeme blotovacím pufrem. K vaně připojíme stabilizovaný zdroj napětí (PowerPac™ Basic, Bio-Rad) a nastavíme přenosové podmínky:

proud: 70mA, čas: 100 min



Obr. 3.8. Schéma složení sendviče pro elektropřenos.

Po skončení elektropřenosu vanu odpojíme od zdroje a rozebereme jednotlivé sendviče.

NC membrány vložíme do 5% BSA v kaseinovém blokačním pufru (1% kasein v PBS) a necháme přes noc při 4°C.

### **3.7.3. Imunodetekce a vyvolání signálů (zesílená chemiluminescence - ECL-enhanced chemiluminescence)**

Membránu opatrně vyjmeme z blokačního roztoku, opláchneme v PBS s 0,05% Tween 20 (v/v) a nařežeme na čistém filtračním papíře podle počtu detekovaných antigenů a použitých primárních protilátek. Jednotlivé části membrán inkubujeme s odpovídajícími primárními protilátkami naředěnými v PBS s 0,05% Tween 20 podle doporučení výrobce. Po 1 hod inkubace primární protilátky odlijeme a k částem membrán přidáme PBS s 0,05% Tween 20. Po 5 min promývací roztok odlijeme a nahradíme ho čistým promývacím roztokem. Takto membrány promyjeme celkem pětkrát a přidáme příslušné sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (HRP – horse radish peroxidase) podle doporučení výrobce. Po 45 min části membrán 3 krát promyjeme PBS s 0,05% Tween 20. Na potravinové fólii složíme dohromady části membrán. Na membrány rovnoměrně naneseeme roztok luminolu smíchaného s peroxidovým pufrem (Immunostar<sup>TM</sup> HRP Substrate sada). Po 1 min roztok luminolu buničinou lehce osušíme, membránu zabalíme do fólie a vložíme do vyvolávacích desek. V temné komoře položíme na membránu vyvolávací film (X-OMAT<sup>TM</sup> Blue XB-1, Kodak, USA) a po 1 min vložíme do vyvolávacího stroje (OPTIMAX, SRN). Vyvolané fotografie náležitě popíšeme a vyznačíme molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů ve standardu.

## 3.8. Detekce transkripčního faktoru Ikaros u leukemických linií NALM-6 a SUP-B15 pomocí SDS-PAGE, Western blotu a hmotnostní spektrometrie

### **3.8.1. Elektroforéza v prostředí SDS a Western blot**

Postup přípravy vzorků na elektroforézu je identický s 3.7. Detekce transkripčního faktoru Ikaros u leukemických linií NALM-6 a SUP-B15 pomocí elektropřenosu na membránu (Western blot)

Vzorky nanášíme na gel v duplikátu, po ukončení elektroforézy gel rozřízneme v polovině tak, aby byly obě poloviny včetně nanesených vzorků identické.

Proteiny z jedné poloviny gelu přeneseme na NC membránu podle výše uvedeného postupu abychom přesně zjistili, kde se protein Ikaros na gelu nachází.

### **3.8.2. Obarvení gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 a odbarvení gelu**

Druhou polovinu gelu opláchneme v destilované vodě a vložíme do barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue R250. Po 1 hod inkubace gel vyjmeme, opláchneme dvakrát v destilované vodě a vložíme do odbarvovacího roztoku. Po odbarvení (odbarvujeme přes noc při 25°C) gel uchováváme v roztoku 1% kyseliny octové.

Identifikaci proteinu Ikaros pomocí hmotnost provedl M.Šulc.

## **3.9. Materiál**

### **3.9.1. Složení roztoků**

**PBS** (fosfátový pufr)

127 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

**Lyzační roztok na erythrocyty**

155mM NH<sub>4</sub>Cl, 11,9mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1mM EDTA, pH 7,2

**Lyzační pufr s Tweenem 20 (TLB)**

50mM HEPES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8,0

Před použitím přidáváme do TLB tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) o finální koncentraci 2μM, inhibitory proteas (Proteas Inhibitor Coctail) a inhibitory fosfatas (Phosphatase Inhibitor Coctail) dle doporučení výrobce.

**Pufr A**

30mM HEPES, 140mM NaCl, pH 8,0

Před použitím přidáváme do pufru A tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) o finální koncentraci 2μM, inhibitory proteas (Protease Inhibitor Coctail) a inhibitory fosfatas (Phosphatase Inhibitor Coctail) dle doporučení výrobce.

**Redukující vzorkový pufr Laemmli**

4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0,004% (w/v) bromfenolová modř, 0,125M Tris HCl, pH 6,8

**Neredukující vzorkový pufr**

0,15M Tris-base, 10% (v/v) glycerol 2,5% (w/v) SDS, 0,004/ (w/v) bromfenolová modř

**Annexinový pufr**

0,1M HEPES, 1,4M NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4

**Elektrodový pufr (10x koncentrovaný):**

0,25M Tris-base , 1,9M glycin, 0,01% (w/v) SDS

**Blotovací pufr**

0,025M Tris-base, 0,15M glycin, 20% (v/v) methanol

**Barvicí roztok s Coomassie Brilliant Blue R250**

0,001% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 10% (v/v) kyselina octová, 40% (v/v) methanol

**Odbarvovací roztok (po obarvení proteinů Coomassie Brilliant Blue R250)**

10% (v/v) kyselina octová, 20% (v/v) methanol

### 3.9.2. Protilátky

Tabulka 3.5. Přehled použitých protilátek, jejich klonů a výrobců

Klony protilátek použitých na imunofenotypizaci					
Protilátka	Klon	Výrobce	Protilátka	Klon	Výrobce

IgM APC	G20-127,	BD Biosciences	iIGM FITC	Dako polycl.	Dako
CD7 APC	eBio1241D1	Bioport Europe	CD99 FITC	Tu12	BD Biosciences
CD22	S-HCL-1	eBioscience	KAPPA PB	A8B5	Exbio
CD10 APC	HI10a	BD Biosciences	CD44 PB	MEM-85	Exbio
Lambda APCH7	1-155-2	BD Biosciences	CD27 PB	LT-27	Exbio
CD3 APCH7	SK7	Fisher Scientific	CD8 PB	MEM-31	Exbio
CD38 APCH7	HB7	BD Biosciences	CD45 PO	HI30	Invitrogen
CD4 APCH7	SK3	BD Biosciences	CD34 PC5.5	8G12	BD Biosciences
CD5 FITC	BL1a	Beckman Coulter	HLADR PC5.5	L243	Exbio
CD58 FITC	AICD58	Beckman Coulter	CD19 PC7	J3-119	Immunotech
iTDT FITC	HT-6	Immunotech	CD2 PE	39C1.5	Immunotech
CD99 PE	Tu12	BD Biosciences	CD66C PE	KOR-SA3544	Immunotech
CD4 ALEXA700	MEM-241	Exbio	CD33 PE	D3HL60.251	Beckman Coulter
CD20 PB	LT20	Exbio	CD21 PB	LT21	Exbio
CD56 FITC	MEM-188	Biolegend	CD117 APC	104D2	BD Biosciences
cyMPO FITC	MPO-7	Dako	CD123 APC	AC145	Biohem
CD15 FITC	MMA	BD Biosciences	CD1a APC	HI149	BD Biosciences
CD13 PE	WM15	BD Biosciences	CD24 APCH7	ML5	BD Biosciences
NG2 PE	7.1	Immunotech	CD81 APCH7	JS-81	BD Biosciences
cyCD79a PE	HM57	Medesa	CD3 ALEXA700	MEM-57	Exbio
CD45RA PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	CD9 PB	MEM-61	Exbio
CD44 PB	MEM-85	Exbio			
<b>Protilátky použité na imunodetekci proteinů na NC membránách</b>					
Ikaros	H-100	Santa Cruz Biotechnologies	Aktin	AC-40	Sigma-Aldrich
2° protilátka koží proti králičí konjugovaná s HRP	Polyclonal	Bio-Rad	2° protilátka koží proti myší konjugovaná s HRP	polyclonal	Bio-Rad

### 3.9.3. Přehled použitých chemikálií a jejich výrobců

akrylamid, 30% (w/v)	Bio-Rad, USA
Annexin V	Exbio, ČR
Annexinový pufr	Exbio, ČR
Anti-CD19-FITC, klon JS-119	Immunotech, Francie
BCA sada	Thermo Scientific, USA
Biotin-PEG <sub>4</sub> -NHS	Thermo Scientific, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA

BSA	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Amresco, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Escin	Sigma-Aldrich, USA
fenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, USA
Fetální hovězí sérum	Hyclone, USA
Ficoll-Hypaque	GE-Healthcare, Švédsko
FIX-PERM sada	ADG, SRN
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	MERCK, SRN
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Imatinib mesylát (Glivec)	Novartis, Švýcarsko
Immunostar HRP substrate sada	Bio-Rad, USA
Kaseinový blokační roztok	Thermo Scientific, USA
Kyselina octová	Penta, ČR
Laemmli	Sigma-Aldrich, USA
Lauryl maltosid	Sigma-Aldrich, USA
Lyzační roztok na erythrocyty	Lékárna FN Motol
methanol	Penta, ČR
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, USA
Neimunní kozí gamma globuliny	Jackson ImmunoResearch, USA
Neimunní myší gamma globuliny	Jackson ImmunoResearch, USA
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich, USA
PBS	Lékárna FN Motol
Penicilin	Lonza, Švýcarsko
Persulfát amonný	Sigma-Aldrich, USA
Propidium jodid (PI)	Exbio, ČR
RPMI-1640	Lonza, Švýcarsko
Sada RosetteSep	STEMCELL Technologies, Kanada
SDS	Sigma-Aldrich, USA
Sepharose-protein G nosič	GE-Healthcare, Švédsko
Směs inhibitorů fosfatas 2	Sigma-Aldrich, USA

Směs inhibitorů proteas	Sigma-Aldrich, USA
Standard molekulových hmotností Page Rule Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Streptavidin-PE	Jackson ImmunoResearch, USA
Streptomycin	Lonza, Švýcarsko
TEMED	Bio-Rad, USA
Trehalosa	Sigma-Aldrich, USA
Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)	Sigma-Aldrich, USA
Tris-base	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA

## **4. Výsledky**

### **4.1. Optimalizace přípravy buněčných lyzátů pro multiplexní sadu protilátek**



V rámci své diplomové práce jsem testovala a validovala novou cytometrickou techniku detekce proteinů pomocí multiplexní sady protilátek představující soubor 1152 populací fluorescenčních kuliček s navázanými protilátkami proti různým buněčným antigenům. Takový počet současně testovaných antigenů význačně převyšuje počty testovaných znaků standardně používanými metodami diagnostiky. Vzhledem k tomuto počtu lze předpokládat zvýšený výskyt nespecifických interakcí (např. protein-protein, antigen-protilátka). Součástí postupu je separace celého proteomu do 24 frakcí podle molekulové hmotnosti přibližně v rozsahu 10-700kDa použitím gelové chromatografie FPLC zachovávající protein-proteinové interakce. Tento separační krok by měl potlačit nespecifické interakce antigen-protilátka v dalším postupu imunodetekce.

Buněčný proteom byl připraven a separován podle tří různých protokolů:

- 1) příprava celkového buněčného lyzátu (viz metody 3.3.2.1., str. 26)
- 2) rozdělení buněčného lyzátu na 2 subcelulární frakce (viz metody 3.3.2.2., str. 27)
  - CYTO frakce obsahující cytosolární proteiny
  - MEM frakce obsahující membránové a jaderné (DNA vazebné) proteiny
- 3) rozdělení buněčného lyzátu na 4 subcelulární frakce. (viz metody 3.3.2.3., str. 27)
  - E1 frakce obsahující cytosolární proteiny
  - E2 frakce obsahující cytosolární proteiny a proteiny z buněčných organel (z Golgiho aparátu, mitochondrií atd.)
  - NP frakce obsahující proteiny vnitřních membrán
  - LM frakce obsahující proteiny vnějších membrány a jádra (DNA vazebné)

#### **4.1.1. Rozdělení buněčného proteomu na 2 subcelulární frakce**

Buněčný lyzáat jsme rozdělili na 2 subcelulární frakce

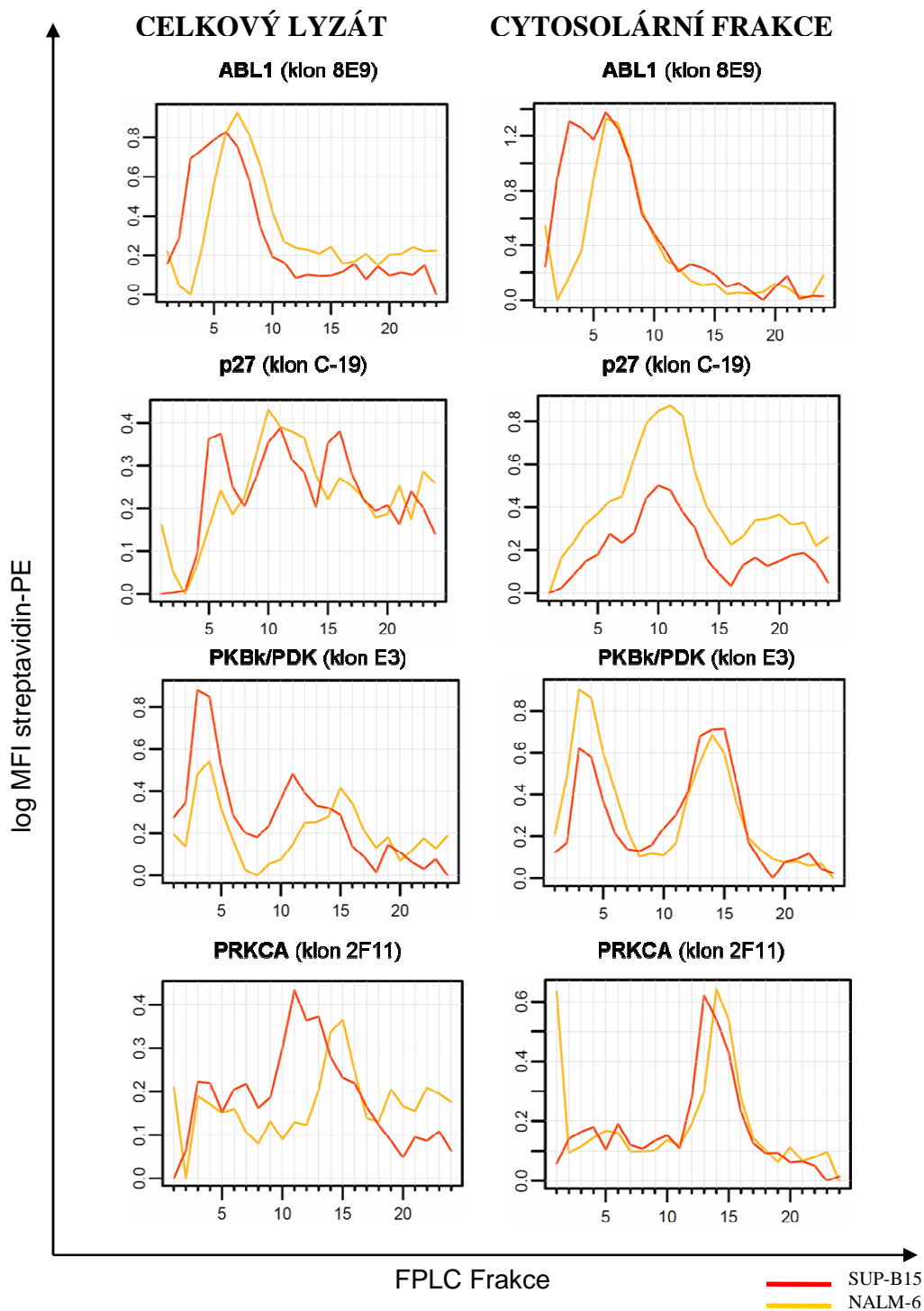
- a) na frakci obsahující proteiny z membrán a DNA vazebné proteiny (MEM frakce)
- b) na frakci obsahující proteiny z organel a z cytosolu (CYTO frakce)

použitím detergentů Tween 20 o cílové koncentraci 0,1% (v/v) a laurylmaltosidu (LM) o výsledné koncentraci 1% (w/v).

Porovnání výsledků plného buněčného lyzátu (TOTAL) a cytosolární frakce je ukázáno na obr. 4.1. (str. 49) na *BCR-ABL1* pozitivní linii SUP-B15 (exprimuje protein ABL1 a fuzní protein BCR-ABL1) a linii NALM-6 (exprimuje pouze protein ABL1). Protilátkou proti ABL1 (klon 8E9) detekujeme v CYTO frakci buněčné linie SUP-B15 dva vrcholy (první ve 3. FPLC frakci odpovídající fuznímu proteinu BCR-ABL1 a druhý v 6. FPLC frakci

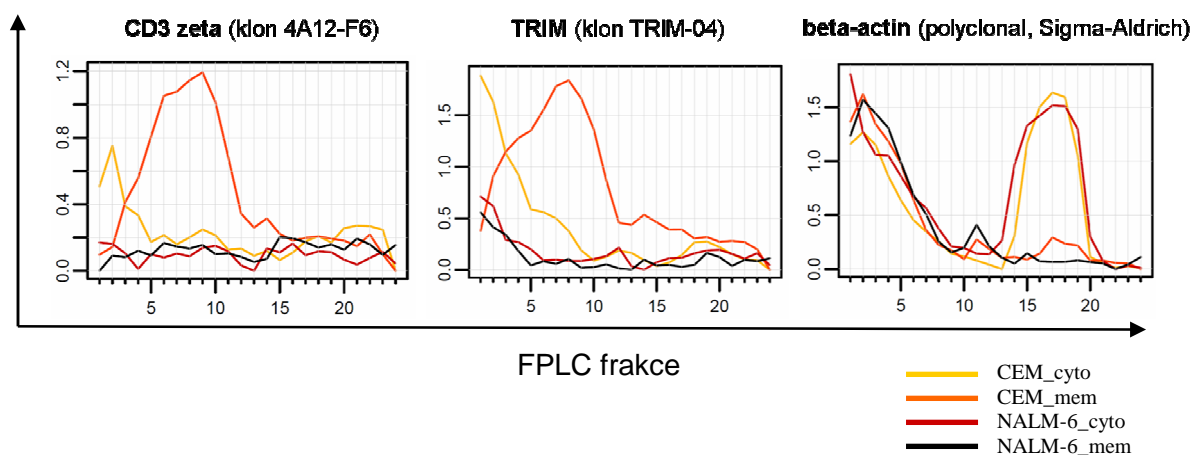
odpovídající kinase ABL1). V případě použití celkového buněčného lyzátu buněk SUP-B16 vrcholy splývají (5.FPLC frakce a její okolí), proto nelze jednoznačně určit a kvantifikovat jednotlivé detekované proteiny. Rozdělení proteomu na dvě subcelulární frakce tedy zlepšuje rozlišení mezi proteinem BCR-ABL1 a proteinem ABL1 a usnadňuje následnou detekci a kvantifikaci exprese proteinu ABL1. Výrazné rozdíly v rozlišení signálů vidíme i u jiných testovaných proteinů (např. p27 (CDKN1B) - 10. FPLC frakce, PKBk -14. FPLC frakce, PRKCA - 14. FPLC frakce).

V celkových buněčných lyzátech jsou signály nejednoznačné, dochází k překrytí dvou signálů, případně ke snížení intenzity signálu. Rozdělení proteomu na dvě subcelulární frakce zlepšilo kvalitu signálu, snížilo nespecifické interakce a umožnilo kvantifikovat jednotlivé proteiny. Proto je vhodnější proteom rozdělit na min. dvě subcelulární frakce.



Obr. 4.1. Porovnání signálů proteinů ABL1, p27, PKBk, PRKCA z nerozdělených lyzátů (vlevo) a CYTO frakce (vpravo) linií NALM-6 (žlutě) a SUP-B15 (červeně). Na y ose log MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

Rozdělením proteomu na dvě subcelulární frakce navíc dokážeme určit lokalizaci proteinu v buňce (viz obr. 4.2.).

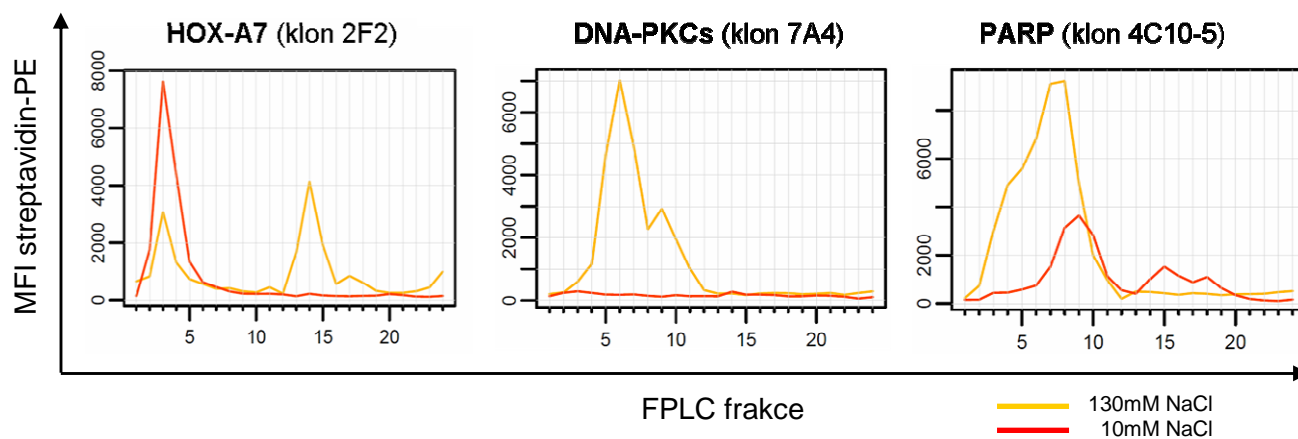


Obr. 4.2. Expres a lokalizace proteinů CD3 zeta, TRIM a  $\beta$ -aktin v CYTO a MEM frakci buněčných linií CEM a NALM-6. Na y ose log MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

Expres antigenu CD3 je spojovaná s membránou zralých T-lymfocytů.<sup>65</sup> U linie CEM (T-ALL) byla molekula CD3 detekovaná v MEM frakci (oranžově), v CYTO frakci vidíme pouze nescifický signál (3. FPLC frakce, žlutě). U linie NALM-6 (BCP-ALL) nebyla nalezena exprese CD3 ani v jedné frakci. Tyto poznatky se shodují s již dříve popsaným výskytem antigenu CD3, který je u zralých T-lymfocytů vázán na membránu a tudíž ho nedetekujeme ani v B-lymfocytární linii NALM-6, ani v cytosolární frakci linie CEM. Transmembránový protein TRIM (z angl. T-cell receptor interacting molekule) se vyskytuje výhradně v membráně T-lymfocytů a tvoří komplex s TCR a CD3 zeta, což vede k indukci mobilizace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů po aktivaci T-lymfocytů.<sup>66</sup> Protein TRIM byl u linie CEM detekován v MEM frakci (8. FPLC frakce, oranžově), v CYTO subcelulární frakci byl nalezen pouze nescifický signál (1. FPLC frakce, žlutě). U B-lymfocytární linie NALM-6 nebyl detekován žádný signál proteinu TRIM ani v jedné frakci, což odpovídá již popsanému jevu výhradní exprese molekuly TRIM na T-lymfocytech. Protože je TRIM protein v komplexu s molekulou CD3 zeta, mají křivky obou proteinů podobný průběh (vrchol o podobném tvaru ve stejné FPLC frakci v membránách T-ALL linie CEM).  $\beta$ -aktin patřící do rozsáhlé rodiny aktinů je cytosolární protein, který se po polymerizaci vyskytuje v cytoskeletu.<sup>67</sup>  $\beta$ -aktin se účastní mnoha buněčných procesů (pohyb, fagocytosa, cytokineze a mitosa) a je exprimován napříč různými tkáněmi.<sup>67</sup> Právě proto je velmi často využíván při detekci rozličných proteinů jako kontrola metody či nanášky. U linií CEM i NALM-6 byl  $\beta$ -aktin detekován v CYTO

subcelulární frakci (17. FPLC frakce, žlutě a červeně) V MEM frakci byl zaznamenán pouze nespecifický signál protilátky (2. FPLC frakce, žlutě, oranžově, červeně i černě).

Jelikož při subcelulární frakcionaci získáváme kromě cytosolární frakce i frakci membrán a DNA vazebných proteinů, byl studován i vliv iontové síly použitého lyzačního pufru. Optimální podmínky pro interakce DNA - protein jsou při nízké iontové síle (10mM-40mM fosfátový pufr), zvýšením iontové síly dochází k narušení těchto vazeb a k efektivnější extrakci DNA vazebných proteinů.<sup>68</sup> Po lyzaci buněk v lyzačním pufru s přidavkem 130mM NaCl dochází k výrazně lepší extrakci DNA vazebných proteinů (Obr. 4.3.) oproti použití lyzačního pufru s 10mM NaCl.



Obr. 4.3. Porovnání izolace DNA vazebných proteinů HOX-A7, DNA-PKCs a PARP pomocí lyzačního pufru s 130mM NaCl (žlutě) a 10mM NaCl (červeně) buněčné linie NB-4. Na y ose MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

Použitím lyzačního pufru s 130mM NaCl dále pravděpodobně došlo k potlačení nespecifických interakcí antigen – protilátka (pokles maxima signálu v 3. FPLC frakci proteinu HOX-A7). HOX-A7 (14. FPLC frakce) patří mezi DNA vazebné transkripční faktory, které hrají klíčovou roli v hematopoéze a diferenciaci.<sup>69</sup> Diferenciální exprese *HOX* genů může odrážet genetické subtypy akutních lymfoblastických leukemií, je tedy velice důležité používat experimentální přístup zachycující jejich expresi.<sup>70</sup> Protein kinasa DNA-PKCs (6. FPLC frakce) je také DNA vazebný enzym, který působí jako senzor zlomu na dvojvláknové DNA a svou katalytickou aktivitou napomáhá poškozenou DNA opravovat.<sup>71</sup> Enzym poly(ADP-ribosa) polymerasa (PARP, 7-9. FPLC frakce) katalyzuje poly(ADP-ribosyl)aci řady jaderných proteinů, jako substrát využívá  $NAD^+$ .<sup>72</sup> Tento DNA vazebný

enzym je aktivován vazbou na DNA nebo na zlomy vláken a předpokládá se, že přispívá k buněčné smrti štěpením  $\text{NAD}^+$  a ATP.<sup>72</sup> Všechny uvedené příklady DNA vazebných proteinů ukazují, že teprve zvýšením iontové síly (např. použitím 130mM NaCl) při lyzaci buněk jsme schopni zachytit přítomnost těchto diagnosticky důležitých znaků v MEM subcelulární frakci.

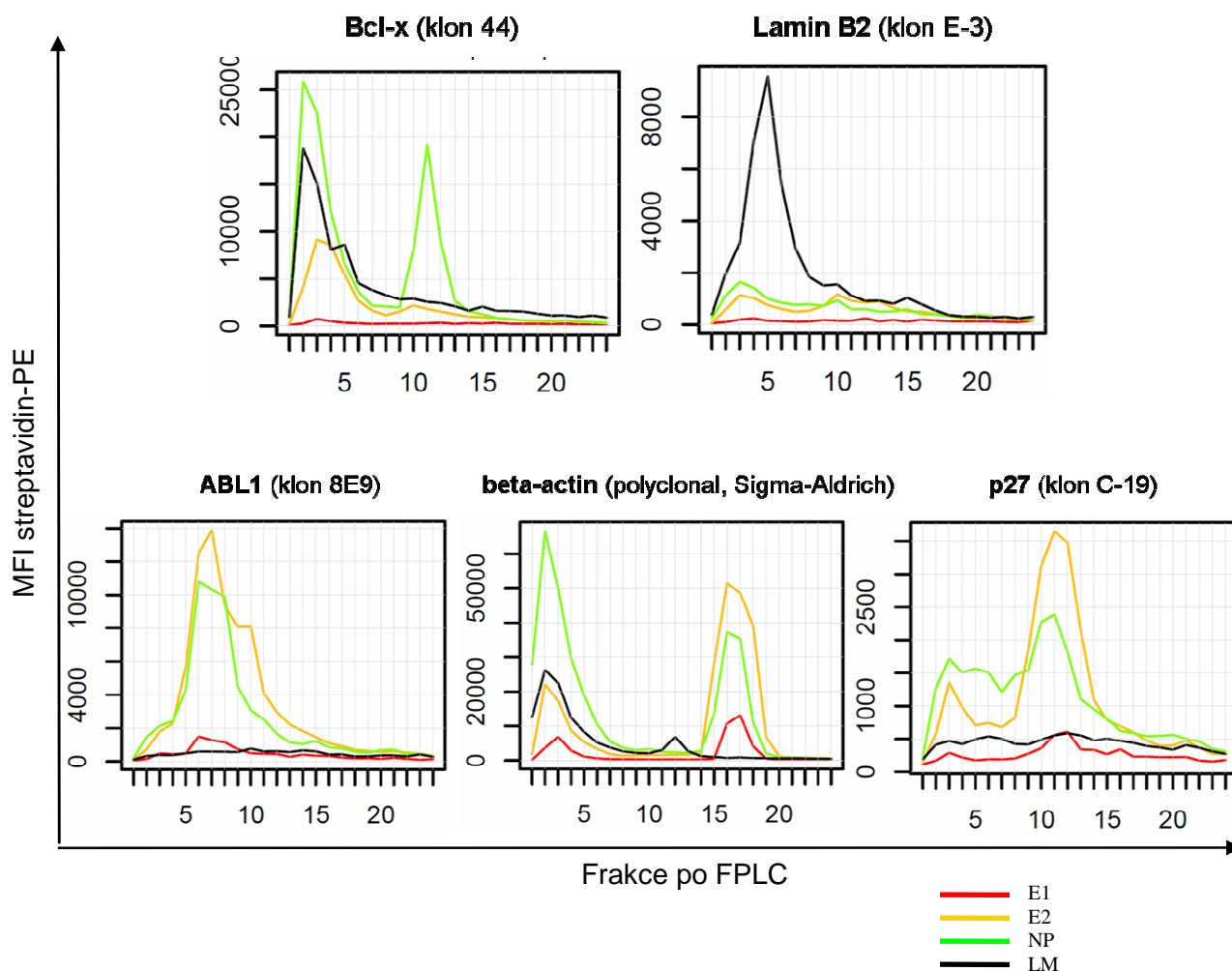
#### **4.1.2. Rozdělení proteomu na 4 subcelulární frakce s použitím detergentů**

##### **Escin, Nonidet P-40 a Laurylmaltosid**

Protože se frakcionací buněčného lyzátu na dvě subcelulární frakce kvantitativně i kvalitativně zlepšila identifikaci jednotlivých prognostických znaků, rozšířili jsme předseparaci tohoto lyzátu na 4 subcelulární frakce:

- a) na frakci obsahující pouze cytosolární proteiny (E1)
- b) na frakci obsahující proteiny z organel jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát atd. (E2)
- c) na frakci obsahující proteiny z vnitřních membrán (NP)
- d) na frakci obsahující jaderné proteiny a proteiny z vnějších membrán (LM)

Takové rozdělení lyzátu by bylo vhodné zejména pokud souvisí patologie jednotlivých proteinů s jejich subcelulární lokalizací. Příklady proteinů, které jsou po frakcionaci lokalizovány v jednotlivých buněčných frakcích, jsou uvedeny na obr. 4.4. (str. 53). Přestože se nám podařilo lokalizovat některé proteiny pouze v určitých, pro ně typických, buněčných kompartmentech (např. Bcl-x protein z mitochondriální membrány<sup>73</sup> - 11. FPLC frakce, jaderný lamin B1<sup>74</sup> - 5. FPLC frakce), celkově frakcionace proteomu na 4 frakce nepřinesla očekávané výsledky. Cytosolární proteiny ABL1<sup>74</sup> a  $\beta$ -aktin<sup>67</sup>, které by se měly vyskytovat pouze ve frakci E1 (červeně) byly nalezeny ve frakci E2 (žlutě). Protein p27 lokalizovaný v buněčném cytosolu<sup>75</sup>, jádře<sup>75</sup> a endosomech<sup>76</sup> se nevyskytuje v jaderné (LM, černě) ani v cytosolární (E1, červeně) frakci. Na základě těchto neuspokojivých výsledků byl pro další experimenty použit postup, který předseparoval buněčný lyzát pouze na dvě subcelulární frakce.



Obr. 4.4. Rozdělení proteomu linie NALM-6 na 4 frakce (E1 červeně, E2 žlutě, NP zeleně, LM černě). Na y ose MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

## 4.2. Validace multiplexní sady protilátek

Vzhledem k tomu, že je multiplexní sada protilátek v tomto rozsahu novou metodou, bylo potřeba ji validovat. K tomu byly použity dva způsoby:

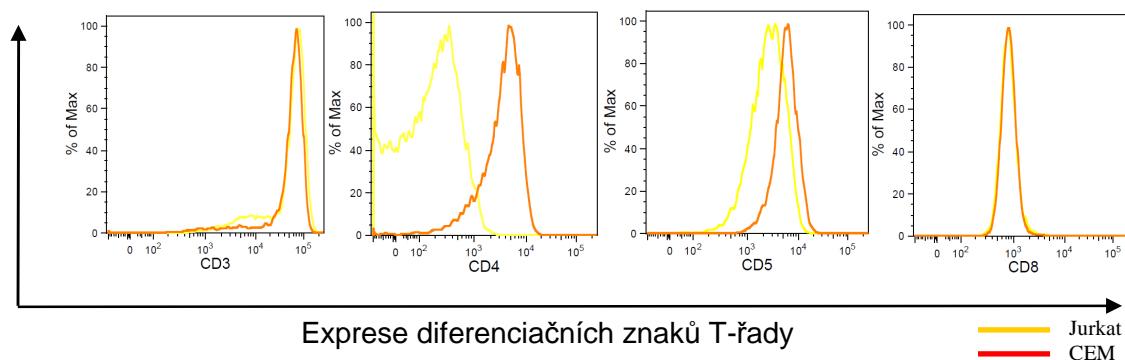
- Porovnáním dat z naší multiplexní sady protilátek s imunofenotypizací měřenou na průtokovém cytometru (FC), který je standardně používán v klinické praxi. Tuto validaci jsme provedli na 11-ti leukemických liniích (viz kapitola 4.2.1.).
- Sledováním změn v expresi proteinů čtyř BCR-ABL1 pozitivní buněčných linií po inhibici fuzního proteinu BCR-ABL1 malý molekulárním inhibítorem, běžně používaným léčivem, imatinib mesylátem (Glivecem) (viz kapitola 4.2.2.).

## 4.2.1. Porovnání imunofenotypu stanoveným průtokovou cytometrií (FC) a multiplexní sadou protilátek

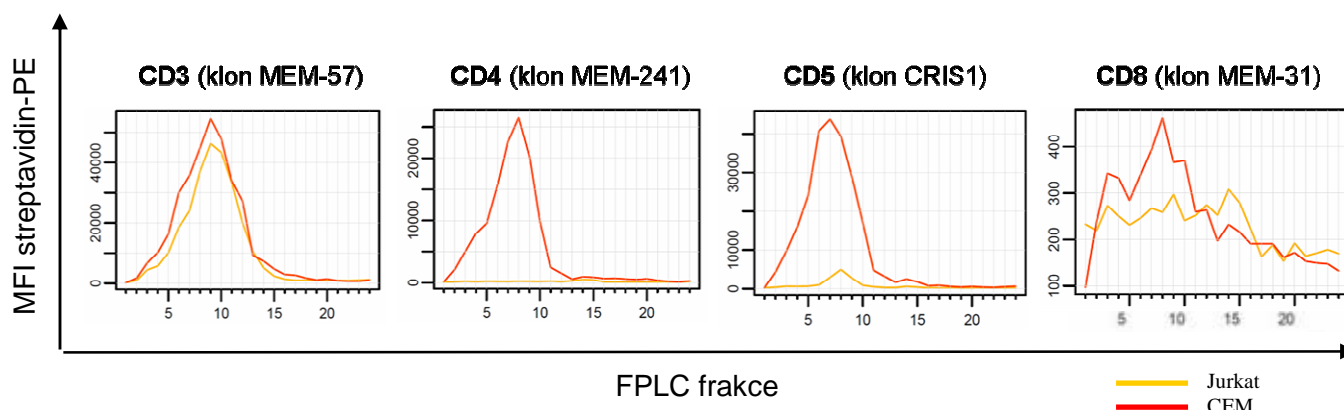
### 4.2.1.1. Data z multiplexní sady protilátek pro znaky asociované s T-buněčnou vývojovou linií

Mezi diferenciační znaky T-řady patří zejména antigeny CD3, CD4, CD5 a CD8. Obě T-ALL buněčné linie (Jurkat i CEM) exprimují molekulu CD3 se srovnatelnou expresí, jak ilustrují výsledky imunofenotypizace na FC (Obr. 4.5., str. 55) i multiplexní sady protilátek (Obr. 4.6., str. 55). Přítomnost znaku CD3 prokázána vazbou protilátky na buňky je na FC vyjádřena získáním hodnoty MFI (medián intenzity fluorescence)  $10^5$  u obou buněčných linií. Pozitivní výskyt molekuly CD3 naší technikou ilustrují výskyty maxima v 8.FPLC frakci u obou buněčných linií. Ani jedna z těchto linií neexprimuje antigen CD8, což prokazujeme opět oběma metodami. Antigen CD8 jsme na průtokovém cytometru měřili protilátkou anti-CD8 konjugovanou s fluorochromem Pacific Blue, který má emisní maximum ve fialové části světelného spektra (450nm). V této oblasti mají měřené buňky vyšší autofluorescenci, proto jsme obdrželi signál MFI až blízko  $10^3$  (vyjádřeno jako MFI anti-CD8 - Pacific Blue) (Obr. 4.5., str. 55), což odpovídá absenci molekuly CD8. Signál získaný naší metodou (Obr. 4.6., str. 55) dosahuje hodnot stovek MFI streptavidinu-PE ve všech FPLC frakcích, což odpovídá signálu pozadí a tudíž nepřítomnosti antigenu CD8. Metoda FC i náš přístup tak potvrdil absenci CD8 na obou buněčných liniích. Buněčná linie CEM, narozdíl od linie Jurkat, exprimuje molekulu CD4, což opět potvrdili obě použité metody imunofenotypizace. Obě buněčné linie se také liší expresí molekuly CD5, buněčná linie CEM exprimuje CD5 řádově více než buněčná linie Jurkat. FC zachytila signifikantní rozdíl obdržení signálu (MFI anti-CD5: (i) CEM:  $10^4$ , (ii) Jurkat:  $5 \times 10^3$ ), podobně jako naše metoda (MFI streptavidin-PE: (i) CEM:  $5 \times 10^4$ , (ii) Jurkat:  $5 \times 10^3$ ). Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že výsledky naší metody kvantitativně i kvalitativně odpovídaly získaným hodnotám na FC.





Obr. 4.5. Expresse diferenciačních znaků T-řady (CD3, CD4, CD5 a CD8) na T-ALL buněčných liniích CEM (oranžově) a Jurkat (žlutě) stanovená imunofenotypizací na průtokovém cytometru. Na x ose MFI fluorescenčně konjugovaných protilátek proti znakům CD3, CD4, CD5, CD8, na y ose podíl buněk v %.

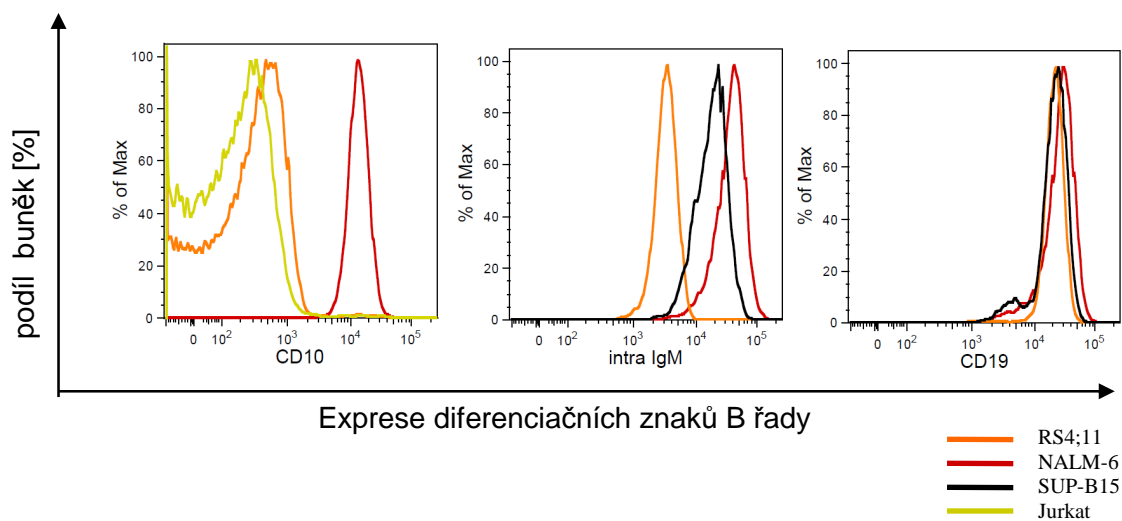


Obr. 4.6. Expresse diferenciačních znaků T-řady (CD3, CD4, CD5 a CD8) na T-ALL buněčných liniích CEM (oranžově) a Jurkat (žlutě) stanovená pomocí multiplexní sady protilátek. Na y ose MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

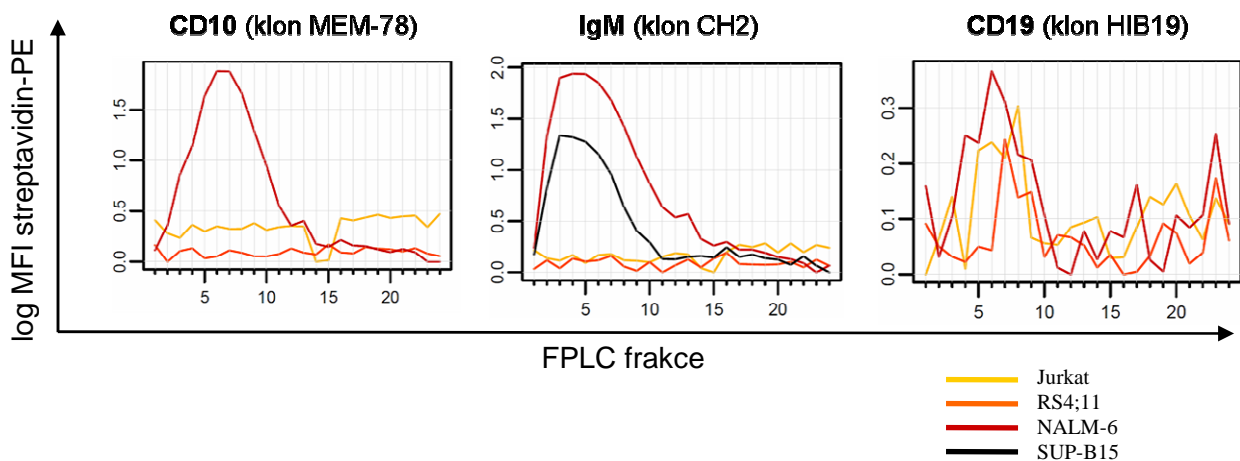
#### 4.2.1.2. Data z multiplexní sady protilátek pro znaky asociované s B-buněčnou vývojovou linií

Mezi diferenciační znaky B-řady patří zejména CD10, CD19 a povrchový nebo intracelulární imunoglobulin M (IgM). Znak CD10 exprimuje pouze linie NALM-6, na výsledku standardně užívané FC imunofenotypizace (obr. 4.7., str. 56) je vidět pozitivní signál MFI u NALM-6 kolem  $2 \times 10^4$ , ostatní linie vykazují signál MFI kolem  $8 \times 10^2$ , resp.  $5 \times 10^2$ , který odpovídá autofluorescenci buněk, tedy negativně pro daný znak. Podobně naše metoda (Obr. 4.8., str. 57) vykazuje maximum pouze pro buněčnou linii NALM6 (log MFI streptavidinu-PE 1,5) oproti hladině pozadí získané u ostatních testovaných buněčných linií. Buněčná linie NALM-

6 exprimuje nejvíce IgM, nižší expresi IgM vykazuje buněčná linie SUP-B15 a buněčná linie RS4;11 IgM neexprimuje vůbec, jak opět ilustrují výsledky získané pomocí obou imunofenotypových metod. Při intracelulárním značení antigenů pomocí FC vykazují používané protilátky vyšší nespecifickou vazbu, proto u linie RS4,11 (Obr. 4.7., oranžově) vyjadřuje absenci proteinu IgM signál MFI o hodnotě  $10^3$  (vyjádřeno jako MFI anti-intra IgM - FITC). Pozitivní signál je vyjádřen hodnotou  $10^4$  -  $10^5$  u buněčných linií NALM-6 a SUP-B15. Naše metoda tedy poskytuje hodnoty, které kvantitativně i kvalitativně odpovídají standardně používané FC imunofenotypizaci. Všechny BCP-ALL linie (RS4;11, NALM-6 i SUP-B15) mají vysokou expresi znaku CD19 měřeného pomocí FC (Obr. 4.7.) s použitím protilátky anti-CD19 (klon J3-119). Výsledky naší metody (multiplexní sady protilátek) jsou v tomto případě těžko interpretovatelné (viz vysoká hladina pozadí na Obr. 4.8., 57). To je pravděpodobně způsobeno nízkou afinitou protilátky anti-CD19 (klon HIB19). Experiment identifikace znaku CD19 na všech testovaných buněčných liniích bude nutné zopakovat s použitím protilátky anti-CD19 (klon J3-119).



Obr. 4.7. Expresie diferenciačních znaků B-řady (CD10, intracelulárního IgM a CD19) na B-ALL buněčných liniích RS4;11 (oranžově), NALM-6 (červeně), SUP-B15 (černě) a na T-ALL linii Jurkat (žlutě) stanovená imunofenotypizací na průtokovém cytometru. Na x ose MFI fluorescenčně konjugovaných protilátek proti znakům CD10, IgM, CD19, na y ose podíl buněk v %.

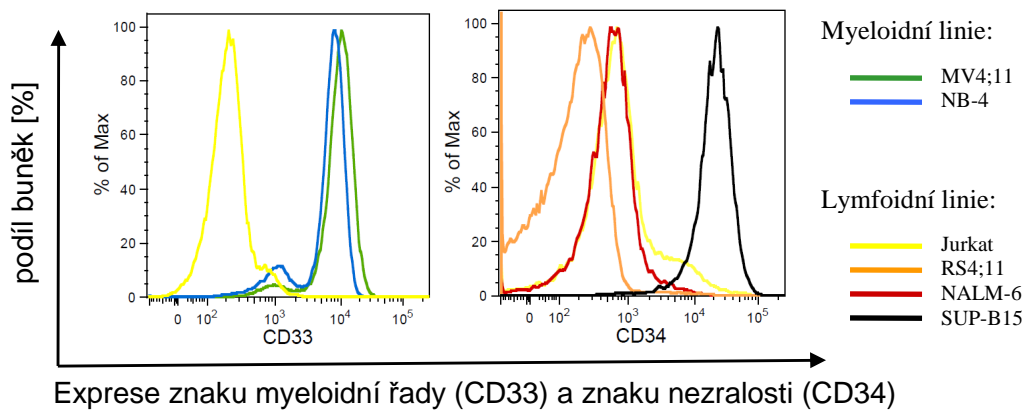


Obr. 4.8. Expresse diferenciačních znaků B-řady (CD10, intracelulárního IgM a CD19) na B-ALL buněčných liniích RS4;11 (oranžově), NALM-6 (červeně), SUP-B15 (černě) a na T-ALL linii Jurkat (žlutě) stanovená pomocí multiplexní sady protilátek. Na y ose log MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

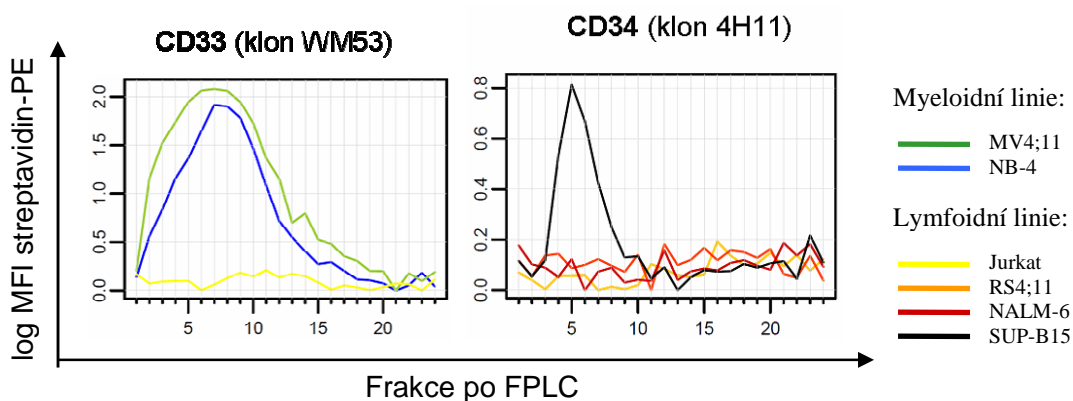
#### 4.2.1.3. Data imunofenotypizace pro znaky asociované s myeloidní vývojevou linií a znaky nezralosti

Jedním z hlavních diferenciačních znaků myeloidní řady je antigen CD33. Znak CD33 exprimují obě použité myeloidní linie MV4;11 i NB-4, což opět prokázaly obě použité metody imunofenotypizace (Obr. 4.9., str. 58 a Obr. 4.10., str. 58). Obě metody také shodně kvantitativně vyjádřily rozdílnou expresi CD33 u obou myeloidních linií: linie MV4;11 (zeleně) má vyšší expresi CD33 než linie NB-4 (modře).

Mezi nejdůležitější diagnostické znaky určující stádium hematopoetických progenitorů patří povrchový membránový glykoprotein CD34, který je znakem nezralých buněk.<sup>77,78</sup> Přítomnost antigenu CD34 v buněčné linii SUP-B15 jsme opět prokázali pomocí obou metod imunofenotypizace (hodnota signálu zjištěného pomocí FC: MFI anti-CD45-PC5.5 =  $2 \times 10^4$ , hodnota signálu zjištěná pomocí multiplexní sady protilátek: log MFI streptavidinu-PE = 0,8). Všechny ostatní linie byly negativní na přítomnost tohoto antigenu. Rozdíl mezi získanými hodnotami u buněčné linie RS4;11 ( $3 \cdot 10^3$ ) a u buněčných linií NALM-6 a Jurkat ( $10^3$ ) stanovený FC je dán vysokou autofluorescencí buněčných linií NALM-6 a Jurkat ve srovnání s buněčnou linií RS4;11. Jak je vidět na Obr. 4.10. (str. 58), u naší metody lze, díky možnosti použití semi-automatického odečtení pozadí, normalizovat získané výsledky a tak zjednodušit interpretaci

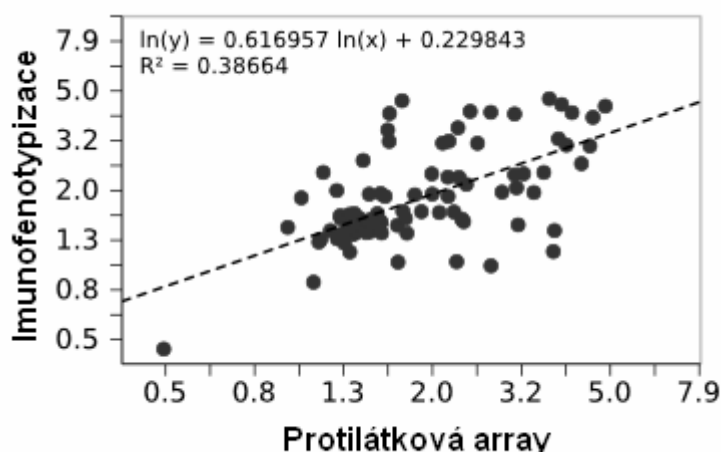


Obr. 4.9. Expresce diferenciálních znaků myeloidní řady (CD33) a znaku progenitorů (CD34) na myeloidních liniích MV4;11 (zeleně), NB-4 (modře), BCP-ALL buněčných liniích RS4;11 (oranžově), NALM-6 (červeně), SUP-B15 (černě) a na T-ALL linii Jurkat (žlutě) stanovená imunofenotypizací na průtokovém cytometru. Na x ose MFI fluorescenčně konjugovaných protilátek proti znakům CD33 a CD34, na y ose podíl buněk v %.



Obr. 4.10. Expresce diferenciálních znaků myeloidní řady (CD33) a znaku progenitorů (CD34) na myeloidních liniích MV4;11 (zeleně), NB-4 (modře), BCP-ALL buněčných liniích RS4;11 (oranžově), NALM-6 (červeně), SUP-B15 (černě) a na T-ALL linii Jurkat (žlutě) stanovená multiplexní sady protilátek. Na y ose log MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

Na Obr. 4.11. (str. 59) je vyjádřena korelace devíti diagnostických znaků měřených na FC s daty získanými naší technikou. Body kolem regresní přímky představují antigeny u dané linie, kde obě metody detekovaly stejně vysokou úroveň exprese. Data získaná pomocí obou použitých metodických postupů vzájemně dobře korelují. Nicméně některé protilátky v naší použité multiplexní sadě protilátek mají vysokou nespecifitu či nízkou afinitu, jak jsme prokázali například u anti-CD19 (klon HIB19), a bude potřeba je nahradit jinými klony.

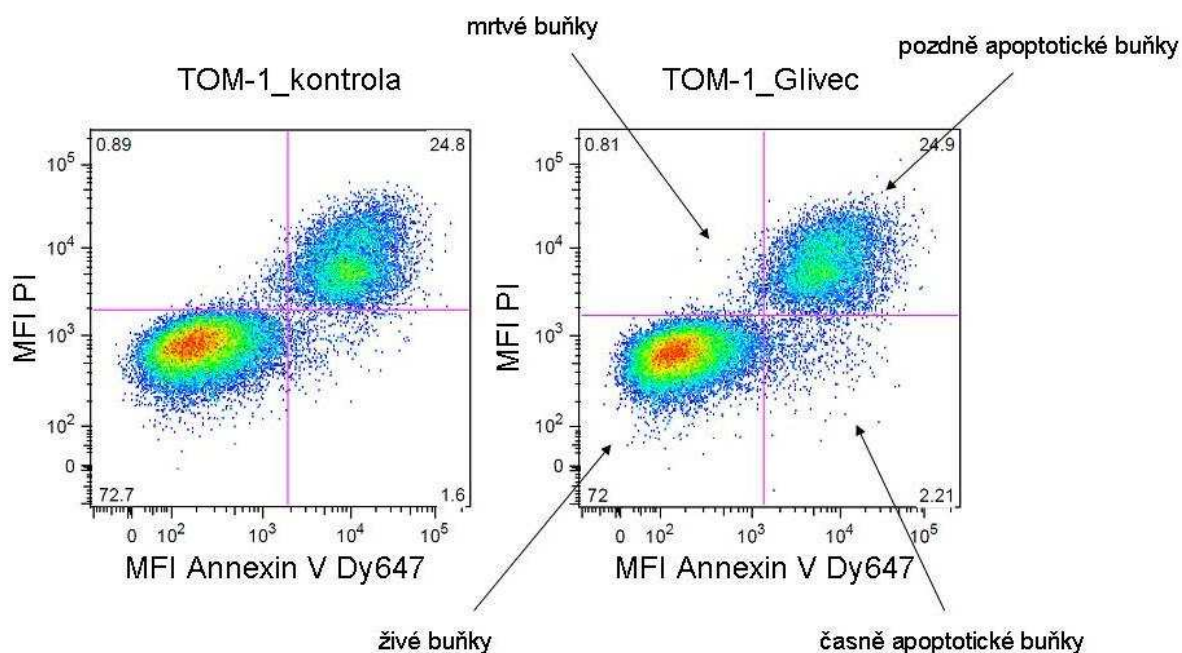


Obr. 4.11. Korelace exprese znaků CD33, CD34, CD38, CD44, CD45, CD58, CD7, HLA-DR a IgM stanovené imunofenotypizací a pomocí multiplexní sady protilátek na buněčných liniích REH, NALM-6, SUP-B15, TOM-1, Jurkat, K562, CEM, RS4;11, NALM-24, NB-4, MV4;11. Na y ose log MFI fluorochromu konjugovaném s danou protilátkou, na x ose log MFI streptavidinu-PE (data zpracoval K. Fišer).

#### 4.2.2. Inhibice *BCR-ABL1* pozitivních buněk imatinib mesylátem (Glivecem)

Dalším cílem validace metody multiplexní sady protilátek bylo zjistit, zda metoda citlivě zachycuje změny prognostických znaků v proteomu leukemických buněk. K tomuto účelu bylo vybráno léčivo imatinib mesylát (Glivec) o finální koncentraci 10 $\mu$ M, se známým způsobem účinku. Glivec se reverzibilně váže na fuzní protein BCR-ABL1, tato kinasa je následně defosforylována, inhibována, buněčný cyklus se zastavuje a buňky směřují do apoptosy.<sup>62</sup> Změny proteomu po inhibici Glivecem byly studovány na čtyřech buněčných liniích (BV-173, K562, SUP-B15 a TOM-1), u nichž jsou tyto změny popsány a mohou tak sloužit pro důslednou validaci naší metody. Po inkubaci léčiva s buněčnými liniemi po dobu 24h v 37°C a 5% CO<sub>2</sub> jsme stanovili procento apoptotických a živých buněk pomocí fluorescenčně značeného Annexinu V. a propidium jodidu (PI). Jedním presentovaným grafickým příkladem je nezměněné procentuálního zastoupení živých a apoptotických buněk po inhibici Glivecem buněčné linie TOM-1, která je na použité léčivo rezistentní (Obr. 4. 12.). Linie BV-173, K562 a SUP-B15 reagují na inhibice Glivecem výrazným snížením procenta živých buněk a vzrůstem procenta buněk v apoptose. Podíl časně apoptotických buněk mezi kontrolním a Glivecem inhibovaným vzorkem se u buněčných liniích BV-173 a SUP-B15

neliší, zvyšují se pouze podíly buněk v pozdní apoptotické fázi. U buněčné linie K562 byl po inhibici Glivecem zachycen procentuální nárůst populace buněk v časné apoptotické fázi společně se zvýšením procenta buněk v pozdně apoptotické fázi (Tabulka 4.1., str. 61). Jak již bylo řečeno u buněčné linie TOM-1 se procentuální zastoupení živých a apoptotických buněk po inhibici Glivecem nezměnilo a tato linie je na působení Glivecu rezistentní (Obr. 4. 12., Tabulka 4.1., str. 61).



Obr. 4.12. Detekce apoptosy u TOM-1 buněk po 24h inhibici Glivecem (vpravo) a kontrolních TOM-1 buněk (vlevo). Na ose x MFI Annexinu V-Dy647, na ose y MFI PI.

Tabulka 4.1. Procento živých, časně apoptotických, pozdně apoptotických a nekrotických buněk linií BV-173, K562, SUP-B15 a TOM-1 po 24h inhibici fuzního proteinu BCR-ABL1 Glivecem.

Buněčná linie	podíl živých buněk [%]	podíl časně apoptotických buněk [%]	podíl pozdně apoptotických buněk [%]	podíl nekrotických buněk [%]

BV-173	Kontrola	51,7	4,45	42,9	0,89
	Glivec	38,8	4,67	55,2	1,4
K562	Kontrola	54,7	1,85	42,8	0,64
	Glivec	19,1	9,27	67,5	4,06
SUP-B15	Kontrola	52,1	6,88	39,6	1,38
	Glivec	37,2	4,26	57,4	1,12
TOM-1	Kontrola	72,7	1,6	24,8	0,89
	Glivec	72	2,21	24,9	0,81

Po detekci určených apoptotických změn působením léčiva Glivec na buněčné linie jsme naši metodu validovali stanovením změn v expresi či posttranslační modifikaci (fosforylaci) proteinů zúčastněných v signalizační dráze pod kinasou BCR-ABL1, apoptose a mezibuněčné adhezivitě. Po inhibici Glivecem se snížila celková tyrosinová fosforylace buněčného proteomu u všech použitých buněčných linií a fosforylace proteinů (např. SLP-76) v signalizační dráze kinyasy BCR-ABL1 (Tabulka 4.2., str.62, příklady na Obr. 4.13., str.63) Protein. SLP-76 (LCP2, lymphocyte cytosolic protein 2) se nachází v signalizační dráze pod BCR-ABL1 kinasou, jeho působením dochází k remodelaci aktinu a následnému zvrásnění membrány.<sup>79</sup> Působením léčiva Glivec je také štěpen enzym PARP (poly(ADP-ribosa) polymerasa). U buněčných linií K562, BV-173 a SUP-B15 (na rozdíl od buněčné linie TOM-1) dochází k nárůstu koncentrace štěpeného PARP (Obr. 4.13., str.63). Štěpený PARP je znakem apoptotizujících buněk.<sup>72</sup> Buněčná linie TOM-1 je rezistentní na inhibici léčivem Glivec, data jsou v souladu s určením nezměněné apoptosy pomocí Annexinu V. a PI (Obr. 4.13., str.63). Mechanismem působení DNA vazebného enzymu PARP, který stanovujeme, je vazba a detekce zlomů na DNA s následným vysláním signálu a k aktivaci reparačního programu nebo apoptosy.<sup>80</sup> V pozdějších stádiích apoptosy je PARP štěpen caspasou-3 nebo caspasou-7 na dva fragmenty o velikosti 89kDa a 24kDa, které obsahují aktivní centrum, respektive DNA vazebnou doménu, a tím je inaktivován.<sup>72,80</sup> Toto štěpení zabraňuje nekrose během apoptosy, aby nedošlo k zánětu.<sup>80</sup> Mezi další proteiny, u kterých se mění hladina exprese po inhibici Glivecem, patří např. CD18, LAT2 a CDKN1A (Tabulka 4.2., Obr. 4.13., str. 63). Antigen CD18 je důležitá adhezivní molekula, která patří do rodiny  $\beta$ 2 integrinů. Integriny jsou heterodimerické transmembránové povrchové receptory, které zprostředkovávají mnoho interakcí (např. interakce buňka-buňka nebo buňka-matrix).<sup>81</sup> Takové interakce jsou důležité v různých procesech, jako je např. imunitní funkce, trombosa a morfogeneze.<sup>81</sup> LAT2 (neboli NTAL) je transmembránový adaptorový protein, který hraje klíčovou roli v signalizaci povrchových receptorů B-lymfocytů, monocytů a NK buněk.<sup>82</sup>

Posledním zmíněným proteinem je molekula CDKN1A (p21), která inhibicí cyklin dependentních kinas způsobuje zastavení buněčného cyklu ve fázi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.<sup>83</sup> Ve všech sledovaných liniích došlo po inhibici Glivecem ke zvýšení exprese tohoto proteinu, který zastavuje buněčnou proliferaci. V Tabulce 4.2. jsou uvedeny změny exprese či fosforylace dalších proteinů, které se účastní buněčné proliferace (CDKN2D, FOS atd.), mají proonkogenní účinek (AFF1) nebo jsou součástí dalších intracelulárních signálních drah, např. Wingless signální dráhy (LEF1)

Tabulka 4.2. Přehled proteinů, jejichž exprese (či fosforylace) se změnila 2krát (vyznačeno tučně) alespoň u dvou použitých linií po inhibici fuzního proteinu BCR-ABL1 imatinib mesylátem (Glivecem), v pravém sloupci uveden buněčný proces, kterého se daný protein účastní. (data zpracoval T.Kalina)

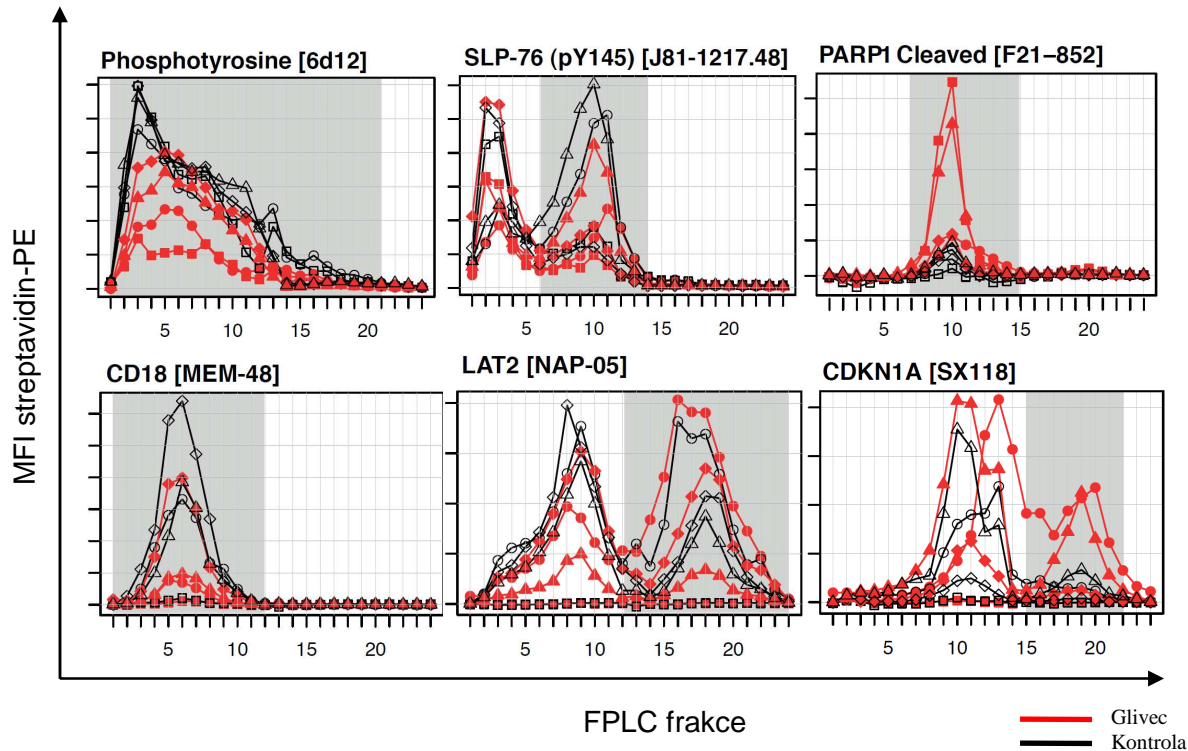
protein	TOM-1	K562	BV-173	SUP-B15	čeho se účastní?
phospho-tyrosine	<b>DOWN</b>	<b>DOWN</b>	DOWN	DOWN	BCR-ABL1 signální dráha
SLP-76_pY128	<b>DOWN</b>	<b>DOWN</b>	DOWN	DOWN	BCR-ABL1 signální dráha
RASA1	<b>DOWN</b>	DOWN	DOWN	<b>DOWN</b>	BCR-ABL1 signální dráha
PARP1_cleaved	unchanged	<b>UP</b>	<b>UP</b>	<b>UP</b>	apoptosa
CD18( ITGB2)	<b>DOWN</b>	unchanged	DOWN	<b>DOWN</b>	adheze
LAT2	unchanged	<b>DOWN</b>	UP	<b>DOWN</b>	Adaptorový protein
CDKN1A	<b>UP</b>	<b>UP</b>	<b>UP</b>	<b>UP</b>	proliferace
CDKN2D	unchanged	<b>DOWN</b>	<b>UP</b>	DOWN	proliferace
E2F1	<b>DOWN</b>	<b>DOWN</b>	UP	DOWN	proliferace
FOS	<b>DOWN</b>	DOWN	DOWN	<b>DOWN</b>	proliferace
TTK	DOWN	<b>UP</b>	<b>UP</b>	unchanged	proliferace
AFF1	<b>DOWN</b>	UP	<b>DOWN</b>	unchanged	protoonkogen, transkripční faktor
LEF1	DOWN	<b>UP</b>	<b>UP</b>	DOWN	WNT/Wingless signální dráha

UP - zvýšená exprese/fosforylace, DOWN - snížená exprese/fosforylace, unchanged - beze změny v expresi/fosforylaci

Výsledky tohoto experimentu jednoznačně prokázaly, že metoda multiplexní sady protilátek je schopná zachytit změny exprese či posttranslační modifikace (např. fosforylace) jednotlivých proteinů při buněčném ději. Změny exprese (či posttranslační modifikace) jednotlivých proteinů navíc můžeme studovat v multiplexním provedení během jednoho experimentu, což poskytuje značnou výhodu aplikace této metody. Takovým příkladem komplexního pohledu na změny celého proteomu je chování buněčné linie TOM-1 v přítomnosti léčiva Glivec. Přestože je buněčná linie TOM-1 rezistentní vůči apoptotickému



signálu, jak ukazuje nezměněná hodnota exprese štěpeného PARP proteinu (Tabulka 4.2., str. 62), po působení léčiva Glivec se její proteinový profil mění a mohou tak být zachyceny další probíhající buněčné procesy. Tyto změny postihují především proteiny asociované se signalizační dráhou kinasy BCR-ABL1, změny v buněčném cyklu a změny související s adhezivitou buněk, které nejsou důsledkem štěpení proteinů při apoptose.

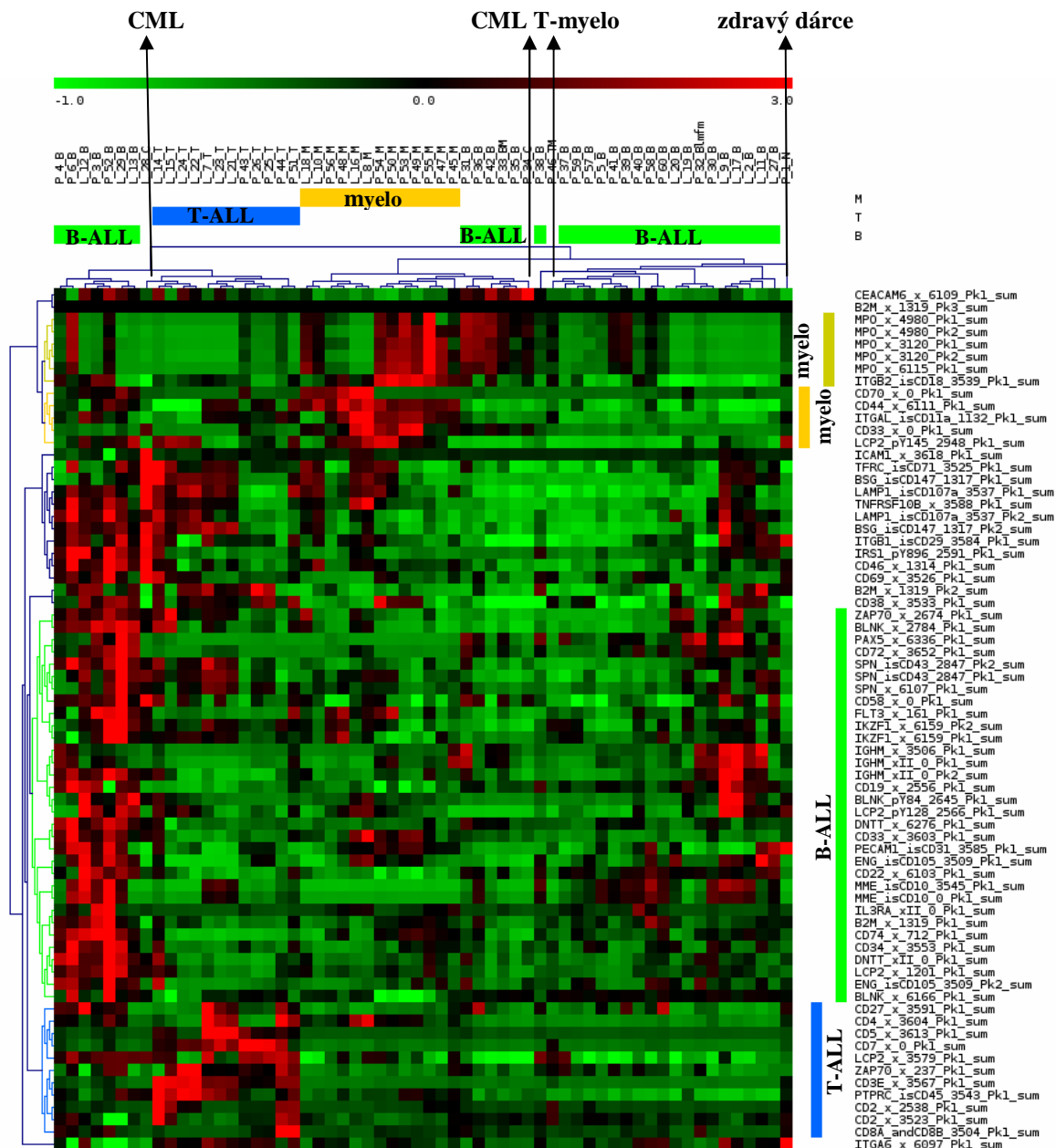


Obr. 4.13. Příklad proteinů, jejichž exprese (nebo fosforylace) se změnila 2krát alespoň u dvou použitých linií po inhibici fuzního proteinu BCR-ABL1 imatinib mesylátem (Glivecem). Kontrolní vzorky černě, Glivecem inhibované vzorky červeně. Na y ose MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24. Čárové grafy vytvořil J. Stuchlý, v hranaté závorce uveden klon protilátky.

### 4.3. Rozlišení typů leukemií pomocí multiplexní sady protilátek

Jelikož se nám podařilo úspěšně validovat pomocí dvou přístupů naši metodu multiplexní sady protilátek, použili jsem ji následně k imunofenotypové charakterizaci 33 patientských vzorků, u většiny z nich byla právě diagnostikovaná leukémie. Jednalo se o 21 BCP-ALL (z toho dvakrát relaps), pět T-ALL, jednu CML, pět AML a jeden B-buněčný lymfom. Čtyři

pacientské vzorky byly změřeny v duplikátu, v různých experimentech. Pro ověření kvality multiplexní sady protilátek jsme data patientských vzorků porovnali s daty leukemických linií (n=11, 5x duplikát, 2x triplikát, 1x tetraplikát). Všechna data byla zpracována K. Fišerem, včetně normalizace na kontrolní protein ( $\beta 2$  mikroglobulin) s následnou poloautomatickou detekcí vrcholů na čárovém grafu, která byla použita ke kvantifikaci proteinové exprese. Čísla vyjadřující plochu pod křivkou jednotlivých vrcholů pak byla pomocí programu MeV zobrazena na tzv. „heat-map“ (podobně jako DNA-expresní profily) a pomocí tzv. Pearson korelace byly jednotlivé vzorky sloučeny do korespondujících skupin (anglicky cluster analysis). Pomocí námi validované metody dobře odlišíme jednotlivé typy leukemií (Obr. 4.14., str. 65). Do jednotlivých skupin se podle klasických imunofenotypových kritérií řadí patientské vzorky a leukemické linie BCP-ALL, T-ALL a myeloidními leukemiemi. Vzhledem k tomu, že jsme měli k dispozici pouze jeden patientský vzorek CML (P\_34\_C) a jednu CML leukemickou linii (K562, L\_28\_C), tato skupina se neoddělila od ostatních myeloidních leukemií. Vzorky myeloidních leukemií jako jediné exprimují myeloidní znaky (např. CD33). Vzorky T-ALL se vyznačují expresí znaků CD2, CD3, CD4 a CD7. Vzorky BCP-ALL se odlišují tím, že neexprimují ani T-specifické ani myeloidní znaky a exprimují některé z B-specifických znaků, jako jsou např. B-specifický transkripční faktor Pax5, CD72 nebo CD19. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že námi validovaná nová metoda - multiplexní sada protilátek - je využitelná i pro zpracování klonických vzorků a tedy i pro diagnostiku a výzkum leukemií. Výhodou námi validované metody je zvýšení možností automatizace (např. FPLC) či semi-automatizace (např. zpracování výsledků) postupu s možností detekce 1152 znaků během jedné analýzy.

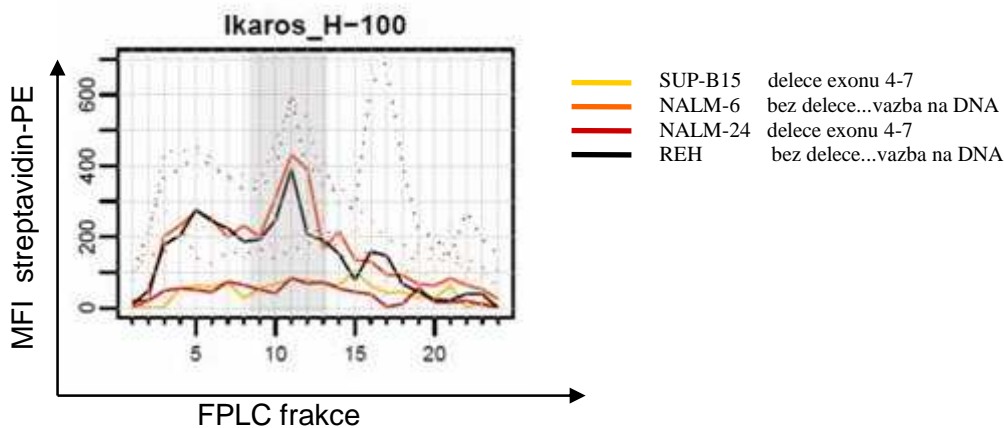


Obr. 4.14. „Heat-map“ zobrazující výběr dat z MEM frakcí patientských vzorků (n=37) a leukemických linií (n=22). Horizontálně jsou zobrazeny jednotlivé vzorky (P-pacientský vzorek, L-vzorek buněčné linie, N-vzorek lymfocytů a monocytů krve zdravého dárce, kvůli anonymizaci jsou vzorky pouze očíslované), vertikálně jsou zobrazeny vybrané měřené diagnostické znaky. Zelená barva udává, že daný znak v příslušném vzorku není detekován, červená barva znamená pozitivitu daného znaku. B (zelená skupina) = BCP-ALL, C = CML, T (modrá skupina) = T-ALL, M (oranžová a žluto-zelená skupina) = AML, BM = hybridní leukemie B-myelo, TM = hybridní leukemie T-myelo, Blmfm = B-buněčný lymfom.

#### 4.4. Detekce proteinu Ikaros

Posledním příkladem aplikace metodického přístupu multiplexní sady protilátek sledování exprese proteinu Ikaros. V posledních letech se ukazuje, že delece v genu *IKZF1* a následná exprese krátkých isoform mRNA a proteinu Ikaros, je významným prognostickým znakem leukemických buněk.<sup>84</sup> Krátké isoformy, které nemají DNA vazebnou doménu, se následně nedostanou do jádra a nemohou působit jako transkripční faktor. Protože je plánován projekt sledování exprese proteinu Ikaros u primárních vzorků akutních leukemií pomocí multiplexní sady protilátek a korelace těchto dat s výsledky změn na úrovni DNA a RNA (laboratoř molekulární genetiky, Jana Volejníková) bylo třeba ověřit, zda naše metoda je schopna tyto změny detekovat. Vzhledem k tomu, že máme k dispozici pouze jeden imunoprecipitující klon protilátky proti proteinu Ikaros (klon H-100), je nutné pomocí jiných proteomických metod ověřit, zda pomocí multiplexní sady protilátek skutečně sledujeme protein Ikaros a nejedná se pouze o nespecifitu dané protilátky.

Pomocí multiplexní sady protilátek jsme byli schopni detekovat protein Ikaros ve vybraných buněčných liniích akutních leukemií. Jednalo se o buněčné linie exprimující protein Ikaros v rozdílné formě: (i) bez delecí DNA vazebných domén (NALM-6, REH), (ii) s delecemi DNA vazebných domén (SUP-B15, NALM-24). Čárový graf (obr. 4.15.) ukazuje MEM frakce (které obsahují i DNA vazebné proteiny) všech buněčných linií.



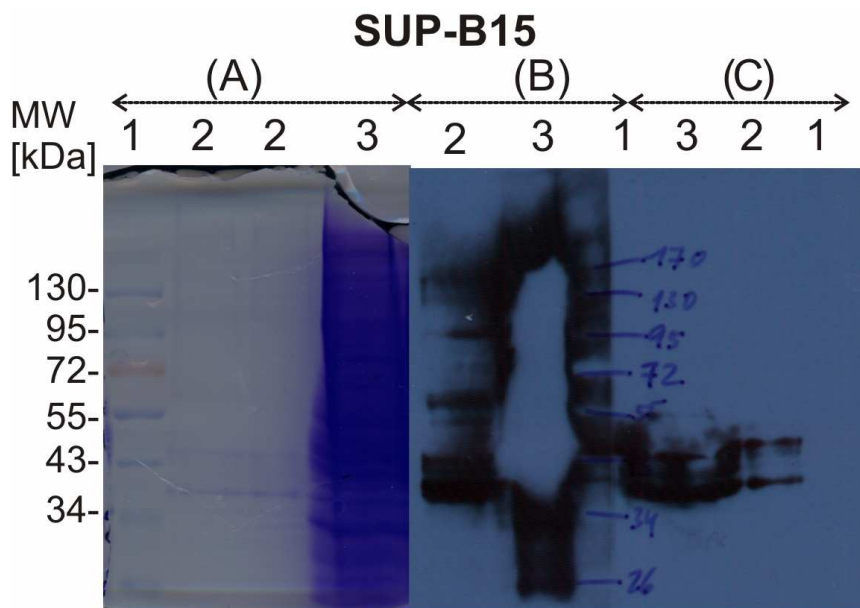
Obr. 4.15. Expresa proteinu Ikaros u čtyř leukemických linií v MEM subcelulárních frakcích (obsahující i DNA vazebné proteiny). SUP-B15 (žlutě), NALM-6 (oranžově), NALM-24 (červeně) a REH (černě). Tečkovaná linie vyjadřuje hladinu signálu před normalizací dat, plná linie vyjadřuje hladinu signálu po normalizaci. Na y ose MFI streptavidinu-PE, na x ose FPLC frakce 1-24.

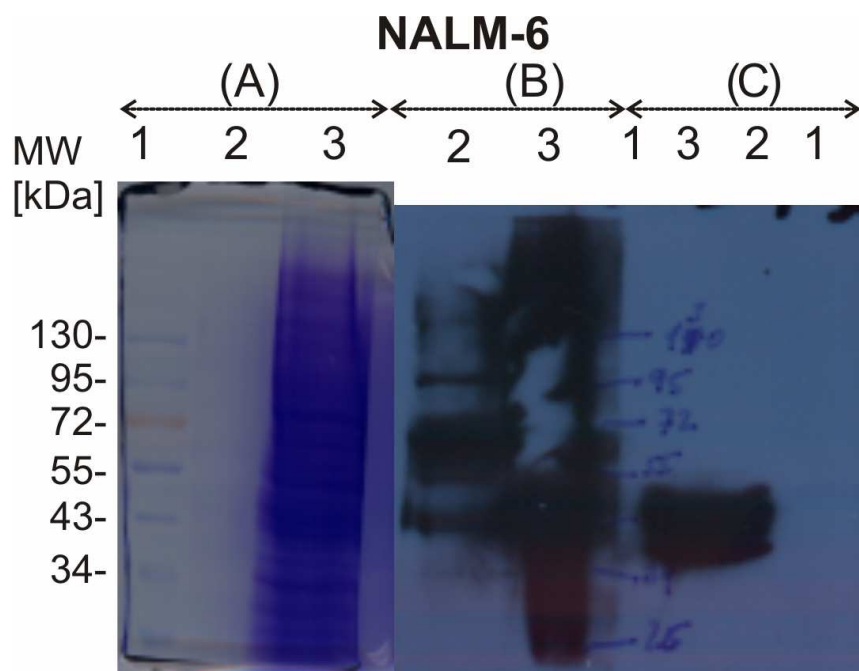
Pro buněčné linie NALM-6 a REH, které skutečně exprimují formy proteinu Ikaros schopné vazby DNA (Volejníková, nepublikované výsledky), nalézáme maximum v 11.FPLC

frakci. Proto jsme použili protilátku anti-Ikaros (klon H-100) na imunoprecipitaci a izolaci proteinu Ikaros z buněčných lyzátů dvou BCP-ALL buněčných linií NALM-6 (bez delece *IKZF1*) a SUP-B15 (s delecí *IKZF1*). Získané vzorky jsme rozdělili na akrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE a následně (a) přenesli na nitrocelulózovou (NC) membránu a vizualizovali pomocí ECL nebo (b) obarvili pomocí Coomassie Brilliant Blue R250

U linie SUP-B15 (obr. 4.16., str. 68) byl získán pozitivní signál imunodetekcí NC membrány po elektropřenosu proteinu o molekulové hmotnosti 40-45kDa v imunoprecipitátu z celkového lyzátu., který, podle výrobce protilátky klonu H-100, odpovídá proteinu Ikaros. Dále vidíme signál odpovídající 60kDa, který je nejspíš protein G z precipitujících kuliček a více drobnějších signálů s molekulovou hmotností 100-150kDa, které odpovídají imunoprecipitující protilátce anti-Ikaros klon H-100 a jejím případným fragmentům. V celém buněčném lyzátu bez imunoprecipitačního kroku byla pozorována vysoká nespecifita signálu, která může být způsobena i velkou nanáškou na SDS-PAGE a tedy špatným dělením proteinů. Naproti tomu buněčná linie NALM-6, která exprimuje proteiny Ikaros bez delecí DNA vazebných domén, byl nalezen silně pozitivní signál odpovídající molekulové hmotnosti 70kDa. Pro oba případy byla provedena i detekce proteinů pomocí protilátky proti aktinu, která prokázala částečnou kontaminaci imunoprecipitátu tímto proteinem.

Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 detekuje stejné signály, pouze v nižší míře, než vizualizace imunodetekcí (obr. 4.16. A, str. 68). V celkovém lyzátu buněk SUP-B15 vidíme nejsilnější signály kolem 43kDa, v celkovém lyzátu buněk NALM-6 jsou nejsilnější signály detekované kolem 70kDa. Proužky vizualizované pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 budou následně analyzovány na hmotnostním spektrometru.





Obr. 4.16. Porovnání barvení gelů roztokem Coomassie Brilliant Blue R250 (A) s ECL vizualizací (B) u dvou linií SUP-B15 (nahore) a NALM-6 (dole). (A) – gel barvený v roztoku Coomassie Brilliant Blue R250, (B) – ECL vyvolaná protilátkou anti-Ikaros (klon H-100), (C) – ECL vyvolaná protilátkou anti-aktin (polyklonal, Sigma-Aldrich). 1-standard molekulových hmotností, 2 – imunoprecipitát z celkového lyzátu, 3 – celkový lyzát. Počáteční množství buněk v každé jamce: 200 milionů.

## 5. Diskuze

Hlavním tématem mé diplomové práce bylo testování a validování multiplexní sady protilátek na leukemických vzorcích. Leukemie je nejčastější nádorové onemocnění u dětí, nejčastějšími formami této nemoci je akutní lymfoblastická leukemie (ALL) a akutní myeloidní leukemie (AML) a proto jsem se ve své práci zaměřila především na tyto dvě formy. Leukemie je neobyčejně komplexní onemocnění, leukemické buňky obsahují značné množství aberací ve svém genomu a tudíž i ve svém proteomu. Výzkum a diagnostika dětských leukemií na úrovni DNA, popř. mRNA, jsou dnes schopny zachytit rozsáhlé množství změn na úrovni genetické informace (DNA čipy, expresní profilování atd.<sup>85</sup>). V posledních letech se však stále více sledují změny v proteomu leukemických buněk, protože právě samotná exprese, posttranslační modifikace a aktivace proteinů jsou klíčovými

ději ve vlastní patologii nemoci.<sup>3</sup> Sady protilátek patří mezi metody, které jsou schopné tyto stavy detekovat. Například Kornblau a kol vytvořili tzv. „Reverse phase protein array“ pomocí které proteomicky profilovali 320 vzorků AML.<sup>3</sup>

Multiplexní sada protilátek je metoda, kterou jsme zavedli nově v naší laboratoři (CLIP-Cytometrie, KDHO 2.LF UK a FNM, Praha) ve spolupráci s pracovištěm dr. Lund-Johansena (Rikshospitalet, Oslo, Norsko). Primárně bylo nutné otestovat postup přípravy buněčných lyzátů. Testováním lyzátů buněčných linií, které nebyly rozděleny na subcelulární frakce, s lyzáty, které byly rozděleny na dvě subcelulární frakce (cytosolární a membránovou), jsme zjistili, že rozdělení lyzátu na dvě subcelulární frakce zvyšuje kvalitu i kvantitu signálu některých protilátek. Experimenty jsme provedli na osmi leukemických buněčných liniích (příklady na obr. 4.1., str. 49), z důvodu kapacity předkládané diplomové práce, ukazujeme příklady pouze na dvou buněčných liniích (SUP-B15 a NALM-6).

U nerozděleného lyzátu se vyskytuje výrazně vyšší pozadí a vlastní signál některých protilátek, např. PKB $\kappa$ , je v tomto šumu těžko odlišitelný. Navíc u některých proteinů, které se váží v určitém komplexu, jehož hydrodynamický poloměr se jen málo liší od původního proteinu, dochází ke sjednocení dvou důležitých signálů, např. ABL1 a BCR-ABL1. K těmto jevům dochází pravděpodobně díky tomu, že se snižuje schopnost dané protilátky vázat příslušný antigen v prostředí, kde se vyskytuje značné množství ostatních antigenů. Proto jsme se rozhodli pro následující testy na primárních leukemických vzorcích používat protokol přípravy buněčného lyzátu rozděleného na 2 frakce (cytosolární a membránovou). Rozdělení proteomu na dvě subcelulární frakce je vhodné i díky tomu, že jsme schopni sledovat subcelulární lokalizaci (membránová a jaderná lokalizace vs. lokalizace v cytosolu a v organelách) jednotlivých proteinů. Ta se může měnit např. po aktivaci nebo vazbou s jinými proteiny. Výhodou našeho přístupu je také schopnost detekovat křivky proteinů s podobným průběhem, což naznačuje tvorbu komplexu, který lze následně studovat pomocí jiných proteomických metod (imunoprecipitace, Western blot, hmotnostní spektrometrie). Příkladem takového komplexu mohou být proteiny CD3 a TRIM (Obr. 4.2., str.50).<sup>66</sup> Protože jsou však naše experimenty na primárních leukemických vzorcích limitovány množstvím dostupného materiálu, v některých důležitých málobuněčných vzorcích (pod 5mil buněk) použijeme plný, nerozdělený lyzát.

Dalším možným dělením buněčného proteomu je rozdělení na 4 subcelulární frakce. Toto rozdělení zatím není optimální, proteiny s charakteristickou subcelulární lokalizací, např. ABL1, detekujeme v jiných frakcích než lze dle literatury očekávat. Protože se nám však zdá rozdělení proteomu na 4 subcelulární frakce vhodnou metodou ke sledování lokalizace a



vnitrobuněčného transportu jednotlivých proteinů, na protokolu dále pracujeme s použitím jiných detergentů. Důležité ale bude zajištění reprodukovatelnosti a zabránění náhodné kontaminace jedné frakce jinou, případně nalezení optimálních interních kontrol.

Potvrdili jsme, že klíčovým krokem pro úspěšnou extrakci DNA-vazebných enzymů, např. PARP, je zvýšení iontové síly. Tento jev byl již v literatuře vícekrát popsán<sup>68</sup> a my jsme ho v našem postupu úspěšně aplikovali.

Pro možnost dalšího využití multiplexní sady protilátek (ať už se jedná o klinické, výzkumné či publikační možnosti) bylo nutné tuto metodu validovat. Metodu jsme validovali (i) porovnáním imunofenotypových dat získaných klasickou technikou pomocí průtokové cytometrie s daty získanými multiplexní sadou protilátek u 11-ti leukemických linií a (ii) sledováním změn proteomu 4 *BCR-ABL1* pozitivních linií po inhibici imatinib mesylátem.

Imunofenotypová data získaná pomocí průtokové cytometrie jsme porovnali s daty z multiplexní sady protilátek pro diagnosticky důležité znaky : znaky asociované s T-buněčnou, B-buněčnou a myeloidní vývojovou linií a dále znaky nezralosti. Zjistili jsme, že obecně data z těchto dvou metod dobře korelují, existují však protilátky proti určitým znakům, které v multiplexní sadě protilátek fungují špatně (neimunoprecipitují nebo mají nízkou afinitu k antigenu). Takovou protilátkou je např. anti-CD19, která je v sadě protilátek zastoupena třemi klony (3H1083, H-300, HIB-19), z nichž ani jeden nebyl schopen detekovat tento znak s dostatečnou afinitou. Další protilátka, která vykazuje nízkou afinitu ke svému antigenu, je anti-CD34 (klon 4H11). Ostatní protilátky, jako jsou např. anti-CD3, anti-CD4, anti-CD10, anti-IgM nebo anti-CD33, detekují dané antigeny na leukemických buňkách ve stejné (či velmi podobné) míře, jaká byla zjištěna pomocí klasické imunofenotypizace na průtokového cytometru (i za použití jiných klonů). Validace probíhá postupně, všechny klony protilátek, možnosti jejich využití i použité validační metody zaznamenáváme v nově vytvořené databázi (<http://www.bioinformin.net>) Použití validovaných protilátek je tedy následně možné i např. v klinických aplikacích, jako je diagnostika a výzkum leukemií. Limitujícím faktorem může být procento leukemických blastů při diagnóze. V případě většiny dětských akutních leukemií se ale procento blastů pohybuje kolem 90%, 10% příměs zdravých leukocytů v patientských vzorcích nijak neovlivnilo zařazení patientských vzorků podle klasických imunofenotypových kritérií.

Imatinib mesylát (Glivec) je léčivo, které inhibuje aberantně exprimovanou kinasu BCR-ABL1, která indukuje leukemogenesi.<sup>62</sup> Tento komplikovaný proces byl již v jiných studiích často sledován a v dostupné literatuře je detailně popsán. Díky tomu se nám tento model jevil jako ideální pro vlastní validaci naší techniky. Nejprve jsme pomocí značení



buněk Annexinem V. a propidium jodidem sledovali, zda-li Glivec spouští apoptosu inhibovaných buněčných linií. Zjistili jsme, že linie TOM-1 (jako jediná z použitých linií) je rezistentní na apoptotický signál vyvolaný Glivcem. Tento jev byl popsán již v jiných publikacích, např. Montiel-Duarte et al, 2008.<sup>86,87</sup> Proteomické změny buněčné linie TOM-1 tedy souvisí pouze s inhibicí signalizační dráhy pod BCR-ABL1 a ne s degradací proteinů při apoptose. BCR-ABL1 je konstitutivní kinasa, po jejíž inhibici došlo ke snížení celkové tyrosinové fosforylace proteinů (Phosphotyrosine-klon 6d12) a fosforylace proteinů, které jsou v signalizační dráze spuštěné aktivací BCR-ABL1. Mezi takové patří např. SLP-76, u kterého bylo již dříve prokázáno, že se nachází v signalizační kaskádě pod BCR-ABL1 vedoucí k remodelaci aktinu.<sup>79</sup> Dále jsme zjistili snížení adhezivitu inhibovaných buněk (snížení exprese adhezivní molekuly CD18 bylo již popsáno v publikaci van der Kuio et al, 2001<sup>88</sup>), zastavení buněčného cyklu (zvýšení exprese inhibitoru buněčného cyklu CDKN1A demonstrovali Keeshan et al, 2003<sup>89</sup>) a indukci apoptosy (štěpení PARP jako znaku apoptotických buněk popsali Moehring et al, 2005<sup>90</sup>). Pomocí multiplexní sady protilátek můžeme specificky i kvantitativně detekovat změny na úrovni proteinů, ke kterým dochází po inhibici/stimulaci určitým léčivem. Multiplexní sada protilátek tedy bude, s dalšími přidanými antigeny, vhodná i pro sledování odpovědi na léčbu u dětských pacientů s akutní leukemií.

Následně jsme stanovili úspěšně validovanou technikou proteinový profil primárních leukemických vzorků dětských pacientů odebraných z kostní dřeně v době diagnózy. Především nás zajímalo, zda-li jsme schopni odlišit jednotlivé typy leukemií podle klasických imunofenotypových kritérií (tedy podle již používaných diagnostických liniově specifických znaků) a následně pak vyhodnocovat expresi nových antigenů, které jsme vybrali z literatury a z dostupných DNA-expressních profilů.<sup>85</sup> Multiplexní sada protilátek nám takovou možnost dává, T-ALL, BCP-ALL a AML vzorky (diagnostické vzorky i leukemické linie) byly velmi dobře sloučeny do odpovídajících diagnostických podskupin.

Multiplexní sada protilátek navíc detekuje vysoký počet diagnostických a prognostických prvků (v multiplexní sadě protilátek použité v této diplomové práci úspěšně prošlo validací celkem 400 protilátek), čímž zvyšuje možnost celkového pohledu na stav buněk (viz např. léčivo Glivec u buněčné linie TOM-1). Tato technika navíc umožňuje automatizaci či semi-automatizaci jednotlivých kroků, čímž se významně usnadňuje a urychluje celý postup. Multiplexní sada protilátek je tedy vhodnou analytickou metodou k detekci značného množství antigenů, díky čemuž se nabízí aplikace ve výzkumu i v klinické praxi.

Důležitá pozorování, např. exprese prognostického znaku Ikaros, musíme ale ověřovat dalšími metodami (Western blot, hmotnostní spektrometrie). Protein Ikaros je v současné době hlavním kandidátem z řad nových prognostických znaků. V posledních letech se ukázalo, že monoalelické delece genu pro Ikaros (*IKZF1*) na úrovni DNA má prognostický význam, tyto delece totiž predikují zvýšenou pravděpodobnost relapsu leukemie.<sup>84,91</sup> V laboratoři CLIP-Cytometrie, která zároveň slouží jako diagnostická laboratoř dětských hematologických malignit (především leukemií), plánujeme detekovat protein Ikaros pomocí multiplexní sady protilátek u nově diagnostikovaných pacientů. Vzhledem k tomu, že máme v sadě protilátek pouze jeden klon (H-100) protilátky anti-Ikaros (ostatní nejsou vhodné k imunoprecipitaci), je nutné ověřit specifitu tohoto klonu jinými metodami. Jako standardní ověřená metoda pro vlastní detekci proteinu Ikaros byla zvolena metoda Western blot a následná analýza proteinu Ikaros separovaném pomocí SDS-PAGE na hmotnostním spektrometru. Protein Ikaros jsme detekovali u dvou BCP-ALL linií (SUP-B15 a NALM-6) pomocí metody elektropřenosu proteinů na nitrocelulosové membrány s následnou imunodetekcí. Protilátka anti-Ikaros H-100 detekovala proteiny pouze v neredukujících podmínkách. U linie SUP-B15 (linie s delecí genu *IKZF1*) byl získán signál o molekulové hmotnosti 45kDa, tedy ve výšce, kde signál deklaruje výrobce protilátky. U linie NALM-6 byl monitorován signál o molekulové hmotnosti 70kDa. Vzhledem k tomu, že jsme tento signál detekovali ve stejném místě u linie NALM-6 ve třech nezávislých experimentech a tato velikost na SDS-PAGE gelu již byla v uvedena v publikaci He et al, 2001<sup>92</sup>, můžeme vyloučit nespecifitu protilátky. Pravděpodobně se jedná o jinou isoformu proteinu Ikaros. Vzorky z SDS-PAGE byly odeslány na testování M. Šulcovi (Laboratoř charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR).

## 6. Závěr

V předkládané diplomové práci jsme testovali a validovali novou metodu multiplexní sadu protilátek, pomocí níž chceme následně sledovat expresi vybraných proteinů (např. nově objevené prognostické faktory) dětských akutních leukemií.

Nejprve jsme na leukemických buněčných liniích otestovali 3 různé protokoly přípravy buněčných lyzátů pro multiplexní sadu protilátek. Nejvhodnějším bylo rozdělení buněčného lyzátu na dvě subcelulární frakce, tento postup jsme aplikovali i na primární diagnostické vzorky.

Protože je multiplexní sada protilátek novou technikou, bylo nutné ji důkladně validovat. Validaci jsme provedli dvěma způsoby:

- 1) Srovnáním imunofenotypu 11-ti leukemických buněčných linií stanoveného naší multiplexní sadou protilátek s klasickou technikou na průtokovém cytometru, která se standardně používá pro imunofenotypizaci. Zjistili jsme, že většina diagnostických znaků mezi oběma metodami dobře koreluje a multiplexní sadu protilátek můžeme dále používat pro imunofenotypizaci dětských leukemií.
- 2) Pomocí multiplexní sady protilátek jsme sledovali změny v expresi / fosforylaci proteinů po inhibici buněk čtyř leukemických linií běžně používaným léčivem imatinib mesylátem, u kterého je dobře popsán vliv na tyto linie. Naší technikou detekované změny proteomu odpovídaly již dříve popsaným změnám a proto multiplexní sadu protilátek lze používat pro sledování změn intracelulárních proteinů po inhibici / stimulaci leukemických buněk.

Pomocí těchto dvou přístupů validace jsme prokázali správnost naší techniky a mohli jsme ji aplikovat na primární diagnostické vzorky s cílem určení typu leukemie u již diagnostikovaných pacientů. Zjistili jsme, že multiplexní sada protilátek rozliší jednotlivé typy leukemie (BCP-ALL, T-ALL nebo AML) a námi stanovená diagnóza ve většině případů korelovala s klinicky stanoveným obrazem diagnózy pacientů. Na rozdíl od klasických metod, námi validovaná metoda testuje mnohonásobně větší počet znaků. Pokud bychom chtěli všechny tyto znaky stanovit, je naše technika výrazně rychlejší než standardní metodika.

Jedním ze zkoumaných prognosticky významných proteinů je protein Ikaros. Pomocí multiplexní sady protilátek jsme zjistili expresi tohoto proteinu ve dvou leukemických liniích, následně jsme ji potvrdili i pomocí Western blotu. Vzhledem k tomu, že je nutné ověřit specifitu použité protilátky, budou signály detekované pomocí Western blotu dále analyzovány hmotnostní spektrometrií a porovnány s výskytem mutací, SNP či exprimovaných isoformů, abychom získali nové poznatky o funkci proteinu Ikaros v leukemických buňkách.

Biologické chování a odpověď leukemických buněk na léčbu je řízeno interakcí mnoha proteinů zapojených do funkčních celků (drah), které kontrolují zásadní buněčné funkce (proliferaci, aktivaci, apoptosu atd.) Je tedy třeba vyvíjet nové nástroje, které jsou schopny detekovat značné množství aberací vzniklé v leukemických buňkách a které bude možno aplikovat v základním výzkumu. Validovaná multiplexní sada protilátek je slibnou technikou pro detekci imunofenotypu buněk, či změn v intracelulárních signálních drahách po inhibici buněk cílenou terapií, kterou jsme schopni rychle sledovat rozsáhlé změny proteomu leukemických buněk dětských pacientů. V kombinaci se současně používanými metodami slibuje přinést řadu prakticky využitelných poznatků v hematologii a v souvisejících oborech (imunologii, onkologii)

## 7. Seznam použité literatury

1. Lightfoot, T.J. and Roman, E.: *Toxicology and applied pharmacology* **199**, 104-17(2004).
2. Colby-Graham, M.F. and Chordas, C.: *Journal of pediatric nursing* **18**, 87-95(2003).
3. Kornblau, S.M. , Tibes, R., Chen, W., Kantarjian, H.M., Andreeff, M., Coombes K and Mills, G.B.: *Blood* **113**, 154-64(2009).
4. Belov, L. Mullighan, S.P., Barber, N., Woolfson, A., Scott, M., Stoner, K., Chrosp, J.S., Sewell, W.A., Bradstock, K.F., Bendall, L., Pascovici, D.S., Thomas, M., Erber, W., Huang, P., Sartor, M., Young, G.A.R., Wiley, J.S., Juneja, S., Wierda, W.F., Green, A.R., Keating, M.J. and Christopherson, R.I.: *British journal of haematology* **135**, 184-97(2006).
5. Cui, J.-W., Wang, J., He, K., Jin, B.-F., Wang, H.-X., Li, W., Kang, L.-H., Hu, M.-R., Li, H.-Y., Yu, M., Shen, B.-F., Wang, G.-J. and Zhang, X.-M.: *Clinical cancer research* **10**, 6887-96(2004).
6. Pui, C.-H.: *Childhood leukemias*, Cambridge University Press, Second Edition (2006).
7. Greaves, M.F. Stem cell origins of leukaemia and curability. *British journal of cancer* **67**, 413-23(1993).
8. Pui, C.-H.: *The New England Journal of Medicine* **332**, 1618-1630(1995).
9. Béné, M.C. and Kaeda, J.S.: *Haematologica* **94**, 1135-50(2009).
10. Campana, D.: *Hematology* **23**, 366-73(2008)
11. Mullighan, C.G. and Downing, J.R.: *Seminars in Hematology* **46**, 3-15(2009).
12. Hamerschlak, N.: *Journal de Pediatria* **84**, 52-57(2008).
13. Harrison, C.J.: *Clinical haematology* **13**, 427-39(2000).

14. Kalina, T., Mejstříková, E., Vášková, M. and Hrušák, O.: *Transfuzni Hematologie dnes* **12**, 20-25(2006).
15. Hrusák, O. and Porwit-MacDonald, A.: *Leukemia* **16**, 1233-58(2002).
16. Bene, M., Castoldi, g., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A. and van 't Veer, M.B.: *Leukemia* **9**, 1783-1786(1995).
17. Ma, S.K., Wan, T.S.K. and Chan, L.C.: *Hematological Oncology* **17**, 91-105(1999).
18. Pui, C.-H., Relling, M.V. and Downing, J.R.: *The New England Journal of Medicine* **350**, 1535-1548(2004).
19. Hegedus, C.M., Gunn, L., Skibola, C.F., Zhand, L., Shiao, R., Fu, S., Dalmasso, E.A., Metayer, C., Dahl, G.V., Buffler, P.A. and Smith, M.T.: *Leukemia* **19**, 1713-8(2005).
20. Béné, M.C., Nebe, T., Bettelheim, P., Buldini, B., Bumbea, H., Kern, W., Lacombe, F., Lemez, P., Marinov, I., Matutes, E., Maynadié, M., Oelschlagel, U., Orfao, A., Schabath, R., Solenthaler, M., Tschurtschenthaler, G., Vladareanu, A.M., Zini, G., Faure, G.C. and Porwit, A.: *Leukemia* **25** 567-74(2011)
21. Béné, M.C.: *Immunology letters* **98**, 9-21(2005).
22. van Lochem, E.G., van der Velden, V.H., Wind, H.K., te Marvelde, J.G., Westerdaal, N.A. and van Dongen, J.J.: *Cytometry*. **60**, 1-13(2004).
23. Xavier, A.C., Ge, Y. and Taub, J.: *Expert review of hematology* **3**, 175-86(2010).
24. Bunin, G.R.: *Toxicology and applied pharmacology* **199**, 91-103(2004).
25. Greaves, M.: *European journal of cancer* **35**, 1941-53(1999).
26. Harrison, C.J.: *Clinical haematology* **14**, 593-607(2001).
27. Pui, C.-H.: *Journal of the Formosan Medical Association* **109**, 777-787(2010).
28. Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C-H., Relling, M.V., Shurtleff, S.A. and Downing, J.R.: *Nature* **453**, 110-4(2008).
29. Zheng, X., Oancea, C., Henschler, R., Moore, M.A.S. and Ruthardt, M: *PLOS one* **4**, e7661(2009).
30. Martinelli, G., Iacobucci, I., Storlazzi, C.T., Vignetti, M, Paoloni, F., Cilloni, D., Soverini, S., Vitale, A., Chiaretti, S., Cimino, G., Papayannidis, C., Paolini S., Elia, L, Fazi, P., Meloni, G., Amadori, S., Saglio, G., Pane, F., Baccarani, M. and Foa, R.: *Journal of clinical oncology* **27**, 5202-5207(2009).
31. Klein, F., Feldhahn, N., Hezog, S., Sprangers, M. Moosters, J.L., Jumaa, H. and Müschen, M.: *Oncogene* **25**, 1118-24(2006).

32. Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W. Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I-M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., Relling, M.V. et al : *The New England Journal of Medicine* **360**, 470-480(2009).
33. Campana, D. and Coustan-Smith, E.: *Clinical haematology* **15**, 1-19(2002).
34. Kalina, T., Vášková, M., Mejstříková, E., Madzo, J., Trka, J., Stary, J. and Hrušák, O.: *BMC cancer* **5**, 38(2005).
35. Harrison, C.J.: *Blood Reviews* **15**, 49-59(2001).
36. Stary, J., Jabali, Y., Trka, J., Hrušák, O., Gajdoš, P., Hrstková, H., Štěrba, J., Blažek, B., Hák, J., Procházková, D., Černá, Z., Smíšek, P., Sedláček, P., Vávra, V., Mihal, V. and Hrodek, O.: *Leukemia* **24**, 425-8(2010).
37. Mullighan, C.G.: *Clinical cancer research* **17**, 396-400(2011).
38. Mullighan, C.G.: *Leukemia research* **34**, 1269-70(2010).
39. Roll, J.D. and Reuther, G.W.: *Cancer research* **70**, 7347-7352(2010).
40. Ma, S., Pathak, S., Mandal, M., Trinh, L., Clark, M.R. and Lu, R.: *Molecular and cellular biology* **30**, 4149-58(2010).
41. Trageser, D., Iacobucci, I., Nahuk, R., Duy, C., von Levetzow, G., Klemm, L., Park, E., Schuh, W., Gruber, T., Herzog, S., Kim, Y., Hoffmann, W.-K, Li, A., Storlazzi, C.T., Jäck, H.-M., Groffen, J., Martinelli, G., Heisterkamp, N., Jumaa, H. and Müschen, M.: *The Journal of experimental medicine* **206**, 1739-53(2009).
42. Merckenschlager, M., *FEBS Lettes* **584**, 4910-4(2010)
43. Virely, C., Moulin, S., Cobaleda, C., Lasgi, C., Alberdi, A., Soulier, J., Sigaux, F., Chan, S., Kastner, P. and Ghysdael, J.: *Leukemia* **24**, 1200-4(2010).
44. Matuli, M., Paradzik, M., Puskari, B., Stipic, J., Antica, M.: *Coll Antropol* **34**, 59-62(2010).
45. Iacobucci, I., Lonetti, A., Cilloni, D., Messa, F., Ferrari, A., Zuntini, R., Ferrari, S., Ottaviani, E., Arruga, F., Paolini, S., Papayannidis, C., Piccaluga, P.P., Soverini, S., Saglio, G., Pane, F., Baruzzi, A., Vignetti, M., Berton, g., Vitale, A., Chiaretti, S., Müschen, M., Foa, R., Baccarani, M. and Martinelli, G.: *Haematologica* **93**, 1814-21(2008).
46. Hrušák, O., Trka, J., Zuna, J., Poloučková, A. and Kalina, T.: *Leukemia* **16**, 720-725(2002).
47. Greaves, M.F. *The Lancet* **349**, 344-349(1997).
48. Hsu, H.-Y., Joos, T.O. and Koga, H.: *Electrophoresis* **30**, 4008-4019(2009).

49. Tibes, R., Qiu, Y., Lu, Y., Hennessy, B., Andreeff, M., Mills, G.B. and Kornblau, S.M.: *Molecular cancer therapeutics* **5**, 2512-21(2006).
50. Nolan, J.P. and Mandy, F.: *Cytometry* **69**, 318-325(2006).
51. Weerkamp, F., Dekking, E., Ng, Y.Y., van der Velden, V.H.J., Wai, H., Böttcher, S., Brüggemann, M., van der Sluijs, A.J., Koning, A., Boeckx, N., van Poecke, N., Lucio, P., Mendonca, A., Sedek, L., Szczepanski, T., Kalina, T., Kováč, M, Hoogeveen, P.G., Flores-Montero, Orgao, A.: *Leukemia* **23**, 1106-17(2009).
52. Hofmann, A., Gerrits, B., Schmidt, A., Bock, T., Bausch-Fluck, D., Aebbersod, R and Wollscheid, B: *Blood* **116**, 26-34(2010).
53. Eckschlager, T. a kolektiv: *Průtoková cytometrie v klinické praxi*, Grada Publishing, Praha (1999).
54. Wu, W., Slastad, H. de la Rosa Carrillo, D., Frey, T., Tjonnfjord, G., Boretti, E., Aasheim, H.-C., Horejsi, V. and Lund-Johansen, F.: *Molecular & cellular proteomics* **8**, 245-57(2009).
55. Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlen, M., Frej, A.-K., Jörnvall, H., Flock, J.-I. and Lindberg, M.: *The EMBO journal* **5**, 1567-75(1986).
56. Thermo Scientific Inc: Informace o produktu BCA Protein Assay Kit, viz <http://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>
57. Zempleni, J.: *The Journal of Nutritional Biochemistry* **10**, 128-138(1999).
58. Thermo Scientific Inc: Informace o produktu EZ-Link NHS-PEG 4 -Biotin, viz <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=01030914>
59. Freitag, S., Le Trong, I., Klumb, L., Stayton, P.S. and Stenkamp, R.E.: *Protein science* **6**, 1157-66(1997).
60. Holmberg, A., Blomstergre, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J. and Uhlen, M.: *Electrophoresis* **26**, 501-10(2005).
61. Kanderová, V., Hrusák, O. and Kalina, T.: *Experimental hematology* **38**, 653-660.e1(2010).
62. Barr, R.D.: *Pediatric Blood and Cancer* **55**, 18-25(2010).
63. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. and van Oers, M.H.: *Blood* **84**, 1415-1420(1994).
64. Smolewski, P., Grabarek, J., Halicka, H.D. and Darzynkiewicz, Z.: *Journal of immunological methods* **265**, 111-21(2002).



65. Paredes-Aguilera, R., Romero-Guzman, L. Lopez-Santiago, N., Burbano-Ceron, L., Camacho-Del Monte, O. and Nieto-Martinez, S.: *American journal of hematology* **68**, 69-74(2001).
66. Kirchgessner, H., Dietrich J., Scherer, J., Isomäki, P., Korinek, V., Hilgert, V., Bruyns, E., Leo, A., Cope, A.P. and Schraven B.: *The Journal of experimental medicine* **193**, 1269-84(2001).
67. Clarke, M. and Spudich, J.: *Annual review of biochemistry* **46**, 797-822(1977).
68. Sevall, J.S., Cockburn, A., Savage, M. and Bonner, J.: *Biochemistry* **14**, 782-9(1975).
69. Bertrand, F.E., Spengeman, J.D., Shah, N. and LeBien, T.W.: *Leukemia* **17**, 2454-9(2003).
70. Starkova, J., Zamostna, B., Mejstříková, E., Krejčí, R., Drabkin, H.A. and Trka, J.: *Pediatric Blood and Cancer* **55**, 1072-1082(2010).
71. Soubeyrand, S., Pope, L., Pakuts, B. and Hache, R.J.G.: *Cancer Research* 1198-1201(2003).
72. Luo, P., Lin, M., Lin, M., Chen, Y., Xang, B. and He, Q.: *Leukemia & lymphoma* **50**, 1183-9(2009).
73. Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C.B.: *Cell* **74**, 597-608(1993).
74. Yoshida, K., Yamaguchi, T., Natsume, T., Kufe, D and Miki, Y.: *Nature cell biology* **7**, 278-85(2005).
75. Viglietto, G. , Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tsihchlis, P., Bellacosa, A., Fusco, A. and Santoro, M.: *Nature medicine* **8**, 1136-44(2002).
76. Fuster, J.J., Gonzalez, J.M., Edo, M.D., Viana, R., Boya, P., Cervera, J., Verges, M., Rivera, J. and Andres, V.: *The FASEB journal* **24**, 2998-3009(2010).
77. Loken, M.R., Shah, V.O., Dattilio, K.L. and Civin, C.I.: *Blood* **70**, 1316-24(1987).
78. Donnelly, D.S. and Krause, D.S.: *Leukemia & lymphoma* **40**, 221-34(2001).
79. Preisinger, C. and Kolch, W.: *Cellular signalling* **22**, 848-56(2010).
80. Decker, P. and Muller, S.: *Current pharmaceutical biotechnology* **3**, 275-83(2002).
81. Nelson, C., Rabb, H. and Arnaout, M.: *The Journal of biological chemistry* **267**, 3351-7(1992).
82. Brdička, T., Imrich, M., Angelisova, P., Brdičková, N., Horváth, O., Špička, J., Hilgert, I., Lusková, P., Dráber, P., Novák, P., Engels, N., Wienands, J., Simeoni, L.,

- Österreicher, J. Aguado, E., Malisse, M., Schraven, B. and Hořejší V.: *Journal of Experimental Medicine* **196**, 1617-1626(2002).
83. Yang, Z.-Y., Perkins, N.D., Ohno, T., Nabel, E.G. and Nabel, G.J.: *Nature medicine* **1**, 1052-1056(1995).
84. Boer, M.L.D., van Slegtenhorst M., de Menezes, R., Cheok, M.H., Buijs-Gladdines, j.G.C.A.M., Peters, S.T.C.J.M., van Zutven, L.J.C.M., Beverloo, H.B., van der Spek, P., Escherich, G., Horstmann, M.A., Janka-Schaub, G.E., Kamps, W.A., Evans, W.E. and Pieters, R.: *Lancet Oncology*. **10**, 125-134(2009).
85. Yeoh, E.-J., Ross, M.E., Shurtleff, S.A., Williams, W.K., Patel, D., Mahfouz, R., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Relling, M.V., Patel, A., Cheng, C., Campana, D., Wilkins, D., Zhou, X., Li, J., Liu, H., Pui, C.-H., Evans, W., Naeve, C., Wong, L. and Downing, J.R.: *Cancer cell* **1**, 133-43(2002).
86. Montiel-Duarte, C., Cordeu, L. Agirre, X., Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Jose-Eneriz, E.S., Garate, L., Andreu, E.J., Calasanz, M.J., Heiniger, A., Torres, A. and Prosper, F.: *Leukemia research* **32**, 709-16(2008).
87. Quentmeier, H., Eberth, S., Romani, J., Zaborski, M. and Drexler, H.G.: *Journal of hematology & oncology* **4**, 6(2011).
88. van der Kuip, H., Goetz, A.W. Miething, C., Duyster, J. and Aulitzky, W.E.: *Blood* **98**, 1532-1541(2001).
89. Keeshan, K., Cotter, T.G. and McKenna, S.L.: *British journal of haematology* **123**, 34-44(2003).
90. Moehring, A., Wohlbold, L., Aulitzky, W.E. and van der Kuip, H.: *Cell death and differentiation* **12**, 627-36(2005).
91. Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I.-M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., and Relling, M.V.: *The New England Journal of Medicine* **360**, 470-480(2009).
92. He, L.-C., Xu, H.-Z., Gu, Z.-M., Liu, C.-X., Chen, G.-Q., Wang, Y.-F., Wen, D.-H. and Wu, Y.-L.: *Biochemical and biophysical research communications* **406**, 430-4(2011).

