

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie  
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis



Inhibitory histone deacetylase in treatment of plasma cell leukemia: effect of the bone marrow microenvironment

Histone deacetylase inhibitors in plasma cell leukemia treatment: effect of the bone marrow microenvironment

**Mgr. Iona Burianová**

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Praha, 2016

## ABSTRAKT

Mnohočetný myelom a jeho agresivní varianta, tzv. plazmocelulární leukemie, jsou stále považovány za nevléčitelná onemocnění, a to i přes značný pokrok ve vývoji nových léčiv. Příčinou je často mikroprostředí kostní dřeně, které způsobuje, že myelomové buňky se stávají rezistentními na léčbu. Hematopoetické buněčné linie odvozené z jednotlivých hematologických malignit jsou nepostradatelným nástrojem pro studium etiopatogeneze těchto onemocnění a pro testování nových potenciálních léčiv. Jejich ustavení je však stále považováno za náhodnou a vzácnou událost.

První část předkládané práce se zabývá ustavením a charakterizací buněčné linie UHKT-944 odvozené od pacienta s primární plazmocelulární leukemií a dokončením charakterizace buněčné linie UHKT-893 odvozené od pacientky s mnohočetným myelomem. U linie UHKT-893 byly provedeny analýzy zahrnující mimo jiné vyšetření klonální přestavby IgVH genů a cytogenetickou analýzu, které přispěly k detailnějšímu popisu této buněčné linie. Během kultivace buněk linie UHKT-944 byly monitorovány růstové charakteristiky, byla zjištěna závislost této linie na interleukinu-6 (IL-6) a provedena imunofenotypizace, která prokázala přítomnost povrchových znaků specifických pro maligní plazmatické buňky. Analýzou byla zjištěna produkce monoklonálního imunoglobulinu IgA1-kappa. Na základě cytogenetické analýzy byly buňky klasifikovány jako téměř tetraploidní s několika numerickými a strukturními aberacemi.

Ve druhé části práce jsme se zabývali studiem vlivu vybraných inhibitorů histondeacetyláz kyseliny valproové (VPA) a suberoylanilidu kyseliny hydroxamové (SAHA) na buněčnou linii UHKT-944 v přítomnosti či nepřítomnosti mikroprostředí kostní dřeně, které bylo simulováno složkami extracelulární matrix, stromálními buňkami kostní dřeně pacientů s diagnózou mnohočetného myelomu nebo různými koncentracemi IL-6. Bylo zjištěno, že SAHA i VPA indukují apoptózu a inhibují buněčný růst, nebyl však u nich pozorován vliv na zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Z výsledků dále vyplývá, že jedním z mechanismů působení VPA na myelomové buňky je inhibice dráhy JAK/STAT. Byl prokázán vliv mikroprostředí kostní dřeně, především pak stromálních buněk, na účinek těchto inhibitorů. Výsledky práce naznačují možnost využití VPA i SAHA k léčbě tohoto vzácného onemocnění.

## **ABSTRACT**

Multiple myeloma and its aggressive variant, plasma cell leukemia, are still considered to be incurable diseases despite the progressive treatment approaches comprising novel drugs. This can be attributed to the presence of the bone marrow microenvironment which plays an important role in drug resistance of myeloma cells. Hematopoietic cell lines derived from hematologic malignancies are suitable models for the study of etiopathogenesis of these malignant diseases and for testing new potential drugs. Establishment of these cell lines is still considered to be coincidental and rare event.

The first part of the thesis is focused on establishment and characterization of the cell line UHKT-944 derived from a patient with primary plasma cell leukemia, and on completion of characterization of the cell line UHKT-893 derived from a patient with multiple myeloma. Additional analysis of UHKT-893 cell line were performed including sequence analysis of IgVH gene rearrangements and cytogenetic analysis which contributed to more detailed characterization of this cell line. During cultivation of UHKT-944 cells, we monitored the cell growth and confirmed dependence on interleukin-6 (IL-6). Immunophenotype analysis revealed the presence of surface markers characteristic of malignant plasma cells. UHKT-944 cells were found to produce monoclonal IgA1-kappa. According to cytogenetic analysis, these cells were classified as near tetraploid with several numerical and structural abnormalities.

The second part of the thesis is focused on the effect of selected histone deacetylase inhibitors, valproic acid (VPA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on the UHKT-944 cell line in the presence or absence of the bone marrow microenvironment, which was simulated by the presence of bone marrow stromal cells derived from patients diagnosed with multiple myeloma, by extracellular matrix components or by various concentrations of IL-6. We found that SAHA and VPA induced apoptosis, inhibited cell proliferation but had no effect on the cell cycle distribution of UHKT-944 cells. Our results suggest that inhibition of JAK/STAT pathway is one of the mechanisms of action of VPA in myeloma cells. We further revealed that the bone marrow microenvironment, especially stromal cells, influence the efficiency of the used inhibitors. In conclusion, VPA and SAHA might represent an additional therapeutic strategy in the treatment of this rare malignant disease.

## 1. ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění charakterizované přítomností maligních plazmatických buněk v kostní dřeni. Mnohočetný myelom představuje zhruba 1 % všech nádorových onemocnění a 10 % hematologických onemocnění. Mnohočetnému myelomu často předchází onemocnění zvané monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) [1,2].

Plazmocelulární leukemie (PCL) je jedna z nejagresivnějších forem monoklonálních gamapatií. Pro PCL je typická přítomnost monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni a periferní krvi. PCL je považována za vzácnou agresivní formu mnohočetného myelomu, je spojována se špatnou prognózou pacientů s průměrnou dobou přežití počítanou v měsících. Kritériem pro diagnózu plazmocelulární leukemie je počet plazmatických buněk v periferní krvi překračující 20 % a celkový počet plazmocytů nad  $2 \times 10^9 / l$  [3,4].

Rozlišujeme dva typy PCL: primární PCL se vyskytuje „de novo“, tedy u pacientů, kteří nebyli dříve diagnostikováni s mnohočetným myelomem. Tento typ plazmocelulární leukemie se vyskytuje častěji, převážně u mladších pacientů. Druhým typem je sekundární PCL, která se vyskytuje u pacientů s již diagnostikovaným mnohočetným myelomem a jedná se tedy ve většině případů o refrakterní terminální stav [5]. Díky autologní transplantaci krvetvorných buněk, vysokodávkované chemoterapii a zavedení nových léků jako jsou inhibitory proteazomu či imunomodulační látky se zvýšila kvalita života pacientů a celková doba přežití, přesto jsou MM a PCL stále považovány za nevléčitelná onemocnění [6].

Inhibitory histondeacetyláz představují slibné látky pro léčbu různých typů nádorů včetně MM. Inhibitory histondeacetyláz (HDACi) inhibují enzymovou aktivitu HDAC, čímž způsobují mimo jiné dekonenzaci chromatinu a umožňují přístup transkripčním faktorům. Jedním z důležitých následků je exprese původně neaktivních genů, což v konečném důsledku vede k indukci apoptózy, diferenciaci a/nebo zástavě růstu maligních buněk *in vitro* i *in vivo* [7,8]. Suberoylanilid hydroxamové kyseliny (SAHA) byl uznán americkým úřadem pro kontrolu léčiv a potravin (Food and Drug Administration, FDA) jako lék pro terapii kožního T-buněčného lymfomu. SAHA indukuje apoptózu a inhibuje buněčný růst také u ostatních hematologických malignit včetně myelomu, kde je jeho účinek potencován kombinací s ostatními používanými léčivy [9,10]. V současné době se většina HDACi včetně SAHA nachází v několika klinických studiích a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s dalšími

léčivý [11]. Kyselina valproová (VPA) je již několik let používána k léčbě epilepsie a jako stabilizátor nálady. Kromě antikonvulzivního účinku také působí jako inhibitor histonacetyláz. VPA indukuje diferenciaci nádorových buněk, včetně maligních hematopoetických buněk, ovlivňuje růst nádorů a tvorbu metastáz *in vivo* a indukuje apoptózu u leukemických buněk [12,13]. U MM je VPA schopna regulovat buněčný cyklus a indukovat apoptózu, ale i jiné formy buněčné smrti [14,15].

Mikroprostředí kostní dřeně (BMM, z angl. bone marrow microenvironment) hraje velkou roli v patogenezi MM a PCL a jeho ochranný vliv na transformované buňky je často příčinou rezistence k léčbě [16]. Adheze myelomových buněk k stromálním buňkám kostní dřeně (BMSCs, z angl. bone marrow stromal cells) vede k produkci cytokinů a růstových faktorů včetně interleukinu-6 (IL-6), který je považován za nejdůležitější růstový faktor u MM [17]. Působením IL-6 dochází ke stimulaci angiogeneze a aktivaci několika signálních drah jako jsou JAK/STAT či PI3K/Akt [18,19]. Bylo zjištěno, že interakcí myelomových buněk se stromálními buňkami či proteiny extracelulárního matrix jsou buňky více chráněny proti apoptóze indukované léky [20,21]. V současné době je zřejmé, že za proliferaci a přežívání myelomových buněk není zodpovědný jediný cytokin, ale mnoho dalších faktorů, které jsou produkovány mikroprostředím kostní dřeně.

Permanентní hematopoetické buněčné linie odpovídají genotypově a fenotypově maligním buňkám pacientů se zhoubným onemocněním krvinek. Za immortalizované buňky, které tvoří permanentní buněčné linie, můžeme považovat takové buňky, které se rozdělí více než 150 – 200x nebo jsou-li přítomny v kontinuální buněčné kultuře více než rok. [22]. Permanentní linie odvozené z nádorových buněk nemocných jsou nepostradatelným nástrojem pro výzkum nádorů na buněčné i molekulární úrovni. Na permanentních buněčných liniích se testují nové cílené protinádorové látky v preklinických studiích. Ustavení myších myelomových linií umožnilo vznik hybridomových linií, které produkují definované monoklonální protilátky. Díky vývoji kvalitních kultivačních medií s použitím růstových faktorů a cytokinů se podařilo ustavit mnoho buněčných linií, které představují vzácné typy akutních i chronických leukemií.

V této disertační práci jsme studovali vliv vybraných HDAC inhibitorů na plazmocelulární linii UHKT-944. Zaměřili jsme se na možný ochranný účinek mikroprostředí kostní dřeně, především pak stromálních buněk. Dalším z cílů disertační práce byla charakterizace buněčných linií UHKT-893 a UHKT-944, které byly v roce 2010 ustaveny v naší laboratoři. Část analýz linie UHKT-893 byla provedena v rámci diplomové práce Mgr.

Ireny Vančurové. V rámci této disertační práce byla dokončena charakterizace linie UHKT-893 a dále byla provedena kompletní charakterizace linie UHKT-944.

## **2. CÍLE PRÁCE**

- charakterizovat buněčnou linii UHKT-944 odvozenou od pacienta s plazmocelulární leukémií, kterou se podařilo ustavit v naší laboratoři v roce 2010
- charakterizovat buněčnou linii UHKT-893 odvozenou od pacientky s mnohočetným myelomem, kterou se podařilo ustavit v naší laboratoři ve stejném roce jako UHKT-944. Tato linie byla ustavena a charakterizována v rámci diplomové práce Mgr. Ireny Vančurové. Naším cílem bylo provést další analýzy, které přispěly k detailnějšímu popisu této linie
- zjistit účinek vybraných inhibitorů histondeacetyláz - SAHA (suberoylanilid kyseliny hydroxamové) a VPA (kyselina valproová) na proliferaci a indukci apoptózy u plazmocelulární linie UHKT-944
- zjistit, zda je mikroprostředí kostní dřeně schopno ochránit buňky linie UHKT-944 před působením SAHA a VPA
- zjistit vliv SAHA a VPA na vybrané signální dráhy, jejichž permanentní aktivace má za následek přežívání a růst myelomových buněk

## **3. MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1 Materiál**

K vypracování této disertační práce byly použity buněčné linie, protilátky a HDAC inhibitory, jejichž přehled je uveden v disertační práci. Dále byly použity komerčně dostupné chemikálie a kity. Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

### **3.2 Metodika**

Detailní popis použitých metod je uveden v disertační práci.

#### **3.2.1 Přehled metod použitých k ustavení a charakterizaci buněčných linií**

Izolace a kultivace buněk z kostní dřeně pacientů (kostní dřeň pacientů s diagnózou MM byla odebírána pro rutinní diagnostické účely na hematologické klinice ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Tentýž den byla část vzorku dopravena na Ústav hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) a zpracována pro výzkumné účely), měření buněčné proliferace a viability (kolorimetrická metoda WST-1, barvení trypanovou modří), morfologická

charakterizace (cytospinové preparáty barveny dle Giemsy), imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie, cytogenetická analýza (cytogenetická analýza byla provedena konvenční cytogenetickou metodou a metodou mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH) na Oddělení cytogenetiky ÚHK), stanovení mutačního stavu IgVH genů (klonální přestavby IgVH genů byly vyšetřeny v Laboratoři PCR diagnostiky leukemií na ÚHK), průkaz sekrece imunoglobulinů (imunoglobuliny a jejich volné lehké řetězce byly stanoveny rutinní metodou (nefelometrie) na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze), dvourozměrná (2-D) elektroforéza, hmotnostní spektrometrie (analýza byla provedena v Laboratoři hmotnostní spektrometrie na Přírodovědecké fakultě UK v Praze), stanovení anti-HBsAg (možná reaktivita protilátky IgA s antigenem viru hepatitidy B (HBsAg) byla měřena pomocí standardní metody ELISA dle návodu použitého ETI-AB-AUK-3 (antiHBs) kitu a dále metodou CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) s použitím Architect anti-HBs reagenčního kitu v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy (NRL) ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ) v Praze), průkaz kontaminace buněk mykoplazmou (fluorescenční metoda s použitím barviva Hoechst 33258), detekce EBV (analýza virové DNA metodou PCR byla provedena v Národní referenční laboratoři pro herpetické viry v SZÚ, Praha).

### **3.2.2 Přehled metod použitých pro studium vlivu HDAC inhibitorů na buněčnou linii UHKT-944**

Kultivace buněk linie UHKT-944 (buňky UHKT-944 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s L-glutaminem, které bylo dále obohaceno 10% fetálním telecím sérem, rekombinantním interleukinem-6 (1 ng/ml), antibiotiky penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml)), izolace a kultivace stromálních buněk kostní dřeně (stromální buňky byly získány kultivací mononukleárních buněk kostní dřeně pacientů s MM a kultivovány v médiu RPMI-1640 bez IL-6), kultivace buněk UHKT-944 v přítomnosti stromálních buněk (buňky byly nasazeny do skleněných Erlenmeyerových baněk s BMSCs a bez BMSCs, kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA (1 a 1,5 µM) a VPA (0,5 a 1 mM), kultivace buněk v přítomnosti extracelulární matrix (96-jamková mikrotitrační destička s povrchovou úpravou pro tkáňové kultury byla pokryta MaxGel™ ECM (MaxGel). Buňky byly nasazeny do jamek mikrotitrační destičky s navázaným MaxGel a kontrolních neošetřených jamek. Po 48 hodinách inkubace byly buňky ošetřeny SAHA (1 a 1,5 µM) a VPA (0,5 a 1 mM)), kultivace buněk v přítomnosti různých koncentrací IL-6 (buňky UHKT-944 byly nasazeny do skleněných Erlenmeyerových baněk s různými koncentracemi IL-6

(0,2; 1; 3,3 ng/ml), kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA a VPA), měření buněčné proliferace (proliferace byla měřena po 24 a 48 hodinách inkubace metodou AlamarBlue), detekce apoptózy (Annexin-V-FLUOS staining kit, Caspase-3/ CPP32 colorimetric assay kit), měření adhezivity buněk k MaxGel a proteinům extracelulárního matrix (Millicat 96-well ECM Screening Kit, protokol dle Kuželová a spol. (23)), měření koncentrace IL-6 (koncentrace IL-6 byla měřena imunometodou na Oddělení klinické biochemie Thomayerovy nemocnice v Praze), analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie, ELISA (PathScan® Phospho-Stat3 (Tyr705) Sandwich ELISA kit), SDS elektroforéza, Western blotting, statistická analýza (párový T-test, Wilcoxonův párový test).

## **4. VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1 Pacient**

Vzorek kostní dřeně byl získán od 55letého muže, který trpěl únavou a bolestí kostí. V červnu 2010 byla pacientovi diagnostikována primární plazmocelulární leukemie s produkcí monoklonálního imunoglobulinu typu IgA kappa (IgA-κ).

Pomocí průtokové cytometrie bylo v periferní krvi a kostní dřeni pacienta detekováno 25 % plazmatických buněk. Pacient absolvoval 6 cyklů chemoterapie v režimu CD (cyklofosfamid+dexametazon) a CVD (cyklofosfamid+Velcade+dexametazon). Léčba však nebyla úspěšná a pacient zemřel s příznaky progresivní onemocnění doprovázené bronchopneumonií v listopadu 2010.

### **4.2 Ustavení buněčné linie UHKT-944 a růstové charakteristiky**

Primární kultura vzorku kostní dřeně č. 944 byla založena 2. 6. 2010. Po dvou měsících kultivace jsme zaznamenali v kultuře nárůst buněk s morfológií plazmatických buněk a pojmenovali jsme nově vznikající buněčnou linii UHKT-944. Z původní primární buněčné kultury byla část buněk přenesena do nových kultivačních lahvíček, kde se však již nevytvořila vrstva stromálních buněk. Stromální buňky kostní dřeně jsou považovány za zdroj důležitých růstových faktorů a cytokinů [24]. Buňky přenesené do nové lahvičky bez přítomnosti stromálních buněk a IL-6 nebyly schopny proliferace a začaly umírat. Z tohoto důvodu byly buňky nadále kultivovány v médiu s IL-6, klíčového faktoru pro růst a přežívání myelomových buněk [25]. Proliferace a přežívání myelomových buněk v závislosti na přítomnosti IL-6 byla poprvé popsána Kawanem a spol. [26]. Většina ustavených linií odvozených od maligních plazmatických buněk je závislá na IL-6 [22] včetně linie UHKT-



944. Některé linie vyžadují kromě IL-6 i přítomnost dalších faktorů jako je například fibronektin [27]. Ačkoliv jsme zjistili, že koncentrace IL-6 odpovídající 0,5 ng/ml je dostačující pro růst a přežívání buněk linie UHKT-944, byly tyto buňky nadále kultivovány v přítomnosti 1 ng/ml IL-6 jako jiné myelomové linie závislé na IL-6 [28,29]. Závislost buněk na IL-6 byla v průběhu kultivace pravidelně kontrolována.

### **4.3 Morfologie buněk linie UHKT-944**

Morfologické vlastnosti linie UHKT-944 jsme určovali mikroskopicky na cytopspinových preparátech barvených protokolem dle Giemsy, na kterých jsme pozorovali převážně mononukleární buňky, dále se vyskytovaly binukleární buňky a ojediněle bylo možné nalézt multinukleární buňku obsahující až dvanáct jader. Všechny buňky vykazovaly morfologii plazmatických buněk.

### **4.4 Imunofenotypizace buněk UHKT-944**

Charakter plazmatických buněk byl potvrzen podle povrchové exprese znaků CD138 a CD38. Buňky na svém povrchu neexprimovaly většinu markerů typických pro B-buňky, T-buňky a buňky myeloidní řady. Analýzou byla také zjištěna přítomnost cytoplazmatického monoklonálního lehkého řetězce kappa. Aberantní exprese CD28 byla zjištěna u většiny PCL a MM linií včetně UHKT-944. Exprese CD28 je spojována s progresí onemocnění, což také dokládá jeho zvýšená exprese u sekundární PCL, vyskytující se u nemocných s pokročilým či refrakterním MM [30]. Buňky UHKT-944 slabě exprimují CD56, jehož zvýšená exprese je typická pro maligní plazmatické buňky pacientů s MM [31]. Naopak u pacientů s PCL nebyla exprese CD56 zjištěna vůbec nebo pouze velmi slabě, a to jak v případě primární tak i sekundární PCL, jak uvádí ve své práci Pellat-Deceunynck a spol. [32]. Povrchový antigen CD19 vyskytující se na B buňkách nebyl u pacientů s PCL detekován, což je také v souladu s našimi výsledky. Zvýšená exprese molekul CD33, CD98 a absence či nízká exprese CD56 a CD117 jsou spojovány se špatnou prognózou [33-36]. Stejně imunofenotypizační znaky byly detekovány u buněk UHKT-944. Endoglin (CD105) nebyl na buňkách UHKT-944 detekován, což je poněkud překvapivé vzhledem k tomu, že byl nalezen na všech dosud testovaných myelomových liniích [22]. Absence CD105 ale může být specifická pro PCL, neboť PCL linie na tento znak dosud testovány nebyly. U buněk UHKT-944 byla zjištěna silná exprese CD85k a CD123. Přítomnost těchto molekul u linie UHKT-944 je zajímavá, neboť CD85k se nachází na povrchu dendritických buněk, monocytů a makrofágů [37] a CD123 je silně exprimována pouze u plazmacytoidních dendritických buněk a bazofilních granulocytů [38].

Sano a spol. ve své práci zmiňuje případ akutní myeloidní leukemie napodobující leukemii z časných plazmacytoidních dendritických buněk [39]. Zvýšená exprese CD98 je spojována se špatnou prognózou pacientů s diagnostikovaným MM, [34] což odpovídá krátké době přežití pacienta č. 944. CD184 nebyl u ostatních buněčných linií odvozených od plazmatických buněk v době jejich ustavení testován. Avšak silná pozitivita CD184 byla detekována na buňkách UHKT-944, ale také na plazmatických buňkách pacientů s MM, kde se zřejmě účastní procesů spojených s migrací a usidlováním myelomových buněk v kostní dřeni [40]. Povrchové znaky CD3, CD8, CD13, CD15, CD34 a CD65 nebyly u linie UHKT-944 prokázány, stejně jako u ostatních linií odvozených od plazmatických buněk v době jejich ustavení [22].

#### **4.5 Detekce a analýza imunoglobulinů**

Analýzou jsme zjistili, že buňky UHKT-944 produkují IgA1-kappa a výsledky tak souhlasí s nálezem IgA v séru pacienta a lehkých řetězců kappa v pacientově moči a séru. Zjistili jsme také, že linie UHKT-944 nesekretuje volné imunoglobulinové lehké řetězce kappa. Lehké řetězce, které jsou syntetizovány, ale nedochází k jejich sekreci, byly zjištěny i u jiných myelomových buněk [41].

Vybrané proteinové spoty z gelů 2-D elektroforézy byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány jako těžké řetězce lidských imunoglobulinů podtřídy IgA1 a lidské lehké řetězce kappa se specificitou vůči antigenu viru hepatitidy B (HBsAg). Potenciálně prakticky využitelnou možností, že linie UHKT-944 produkuje protilátky proti HBsAg, jsme se pokusili ověřit, ovšem obě imunoanalýzy použité k detekci antiHBsAg měly v souladu s našim předpokladem negativní výsledek.

V buňkách linie UHKT-944 kultivovaných po dobu 9 měsíců byla prokázána přítomnost somatické hypermutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinového genu (IgVH). Byla detekována klonální přestavba VH3-9, která vykazovala 91% homologii se zárodečnou linií. Výsledky také potvrzují klonální původ linie UHKT-944.

#### **4.6 Cytogenetická analýza**

Pomocí techniky mFISH a klasické cytogenetické analýzy byla u linie UHKT-944 prokázána přítomnost téměř tetraploidního karyotypu s několika numerickými a strukturními aberacemi včetně translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinů (IgH) na chromozomu 14q32. Výskyt těchto translokací je často spojován s progresí onemocnění [42-

44]. U linie UHKT-944 byla zjištěna translokace t(14;20). Tato translokace, která byla detekována i u jiných MM a PCL linií, je spojována s horší prognózou a odpovídá pacientově krátké době přežití [45,46]. Translokace t(14;20) byla také detekována ve vzorku kostní dřeně pacienta, který byl získán v době stanovení diagnózy, což vylučuje možnost, že by tato aberace vznikla jako důsledek dlouhodobé kultivace buněk UHKT-944 *in vitro*. Cytogenetická analýza vzorků kostní dřeně pacienta a buněk UHKT-944 odhalila přítomnost monosomie 13, která je považována za negativní prognostický faktor u PCL [47]. Některé chybějící nebo naopak nadpočetné chromozomy zjištěné u linie UHKT-944 lze také nalézt u plazmocelulárních a myelomových linií. U linie UHKT-944 byly zjištěny translokace t(1;9), t(1;18), t(6;18), t(15;16) a delece del(5). Tyto aberace byly popsány i u výše zmíněných buněčných linií, avšak na jiných lokusech a jen velmi výjimečně. Chromozomální aberace der(13)t(1;13) byla kromě linie UHKT-944 detekována také u linie FR4 odvozené od plazmocyтому [48]. Zdá se, že ostatní strukturní aberace zjištěné u linie UHKT-944 nebyly dosud u buněčných linií odvozených od plazmatických buněk popsány [22].

#### 4.7 Vyloučení přítomnosti EBV a mykoplazmy

Přítomnost DNA viru EBV u linie UHKT-944 byla vyloučena metodou PCR. Fluorescenční barvení DNA neprokázalo přítomnost mykoplazmat. Kontaminace buněk UHKT-944 mykoplazmaty byla během kultivace pravidelně kontrolována.

#### 4.8 Vliv SAHA a VPA na indukci apoptózy linie UHKT-944

Působením obou inhibitorů docházelo k translokaci fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány a ke zvýšení počtu nekrotických buněk. Vliv inhibitorů byl značně snížen přítomností inhibitoru kaspáz Q-VD-OPh, což naznačuje, že smrt buněk, která nastává po působení těchto inhibitorů, je závislá na kaspázách. Zjistili jsme, že SAHA i VPA byly schopny navodit apoptózu prostřednictvím aktivace kaspázy-3. Dle výsledků publikovaných studií mohou SAHA i VPA inhibovat buněčnou proliferaci a indukovat na kaspázách závislou i nezávislou apoptózu, včetně jiné formy buněčné smrti u řady myelomových linií a primárních myelomových buněk [10,13,14].

#### 4.9 Vliv mikroprostředí kostní dřeně na antiproliferační účinek SAHA a VPA

Zjistili jsme, že SAHA i VPA inhibují buněčnou proliferaci, která klesala jak se zvyšující se koncentrací inhibitorů, tak také s dobou jejich působení. Přítomnost složek ECM

neovlivňovala cytotoxický účinek SAHA a VPA, a tudíž mikroprostředí simulované proteiny ECM nemá ochranné účinky na buňky UHKT-944, což je v rozporu s některými studii [20,49,50]. Jedním z důvodů může být nízká schopnost linie UHKT-944 vázat se ke složkám použitého MaxGel<sup>TM</sup> ECM (MaxGel). Výsledky analýzy, kde byly použity komerční stripky potažené konkrétními proteiny ECM, potvrdily schopnost buněk UHKT-944 vázat se výrazněji pouze k lamininu. Přestože je dle výrobce laminin součástí MaxGel, nemusí být tato složka přítomna v dostatečném množství. Na druhé straně je možné, že se buňky UHKT-944 mohou vázat k jinému proteinu, který není součástí MaxGel, a k přirozené lidské extracelulární matici kostní dřevě by buňky adherovaly lépe.

Rozdíly v proliferaci byly detekovány mezi myelomovými buňkami kultivovanými s BMSCs a bez stromálních buněk, a to v případě ošetření SAHA. Snížení antiproliferačního a antiapoptického účinku léčiv vlivem interakcí BMSCs s myelomovými buňkami bylo popsáno také v několika studiích [51,52]. Z výsledků vyplývá, že mikroprostředí kostní dřevě simulované stromálními buňkami má částečný ochranný účinek proti působení SAHA. Zajímalo nás, zda není tento efekt způsoben pouze zvýšenou koncentrací IL-6, který je, jak jsme potvrdili analýzou, produkován stromálními buňkami, a z tohoto důvodu byly buňky UHKT-944 kultivovány s různými koncentracemi IL-6 a poté ošetřeny SAHA a VPA. Proliferace byla měřena metodou AlamarBlue. Naše data ukazují, že koncentrace IL-6, která odpovídala průměrné koncentraci zjištěné při kultivaci buněk se stromálními buňkami během experimentů, tj. 1 ng/ml (5x vyšší koncentrace IL-6 oproti kontrole) neměla žádný vliv. V případě vyšší koncentrace IL-6 (3,3 ng/ml) došlo ke snížení antiproliferačního účinku obou inhibitorů. Rozdíly však nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. Ačkoliv byly buňky UHKT-944 kultivovány v přítomnosti IL-6, který byl do kultivačního média přidáván v koncentraci 1 ng/ml, skutečná koncentrace, která byla měřena imunometodou odpovídala 0,2 ng/ml IL-6. Z výsledků lze usuzovat, že k ochrannému efektu mikroprostředí kostní dřevě může přispívat samotný cytokin, v našem případě vyšší koncentrace IL-6, ale také interakce stromálních buněk či přítomnost jiných faktorů, které jsou těmito buňkami produkovány, což také dokládá řada studií [53,54].

#### **4.10 Ovlivnění buněčného cyklu linie UHKT-944 po působení SAHA a VPA**

Analýzou buněčného cyklu jsme zjistili, že působením daných koncentrací SAHA i VPA nedochází k zástavě buněčného cyklu. Rozdíly v distribuci jednotlivých fází buněčného

cyklu nebyly detekovány ani mezi buňkami kultivovanými v přítomnosti BMSCs a buňkami samotnými. Z výsledků je tedy zřejmé, že oba inhibitory ovlivňují buněčnou proliferaci jiným mechanismem než je zástava buněčného cyklu.

Pomocí průtokové cytometrie jsme také detekovali procentuální zastoupení buněk v tzv. sub-G1 fázi, která odpovídá buňkám v pozdní fázi apoptózy. Působením obou inhibitorů docházelo k akumulaci buněk v sub-G1 fázi. Pokud byly buňky ošetřeny SAHA a kultivovány 48 hodin v přítomnosti BMSCs, došlo ke snížení počtu buněk v sub-G1 fázi oproti buňkám bez BMSCs. Rozdíly však nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. Přestože HDAC inhibitory jsou známy svojí schopností indukovat zástavu buněčného cyklu v různých typech nádorů včetně MM [14,55,56], v souladu s našimi závěry Du a spol. dokazuje, že butyrát sodný, látka ze skupiny HDAC inhibitorů, není schopna indukovat zástavu buněčného cyklu v G1 fázi [57]. Ke stejným závěrům dospěl i Gao a spol., který zjistil, že panobinostat, jeden ze slibných léků s inhibičním účinkem na HDAC, není schopen navodit zástavu buněčného cyklu, a to ani v kombinaci s inhibitorem proteazomu carfilzomibem [58]. Rozdílná schopnost látek indukovat zástavu buněčného cyklu může být zapříčiněna především různými typy testovaných buněčných linií či působením rozdílných látek.

#### **4.11 Ovlivnění signálních drah JAK/STAT a PI3K/Akt působením SAHA a VPA**

Abychom zjistili, zda vybrané HDAC inhibitory ovlivňují JAK/STAT a PI3K/Akt signální dráhy, testovali jsme míru fosforylace tyrozinové kinázy JAK2, transkripčního faktoru STAT3, proteinu Akt a dále změny ve fosforylaci substrátů Akt.

Působením VPA došlo ke snížení fosforylace STAT3 (Tyr705), jak ukázaly výsledky analýzy pomocí ELISA. Překvapivě byla fosforylace STAT3 snížena i v případě kokultivace buněk s BMSCs, kde jsme předpokládali pouze částečný efekt. Důvodem našeho předpokladu byla námi ověřená schopnost BMSCs produkovat velké množství IL-6, který je odpovědný za aktivaci JAK/STAT signální dráhy [59]. Schopnost VPA selektivně inhibovat fosforylaci STAT3 byla poprvé popsána Zhuem a spol. na NK buňkách [60]. Kromě VPA může být JAK/STAT signální dráha u myelomových buněk blokována inhibitorem JAK AZD1480 a to i v případě kokultivace buněk s BMSCs, což je v souladu s výsledky našich experimentů [61]. Výsledky byly také potvrzeny Western blotem, kde byla testována míra fosforylace STAT3 a JAK2. Působením VPA došlo ke snížení fosforylace obou testovaných proteinů. Působením

obou inhibitorů došlo také ke snížení fosforylace Akt. V případě ošetření buněk VPA nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly ve fosforylaci testovaných proteinů mezi buňkami kultivovanými s BMSCs a buňkami bez BMSCs. Rozdíly však byly patrné v případě buněk ošetřených SAHA, přičemž vliv BMSCs na účinek SAHA byl nejvíce zřejmý v případě změn fosforylace substrátů Akt. Domníváme se, že tento efekt může být způsoben přítomností stromálních buněk.

#### **4.12 Charakterizace buněčné linie UHKT-893**

U linie UHKT-893 byl cytogenetickou analýzou zjištěn hyperdiploidní karyotyp se strukturními a početními změnami zahrnující mimo jiné trisomii 9, 19 a 21, které se vyskytují častěji u pacientů s hyperdiploidním typem myelomu [62]. Trisomie 9 a 19 jsou spojovány s lepší prognózou [63]. Ztráta chromozomu X u žen, která byla také zjištěná u linie UHKT-893, je jednou z dalších početních změn chromozomů, které se často vyskytují u MM [64]. Většina strukturních aberací zjištěných u linie UHKT-893 nebyla dosud popsána a jejich prognostický význam není znám. V buňkách UHKT-893 kultivovaných po dobu 4 a 7 měsíců byla prokázána přítomnost somatické hypermutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinového genu (IgVH). Byla zjištěna klonální přestavba VH4-39, která vykazovala 87,8% homologii se zárodečnou linií. Výsledky tedy potvrzují klonální původ této linie. Postupným snižováním koncentrace IL-6 v médiu se nám podařilo ustavit linii UHKT-893, která je zcela nezávislá na IL-6. Tato sublinie byla pojmenována UHKT-893a.

### **5. ZÁVĚRY**

Ustavení buněčné linie je stále náhodnou událostí s velmi malou úspěšností. Přesto se nám podařilo ustavit dvě permanentní buněčné linie závislé na IL-6 a sublinii nezávislou na IL-6 s charakterem plazmatických buněk odvozených od pacientky s myelomem (UHKT-893, UHKT-893a) a pacienta s plazmocelulární leukémií (UHKT-944). Linie UHKT-893 byla charakterizována v rámci diplomové práce Mgr. Ireny Vančurové. V disertační práci jsme se zaměřili na charakterizaci plazmocelulární linie UHKT-944 a zároveň byly u linie UHKT-893 provedeny další analýzy včetně vyšetření klonální přestavby IgVH genů a cytogenetická analýza, které přispěly k detailnějšímu popisu této buněčné linie. U linie UHKT-944 byl prokázán fenotyp maligních plazmatických buněk a zjištěna produkce imunoglobulinu IgA1-kappa. Cytogenetickou analýzou byl prokázán téměř tetraploidní karyotyp s numerickými a strukturními aberacemi typickými pro MM a PCL. Výsledky analýzy přestaveb imunoglobulinových genů potvrdily klonální původ linie UHKT-944 a přítomnost somatické

hypermutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinového genu. Ustavené buněčné linie jsou nepostradatelným nástrojem pro studium patogeneze tohoto onemocnění jak na buněčné, tak také molekulární úrovni. Obě linie UHKT-893 i UHKT-944 byly zaslány do německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig) a jsou volně k dispozici pro výzkumné účely. Sesterská linie UHKT-893a nezávislá na IL-6 bude užitečným modelem pro studium vlivu tohoto cytokinu na buněčnou signalizaci u mnohočetného myelomu.

Ve druhé části disertační práce jsme se zaměřili na studium vlivu HDAC inhibitorů, kyseliny valproové (VPA) a suberoylanilidu kyseliny hydroxamové (SAHA), na buněčnou linii UHKT-944 v přítomnosti či nepřítomnosti mikroprostředí kostní dřeně. Zjistili jsme, že SAHA i VPA indukují apoptózu závislou na kaspázách a inhibují buněčný růst, nebyl však u nich pozorován vliv na zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Naše výsledky ukazují, že jedním z mechanismů působení VPA na tyto buňky je inhibice JAK/STAT signální dráhy. Dále jsme prokázali, že působení inhibitorů je ovlivněno mikroprostředím buňky, především přítomností stromálních buněk z kostní dřeně pacientů s MM. Naše výsledky naznačují, že SAHA i VPA by mohly představovat slibné látky v terapii MM a PCL. Mikroprostředí kostní dřeně bychom neměli opomenout v případě testování nových potenciálních léků proti těmto hematologickým malignitám.

# CURRICULUM VITAE

**Jméno a příjmení:** Ilona Burianová

**Rodné příjmení:** Vyhlídalová

**Datum a místo narození:** 31. 3. 1983 Nové Město na Moravě

**Místo trvalého pobytu:** Na Křečku 348, 109 00 Praha 15

**Telefon:** +420 776 147 707

**E-mail:** [yla@atlas.cz](mailto:yla@atlas.cz)

## Dosavadní praxe:

### 2015 – současnost

- mateřská dovolená

### 2013 – současnost Thomayerova nemocnice, Oddělení klinické biochemie

- odborný pracovník v laboratorních metodách
- provádění základních a specializovaných biochemických vyšetření, práce s automatickými analyzátory, stanovení koncentrací léčiv metodou HPLC, spolupráce s klinickým farmakologem, práce s laboratorním informačním systémem (LIS) a počítačovým systémem SLP, výzkumná činnost

### 2011 – 2013 Thomayerova nemocnice, Oddělení klinické farmakologie

- odborný pracovník v laboratorních metodách
- měření hladin léčiv metodou HPLC, FPIA, MEIA, spolupráce s klinickým farmakologem, zajištění běžného chodu laboratoře, výzkumná činnost

### 2009 – 2011 - Ústav hematologie a krevní transfuze (ÚHKT), Oddělení proteomiky

- vědecký pracovník
- práce s buněčnými kulturami, elektroforetické metody, Western blotting, ELISA

## Vzdělání:

### 2007 – současnost Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra biochemie

- doktorské studium v programu biochemie



- dizertační práce vypracována na Oddělení proteomiky ÚHKT

**2005 – 2007** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra analytické chemie

- obor Klinická a toxikologická analýza
- ukončeno státní závěrečnou zkouškou, titul: Mgr.

**2002 – 2005** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra analytické chemie

- obor Klinická a toxikologická analýza
- ukončeno státní závěrečnou zkouškou, titul: Bc.

**1996 – 2002** Gymnázium Postupická, Praha

**Jazykové znalosti:**

- anglický jazyk – středně pokročilý, certifikát FCE (2009)
- francouzský jazyk – základy

**Počítačové znalosti:**

- MS-Office (Word, Excel, PowerPoint)
- internet

**Absolvované kurzy:**

- Akreditovaný kvalifikační kurz (AKK) – Odborné zdravotnické laboratorní metody, 2012, IPVZ, Praha
- Příprava na nelékařskou atestaci v oboru Klinická biochemie k získání specializované způsobilosti dle zákona č. 96/2004 Sb, IPVZ, Praha

**Přednášky:**

- **Burianová I.**, Bořecká K. Terapeutické monitorování hladin aktivního metabolitu karbamazepinu: skutečně nutnost v rutinní praxi? XXXIII Regionální pracovní dny klinické biochemie, 2014, Karlova Studánka
- Paluch Z., Richter T., Hermankova Z., Mottlova J., Sadilkova L., **Vyhliďalova I.**, Alusik S. Antidepressant therapy and therapeutic drug monitoring (TDM) in polymorbid elderly patients. Congress of the Clinical Section IAGG-ER, 2012, Prague

- Paluch Z., Adamek T., Chrbolka P., Mottlova J., Hermankova Z., Jedlickova V., **Vyhlídalova I.**, Alusik S. The Efficacy Antiplatelet Therapy with Acetylsalicylic Acid in Patients with Peripheral Arterial Disease. XXV World Congress of the International Union of Angiology, 2012, Prague
- Paluch Z., **Vyhlídalová I.**, Alušík Š.: Terapeutické monitorování antidepresiv v interní praxi. XIX kongres České internistické společnosti ČLS J.E. Purkyně. 2012. Brno
- Paluch Z., Mottlová J., **Vyhlídalová I.**, Sadílková L., Heřmánková Z., Richter T., Alušík Š.: TDM antidepresiv a klinická praxe. 15. Česká konference klinické farmakologie, 2012, Štířín

# SEZNAM PUBLIKACÍ

## Publikace, které jsou podkladem disertační práce:

1. Uherková L., Vančurová I., **Vyhlídalová I.**, Pleschnerová M., Špička I., Mihalová R., Březinová J., Hodný Z., Čermáková K., Polanská V., Marinov I., Jedelský P.L., Kuželová K., Stöckbauer P. Novel human multiple myeloma cell line UHKT-893. *Leuk Res* 2012; 37: 320-326. **IF** 2,606
2. **Vyhlídalová I.**, Uherková L., Pleschnerová M., Špička I., Březinová J., Michalová K., Čermáková K., Polanská V., Jedelský P.L., Hamšíková E., Kuželová K., Stöckbauer P. Characterization of a new human plasma cell leukemia cell line UHKT-944. *Eur J Haematol* 2015; 95: 352-360. **IF** 2,544
3. **Burianová I.**, Kuželová K., Mitrovský O., Špička I., Stöckbauer P., Žáčková M. Histone deacetylase inhibitors in plasma cell leukemia treatment: Effect of the microenvironment. *Neoplasma* (přijato s drobnými úpravami, v recenzním řízení). **IF** 1,961

## Publikace bez vztahu k tématu disertační práce:

1. **Burianová I.**, Bořecká K. Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary? *Clin Biochem* 2015; 48: 866-869. **IF** 2,382
2. Richter T., Alusik S., Paluch Z., **Burianova I.**, Cybulja A., Sadilkova L. Suppressive effect of citalopram on plasma concentrations of thromboxane B2. *Scand J Clin Lab Invest* 2015; 75: 615-620. **IF** 1,471
3. Paluch Z., **Vyhlídalová I.**, Chrbolka P., Alušík Š. Terapeutické monitorování léčiv v běžné praxi. *Farmakoterapie. Acta Medicinæ*. 2013, ročník 9. S. 10-15
4. Adamek T., Paluch Z., Sadilkova L., **Burianova I.**, Chrbolka P., Alusik S.  
The efficacy of antiplatelet therapy with aspirin in ischemic stroke survivors. (v recenzním řízení)

## 1. INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a type of cancer characterized by the presence of malignant plasma cells in the bone marrow. MM accounts for approximately 1 % of all cancers and for 10 % of all hematologic diseases. MM usually evolves from a disease termed monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) [1,2]. Plasma cell leukemia (PCL) is one of the most aggressive form of monoclonal gammopathies characterized by the presence of monoclonal plasma cells in the bone marrow and in the peripheral blood. It is considered to be a rare and aggressive variant of multiple myeloma and is associated with poor prognosis with median survival counted in months. The diagnostic criteria of PCL require both more than 20% plasma cells in peripheral blood and an absolute count greater than  $2 \times 10^9/l$  [3,4]. PCL is divided into primary and secondary. Primary PCL arise de novo and is observed in younger patients than MM. Primary PCL is more frequent than secondary PCL which evolves from an existing case of multiple myeloma as part of the terminal phase of the disease [5]. Despite progressive treatment approaches comprising novel drugs like proteasome inhibitors, immunomodulatory drugs, as well as high-dose chemotherapy and stem cell transplantation, the disease still remains incurable [6]. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are promising therapeutic agents for cancer treatment including myeloma. Inhibition of histone deacetylation results in opening of chromatin structure and subsequently in changes in the gene transcription. This leads to apoptosis, differentiation and/or growth arrest of tumour cells both *in vitro* and *in vivo* [7,8]. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) is an HDACi approved by the U. S. Food and Drug Administration for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. SAHA induces apoptosis and growth arrest in other hematological malignancies including myeloma and its efficacy increases in combination with other antimyeloma drugs [9,10]. Several HDACi including SAHA are currently being evaluated in clinical trials both in monotherapy and in combination with other therapeutics [11]. Valproic acid (VPA) is primarily used in the treatment of epilepsy and as a mood stabilising drug. Besides its anticonvulsant effect it also acts as a HDACi. VPA induces differentiation of cancer cells including malignant hematopoietic cells, suppresses tumour growth and metastasis *in vivo* and induce apoptosis in leukemic cells [12,13]. In MM VPA regulates the cell cycle and induces apoptosis as well as other types of cell death [14,15].

Bone marrow microenvironment (BMM) plays a critical role in the pathogenesis of MM and PCL and is considered to be responsible for the resistance to treatment [16]. Adhesion of malignant plasma cells to bone marrow stromal cells (BMSCs) activates several

signalling pathways and contributes to the production of several growth factors and cytokines including interleukin-6 (IL-6) which is considered to be one of the growth and survival factors in MM [17]. IL-6 stimulates angiogenesis and activates several signalling pathways such as JAK/STAT and PI3K/Akt [18,19]. It was reported that interaction with bone marrow stromal cells or extracellular matrix (ECM) proteins can protect myeloma cells from drug-induced cell death [20,21]. Not only IL-6, but other growth factors as well as cytokines produced by the bone marrow microenvironment are responsible for proliferation and survival of myeloma cells.

Permanent hematopoietic cell lines retain most of the genotypic and phenotypic features of malignant cells of patients with blood malignancies. Cells forming permanent cell lines are considered to be immortal when they are capable of greater than 150-200 doublings, another parameter may be continuous growth for at least one year [22]. Permanent cell lines derived from malignant cells are indispensable tools for the study of cellular and molecular mechanisms of pathogenesis of malignant diseases. Permanent cell lines are suitable models for testing new therapeutics in preclinical studies. Established murine myeloma cell lines are essential tools for monoclonal antibody production technology. With the development of high quality culture media supplemented with growth factors and cytokines, many cell lines representing rare types of acute and chronic leukemia have been established.

In this dissertation, we investigated the effect of SAHA and VPA on a plasma cell leukemia cell line UHKT-944. We further focused on possible protective effect of BMM, especially BMSCs, against the treatment with these inhibitors. The other aim of the dissertation was characterization of cell lines UHKT-893 and UHKT-944 which were established in our laboratory in 2010. The UHKT-893 cell line was characterized in the Thesis of MSc. Irena Vančurová. We performed additional analysis to complete characterization of this cell line and provided detailed characterization of the UHKT-944 cell line.

## **2. AIMS OF THE STUDY**

- to characterize the cell line UHKT-944 derived from a patient with plasma cell leukemia, which was established in our laboratory in 2010
- to characterize the cell line UHKT-893 derived from a patient with multiple myeloma which was established in our laboratory in the same year as UHKT-944. This cell line was established and characterized in the Thesis of MSc Irena Vančurová and we

performed additional analyses which contributed to detailed characterization of this cell line

- to describe and analyse the effect of selected histone deacetylase inhibitors on proliferation and induction of apoptosis in UHKT-944 cell line
- to find out and analyse possible protective effect of the bone marrow microenvironment against SAHA and VPA
- to determine the effect of SAHA and VPA on selected signalling pathways that are responsible for myeloma cell growth and survival

### **3. MATERIAL AND METHODS**

#### **3.1 Material**

For the experiments we used cell lines, antibodies and HDAC inhibitors listed in the dissertation. We further used commercially available chemicals and kits. All chemicals used were of analytical grade.

#### **3.2 Methods**

A detailed description of the used methods is given in the dissertation.

##### **3.2.1 List of methods used for establishment and characterization of cell lines**

Isolation and cultivation of cells from the bone marrow (bone marrow samples were obtained from patients diagnosed with MM for routine diagnostic purposes at the Division of Hematology, General Faculty Hospital, Prague. The same day, a part of the sample was sent to the Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT) and processed for research purposes), measurement of cell proliferation and viability (Cell Proliferation Reagent kit WST-1, trypan blue dye exclusion staining), morphology characterization (the plasma cell morphology has been confirmed by Giemsa staining of cytopsin preparations), immunophenotype FACS analysis, cytogenetic analysis (classical cytogenetic and mFISH analysis were performed at the Department of Cytogenetics, IHBT), analysis of IgVH gene mutation status (clonal IgVH rearrangements were identified in the Leukemia PCR Diagnostics Laboratory, IHBT), measurement of secreted immunoglobulins (the cell secretion of immunoglobulins and of their free light chains was routinely measured by a nephelometry technique at the Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General

Faculty Hospital, Prague), two-dimensional (2-D) electrophoresis, mass spectrometry (analysis was performed in the Laboratory of Mass Spectrometry, Faculty of Science of the Charles University in Prague), analysis of anti-HBsAg antibody (to evaluate the potential response of IgA antibody to hepatitis B virus (HBsAg) the samples were measured by a direct non-competitive ELISA using ETI-AB-AUK-3 (anti-HBs) kit and by CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) using Architect anti-HBs assay at the National Reference Laboratory (NRL) for Viral Hepatitis (National Institute of Public Health [NIPH], Prague)), mycoplasma detection (standard fluorescent DNA staining with Hoechst 33258), EBV detection (UHKT-944 cell line was routinely examined for the presence of Epstein–Barr virus (EBV) DNA by PCR at the NRL for Herpetic Viruses (NIPH, Prague)).

### **3.2.2 List of methods used for the study of the effect of HDACi on UHKT-944 cell line**

Cultivation of UHKT-944 cells (cells were cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, 1 ng/ml recombinant human IL-6, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), isolation and cultivation of bone marrow stromal cells (stromal cells were obtained by cultivation of mononuclear cells from patient's bone marrow and cultivated in RPMI-1640 medium without IL-6), cell cultivation in BMSCs surroundings (UHKT-944 cells were seeded in glass Erlenmeyer flasks with or without BMSCs, cells were allowed to interact with BMSCs for 3 days and thereafter HDACi were added to reach final concentrations of 0,5 mM or 1 mM VPA and 1 µM or 1,5 µM SAHA), cell cultivation in ECM surroundings (a tissue culture 96-well plate was coated with MaxGel™ ECM (MaxGel), cells were added to wells coated with MaxGel and to untreated wells, after 48 hours of incubation with ECM, HDACi were added to reach final concentrations of 0,5 mM or 1 mM VPA and 1 µM or 1,5 µM SAHA), cell cultivation in the presence of various concentrations of IL-6 (UHKT-944 cells were seeded in glass Erlenmeyer flasks with different IL-6 concentrations: 0,2 ng/ml, 1 ng/ml and 3,3 ng/ml. Cells were incubated for 3 days and thereafter HDACi were added to reach final concentrations of 0,5 mM or 1 mM VPA and 1 µM or 1,5 µM SAHA), cell proliferation assay (cell proliferation was measured after 24 and 48 hours of treatment using AlamarBlue® assay), detection of apoptosis (Annexin-V-FLUOS staining kit, Caspase-3/CPP32 colorimetric assay kit), measurement of adhesion to MaxGel and ECM proteins (Milliccoat 96-well ECM Screening Kit, performed according to procedure Kuželová et al. [23]), measurement of IL-6 concentrations (IL-6 was measured by means of immunoassay at the Department of Clinical

Biochemistry, Thomayer Hospital, Prague), flow cytometry cell cycle analysis, ELISA (PathScan® Phospho-Stat3 (Tyr705) Sandwich ELISA kit), SDS electrophoresis, Western blotting, statistical analysis (Student's t-test and Wilcoxon paired samples test)

## **4. RESULTS AND DISCUSSION**

### **4.1 Patient**

The patient's bone marrow sample was obtained from a 55-year-old man suffering from fatigue and bone pain. The patient was diagnosed with plasma cell leukemia of IgA- $\kappa$  type in June 2010. Flow cytometry analysis showed 25 % plasma cells in the bone marrow and 25 % in the peripheral blood. The patient was treated by 6 cycles of chemotherapy with Cyclophosphamide + Dexamethasone (CD) or Cyclophosphamide + Velcade + Dexamethasone (CVD) but unsuccessfully. The patient died of the disease progression accompanied by bronchopneumonia in November 2010.

### **4.2 Cell line establishment and growth characteristic**

Primary culture of the bone marrow sample was established 2. 6. 2010. Proliferation of cells with plasma cell morphology was noticed two months after the culture initiation and the emerging cell line was named UHKT-944. Cells from the primary culture were transferred to stroma cell-free culture flask. Bone marrow stromal cells produce growth factors and cytokines necessary for the myeloma cell growth [24]. Following each transfer to stroma cell-free culture flask without IL-6, the cells stopped proliferating and were progressively dying. For that reason, the cells were permanently cultivated in the presence of IL-6 which is considered to be the key factor responsible for the survival and growth of myeloma cells [25]. Kawano et al. first showed that myeloma cells proliferate in response to IL-6 [26]. Most of the cell lines derived from malignant plasma cell is dependent on IL-6 including UHKT-944 cell line [22]. Other factors such as fibronectin can also be critical [27]. Although IL-6 concentration of 0,5 ng/ml was found to be sufficient for the growth and survival of UHKT-944 cells, they were permanently cultivated in the presence of 1 ng/ml IL-6. The same concentration was used in other studies involving myeloma cell lines [28,29]. The dependence of UHKT-944 cells on IL-6 has been repeatedly verified.



### **4.3 Morphology of UHKT-944 cells**

Cytospine preparations of UHKT-944 cells stained by Giemsa showed a mixture of mononuclear, larger binuclear, and multinuclear cells with plasma cell morphology. Up to twelve nuclei in one cell were found among UHKT-944 cells, with rare incidence.

### **4.4 Immunophenotype FACS analysis of UHKT-944 cells**

The expression of CD138 and CD38 confirmed a plasma cell phenotype. UHKT-944 cells were negative for most of the tested B-cell, T-cell, and myeloid markers. The analysis also revealed the presence of monoclonal cytoplasmic Ig kappa light chain. Aberrant expression of CD28 on the surface of PCL and MM cell lines is very frequent and is also present on UHKT-944 cells. CD28 expression is associated with disease progression which is also supported by its increased expression in secondary PCL, occurring in patients with advanced or refractory MM [30]. Slight expression of CD56 was found in UHKT-944 cells. Strong expression of CD56 is characteristic for malignant plasma cells of MM patient [31]. Contrarily, in the study of Pellat-Deceunynck et al., patients with both primary and secondary PCL do not express CD56 or very weakly [32]. The B-cell marker CD19 was not detected in patients with PCL neither in UHKT-944 cells. The aberrant expression of CD33, the presence of CD98 and the absence or weak expression of CD56 and CD117 have been shown to correlate with a poor prognosis [33-36]. The same expression pattern was found in UHKT-944 cells. Endoglin (CD105) was negative in UHKT-944 cells, which was striking with regard to the positivity of all MM cell lines tested to date [22]. Strong coexpression of CD85k (ILT-3, LIR-5) with CD123 (IL-3R alpha) is peculiar, because CD85k is expressed on the surface of dendritic cells, monocytes and macrophages [37] and CD123 is highly expressed only in plasmacytoid dendritic cells and basophil granulocytes [38]. Also peculiar, a case of acute myeloid leukemia mimicking plasmacytoid dendritic precursor cell leukemia has been described [39]. High expression of CD98 have been shown to correlate with a poor prognosis of patients diagnosed with MM which is in agreement with the short survival of our patient numbered 944 [34]. CD184 (CXCR4) was not tested on other plasma cell derived cell lines at their establishment, but it was clearly present on UHKT-944 cells and also on plasma cells in patients with MM. It was demonstrated to be involved in migration and homing of MM cells [40]. CD3, CD8, CD34, CD13, CD15, and CD65 were negative on UHKT-944 and always negative in other plasma cell lines at the time of their establishment [22].

## 4.5 Secreted immunoglobulins

UHKT-944 cells were found to produce IgA1-kappa, which is in agreement with the finding of IgA and kappa light chain in the patient's serum and urine. We also found that UHKT-944 cells produce, but do not secrete free light chains. Synthesized but not secreted light chains were also detected in other myeloma cells [41].

One selected protein spot from 2-D electrophoresis was analysed by mass spectrometry and identified as human immunoglobulin alpha-1 (IgA1) heavy chain. A second spot showed similarity to human kappa light chain with the specificity to the hepatitis B surface antigen (HBsAg). Based on this finding, we tried to verify whether the antibody produced by UHKT-944 cells really displays the affinity to HBsAg. As we expected, the results of both immunoanalysis were negative. In 9-month-old UHKT-944 cells, sequence analysis of IgVH gene rearrangements revealed IgVH gene somatic hypermutation. The rearrangement was found of VH3-9 IgVH genes with 91% homology to the germline sequence. The results confirmed the clonal origin of the UHKT-944 cell line.

## 4.6 Cytogenetic analysis

Using mFISH and classical cytogenetic analysis, the cells were classified as near tetraploid with several numerical and structural abnormalities including translocation involving IgH locus on chromosome 14q32. These translocations are associated with progression of the disease [42-44]. In UHKT-944 cells, we detected t(14;20) translocation which is associated with poor prognosis. This translocation was also detected in some MM and PCL cell lines and corresponds with short survival of patient n. 944 [45,46]. This translocation was also detected in the patient's bone marrow sample at the time of diagnosis, which excludes the possibility that t(14;20) was the result of the long-term cell cultivation. The cytogenetic analysis of both patient's and UHKT-944 cells revealed monosomy of the 13th chromosome, which is also considered to be a negative prognostic factor in plasma cell leukemia [47]. Some missing or redundant chromosomes corresponding to those detected in UHKT-944 cells have been also found in several PCL, MM, and plasmacytoma cell lines.

T(1;9), (1;18), (6;18) (15;16), and del (5) were also found in plasma cell lines, but on different locuses and very rarely. UHKT-944 cells carry der(13)t(1;13), which was also found in FR4 plasmacytoma cell line [48]. Other structural abnormalities in UHKT-944 karyotype appear to have been noted for the first time among plasma cell derived cell lines [22].

#### **4.7 Mycoplasma and EBV detection**

Using PCR, UHKT-944 cells were shown to be negative for the presence of EBV-DNA. According to the fluorescent DNA staining, contamination by mycoplasma has been repeatedly excluded.

#### **4.8 Effect of SAHA and VPA on apoptosis in UHKT-944 cells**

Treatment by both SAHA and VPA increased phosphatidylserine externalization and the number of necrotic cells. When the cells were co-treated with the pan -caspase inhibitor, the effects were largely reduced suggesting that the cell death caused by these inhibitors is caspase-dependent. Both VPA and SAHA induced apoptosis via caspase-3 activation in UHKT-944 cells. Both VPA and SAHA have been shown to induce both caspase-dependent and -independent apoptosis or even non-apoptotic cell death and to inhibit the proliferation of other myeloma cell lines as well as in primary multiple myeloma cells [10,13,14].

#### **4.9 Impact of the bone marrow microenvironment (BMM) on antiproliferative effect of SAHA and VPA**

We found that both SAHA and VPA inhibited cell proliferation in a dose and time dependent manner. Cytotoxicity effect of SAHA and VPA was not influenced by the presence of ECM proteins. BMM simulated by ECM proteins had thus no protective effect which is in contrast to some studies [20,49,50]. The reason for that could be the low ability of UHKT-944 cells to adhere to plate coated with MaxGel. Adhesion assay using Millicoat 96-well ECM Screening Kit showed strong interaction of UHKT-944 cells only with laminin. Although laminin is a component of the MaxGel it may not be present in sufficient quantities. On the other hand, UHKT-944 cells might adhere to another ECM protein which is absent from MaxGel. Importantly, differences in the cell proliferation were observed between the cells co-cultured with BMSCs and cultured alone, especially in the presence of SAHA suggesting that BMSCs have partial protective effect against SAHA treatment. Previous studies showed that BMSCs protect myeloma cells from drug induce apoptosis or inhibit their antiproliferative effect [51,52].

The results revealed that BMSCs had partial protective effect against SAHA treatment. Because we proved that BMSCs produce IL-6, we further wanted to address the question whether IL-6 alone could be responsible for these observations. For that reason the cells were cultivated in the presence of various concentrations of IL-6 and thereafter HDACi were

added. Cell proliferation was measured using AlamarBlue assay. Concentration of IL-6 which corresponded to the mean concentration produced by BMSCs in the experiments – i.e. 1 ng/ml (5 times higher than in the culture medium from the control cells) did not have any effect, however higher concentration of IL-6 (3,3 ng/ml) had a tendency to decrease the antiproliferative effect of both VPA and SAHA. However, these results were not found statistically significant.

Although the UHKT-944 cells were cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 1 ng/ml IL-6, the real concentration of IL-6 measured by means of immunoassay was 0,2 ng/ml. Our results suggest that the protective effect of BMM may be partly due to IL-6 alone but also to the presence of stromal cells or other factors they produce as evidenced by several studies [53,54].

#### **4.10 Effect of SAHA and VPA on cell cycle distribution**

Using cell cycle analysis we showed that neither SAHA nor VPA had any significant effect on the cell cycle distribution of UHKT-944 cells cultured alone or in the presence of BMSCs. Hence, these compounds can influence the cell growth without causing cell cycle arrest. Using the cell cycle analysis, we also quantified the percentage of the cells in sub-G1 phase which represents a population of late apoptotic cells. We found that both VPA and SAHA increased sub-G1 cell population. When the cells were 48 hours treated with SAHA in the presence of BMSCs, the number of apoptotic cells was lower in comparison with cells cultured with SAHA alone. However, these results were not found statistically significant. In several studies, HDACi have been shown to induce a cell cycle arrest in several types of tumour including MM [14,55,56]. In agreement with our data, Du et al. reported that another HDACi, sodium butyrate, did not arrest the cell cycle in the G1 phase [57]. Similarly, panobinostat, one of promising HDACi for combined therapy showed no effect on MM cell cycle distribution while used alone or in combination with the proteasome inhibitor carfilzomib [58]. Reasons for discrepancies in studies are unclear, but different type of treatment involving different cell lines may be responsible for these different results.

#### **4.11 Effect of SAHA and VPA on JAK/STAT and PI3K/Akt signalling pathways**

To find out whether SAHA and VPA target JAK/STAT or PI3K/Akt signalling pathways, we investigated the phosphorylation status of tyrosine kinase JAK2, transcription

factor STAT3, Akt protein and also the profile of Akt phospho-serine/threonine substrates. Results from ELISA test of pSTAT3(Tyr705) showed that VPA down-regulated the phosphorylation of STAT3 even when the cells were co-cultured with BMSCs where we had assumed only partial effect. The reason for this assumption was the fact that BMSCs produce high concentration of IL-6 which is one of the factors responsible for JAK/STAT pathway activation [59]. In consistency with our data, VPA has been shown to inhibit STAT3 phosphorylation in natural killer cells as reported by Zhu et al. [60]. Apart from VPA, a novel JAK inhibitor AZD1480 was shown to block JAK/STAT signalling in myeloma cells cultured alone, or even when co-cultured with BMSCs, similarly as in our experimental system [61]. These results were confirmed by western blot analyses showing the decrease of pJAK2 and pSTAT3. Both VPA and SAHA also down-regulated the phosphorylation at the tested Akt phosphorylation sites. No significant differences were found between the cells cultured alone or co-cultured with BMSCs when VPA was present. Interestingly, co-culture of UHKT-944 cells with BMSCs slightly influenced the phosphorylation changes in case of SAHA treatment. The effect was more evident in Akt substrates phosphorylation changes. We suppose this might be attributed to the presence of BMSCs.

#### **4.12 Characterization of the cell line UHKT-893**

Using cytogenetic analysis, UHKT-893 cells were classified as hyperdiploid with numerical and structural abnormalities including trisomy 9, 19 and 21, which are often found in patients with the hyperdiploid variant of myeloma [62]. Trisomy of chromosomes 9 and 19 has been shown to be associated with a favourable prognosis [63]. The loss of chromosome X in women belongs to the most frequent chromosomal losses in MM and the chromosome X was also missing in UHKT-893 cells [64]. The most of the structural abnormalities in UHKT-893 karyotype appear to have been noted for the first time and their prognostic significance is not known. In 4-month-old and 7-month-old UHKT-893 cells, sequence analysis of IgVH gene rearrangements revealed IgVH gene somatic hypermutation. The rearrangement was found of VH4-39 IgVH genes with 87,8% homology to the germline sequence. The results confirmed the clonal origin of the UHKT-893 cell line. We succeeded in establishing IL-6 independent subline termed UHKT-893 by gradually reducing the concentration of IL-6 in culture medium.

## 5. CONCLUSIONS

Establishment of a cell line is still a coincidental event with very low incidence. In spite of this we succeeded in establishing IL-6-dependent permanent cell lines and IL-6-independent subline with the character of plasma cells derived from a patient with myeloma (UHKT-893, UHKT-893a) and a patient with plasma cell leukemia (UHKT-944). UHKT-893 cell line was established and partially characterized in the Thesis of MSc. Irena Vančurová. We focused on characterization of the plasma cell leukemia cell line UHKT-944 as well as additional analyses including sequence analysis of IgVH gene rearrangements and cytogenetic analysis which contributed to more detailed characterization of the UHKT-893 cell line. Analysis of UHKT-944 cells showed the phenotype of malignant plasma cells and production of immunoglobulin IgA1-kappa. According to cytogenetic analysis the cells were classified as near tetraploid with several numerical and structural abnormalities typical for MM and PCL. Sequence analysis of IgVH gene rearrangements confirmed the clonal origin of UHKT-944 cell line and revealed IgVH gene somatic hypermutation. Established cell lines are indispensable tools for the study of cellular and molecular mechanisms of pathogenesis of many malignant diseases. Both cell lines UHKT-893 and UHKT-944 were sent to the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig) and are freely available for research purposes. Interleukin-6 independent subline UHKT-893a provides a useful model for studying the effects of this cytokine on cell signalling in MM.

The second part of the thesis was focused on the effect of selected HDACi VPA and SAHA on the UHKT-944 cell line in the presence or absence of the bone marrow microenvironment. We found that SAHA and VPA induced caspase-dependent apoptosis, inhibited cell proliferation but had no effect on the cell cycle distribution of UHKT-944 cells. Our results suggest that inhibition of JAK/STAT pathway is one of the mechanisms of action of VPA in myeloma cells. We further revealed that BMM, especially BMSCs derived from patients with MM, influenced the efficiency of used inhibitors. In conclusion, VPA and SAHA might represent an additional therapeutic strategy in the treatment of MM and PCL. According to our results, BMM should be taken into account when investigating a prospective therapeutic agents against these hematologic malignancies.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2962-2972.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1860-1873.
3. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 1974; 133: 813-818.
4. Noel P, Kyle RA. Plasma cell leukemia: an evaluation of response to therapy. *Am J Med* 1987; 83: 1062-1068.
5. Bladé J, Kyle RA. Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 1259-1272.
6. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J. Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024725024
7. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 2011; 3: 166 -179.
8. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 5459 - 5468.
9. Cheriya V, Glaser KB, Healan -Greenberg C, Waring JF, Kalaycio M, Borden EC. Epigenetic regulation of IFN - 2b in multiple myeloma by a hydroxamic acid histone deacetylase (HDAC) inhibitor (SAHA) and a non -hydroxamic acid HDAC inhibitor (A - 423378). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*; 2007; 25: No 18S: suppl. 14048.
10. Mitsiades N, Mitsiades CS , Richardson PG , McMullan C , Poulaki V , Fanourakis G, Schlossman R , Chauhan D , Munshi NC , Hideshima T , Richon VM , Marks PA , Anderson KC. Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood* 2003; 101: 4055-4062.
11. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, Palumbo A, Mateos MV, Orłowski R, Kumar S, Usmani S, Roodman D, Niesvizky R, Einsele H, Anderson KC, Dimopoulos MA, Avet-Loiseau H, Mellqvist UH, Turesson I, Merlini G, Schots R, McCarthy P, Bergsagel L, Chim CS, Lahuerta JJ, Shah J, Reiman A, Mikhael J, Zweegman S, Lonial S, Comenzo R, Chng WJ, Moreau P, Sonneveld P, Ludwig H, Durie BG, Miguel JF. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 2014; 28: 525-542.
12. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001; 20: 6969-6978.
13. Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk Res* 2002; 26: 495-502.
14. Schwartz C, Palissot V, Aouali N, Wack S, Brons NH, Leners B, Bosseler M, Berchem G Valproic acid induces non-apoptotic cell death mechanisms in multiple myeloma cell lines. *Int J Oncol* 2007; 30: 573-582.
15. Neri P, Tagliaferri P, Di Martino MT, Calimeri T, Amodio N, Bulotta A, Ventura M, Eramo PO, Viscomi C, Arbitrio M, Rossi M, Caraglia M, Munshi NC, Anderson KC, Tassone P. In vivo anti-myeloma activity and modulation of gene expression profile induced by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Br J Haematol* 2008; 143: 520-531.
16. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1564-1573.

17. Uchiyama HI, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993; 82: 3712-3720.
18. Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, Weber D, Alexanian R, Raj-Vadhan S, Estrov Z, Talpaz M, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood* 2004; 103: 3175-3184.
19. Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1574-1580.
20. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999; 93: 1658-1667
21. Grigorieva I, Thomas X, Epstein J. The bone marrow dexamethasone. Exp stromal environment is a major factor in myeloma cell resistance to Hematol 1998; 26: 597-603.
22. Drexler HG. Guide to leukemia-lymphoma cell lines, 2nd ed. Braunschweig; 2010 [CD medium].
23. Kuželová K, Pluskalová M, Brodská B, Otevřelová P, Elknerová K, Grebeňová D, Hrkal Z. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) at subtoxic concentrations increases the adhesivity of human leukemic cells to fibronectin. *J Cell Biochem* 2010; 109: 184 -195
24. Rougier F, Cornu E, Praloran V, Denizot Y. IL-6 and IL-8 production by human bone marrow stromal cells. *Cytokine* 1998; 10: 93-97.
25. Urashima M, Ogata A, Chauhan D, Vidriales MB, Teoh G, Hoshi Y, Schlossman RL, DeCaprio JA, Anderson KC. Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. *Blood* 1996; 88: 2219-2227.
26. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T: Autocrine generation and requirement of BSF-2fL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332: 83-85.
27. Sakai A, Oda M, Itagaki M, Yoshida N, Arihiro K, Kimura A. Establishment of an HS23 stromal cell-dependent myeloma cell line: fibronectin and IL-6 are critical. *Int J Hematol* 2010; 92: 598-608.
28. Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Löffler D, Koczan D, Thiesen HJ, Burger R, Gramatzki M, Horn F. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 2004; 103: 242-251.
29. Voorhees PM, Chen Q, Small GW, Kuhn DJ, Hunsucker SA, Nemeth JA, Orlowski RZ. Targeted inhibition of interleukin-6 with CNTO 328 sensitizes pre-clinical models of multiple myeloma to dexamethasone-mediated cell death. *Br J Haematol* 2009; 145: 481-490.
30. Pellat-Deceunynck, R. Bataille, N. Robillard, et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 1994; 84: 2597-2603
31. Van Camp B, Durie BG, Spier C, De Gaele M, Van Riet I, Vela E, Frutiger Y, Richter L, Grogan TM. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 1990; 76: 377-382.
32. Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Jego G, Puthier D, Robillard N, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998; 12: 1977-1982.



33. Shim H, Ha JH, Lee H, Sohn JY, Kim HJ, Eom HS, Kong SY. Expression of myeloid antigen in neoplastic plasma cells is related to adverse prognosis in patients with multiple myeloma. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 8. Article ID 893243.
34. Isoda A, Kaira K, Iwashina M, et al. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci* 2014; 105: 1496-1502.
35. Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1293-1299.
36. Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2737-2744.
37. Cella M, Döhning C, Samaridis J, Dessing M, Brockhaus M, Lanzavecchia A, Colonna M. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* 1997; 185: 1743-1751.
38. Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, Archibeque T, Lipscomb MF. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol*. 2006; 177: 7784-7793.
39. Sano F, Tasaka T, Nishimura H, Akiyama T, Kubo Y, Matsushashi Y, Wada H, Sugihara T, Yamakawa M, Sadahira Y. A peculiar case of acute myeloid leukemia mimicking plasmacytoid dendritic precursor cell leukemia. *J Clin Exp Hematop* 2008; 48: 65-69.
40. Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 2708-2717.
41. Mosmann TR, Baumal R, Williamson AR. Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells. I. Functional analysis by cell fusion. *Eur J Immunol* 1979; 9: 511-516.
42. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002; 99: 2185-2191.
43. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-1424.
44. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-4575.
45. Boersma-Vreugdenhil GR, Kuipers J, Van Stralen E, Peeters T, Michaux L, Hagemeyer A, Pearson PL, Clevers HC, Bast BJ. The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *Br J Haematol* 2004; 126: 355-363.
46. Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Protheroe RKM, Stockley DM, Harrison CJ, Cross NCP, Szubert AJ, Drayson MT, Morgan GJ. The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica* 2010; 95: 1221-1225.
47. Garcia-Sanz R, Orfão A, González M, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simón JA, Rasillo A, Miguel JF. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999; 93: 1032-1037.

48. Tagawa S, Doi S, Taniwaki M, Abe T, Kanayama Y, Nojima J, Matsubara K, Kitani T. Amylase-producing plasmacytoma cell lines, AD3 and FR4, with der(14)t(8;14) and dic(8)t(1;8) established from ascites. *Leukemia* 1990; 4: 600-605.
49. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* 2000; 19: 4319-4327.
50. Ding Y, Shen Y2. Notch increased vitronection adhesion protects myeloma cells from drug induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467: 717-722.
51. Grigorieva I, Thomas X, Epstein J. The bone marrow stromal environment is a major factor in myeloma cell resistance to dexamethasone. *Exp Hematol* 1998; 26: 597-603.
52. Hao M, Zhang L, An G, Meng H, Han Y, Xie Z, Xu Y, Li C, Yu Z, Chang H, Qiu L. Bone marrow stromal cells protect myeloma cells from bortezomib induced apoptosis by suppressing microRNA-15a expression. *Leuk Lymphoma* 2011; 52: 1787-1794.
53. Xu FH, Sharma S, Gardner A, Tu Y, Raitano A, Sawyers C, Lichtenstein A. Interleukin - 6 - induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis: support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of the JNK/SAPK pathway. *Blood* 1998; 92: 241-251.
54. Xu F, Gardner A, Tu Y, Michl P, Prager D, Lichtenstein A. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone -induced apoptosis by insulin -like growth factors. *Br J Haematol* 1997; 97: 429-440.
55. Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O, Boccuzzi G. Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1383-1389.
56. Huang L, Pardee AB. Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Mol Med* 2000; 6: 849-866.
57. Du HL, Ren LM, Chen H, Zhu Y, Qi Y. Re -expression of p16 gene in the myeloma cell line U266 induced by synergy of sodium butyrate and 5 -Aza -2' -deoxycytidine. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002; 22: 981-984.
58. Gao L, Gao M, Yang G, Tao Y, Kong Y, Yang R, Meng X, Ai G, Wei R, Wu H, Wu X, and Shi J. Synergistic Activity of Carfilzomib and Panobinostat in Multiple Myeloma Cells via Modulation of ROS Generation and ERK1/2. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 1-9.
59. Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1005-1014.
60. Zhu S, Denman CJ, and Lee DA. Valproic Acid Selectively Inhibits STAT3 Phosphorylation. 51th ASH Annual Meeting & Exposition. Dec 5, 2009. New Orleans, LA
61. Scuto A, Krejci P, Popplewell L, Wu J, Wang Y, Kujawski M, Kowolik C, Xin H, Chen L, Wang Y, Kretzner L, Yu H, Wilcox WR, Yen Y, Forman S, Jove R. The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival. *Leukemia* 2011; 25: 538 -550.
62. Smetana J, Fröhlich J, Vranová V, Mikulášová A, Kuglik P, Hájek R. Oligonucleotide-based array CGH as a diagnostic tool in multiple myeloma patients. *Klin Onkol* 2011; 24: 43-48.
63. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, Attal M, Marit G, Mathiot C, Facon T, Moreau P, Anderson KC, Campion L, Munshi NC, Minvielle S. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4585-4590.
64. Tabertero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz M, Nájera L, García-Isidoro M, Peréz-Simon JA, Gonzalez M, Wiegant J, Raap AK, Orfão A. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 1996; 149: 153-161.

# CURRICULUM VITAE

**Name:** Ilona Burianová

**Birth name:** Vyhlídalová

**Date and place of birth:** 31. 3. 1983 Nové Město na Moravě

**Permanent stay:** Na Křečku 348, 109 00 Prague 15

**Phone:** +420 776 147 707

**E-mail:** [yla@atlas.cz](mailto:yla@atlas.cz)

## Professional Experience:

### 2015 – present

- maternity leave

### 2013 – present Thomayer Hospital, Department of Clinical Chemistry

- specialist in laboratory methods
- performing basic and specialised biochemical tests, automated biochemical analysers operation, determination of drug concentrations using HPLC, collaboration with clinical pharmacologist, handling laboratory information system (LIS) and electronic laboratory notebooks (SLP), research activities

### 2011 – 2013 Thomayer Hospital, Department of Clinical Pharmacology

- specialist in laboratory methods
- determination of drug concentrations using HPLC, FPIA, MEIA, collaboration with clinical pharmacologist, ensuring the normal operation of laboratory, research activities
- **2009 – 2011** - Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT), Department of Proteomics
- researcher
- work with cell cultures, electrophoretic methods, Western blotting, ELISA

## Education:

**2007 – present**

- Ph.D. student at Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry
- Field of study: Biochemistry
- The research was carried out at the Department of Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT)

**2005 – 2007**

- Master's degree at Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry
- Field of study: Clinical and Toxicological Analysis

**2002 – 2005**

- Bachelor's degree at Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry
- Field of study: Clinical and Toxicological Analysis

**1996 – 2002** Grammar school Postupická, Prague

**Language skills:**

- English – intermediate, FCE (2009)
- French – elementary

**Computer skills:**

- MS-Office (Word, Excel, PowerPoint)
- internet

**Attended courses:**

- accredited qualification course (AKK) – Medical Laboratory Technics, 2012, The Institute for Postgraduate Medical Education (IPVZ), Prague
- preparing for attestation in the field of Clinical Chemistry to obtain specialized technical competence in the connection with the Act No. 96/2004 Coll, IPVZ, Prague

### Oral presentations:

- **Burianová I.**, Bořecká K. Terapeutické monitorování hladin aktivního metabolitu karbamazepinu: skutečně nutnost v rutinní praxi? XXXIII Regionální pracovní dny klinické biochemie, 2014, Karlova Studánka
- Paluch Z., Richter T., Hermankova Z., Mottlova J., Sadilkova L., **Vyhliďalova I.**, Alusik S. Antidepressant therapy and therapeutic drug monitoring (TDM) in polymorbid elderly patients. Congress of the Clinical Section IAGG-ER, 2012, Prague
- Paluch Z., Adamek T., Chrbolka P., Mottlova J., Hermankova Z., Jedlickova V., **Vyhliďalova I.**, Alusik S. The Efficacy Antiplatelet Therapy with Acetylsalicylic Acid in Patients with Peripheral Arterial Disease. XXV World Congress of the International Union of Angiology, 2012, Prague
- Paluch Z., **Vyhliďalová I.**, Alušík Š.: Terapeutické monitorování antidepresiv v interní praxi. XIX kongres České internistické společnosti ČLS J.E. Purkyně. 2012. Brno
- Paluch Z., Mottlová J., **Vyhliďalová I.**, Sadílková L., Heřmánková Z., Richter T., Alušík Š.: TDM antidepresiv a klinická praxe. 15. Česká konference klinické farmakologie, 2012, Štířín

## SELECTED PUBLICATIONS

### Publications included in the Ph.D. thesis:

1. Uherková L., Vančurová I., **Vyhlídalová I.**, Pleschnerová M., Špička I., Mihalová R., Březinová J., Hodný Z., Čermáková K., Polanská V., Marinov I., Jedelský P.L., Kuželová K., Stöckbauer P. Novel human multiple myeloma cell line UHKT-893. *Leuk Res* 2012; 37: 320-326. **IF** 2,606
2. **Vyhlídalová I.**, Uherková L., Pleschnerová M., Špička I., Březinová J., Michalová K., Čermáková K., Polanská V., Jedelský P.L., Hamšíková E., Kuželová K., Stöckbauer P. Characterization of a new human plasma cell leukemia cell line UHKT-944. *Eur J Haematol* 2015; 95: 352-360. **IF** 2,544
3. **Burianová I.**, Kuželová K., Mitrovský O., Špička I., Stöckbauer P., Žáčková M.. Histone deacetylase inhibitors in plasma cell leukemia treatment: Effect of the microenvironment. *Neoplasma* (accepted with minor revisions). **IF** 1,961

### Other publications:

1. **Burianová I.**, Bořecká K. Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary? *Clin Biochem* 2015; 48: 866-869. **IF** 2,382
2. Richter T., Alusik S., Paluch Z., **Burianova I.**, Cybulja A., Sadilkova L. Suppressive effect of citalopram on plasma concentrations of thromboxane B2. *Scand J Clin Lab Invest* 2015; 75: 615-620. **IF** 1,471
3. Paluch Z., **Vyhlídalová I.**, Chrbolka P., Alušík Š. Terapeutické monitorování léčiv v běžné praxi. *Farmakoterapie. Acta Medicinae.* 2013, volume 9. p. 10-15.
4. Adamek T., Paluch Z., Sadilkova L., **Burianova I.**, Chrbolka P., Alusik S.  
The efficacy of antiplatelet therapy with aspirin in ischemic stroke survivors.  
(manuscript under revision)