

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Iona Burianová

Inhibitory histonedeacetyláz v léčbě plazmocelulární leukemie: vliv mikroprostředí kostní
dřeně

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

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Praha, 2016

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, 1. 9. 2016

Mgr. Ilona Burianová

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašujeme, že Mgr. Ilona Burianová rozhodujícím způsobem přispěla (30 – 90 %) ke vzniku všech článků, které jsou součástí této disertační práce. Podílela se na všech experimentech, na jejich plánování a na interpretaci výsledků.

V Praze, 1. 9. 2016

Doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Poděkování:

Ráda bych zde vyslovila poděkování svému školiteli Doc. RNDr. Petru Stöckbauerovi CSc. za vedení a přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegyním Mgr. Lence Uherkové Ph.D. a RNDr. Markétě Žáčkové Ph.D. za vytvoření přátelského prostředí, jejich cenné rady a pomoc při experimentech. Dále děkuji profesoru MUDr. Ivanu Špičkoví a lékařům z 1. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za poskytnutí cenných vzorků kostní dřeně. V neposlední řadě děkuji vedoucí Oddělení proteomiky RNDr. Kateřině Kuželové Ph.D. za pomoc a cenné rady a možnost vypracování disertační práce na tomto oddělení. A závěrem bych chtěla poděkovat celé mé rodině, dceři Elišce za trpělivost a především manželovi Zdeňkovi za pochopení pro mou práci a jeho důvěru v úspěšné dokončení mého studia.

OBSAH

OBSAH.....	4
1 Úvod.....	12
1.1 Mnohočetný myelom a plazmocelulární leukemie.....	12
1.1.1 Chromozomální aberace MM a PCL.....	14
1.1.2 Imunofenotyp MM a PCL.....	16
1.1.3 Léčba MM a PCL.....	18
1.2 Mikroprostředí kostní dřeně.....	20
1.2.1 Adhezivní molekuly.....	21
1.2.2 Stromální buňky kostní dřeně a proteiny ECM.....	22
1.2.3 Interleukin-6.....	22
1.2.4 Signální dráhy aktivované interakcí mikroprostředí kostní dřeně s myelomovými buňkami.....	23
1.3 Epigenetické mechanismy.....	24
1.3.1 Metylace DNA.....	24
1.3.2 Acetylace histonů.....	25
1.4 Hematopoetické buněčné linie a jejich význam.....	28
1.4.1 Historie buněčných linií.....	29
2 Cíle práce.....	31
3 Materiál a metody.....	32
3.1 Materiál.....	32
3.1.1 Přehled použitých buněčných linií.....	32
3.1.2 HDAC inhibitory.....	33
3.1.3 Seznam použitých protilátek.....	33
3.2 Přehled metod.....	33
3.2.1 Izolace a kultivace buněk z kostní dřeně pacientů.....	33

3.2.2	Měření buněčné proliferace, viability a morfológická charakterizace	34
3.2.3	Určení počtu vícejaderných buněk metodou průtokové cytometrie.....	34
3.2.4	Imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie.....	35
3.2.5	Cytogenetická analýza	36
3.2.6	Stanovení mutačního stavu IgVH genů.....	37
3.2.7	Průkaz sekrece imunoglobulinů	37
3.2.8	Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie	37
3.2.9	Detekce anti-HBsAg.....	38
3.2.10	Průkaz kontaminace buněk mykoplazmou	39
3.2.11	Detekce EBV.....	39
3.2.12	Buněčná linie UHKT-944.....	39
3.2.13	Stromální buňky kostní dřeně (BMSCs)	39
3.2.14	Kultivace buněk v přítomnosti BMSCs.....	40
3.2.15	Kultivace buněk v přítomnosti extracelulární matrix (ECM).....	40
3.2.16	Kultivace buněk v přítomnosti různých koncentrací IL-6.....	40
3.2.17	Měření buněčné proliferace pomocí AlamarBlue®	41
3.2.18	Detekce apoptózy	41
3.2.19	Měření adhezivity buněk UHKT-944 k ECM	42
3.2.20	Měření koncentrace interleukinu-6	42
3.2.21	Analýza buněčného cyklu.....	43
3.2.22	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	43
3.2.23	Western blotting	44
3.2.24	Statistická analýza	44
4	Výsledky	45
4.1	Pacient	45
4.2	Ustavení buněčné linie UHKT-944	45
4.3	Růstové charakteristiky	45

4.4	Morfologie buněk linie UHKT-944	47
4.5	Imunofenotypizace buněk UHKT-944.....	49
4.6	Detekce a analýza imunoglobulinů	51
4.7	Vyloučení přítomnosti EBV a mykoplazmy	52
4.8	Cytogenetická analýza	52
4.9	Charakterizace buněčné linie UHKT-893	54
4.9.1	Stanovení mutačního stavu IgVH genů	54
4.9.2	Cytogenetická analýza	54
4.9.3	Ustavení linie UHKT-893 nezávislé na IL-6	55
4.10	Vliv SAHA a VPA na indukci apoptózy linie UHKT-944	55
4.11	Vliv mikroprostředí kostní dřeně na antiproliferační účinek SAHA a VPA.....	57
4.12	Ovlivnění buněčného cyklu linie UHKT-944 po působení SAHA a VPA.....	61
4.13	Ovlivnění signálních drah JAK/STAT a PI3K/Akt působením SAHA a VPA.....	63
5	Diskuze	66
6	Závěr	72
7	Použitá literatura	73
8	Seznam publikací	81
	Příloha A.....	82

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-D	dvourozměrná (two-dimensional)
ALCL	anaplastický velkobuněčný lymfom (anaplastic large cell lymphoma)
ALL	akutní lymfoblastická leukemie (acute lymphoblastic leukemia)
AML	akutní myeloidní leukemie (acute myeloid leukemia)
ASCT	autologní transplantace krvetvorných buněk (autologous stem cell transplantation)
BMM	mikroprostředí kostní dřeně (bone marrow microenvironment)
BMSCs	stromální buňky kostní dřeně (bone marrow stromal cells)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
CAF1	chaperon účastnící se sestavování chromatinu během DNA replikace (chromatin assembly factor 1)
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CML	chronická myeloidní leukemie (chronic myelogenous leukemia)
CMML	chronická myelomonocytární leukemie (chronic myelomonocytic leukemia)
CpG	dinukleotid cytozin - fosfát – guanin
CTD	léčebný režim zahrnující cyklofosfamid, thalidomid, dexametazon
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSMZ	německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
EBV	virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus)
ECACC	evropská sbírka buněčných kultur (European Collection of Cell Cultures)
ECM	extracelulární matrix (extracellular matrix)
FBS	fetální telecí sérum (fetal bovine serum)
FDA	americký úřad pro kontrolu léčiv a potravin (Food and Drug Administration)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescence in situ hybridization)
FSC	přímý rozptyl (forward scatter)
GCN5	histon acetyltransferáza GCN5
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)

GM-CSF	faktor stimulujiící kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte monocyte colony-stimulating factor)
GNAT	rodina histon acetyltransferáz
HAT	histon acetyltransferáza (histone acetyltransferase)
HDAC	histondeacetyláza (histone deacetylase)
HDACi	inhibitory histondeacetyláz (histone deacetylase inhibitors)
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
HSP	protein teplotního šoku (heat shock protein)
Ig	imunoglobulin
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
IL	interleukin
ISCN	mezinárodní systém cytogenetické nomenklatury (the international system for human cytogenetic nomenclature)
JAK	janus kináza (janus kinase)
LFA-1	adhezní molekula na povrchu T-buněk, B-buněk, makrofágů a neutrofilů (lymphocyte function-associated antigen 1)
MALDI	ionizace a desorpce za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinase)
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of unknown significance)
M-Ig	monoklonální imunoglobulin
MM	mnohočetný myelom (multiple myeloma)
MPT	léčebný režim zahrnující melfalan, prednison, thalidomid
MRN	minimální reziduální nemoc
MYST	rodina histon acetyltransferáz
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NF-κB	nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
NK	buňka přirozený zabíječ (natural killer cell)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (polyacrylamide gel electrophoresis)
P300/CBP	rodina histon acetyltransferáz
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCL	plazmocelulární leukemie (plasma cell leukemia)

PE	fykoerytrin (phycoerythrin)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (phosphatidylinositol 3-kinase)
PVDF	polyvinylidene difluorid
SAGE	sériová analýza genové exprese (serial analysis of gene expression)
SAHA	suberoylanilid hydroxamové kyseliny (suberoylanilide hydroxamic acid)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulphate)
Sir2	rodina histondeacetyláz
SSC	boční rozptyl (side scatter)
STAT	signální transduktor a aktivátor transkripce (signal transducer and activator of transcription)
TAFII250	protein s aktivitou histon acetyltransferázy
T-ALL	akutní lymfoblastická leukemie T-buněčného typu (T-cell acute lymphoblastic leukemia)
TNF α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)
TSA	trichostatin A
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
UPR	signální dráha, která je aktivována při stresu endoplasmatického retikula (unfolded protein response)
VAD	léčebný režim zahrnující vinkristin, adriamycin (doxorubicin) a dexametazon
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VMP	léčebný režim zahrnující bortezomib, melfalan a prednison
VPA	kyselina valproová (valproic acid)

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

1.1 MNOHOČETNÝ MYELOM A PLAZMOCELULÁRNÍ LEUKEMIE

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění charakterizované přítomností maligních plazmatických buněk v kostní dřeni. Podstatou je patrně maligní transformace B-lymfoidních buněk ve folikulu lymfatické tkáně, které nekontrolovaně proliferují a zároveň diferencují na patologické plazmablastické buňky. Proliferace a akumulace plazmatických buněk probíhá převážně v kostní dřeni. Mnohočetný myelom představuje zhruba 1 % všech nádorových onemocnění a 10 % hematologických onemocnění s incidencí 4-6 případů na 100 000 obyvatel [1,2,3]. Medián celkového přežití je u pacientů schopných podstoupit autologní transplantaci krvetvorných buněk (ASCT) 6-8 let, u pacientů, kteří nesplňují kritéria pro ASCT, je medián celkového přežití nižší [4]. Mnohočetnému myelomu předchází onemocnění zvané monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), které je charakterizované přítomností monoklonálního imunoglobulinu (<30 g/l), ale nedochází k poškození kostí či ledvin. Počet monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni nepřekračuje 10 %. Toto onemocnění bylo dříve označováno také jako benigní monoklonální gamapatie [5,6] Plazmatická buňka vzniká diferenciací B-lymfocyty je za normálních okolností nedělící se buňkou, jejímž hlavním úkolem je sekrece imunoglobulinů. Fyziologické plazmatické buňky brzy podléhají apoptóze, tedy programované buněčné smrti, naopak myelomové buňky jsou téměř nesmrtelné. Myelomové buňky pochází z jednoho vývojového klonu B-lymfocyty a mají tedy schopnost tvořit tzv. monoklonální imunoglobulin. Může se jednat o kompletní imunoglobulin, méně často pak o lehké řetězce nebo myelomová buňka imunoglobulinu produkuje, ale nedochází k jejich sekreci. Samotný imunoglobulin pak může vyvolávat celou řadu klinických příznaků jako je např. myelomová nefropatie, porucha krevní srážlivosti atd. V moči lze detekovat tzv. Bence-Jonesovu bílkovinu. Jedná se o paraprotein tvořený většinou lehkými řetězci monoklonálního imunoglobulinu. Dalšími příznaky, které jsou způsobené převážně cytokiny myelomových buněk, je poškození skeletu s rozvojem tzv. myelomové kostní nemoci, časté infekce, horečky a celková slabost. Diagnózu mnohočetného myelomu stanovuje klinický lékař a to na základě vyhodnocení zobrazovacích, morfologických a laboratorních údajů [2]. Pro stanovení

správné diagnózy je nutno splnit některá ze starších či novějších kritérií, která jsou uvedena v tabulce 1 a tabulce 2.

Tab. 1 – Kritéria mnohočetného myelomu dle Durieho a Salmona, 1975 [7].

Velká kritéria	Malá kritéria
1) plazmocytom (histologie tkáně)	a) 10 – 30 % plazmocytů v kostní dřeni
2) počet plazmocytů v kostní dřeni > 30 %	b) koncentrace M-Ig nižší než v bodě 3
3) sérové koncentrace monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig): M-IgG > 35 g/l M-IgA > 20 g/l nebo množství lehkých řetězců v moči za 24 h > 1 g	c) přítomna osteolytická ložiska d) snížení ostatních fyziologických Ig IgM < 0,5 g/l IgA < 1 g/l IgG < 6 g/l
Diagnóza mnohočetného myelomu je jasná, je-li přítomno jedno velké a jedno malé kritérium, anebo jsou-li přítomna kritéria a+b a dále kritérium c nebo d.	

Tab. 2 – Diagnostická kritéria symptomatického myelomu IMWG, 2003 (International Myeloma Working Group) [2,8].

<p>Pro diagnózu mnohočetného myelomu je nutno splnit všechna tři kritéria:</p> <p>1) V kostní dřeni jsou přítomny klonální plazmocyty a (nebo) biopsie kostní dřene prokázala plazmocytom</p> <p>2) Je přítomen monoklonální imunoglobulin v séru a (nebo) v moči</p> <p>3) Je přítomná nejméně jedna dysfunkce či poškození orgánu způsobené mnohočetným myelomem:</p> <ul style="list-style-type: none"> • (C - calcium) zvýšená hladina kalcemie nad 2,75 mmol/l nebo o 0,25 nad normální limit • (R - renal) renální insuficience s kreatininem nad 176,8 μmol/l • (A - anemia) anémie, hemoglobin pod 100 g/l nebo 20 g/l pod dolní limit • (B – bone) lytická kostní ložiska nebo osteoporóza s kompresivními frakturami (většinou vyžaduje kostní denzitometrii a prokázání patologické infiltrace pomocí MR nebo CT vyšetření) • Další s myelomem a gamapatií související nálezy: symptomatická hyperviskozita, amyloidóza, opakující se bakteriální infekce (> 2 epizody za 12 měsíců)
--

Plazmocelulární leukemie (PCL) je jedna z nejagresivnějších forem monoklonálních gamapatií. Je považována za agresivní variantu mnohočetného myelomu s incidencí 0,04/100 000 obyvatel evropské populace [1]. Průměrná doba přežití je

počítána v měsících. Pro PCL je typická přítomnost cirkulujících maligních plazmatických buněk v periferní krvi. Jedním typem PCL je tzv. primární PCL, která 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. Druhý typ, sekundární PCL, se vyskytuje u pacientů s již diagnostikovaným mnohočetným myelomem a jedná se tedy ve většině případů o refrakterní terminální stav [9].

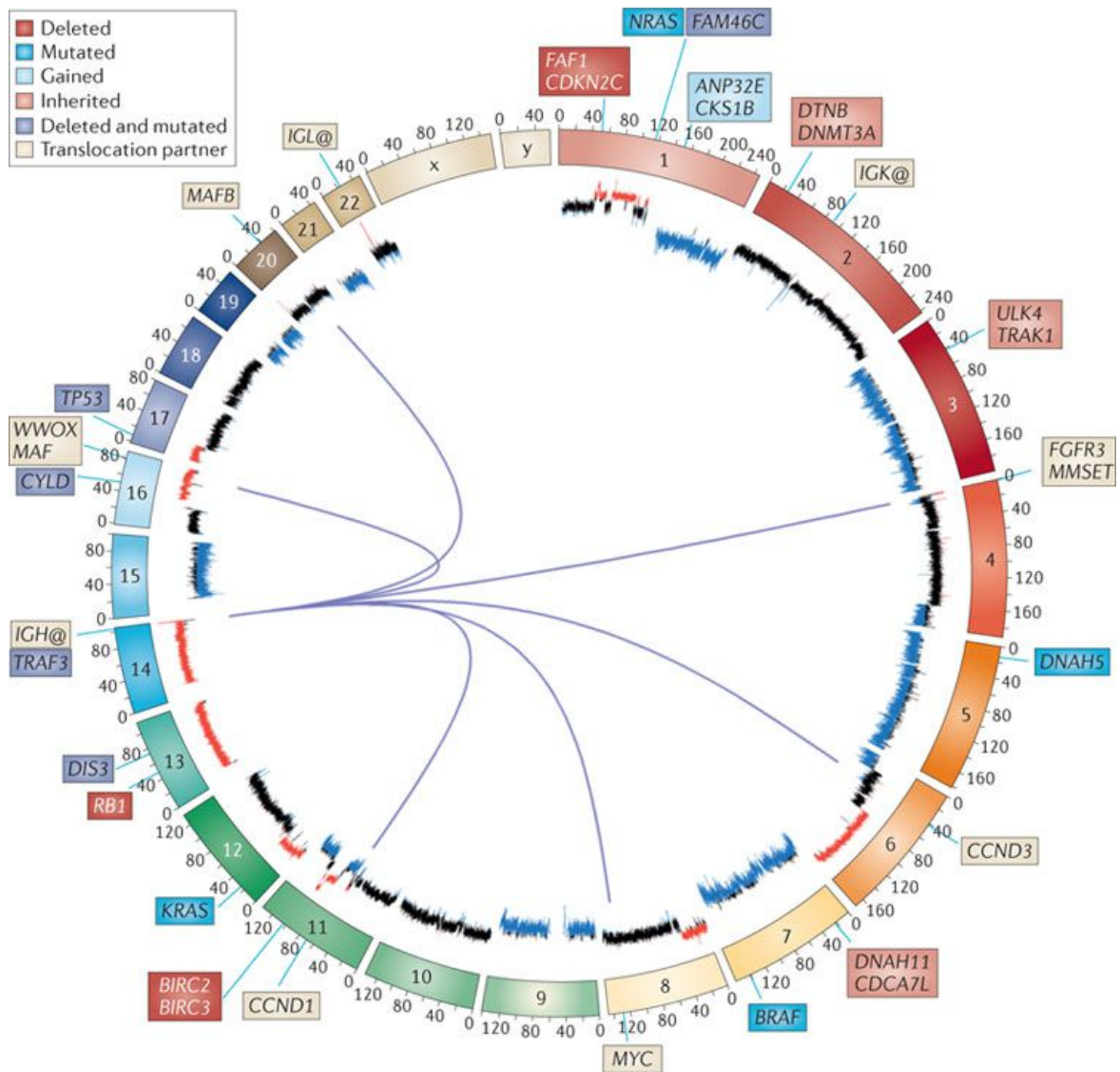
Primární plazmocelulární leukemie se liší od sekundární PCL jak cytogenetickými tak molekulárními nálezy [10]. První případ primární PCL byl popsán Gluzinskim a Reichensteinem v roce 1906 [11]. Jednalo se o 47letého muže s frakturou žeber, bolestmi kostí, anémií a zvětšenou slezinou. Moč obsahovala velké množství proteinů. V krevním nátěru byly identifikovány erytroblasty a nezralé vícejaderné plazmatické buňky. Počet leukocytů byl stanoven na $39,4 \times 10^9$, z toho 91 % tvořily plazmatické buňky.

Kritériem pro diagnózu plazmocelulární leukemie je počet plazmatických buněk v periferní krvi překračující 20 % a celkový počet plazmocytů nad $2 \times 10^9/l$ [12,13]. Již delší dobu jsou diskutovány změny týkající se snížení těchto hodnot, případně by měla být dostatečným kritériem pro diagnózu pouze jedna podmínka. Přítomnost samotných cirkulujících plazmocytů v periferní krvi nemusí být vždy příznakem plazmocelulární leukemie, ale může se též jednat o nemaligní plazmatické buňky vyskytující se při závažné sepsi či infekční mononukleóze [14]. V tomto případě je nutné odlišit monoklonální buňky od polyklonálních např. pomocí průtokové cytometrie a vyloučit tak jiné lymfoproliferativní onemocnění. Medián věku při stanovení diagnózy je u primární plazmocelulární leukemie přibližně 55 let na rozdíl od myelomu, kde jsou diagnostikovaní pacienti v průměru o 10 let starší [15,16]. Hlavními příznaky plazmocelulární leukemie jsou bledost, dušnost, únava z důvodu anémie, krvácivé projevy vyplývající z trombocytopenie, pleurální výpotek atd. Osteolytická ložiska se vyskytují méně často než u myelomu [2].

1.1.1 Chromozomální aberace MM a PCL

Myelomové buňky vykazují četné cytogenetické aberace, které jsou lépe detekovatelné metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) než klasickým cytogenetickým vyšetřením. Ve většině případů chromozomálních aberací se jedná o hyperdiploidii, to znamená, že v myelomových buňkách se nachází více než 46 chromozomů, v menší míře se pak vyskytuje hypodiploidie, která je však spojována s horší prognózou pacientů [17]. U primární PCL se však hyperdiploidie vyskytuje pouze u 0 %-

8,8 % případů [15,18], zatímco u nově diagnostikovaných pacientů s MM je to okolo 50 % [19]. U PCL byl zjištěn zvýšený výskyt cytogenetických aberací ve srovnání s MM. Typické numerické aberace zjištěné u PCL jsou monosomie 13, změny chromozomu 1, trisomie 18 a monosomie X u žen [20]. Četné numerické aberace byly také zjištěny u MM a to především trisomie 1, 6, 9 a 15. Monosomie 13, která je spojována se špatnou prognózou, se vyskytuje častěji u pacientů s PCL oproti MM, naopak trisomie 9 a trisomie 6 můžeme pozorovat především u pacientů s MM [20]. Nejčastějšími strukturními aberacemi MM a PCL jsou chromozomové translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) na chromozomu 14 v oblasti 14q32. Mezi ně patří nejčastěji se vyskytující translokace t(4;14)(p16;q32) a t(11;14)(q13;q32), dále pak t(14,16)(q32;q23) a t(14;20)(q32;q12). Pacienti s translokací t(11;14) mají příznivější prognózu, ostatní translokace jsou ve většině případů spojovány s horším průběhem onemocnění [21-23]. Aberace chromozomu 1 jako delece 1p a zisk 1q patří mezi další strukturní aberace typické pro MM. Dalším důležitým prognostickým faktorem MM je delece dlouhých ramen chromozomu del(13q) a delece del(17p) [22]. Nejdůležitější genetické změny u MM jsou znázorněny na obrázku 1.



Nature Reviews | Cancer

Obr. 1 – Grafické zobrazení nejdůležitějších genetických změn u MM. Ilustrativní obrázek znázorňující chromozomy a jejich nejčastější početní a strukturní změny včetně mutací v jednotlivých genech u pacientů s MM. Převzato z [24].

1.1.2 Imunofenotyp MM a PCL

Určení fenotypu plazmatických buněk slouží především pro identifikaci a charakterizaci maligních buněk, stanovení prognostických markerů, detekci minimální reziduální nemoci (MRN) a v neposlední řadě může i zabránit určení falešné diagnózy MM. Na základě určení fenotypu lze také navrhnout cílenou terapii s využitím monoklonálních protilátek. Za markery plazmatických buněk jsou považovány molekuly CD38 a CD138 (syndecan-1), které lze snadno identifikovat pomocí průtokové cytometrie. Molekula CD138 patří do rodiny transmembránových heparan-sulfátových proteoglykanů a zajišťuje interakce s extracelulární matrix. CD38 je panleukocytární antigen, jehož

exprese je u maligních plazmatických buněk nižší než u normálních plazmatických buněk. Oba tyto znaky jsou exprimovány jak u zdravých, tak také u neoplastických plazmatických buněk. K odlišení polyklonálních plazmatických buněk, které se nacházejí přirozeně v kostní dřeni, od monoklonálních neexistuje jednoznačný parametr a je tedy nutné stanovit více znaků. Maligní plazmatické buňky se vyznačují ztrátou či nízkou expresí molekul CD19 a CD27. Slabě jsou exprimovány také CD38 a CD45, naopak zvýšenou expresí můžeme pozorovat u molekul CD28, CD33 a CD56 [25]. V průběhu diferenciaci dochází ke ztrátě znaku CD45, který již na zralých plazmatických buňkách nebývá exprimován, jeho exprese však může být zachována u cirkulujících či reaktivních normálních plazmatických buněk. Sub-populaci CD45 pozitivních buněk můžeme také nalézt v kostní dřeni pacientů s MM [26,27]. Fyziologické plazmatické buňky exprimují CD27, jehož exprese je u maligních plazmatických buněk snížena. Molekula CD56, která je považována za marker NK (z angl. natural killer, přirozený zabíječ) buněk, je ve zvýšené míře exprimována u většiny pacientů s nově diagnostikovaným MM [28].

Zvýšenou expresí specifického markeru T-buněk CD28, který není exprimován u normálních plazmatických buněk, můžeme pozorovat u zhruba poloviny případů MM a téměř všech myelomových buněčných linií [29]. Expresi CD28 koreluje s progresí onemocnění [30]. Ztráta exprese markeru B-buněk CD19 je považována za charakteristický znak myelomových buněk, přesto můžeme nalézt kromě CD19 negativních i CD19 pozitivní myelomové buňky [3]. Antigen CD33, který je exprimován na povrchu myeloidních buněk, můžeme detekovat na povrchu maligních plazmatických buněk. Dle studie Sahara a spol. [32] mají CD33 pozitivní pacienti zvýšenou hladinu β 2-mikroglobulinu a laktátdehydrogenázy a vyšší riziko anemie a trombocytopenie. Mezi další aberantně exprimované znaky patří B-lymfocytární marker CD20 a CD117 (c-kit).

Fenotyp cirkulujících plazmatických buněk je odlišný od plazmatických buněk v kostní dřeni pacientů s MM. Rozdílně jsou exprimovány antigeny CD9, CD20, CD71, CD117, a HLA-DR. Nádorové buňky u primární PCL častěji exprimují CD20, CD45, CD19, CD27 a CD23 [33]. Charakteristickým znakem PCL je také absence či snížená exprese adhezni molekuly CD56 a LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1). Absence CD56 či LFA-1 vede ke snížené schopnosti myelomových buněk vázat se na stromální buňky kostní dřene [34]. Antigen B-buněk CD20 je exprimován u zhruba 50 % PCL ve srovnání s MM, kde byla zjištěna exprese u 17 % případů [35].

1.1.3 Léčba MM a PCL

Díky autologní transplantaci krvetvorných buněk a zavedení nových léčebných režimů se zvýšila kvalita života pacientů a celková doba přežití, přesto jsou MM a PCL stále považovány za nevléčitelná onemocnění. U většiny pacientů dojde k opakovaným relapsům nemoci, které jsou již hůře ovlivnitelné léčbou. Léčba myelomu se zahajuje při zjištění subjektivních příznaků nemoci nebo při poškození orgánů a tkání (viz tabulka 2). Chemoterapie není indikována u pacientů s MGUS nebo u pacientů s doutnající nebo indolentní formou MM. U těchto pacientů se doporučuje pravidelné kontrolování a oddalování zahájení léčby až do prvních příznaků nemoci. Předčasné zahájení chemoterapie neprodlužuje celkové přežití, naopak může vést k indukci sekundárního myelodysplastického syndromu. Radiografický průkaz alespoň jednoho osteolytického ložiska nebo jiný průkaz aktivních osteolytických změn je důvodem k zahájení léčby i přesto, že pacient nemá žádné subjektivní potíže [2].

Současná léčba zahrnuje vysokodávkovanou chemoterapii s autologní transplantací kmenových buněk. Tato léčba je vhodná pro pacienty, kteří splňují určitá kritéria jako např. věk < 65 let, nepřítomnost závažného srdečního či plicního onemocnění atd. Indukční předtransplantační léčba se skládá z jednoho či několika léčebných režimů. Dříve standardní indukční režim VAD (vinkristin, doxorubicin, dexametazon) byl postupně nahrazen režimem se začleněním nových léčiv, jako jsou inhibitor proteazomu bortezomib či imunomodulační látky jako např. thalidomid a lenalidomid, v kombinaci s kortikoidem, případně i s některými klasickými chemoterapeutiky. Podává se také cyklofosfamid a melfalan či kombinace melfalanu s bortezomibem. Melfalan by neměl být podáván pacientům před sběrem kmenových buněk [36,37]. Indukční chemoterapie zakončená alogenní transplantací krvetvorných buněk je zatížena vysokou mortalitou a je tedy vhodná pouze pro vybrané pacienty.

Konvenční chemoterapie bez transplantace kmenových buněk je indikována u pacientů starších 65 let nebo pacientů, kteří nespĺňují kritéria pro vysokodávkovanou chemoterapii s transplantací kmenových buněk. V současné době je pro starší pacienty standardním léčebným postupem režim zahrnující kombinaci bortezomibu, melfalanu a prednisonu (VMP), dále se uplatňuje režim zahrnující kombinaci melfalanu, prednisonu a thalidomidu (MPT) či kombinace cyklofosfamidu, thalidomidu a dexametazonu (CTD), které jsou mnohem účinnější než dříve používané kombinace melfalanu s prednisonem nebo cyklofosfamidu s prednisonem [38].

1.1.3.1 Nové léky v léčbě MM a PCL

Vývoj nových léků přinesl značné zlepšení celkového stavu pacienta a prodloužil celkovou dobu přežití. Podle mechanismu účinku můžeme léky rozdělit do několika skupin: inhibitory proteazomu, imunomodulační látky, inhibitory histondeacetyláz, inhibitory tyrozinkináz, inhibitory signálních drah či monoklonální protilátky. Některé látky jsou stále ve fázi klinických testů nebo vývoji. Současná léčba je zaměřena cíleně na mechanismus růstu a přežívání nádorových buněk a zasahuje také do interakcí myelomových buněk s mikroprostředím kostní dřeně. Tyto léky se používají jak v monoterapii, tak v kombinaci se standardně používanými kortikosteroidy a cytostatiky [39].

Mezi nové účinné léky v léčbě myelomu můžeme zařadit např. inhibitor proteazomu bortezomib a imunomodulační látky jako thalidomid a lenalidomid. Thalidomid má imunomodulační účinek, stimuluje proliferaci a aktivitu T-buněk, inhibuje tvorbu TNF- α (faktor nádorové nekrózy alfa), indukuje apoptózu a inhibuje růst myelomových buněk, zvyšuje produkci interleukinu-2, má antiangiogenní účinek a působí také na stromální buňky. Jeho použití je z důvodu jeho teratogenního účinku spjato s velkými bezpečnostními opatřeními [36,40].

Lenalidomid je lék odvozený od thalidomidu s vyšším imunomodulačním účinkem. Lenalidomid tlumí angiogenezi, snižuje syntézu TNF- α , stimuluje proliferaci T buněk, inhibuje proliferaci, indukuje apoptózu a snižuje také adhezivitu myelomových buněk [41]. Lenalidomid má stejně jako thalidomid teratogenní účinky a při jeho použití je nezbytné dodržovat stanovený bezpečnostní program.

Pomalidomid je nová imunomodulační látka, která se již pomalu dostává do standardní léčby. Pomalidomid má imunomodulační, antiangiogenní účinek a ovlivňuje také mikroprostředí kostní dřeně [42].

Bortezomib je selektivní inhibitor proteazomu používaný v kombinaci s ostatními léčivy. Uplatňuje se ve všech fázích léčby, většinou v první linii před ASCT i u pacientů nevhodných k transplantaci. Bortezomib inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu myelomových buněk, tlumí angiogenezi a expresi cytoadhezivních molekul. Bortezomib dále ovlivňuje mikroprostředí kostní dřeně a inhibuje nukleární faktor kappa B (NF κ B), který zvyšuje přežívání nádorových buněk [43].

Dalším lékem schváleným americkým úřadem pro kontrolu léčiv a potravin (Food and Drug Administration, FDA) pro léčbu myelomu je inhibitor proteazomu carfilzomib. Je indikován především u pacientů, kteří neodpovídají na léčbu [44]. Mezi další inhibitory

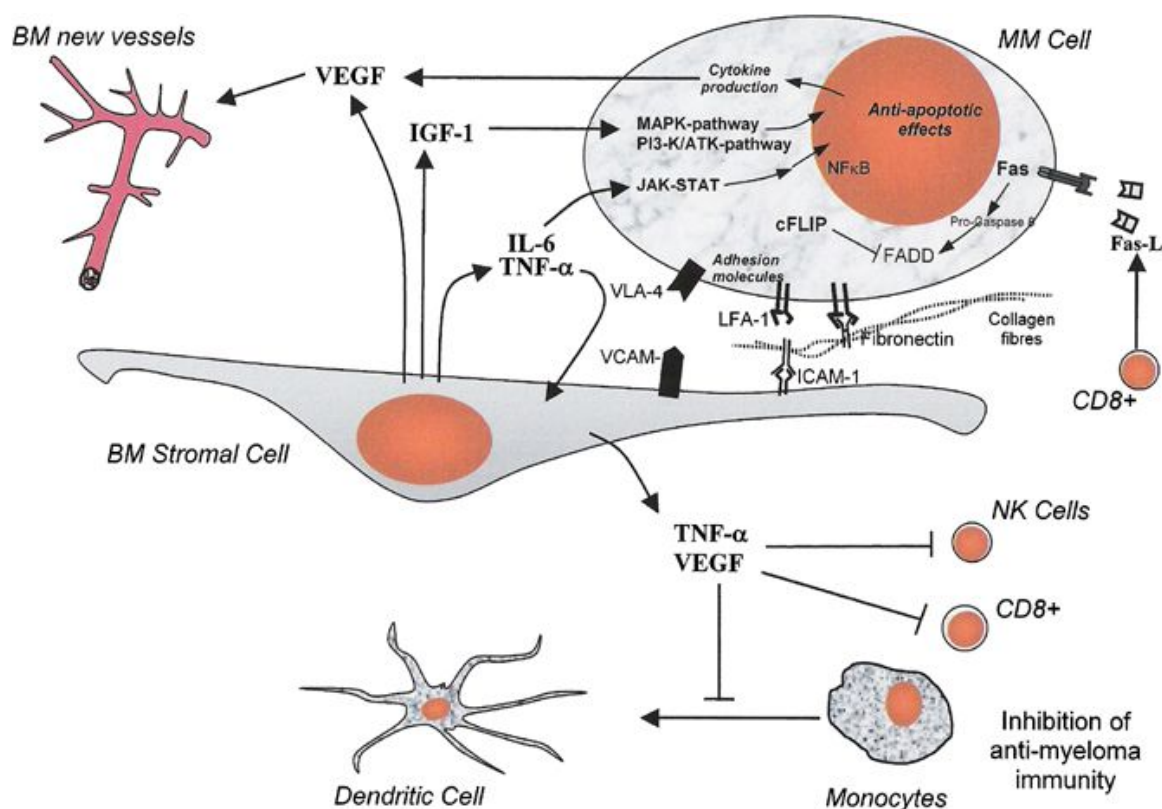
proteazomu, které jsou v různých fázích klinického testování, můžeme zmínit např. ixazomib a marizomib [39].

Monoklonální protilátky jsou rychle se rozvíjející skupinou látek v léčbě nádorových onemocnění. V současné době jsou monoklonální protilátky pro léčbu mnohočetného myelomu ve fázi klinického testování. Příkladem je siltuximab, lék schválený k léčbě multicentrické formy Castlemanovy choroby. Jedná se o chimerickou monoklonální protilátku proti IL-6, což je klíčový faktor podporující růst a přežívání myelomových buněk [45]. Siltuximab byl testován proti různým typům nádorů včetně non-Hodgkinova lymfomu a mnohočetného myelomu [46]. Mezi další monoklonální protilátky, které jsou ve fázi klinického testování, patří elotuzumab vázící se na glykoprotein specifický pro plazmatické buňky, dále daratumumab namířen proti antigenu CD38 nacházejícím se na povrchu plazmatických buněk a další [39].

Mezi další látky, které jsou ve fázi klinického testování, patří inhibitory HSP90 (heat shock protein 90). HSP90 patří do skupiny chaperonů. Chaperony jsou proteiny, které pomáhají skládat další proteiny, stabilizují jejich konformaci a zabraňují vzniku nefunkčních proteinových komplexů. Při jejich nesprávné funkci dochází k akumulaci nesbalených nebo špatně sbalených proteinů a aktivaci UPR (Unfolded Protein Response) signální dráhy. Tanespimycin je příkladem inhibitoru HSP90, který byl testován v kombinaci s bortezomibem a dexametazonem u pacientů s MM [47,48]. Mezi další látky, které jsou studovány, můžeme zmínit Akt inhibitory, mTOR inhibitory či inhibitory histondeacetyláz, které jsou podrobněji popsány v kapitole 1.3.2.3.

1.2 MIKROPROSTŘEDÍ KOSTNÍ DŘENĚ

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 [49]. Mikroprostředí kostní dřeně se skládá z proteinů extracelulární matrix, mezi které patří kolagen, laminin, fibronectin, vitronektin, elastin, dále pak proteoglykany a glykosaminglykany. Součástí BMM jsou také nehematopoetické buňky, mezi které patří stromální buňky kostní dřeně, osteoblasty, osteoklasty, mezenchymální kmenové buňky, tukové buňky a další [50]. Další složku BMM tvoří cytokiny, růstové faktory, adhezivní molekuly a další faktory, které jsou produkovány buňkami v kostní dřeni (Obr. 2).



Obr. 2 – Mikroprostředí kostní dřeně mnohočetného myelomu. Myelomové buňky interagují se stromálními buňkami kostní dřeně a extracelulární matrix prostřednictvím adhezivních molekul, čímž je podporováno vylučování cytokinů a růstových faktorů, což v konečném důsledku vede k růstu a přežívání myelomových buněk. Převzato z [51].

1.2.1 Adhezivní molekuly

Adhezivní molekuly umožňují přímou interakci myelomových buněk s BMM, jako je např. vazba myelomových buněk k buňkám stromatu, interakce buněk s proteiny ECM a buněk navzájem a hrají tak důležitou roli v rozvoji onemocnění. Interakcí myelomových buněk s BMM je stimulována tvorba různých cytokinů a růstových faktorů [52,53]. Adhezivní molekuly mají také vliv na usídlení a zadržování maligních buněk v kostní dřeni. Mezi adhezivní molekuly, které můžeme detekovat na povrchu maligních plazmatických buněk, patří syndekan-1 (CD138), H-CAM (CD44), VLA-4 (CD49d/CD29), ICAM-1 (CD54), N-CAM (CD56) a LFA-3 (CD58) [54]. Předchozí studie naznačují, že syndekan-1, specifický marker myelomových buněk, se váže na kolagen typu 1 a jeho exprese byla detekována na myelomových buňkách s fenotypem CD19⁻ a CD45⁻ [55]. Dále bylo zjištěno, že syndekan-1 reguluje růst nádorových buněk i diferenciaci kostních buněk [56]. Molekula CD44 je zodpovědná za interakci myelomových buněk s hyaluronanem a její exprese je ovlivněna IL-6 [57].

1.2.2 Stromální buňky kostní dřeně a proteiny ECM

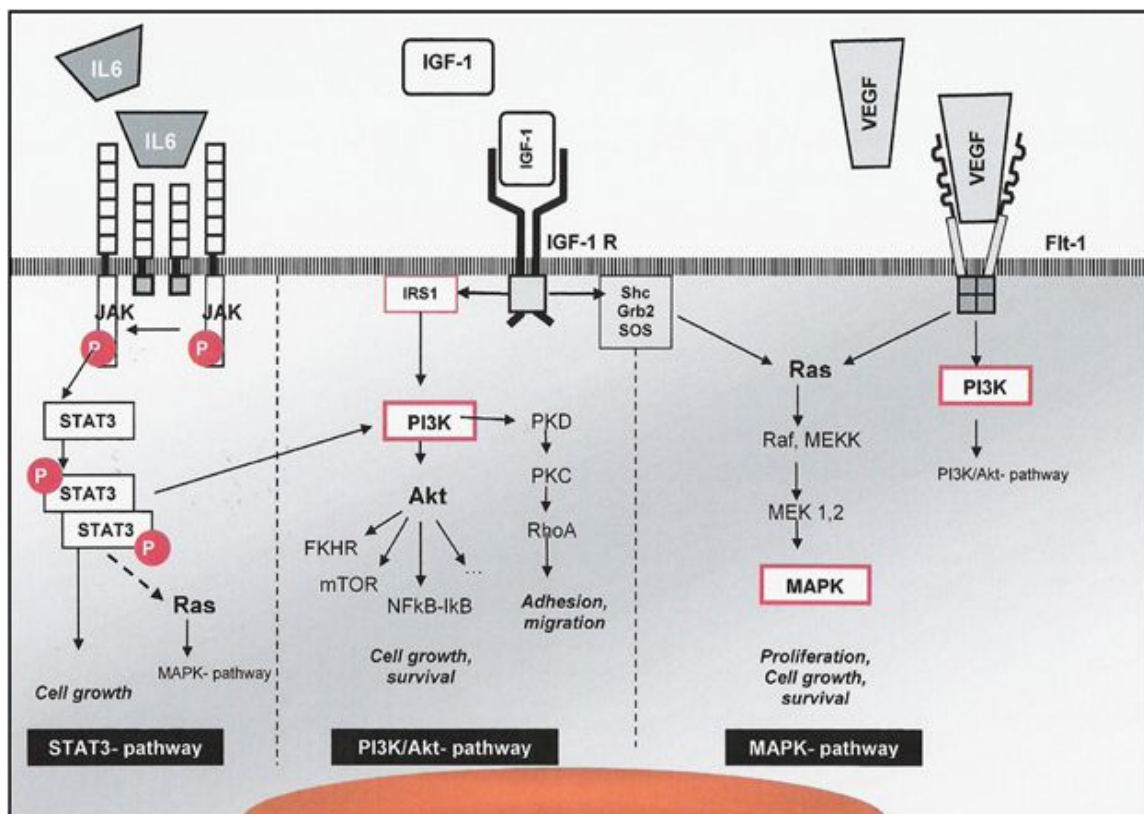
Stromální buňky kostní dřeně (BMSCs) jsou popisovány jako heterogenní populace mezenchymálních buněk s morfologií podobnou fibroblastům. Adheze myelomových buněk k BMSCs prostřednictvím různých adhezivních molekul vede k produkci cytokinů a růstových faktorů a aktivaci vnitřních signálních drah, což v konečném důsledku vede k proliferaci a přežívání myelomových buněk. Stromální buňky jsou schopny chránit myelomové buňky před apoptózou indukovanou dexametazonem, jak dokládají některé studie [58,59]. Kultivace stromálních buněk pacienta s MM s myelomovými buňkami ošetřenými bortezumibem vede k aktivaci dráhy NF- κ B (nuclear factor-kappa B) a ke zvýšení rezistence k bortezumibu [60]. Kromě stromálních buněk i samotná adheze myelomových buněk k proteinům ECM způsobuje, že buňky jsou více chráněny před apoptózou. Bylo zjištěno, že interakcí myelomových buněk s fibronektinem jsou buňky více chráněny před účinky doxorubicinu a melfalanu [61]. Ochranné účinky proti apoptóze indukované léky má i další protein ECM vitronektin, jehož adheze k myelomovým buňkám aktivuje signální dráhu Notch, která má významný vliv na proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk [62].

1.2.3 Interleukin-6

Interleukin-6 je produkován různými typy buněk včetně nádorových. Je považován za nejdůležitější růstový faktor u mnohočetného myelomu, který umožňuje přežívání maligních buněk a inhibuje apoptózu indukovanou léky [63]. IL-6 může být produkován samotnými plazmatickými buňkami (autokrinní produkce), primárně je však produkován stromálními buňkami kostní dřeně (parakrinní produkce) [64-66]. Bylo prokázáno, že sekrece IL-6 je stimulována adhezí myelomových buněk ke stromálním buňkám kostní dřeně nebo prostřednictvím jiných cytokinů [67,68]. Působením IL-6 dochází ke stimulaci angiogeneze a aktivaci několika signálních drah, jejichž činnost ovlivňuje proliferaci a apoptózu myelomových buněk. V současné době je jasné, že za proliferaci a přežívání myelomových buněk není odpovědný jediný cytokin, ale mnoho dalších faktorů, které jsou produkovány mikroprostředím kostní dřeně. Mezi ně patří např. VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), IL-21 (interleukin-21) a další [69].

1.2.4 Signální dráhy aktivované interakcí mikroprostředí kostní dřeně s myelomovými buňkami

Interakcí myelomových buněk s mikroprostředím kostní dřeně dochází k aktivaci několika signálních drah (Obr. 3), které podporují proliferaci maligních buněk, stimulují angiogenezi a osteoklastogenezi. Signální dráha JAK/STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription) podporuje růst a přežívání myelomových buněk. Působením IL-6 dochází přes JAK2 k fosforylaci STAT3, který aktivuje transkripci antiapoptotických genů. Bylo zjištěno, že STAT3 je permanentně aktivován v myelomových buňkách a inhibicí dráhy JAK/STAT dochází k indukci apoptózy [70,71] IL-6 je zodpovědný za aktivaci dalších drah, které stimulují proliferaci myelomových buněk. Signální dráha PI3K/Akt reguluje buněčný cyklus a apoptózu a podporuje přežívání myelomových buněk. Kromě IL-6 je tato dráha aktivována také IGF-1 (insulin-like growth factor 1) [72]. IGF-1 je jedním z dalších důležitých růstových faktorů u MM. Tento cytokin je zodpovědný za proliferaci, růst a přežívání myelomových buněk, ochranu před apoptózou a také umožňuje jejich migraci [73,74]. Interakcí myelomových buněk s mikroprostředím kostní dřeně dochází k aktivaci Ras/MAPK, další dráhy důležité pro přežívání myelomových buněk a to mechanismem nezávislým na IL-6. Tato signální dráha může být kromě BMM také permanentně aktivována přítomností mutace onkogenu Ras. [70]. Dráha NF- κ B je obecně důležitá pro proliferaci a přežívání nádorových buněk. U MM je dráha aktivovaná několika faktory včetně IL-6 a TNF α [75]. Bylo zjištěno, že NF- κ B je permanentně aktivován u primárních myelomových buněk a inhibicí tohoto transkripčního faktoru je indukována apoptóza [76].



Obr. 3 – Signální kaskády u mnohočetného myelomu. Vazbou IL-6 na jeho receptor je spuštěna signální dráha MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3 kinase/Akt) a JAK/STAT3 (janus kinase/signaling transducer and activator of transcription 3) signální dráha; VEGF (vascular endothelial growth factor) spouští MAPK a IGF-1 (insulin like growth factor-1) spouští MAPK a PI3K/Akt signální dráhu. Převzato z [51].

1.3 EPIGENETICKÉ MECHANISMY

Mezi epigenetické mechanismy můžeme zařadit takové procesy, které dědičně ovlivňují expresi genů, aniž by docházelo ke změně primární struktury DNA. Příkladem mohou být různé posttranslační modifikace histonů (acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinace nebo sumoylace) či metylace DNA. Další důležitou epigenetickou regulací je RNA interference, při které dochází k ovlivnění transkripce i translace pomocí krátkých molekul RNA. Aberantně snížená exprese genů vlivem hypermetylace DNA či deacetylace histonů je pozorována u většiny nádorových onemocnění.

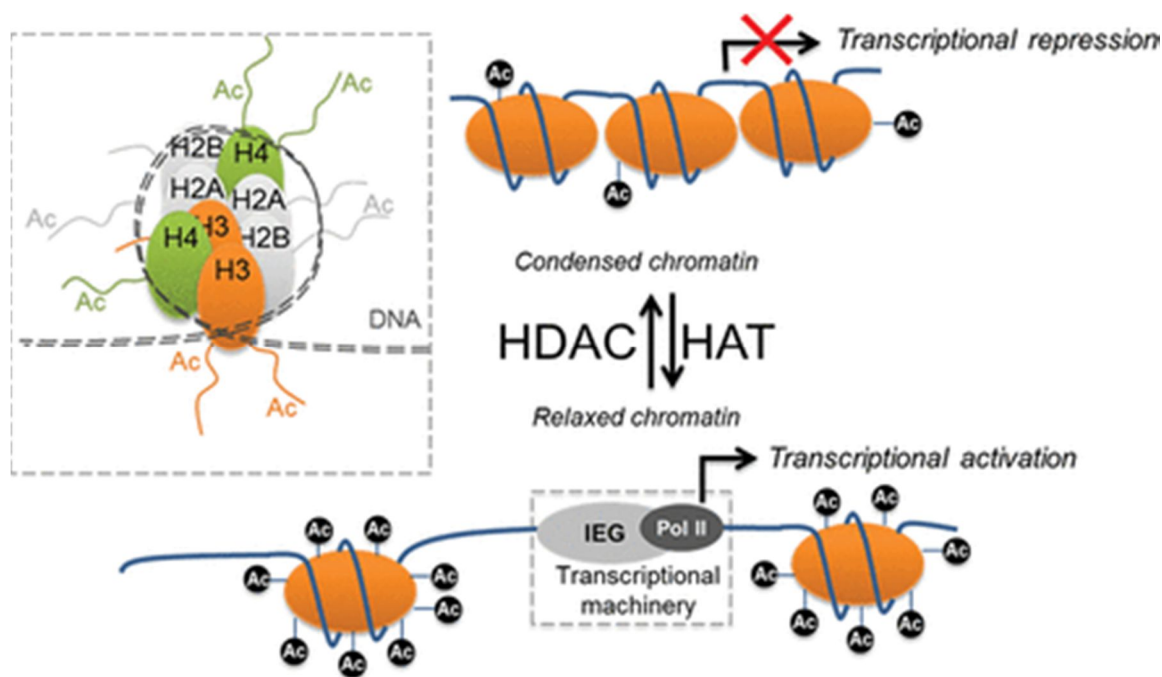
1.3.1 Metylace DNA

Metylace DNA se významně podílí na celé řadě důležitých procesů, jako je inaktivace chromozomu X, genomový imprinting či regulace genové exprese [77]. Genová exprese může být ovlivněna jednak zabráněním přístupu transkripčních faktorů, ale i

vazbou inhibičních komplexů, které obsahují histondeacetylázy a další faktory, které vedou k přestavbě chromatinu do inaktivní podoby. K metylaci dochází na cytosinu v dinukleotidu CpG za katalýzy DNA metyltransferázy. Oblasti, kde se CpG dinukleotidy vyskytují s vysokou frekvencí, se nazývají CpG ostrůvky. Tyto ostrůvky se vyskytují především v promotorových úsecích genů [78]. Hypermetylace v promotorové oblasti nádorově supresorových genů je příčinou jejich utlumení a nekontrolovaného růstu buněk. Několik studií potvrdilo, že DNA metylace má za příčinu utlumení genů v různých typech nádorů [79]. Chemický analog cytidinu 5-azacytidin je látka s cytotoxickým účinkem, která byla původně zkoušena u akutních leukemií. Kromě cytotoxického účinku byl později objasněn další mechanismus účinku, kterým je inhibice DNA-methyltransferázy. 5-azacytidin je indikován u pacientů s myelodysplastickým syndromem a dále u pacientů s chronickou myelomonocytární leukemií (CMML) a akutní myeloidní leukemií (AML) [80]. Cytotoxický účinek 5-azacytidinu byl také testován na myelomových buněčných liniích a patientských myelomových buňkách a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s ostatními léčivy [81].

1.3.2 Acetylace histonů

Jedním z dalších významných regulačních mechanismů je acetylace lysinových zbytků v molekule histonu, čímž dochází k odstranění pozitivního náboje histonů a jejich následnému uvolnění z vazby s elektronegativní DNA. Vlákno DNA je tedy více rozvolněné a přístupné pro transkripční faktory (Obr. 4). Kromě aktivace transkripce je acetylace histonů spjata s dalšími procesy, jako je například replikace či oprava DNA [82]. Deacetylací histonů dochází naopak k vazbě mezi DNA a histony a kondenzaci chromatinových struktur, čímž se chromatin stává nepřístupný pro transkripční faktory [83]. Acetylace a deacetylace histonu je katalyzována histon acetyltransferázou a histondeacetylázou.



Obr. 4 - Acetylace histonů vedoucí k ovlivnění genové exprese. Acetylace a deacetylace histonů je katalyzována histon acetyltransferázou (HAT) a histondeacetylázou (HDAC). Acetylace histonů způsobuje dekondenzaci chromatinu, což vede k aktivaci transkripce. Deacetylaci histonů dochází ke kondenzaci chromatinových struktur, čímž se chromatin stává nepřístupný pro transkripční faktory a je potlačena exprese genů. Vložený obrázek je nukleozom tvořený osmi histony, obtočenými částí vlákna DNA o délce 147 párů bází. Převzato z [84].

1.3.2.1 Histon acetyltransferázy

Histon acetyltransferázy (HAT) jsou enzymy, které přenášejí acetylovou skupinu z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) na ϵ -aminoskupinu lysinu v histonu. HAT mohou také acetylovat proteiny nehistonové povahy jako jaderné receptory a další transkripční faktory. Existují dvě hlavní třídy HAT: HAT typu A a HAT typu B [85]. HAT typu A se nacházejí v jádře a jsou zodpovědné za acylaci histonů v chromatinu. HAT typu A jsou charakteristické svou bromodoménou, která je schopná vázat acetylované zbytky lysinu na N-terminálních koncích histonů [86]. Příkladem HAT typu A jsou GCN5, p300-CBP a TAFII250. HAT typu B jsou lokalizovány v cytoplasmě a acetylují nově vznikající histony před jejich začleněním do chromatinu [87]. Mezi HAT typu B patří histon acetyltransferáza 1 (HAT1), která acetyluje histon H4 na lysinu 5 a lysinu 12. HAT1 je součástí multiproteinového komplexu obsahujícího histon acetyltransferázu 2 (HAT2) a podjednotky CAF1 (chromatin assembly factor 1), které se podílejí na sestavování chromatinu. Dle sekvenční homologie, strukturální podobnosti a společných funkcí dělíme HAT do několika rodin. Mezi nejznámější patří rodina GNAT (GCN5-related N-

acetyltransferases), MYST a P300/CBP. Rodina GNAT je charakteristická bromodoménou a svojí schopností acetylovat histony H2B, H3 a H4. Pro rodinu MYST je typická chromodoména a proteinový motiv zinkový prst. HAT rodiny MYST acetylují histony H2A, H3 a H4 [88].

1.3.2.2 Histondeacetylázy

Histondeacetylázy (HDAC) katalyzují deacetylaci aminoskupiny lysinů v N-terminální části histonů. HDAC mohou také katalyzovat deacetylaci proteinů nehistonové povahy. Příkladem mohou být některé transkripční faktory, mediátory signální transdukce, enzymy podílející se na opravě DNA a další [89].

U lidí bylo identifikováno 18 HDAC, které rozdělujeme do čtyř tříd (I – IV) na základě jejich homologie s proteiny kvasinek. Do I. třídy patří HDAC1, HDAC2, HDAC3 a HDAC8. Podle struktury deacetylační domény rozdělujeme II. třídu na podtřídu IIa, kam patří HDAC4, HDAC5, HDAC7 a HDAC9 a na podtřídu IIb, kam řadíme HDAC6 a HDAC10. Samostatnou třídu tvoří HDAC11 (IV třída). Všechny tyto třídy obsahují v katalytické doméně Zn^{2+} a jsou označovány jako tzv. klasické HDAC. Do III. třídy řadíme Sir2 rodinu deacetyláz, kterou u savců tvoří sedm sirtuinů, jejichž katalytický mechanismus vyžaduje přítomnost nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+) [90]. Tyto proteiny s HDAC aktivitou se odlišují od ostatních tříd tím, že jsou rezistentní vůči inhibici trichostatinem A (TSA) a suberoylanilidem hydroxamové kyseliny (SAHA). Zvýšená exprese HDAC byla pozorována u několika nádorů včetně MM. Na základě sériové analýzy genové exprese SAGE (serial analysis of gene expression) bylo zjištěno, že HDAC 1, 2, 3, 5, 6, 7 a 10 se nachází ve všech zkoumaných tkáních, zatímco HDAC 4, 8 a 9 jsou přednostně exprimovány v nádorových buňkách [91].

1.3.2.3 Inhibitory histondeacetyláz (HDACi)

Následkem deacetylace histonů DNA dochází k patologicky snížené expresi řady genů pozorované u většiny nádorů. Inhibitory histondeacetyláz inhibují enzymovou aktivitu HDAC, čímž způsobují mimo jiné dekondenzaci chromatinu a umožňují přístup transkripčním faktorům. Jedním z důležitých následků je exprese původně neaktivních genů. Inhibicí HDAC dochází také k acetylaci proteinů nehistonové povahy, které hrají důležitou roli v několika biologických procesech, jako je genová exprese, buněčná proliferace, diferenciacce, apoptóza či jiný druh buněčné smrti [92]. Na základě chemické struktury rozdělujeme HDACi do několika skupin: mastné kyseliny s krátkým řetězcem

(butyrát, fenylbutyrát, fenylacetát, kyselina valproová), syntetické deriváty benzamidů (MS-275, CI-994, N-acetyldinalin), cyklické tetrapeptidy/epoxydy (chlamydocin, trapoxin, apicidin, HC-toxin) a hydroxamové kyseliny (pyroxamid, TSA, SAHA).

V současné době jsou HDACi testovány proti různým typům malignit včetně MM, obvykle v kombinaci s ostatními používanými léčivy a většina HDACi se nachází v několika klinických studiích [39]. Bylo zjištěno, že HDACi indukují apoptózu, způsobují zástavu buněčného cyklu a indukují diferenciaci u mnoha typů nádorů [93]. Mezi HDACi, které jsou v současné době používány v klinické praxi, můžeme zařadit Vorinostat (SAHA, Zolinza®), který byl roce 2006 uznán FDA jako lék pro terapii kožního T-buněčného lymfomu, a panobinostat (Farydak®), který je v kombinaci s bortezomibem a dexametazonem určen k léčbě dospělých pacientů s relabujícím a/nebo refrakterním mnohočetným myelomem [94]. SAHA byla testována *in vitro* u mnoha typů nádorů včetně MM [95,96]. V současnosti je SAHA v několika klinických studiích a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s dalšími léčivy bortezomibem, dexametazonem, lenalidomem a dalšími. [39].

Kyselina valproová je již několik let používána k léčbě epilepsie a jako stabilizátor nálady. Kromě antikonvulzivního účinku také působí jako inhibitor histondeacetyláz. VPA indukuje diferenciaci nádorových buněk, včetně maligních hematopoetických buněk, ovlivňuje růst nádorů a tvorbu metastáz *in vivo* a indukuje apoptózu u leukemických buněk [97,98]. VPA byla testována pro možné využití v léčbě myelodysplastického syndromu a akutní myeloidní leukemie a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s ostatními léčivy [99,100]. U MM je VPA schopna regulovat buněčný cyklus a indukovat apoptózu, ale i jiné formy buněčné smrti [101].

1.4 HEMATOPOETICKÉ BUNĚČNÉ LINIE A JEJICH VÝZNAM

Permanentní hematopoetické buněčné linie odpovídají genotypově a fenotypově maligním buňkám pacientů se zhoubným onemocněním krve. Normální hematopoetické buňky jsou schopny přežít v podmínkách *in vitro* pouze několik dnů či týdnů, naopak buněčné linie jsou adaptovány na podmínky *in vitro* a mají schopnost se neomezeně dělit. 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 [102]. Maligní hematopoetické buněčné linie vznikají z primární kultury, to znamená z leukemických nebo myelomových buněk izolovaných z periferní krve nebo kostní dřeně nemocných s leukemií nebo myelomem.

Separované mononukleární buňky jsou kultivovány ve skleněných nebo plastických baňkách v kultivačních médiích bez přítomnosti nebo v přítomnosti růstových faktorů – cytokinů – např. IL-6 v případě myelomových buněk nebo rekombinantního faktoru stimulujícího tvorbu kolonií granulocytů (G-CSF) nebo granulocytů i monocytů (GM-CSF) po celou dobu kultivace. Kultivace se provádí zpravidla po několik týdnů až měsíců, vždy do doby, kdy kultura buď zanikne, zdiferencuje a nebo z ní vznikne permanentní buněčná linie. Vznik permanentní linie odvozené od leukemických nebo myelomových buněk nemocných je vždy náhodnou a vzácnou událostí. Navíc vzniklé linie nemusí vždy pocházet z původních leukemických a myelomových buněk nemocného. Kritériem je obsah genomu viru Epstein-Barrové (EBV), který může vést ke vzniku B-lymfoblastoidní buněčné linie, která neodpovídá fenotypově MM [102]. Ustavené linie odvozené z původních leukemických nebo myelomových buněk exprimují zpravidla stejné znaky jako původní maligní buňky pacienta. Linie, které vznikly z myelomu, často sekretují nebo exprimují v cytoplasmě imunoglobulin stejné třídy a i stejného idiotypu jako původní myelomové buňky nemocného. Každá permanentní linie odvozená z nádorových buněk nemocného se stává mocným nástrojem k výzkumu nádorů na buněčné i molekulární úrovni. Na permanentních leukemických i nádorových liniích se testují nové cílené protinádorové látky v preklinických studiích. Ustavení myších myelomových linií umožnilo vznik hybridomových linií, které produkují definované monoklonální protilátky. Buněčné linie slouží jako neomezený zdroj buněčného materiálu, což můžeme zařadit mezi hlavní výhody buněčných linií spolu s celosvětovou dostupností buněčného materiálu a možností jejich skladování v tekutém dusíku. Další výhodou je nepřítomnost kontaminujících normálních buněk [102].

1.4.1 Historie buněčných linií

První permanentní buněčné linie byly ustaveny z biopsií nemocných Burkittovým lymfomem na začátku 60. let. Jednalo se o B-lymfoidní linie, u nichž se později podařilo objevit virus Epstein-Barrové (EBV) [103]. Později se podařilo ustavit další linii CCRF-CEM, která byla odvozena od leukemických buněk pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií T buněčného typu (T-ALL) [104], dále první linii odvozenou od plazmatických buněk pacienta s MM nazvanou RPMI 8226 [105]. V roce 1968 byla ustavena další myelomová linie U-266 a to z periferní krve 53 letého muže s refrakterním MM v terminálním stadiu. Linie U-266 byla unikátní tím, že sekretovala IgE λ [106]. V roce 1970 se podařilo ustavit buněčnou linii K562 [107], která byla odvozená od leukemických

buněk pacienta s chronickou myeloidní leukémií (CML) v blastickém zvratu. Později bylo zjištěno, že buňky odpovídají prekurzorovým buňkám několika hematopoetických vývojových řad. Díky svému fenotypu, chromozomálním aberacím typickým pro CML a schopností diferenciac se tato linie stala jednou z nejstudovanějších, co se týče výzkumu maligního bujení. V roce 1976 byla ustavena další hojně studovaná linie HL-60. Tato linie byla odvozena od leukemických buněk pacienta s akutní myeloidní leukémií a odpovídala morfologicky promyelocytům a myeloidním blastům. Linie HL-60 se stala zajímavou hlavně svou schopností diferencovat působením některých chemických látek [108]. Díky vývoji kvalitních kultivačních medií s použitím růstových faktorů a cytokinů se podařilo ustavit mnoho dalších linií, které představují vzácné typy akutních i chronických leukémií. V současné době existuje téměř ke každému typu leukemie fenotypově odpovídající buněčná linie.

2 CÍLE PRÁCE

- charakterizovat buněčnou linii UHKT-944 odvozenou od pacienta s plazmocelulární leukemií, 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 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 METODY

Použité metodiky uvedené v první části této kapitoly sloužily především k detailní charakterizaci ustavené linie UHKT-944. Metody ve druhé části kapitoly (od kapitoly 3.2.12) byly použity pro studium vlivu HDAC inhibitorů na tuto buněčnou linii. Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Přehled použitých buněčných linií

- CML-T1: buněčná linie nezralých T lymfocytů odvozená od chronické myeloidní leukemie (CML) v akutní fázi. Pochází z německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig).
- JURL-MK1: převážně megakaryocytární buněčná linie odvozená od CML v blastickém zvratu. Pochází z DSMZ.
- Karpas-299: odvozená od anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALCL) v terminálním stádiu. Pochází z DSMZ.
- JURKAT: buněčná linie nezralých T lymfocytů odvozená od akutní lymfoblastické leukemie (ALL). Pochází z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC, Velká Británie)
- HEL: odvozená od akutní myeloidní leukemie (AML) subtypu M6. Byla získána od Dr. P. Martin, Fred Hutchinson Cancer Research Centre, Seattle, WA, USA
- HL-60: odvozená od (AML) subtypu M2. Linie pochází od Dr. R. C. Gallo, National Cancer Institute, Bethesda, USA.
- MOLM-7: odvozená od CML v blastickém zvratu. Pochází od Dr. Y. Matsuo, Fujisaki Cell Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japonsko. Získána Dr. P. Stöckbauerem.
- KG-1: odvozená od AML subtypu M6. Byla získána od Dr. Jun Minowada, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y., USA.
- NALM-16: buněčná linie prekurzorových B buněk odvozená od ALL. Byla získána od Dr. Jun Minowada, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y., USA.
- HeLa: odvozená od nádoru děložního hrdla. Byla získána z Oddělení buněčné fyziologie Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT).

- UHKT-893: odvozená od mnohočetného myelomu (MM). Ustavená v naší laboratoři (ÚHKT) v roce 2010.
- UHKT-944: odvozená od plazmocelulární leukemie (PCL). Ustavená v naší laboratoři (ÚHKT) v roce 2010.

3.1.2 HDAC inhibitory

- Kyselina valproová VPA (Cayman Chemicals, USA), 300 mM zásobní roztok v kultivačním médiu, připravován vždy čerstvý
- Suberoylanilid hydroxamové kyseliny SAHA (Alexis, USA), 40 mM zásobní roztok v DMSO (Sigma-Aldrich, ČR) ve 4 °C

3.1.3 Seznam použitých protilátek

- Jak2 (D2E12) XP® Rabbit mAb #3230 (Cell Signaling Technology, USA)
- Akt (pan) (40D4) Mouse mAb #2920 (Cell Signaling Technology, USA)
- pJAK2 (Tyr1007/Tyr1008) (R Rabbit pAb sc-16566-R) (SantaCruz Biotechnology, USA)
- Phospho-Akt (Ser473) Antibody #9271 (Cell Signaling Technology, USA)
- Phospho-Stat3 (Tyr705)(3E2) Mouse mAb#9138 (Cell Signaling Technology, USA)
- Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate Antibody #9611 (Cell Signaling Technology, USA)
- Anti-β-Actin antibody, Mouse monoclonal (clone AC-15) A1978 (Sigma-Aldrich, ČR)
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074 (Cell Signaling Technology, USA)
- Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076 (Cell Signaling Technology, USA)

3.2 PŘEHLED METOD

3.2.1 Izolace a kultivace buněk z kostní dřene pacientů

Kostní dřeň pacientů byla odebírána pro rutinní diagnostické účely na hematologické klinice ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Tentýž den byla část vzorku dopravena do ÚHKT a zpracována pro výzkumné účely. Mononukleární buňky byly získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque® - 1077 (Sigma-Aldrich, USA). Buňky byly kultivovány v 25 cm² plastických kultivačních lahvích pro suspenzní buňky a v 50 ml skleněných Erlenmeyerových baňkách v médiu RPMI-1640 (Biochrom, Německo) s L-glutaminem,

kteřé bylo obohaceno 10% fetálním telecím séřem (Biochrom), rekombinantním IL-6 (1 ng/ml; Invitrogen, USA) a antibiotiky penicilinem (100 U/ml; Sigma-Aldrich) a streptomycinem (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Buněčné kultury byly uchovávány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Médium bylo měněno dle potřeby, zpravidla jednou až dvakrát týdně.

3.2.1.1 Vzorek kostní dřene č. 944

Vzorek kostní dřene 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).

3.2.2 Měření buněčné proliferace, viability a morfologická charakterizace

Morfologie plazmatických buněk byla určena z cytospinových preparátů, které byly barveny dle Giemsy. Z kultivačních nádobek bylo odebráno 200 µl buněčné suspenze, která byla dle potřeby naředěna fosfátovým pufřem (phosphate buffered saline, PBS), následovala centrifugace na cytospinové centrifuze Cytospin 2 (Shandon) při 800 rpm/10 min. Druhý den byly buňky na podložním sklíčku fixovány a následně barveny Giemsovým činidlem. Hotové preparáty byly pozorovány pod mikroskopem (Nikon Alphaphot 2). Ke snímání fotografií byl použit fotoaparát Olympus C-3030 ZOOM. Životnost buněk byla zjišťována pomocí 0,4% roztoku trypanové modři, který byl přidán k suspenzi buněk v poměru 1:1. Vzorek byl nanesen do počítací komůrky (TC-10 dual-chamber counting slides, Bio-Rad). Počet živých a mrtvých buněk byl stanoven na automatickém čítači buněk (Cell Counter TC10™, Bio-Rad, USA). Buněčná proliferace byla měřena v přítomnosti různých koncentrací IL-6 kolorimetrickou metodou WST-1 (Roche, Německo), při které jsou tetrazoliové soli metabolizovány mitochondriálními dehydrogenázami na formazan. Jeho vznik a množství koreluje s počtem metabolicky aktivních, tj. živých buněk. Analýza byla provedena dle instrukcí v příbalovém letáku. Absorbance byla měřena při 450 nm a při referenční vlnové délce 690 nm na ELISA readeru Dynatech, Model MRX (Dynatech Laboratories, USA). Růst buněk v kultivační nádobě byl průběžně pozorován v inverzním mikroskopu Meopta IDM.

3.2.3 Určení počtu vícejaderných buněk metodou průtokové cytometrie

Stanovení obsahu jaderné DNA pomocí průtokové cytometrie bylo využito k určení počtu vícejaderných buněk. Průtoková cytometrie je standardně používaná metoda pro

fenotypizaci a charakterizaci buněčných populací nebo částic. Uplatňuje se při určování typu krevních buněk, ploidie, analýze buněčného cyklu či stanovení jaderné DNA. Buňky jsou před analýzou obarveny fluorescenčně značenými protilátkami nebo fluorescenčními barvivy (fluorochromy), které se váží na proteiny, DNA či jiné struktury uvnitř či na povrchu buňky. Buňky jsou ozářeny laserovým paprskem, přičemž dojde k absorpci záření fluorochromy a následné emisi záření s odlišnou vlnovou délkou. Pomocí laserových paprsků jsou měřeny kromě fluorescence i dva rozptylové parametry: přímý rozptyl (FSC, forward scatter), který je úměrný velikosti buňky, a boční rozptyl (SSC, side scatter), který odráží vnitřní strukturu buněk, např. granularitu [109].

Buňky (5×10^5) byly 1x promyty v roztoku PBS, centrifugovány (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut) a resuspendovány v 4,5 ml ledového 70% ethanolu. Buňky byly inkubovány 30 minut při 4 °C a následně uchovány při -20 °C. V den analýzy byly buňky 2x promyty v PBS a inkubovány 2 hodiny při 4 °C v 0,5 ml modifikovaného Vindelova pufru s propidium jodidem (10 mM Tris, pH8, 1 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 20 µg/ml propidium jodid, 10 U (mezinárodní jednotka) ribonukleázy A). Poměrné zastoupení buněk obsahujících větší množství DNA než dvojnásobek běžného obsahu v G1/G0 fázi byla určena z histogramů fluorescence propidium jodidu měřené na průtokovém cytometru LSR Fortessa (BD Biosciences, USA). Měření probíhalo při nízké průtokové rychlosti (kolem 50 událostí/sec) a vyhodnocení bylo navíc omezeno na singletní události určené ze scattergramů FSC-A vs FSC-H, aby byly vyloučeny možné nepřesnosti způsobené současným průchodem více buněk měřícím laserovým svazkem.

3.2.4 Imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie byla také sledována exprese vybraných povrchových antigenů. Pro určení povrchových znaků se standardně využívá specifických protilátek značených fluorochromem (přímá fluorescence), v případě neznačené primární protilátky je možné použít sekundární značenou protilátku.

Buňky (cca 4×10^5) byly stočeny (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/5 minut), 2x promyty v PBS a sediment resuspendován ve zbytku PBS (cca 50 µl). K buněčné suspenzi byla přidána primární protilátka proti: CD3, CD28, CD33, CD38, CD45, CD56, CD138, CD117 (Invitrogen); CD10, CD24 (Ortho Diagnostic System, USA); CD4, CD13 (eBioscience, USA); κ a λ lehkým řetězcům (Dako, Denmark); CD5 (clone L17F12, získána od Prof. Ronalda Levyho, Stanford, USA); CD8 (BioLegend, USA); CD1a, CD19, CD20, CD21, CD25, CD85k, CD123 (Beckman Coulter, USA); CD34 (clone 4H11)

(Exbio, Česká republika); CD184 (Gen-Probe, USA); HLA-DR (clone B33.1; získána od Dr. Bice Perrusia, Wistar Institute, USA); CD98, CDw65, CD89, CD95 (Immunotech, Česká republika); CD9 (Hybritech, USA); CD15 (Becton Dickinson, USA) a CD105 (Ansell, USA). Buňky byly inkubovány s primární protilátkou 30 minut při 4°C. Buňky s navázanou primární protilátkou byly 2x promyty v PBS a následně inkubovány se sekundární protilátkou značenou fykoerythrinem (PE, phycoerythrin). Proti myším primárním protilátkám byly použity králičí a kozí sekundární protilátky (Dako). Buňky byly inkubovány 30 minut při 4 °C, promyty 2x v PBS a resuspendovány v přebytku PBS. Jako pozitivní a negativní kontrola byly použity buněčné linie uvedené v kapitole 3.1.1. Jako kontrola nespecifických vazeb byly použity neznačené buňky a buňky značené pouze sekundární protilátkou. Intenzita fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru Coulter Epics XL (Beckman Coulter) a vyhodnocena v programu WinMDI 2.8 (BD, Franklin lakes, USA) Pomocí tzv. gatingu byl ve scattergramech vybrán region, který zahrnoval pouze populaci živých buněk, tj. s minimální granularitou a ten byl následně vyhodnocen. Povrchové antigeny byly také analyzovány v laboratoři průtokové cytometrie na ÚHKT. Zde byly testovány znaky CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD27, CD28, CD38, CD45, CD56, CD117, CD138 a cytoplazmatický lehký řetězec kappa.

3.2.5 Cytogenetická analýza

Klasické cytogenetické vyšetření využívá techniku pruhování chromozomů, která umožňuje analýzu karyotypu a prokázání numerických a strukturních aberací chromozomů. Vyšší rozlišovací schopnost a citlivost poskytují molekulárně cytogenetické metody, které využívají fluorochromem značené DNA sondy k detekci určitých genů, chromozomových oblastí i celých chromozomů. Cytogenetická analýza byla provedena konvenční cytogenetickou metodou a metodou mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH) na Oddělení cytogenetiky ÚHKT.

3.2.5.1 Konvenční cytogenetická analýza

Buňky byly zpracované standardním postupem, který zahrnuje kultivaci buněk v médiu RPMI-1640, následuje zástava buněčného cyklu kolcemidem, inkubace v hypotonickém roztoku, fixace v roztoku kyseliny octové a metanolu, G-pruhování a barvení roztokem Giemsa-Romanowski. Chromozomové preparáty byly vyhodnocovány pomocí mikroskopu a počítačové analýzy obrazu (IKAROS, MetaSystems, Německo).

Chromozomy byly hodnoceny podle ISCN (The International System for Human Cytogenetic Nomenclature) nomenklatury.

3.2.5.2 mFISH analýza

Analýza byla provedena pomocí 24Xyte Human Multicolor FISH Probe Kit (MetaSystems) nebo SpectraVision™ Assay (Abbott Laboratories) dle instrukcí v příbalovém letáku. Standardní postup mFISH analýzy zahrnuje hybridizaci fluorochromy značených DNA sond na cytogenetické preparáty, které jsou připravené konvenčním způsobem, mikroskopování, analýzu signálu ve fluorescenčním mikroskopu a počítačovou analýzu obrazu. Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axioplan 2 nebo Nikon Eclipse 90i a obraz byl dále zpracován pomocí softwaru ISIS (MetaSystems) nebo LUCIA (Laboratory Imaging, ČR).

3.2.6 Stanovení mutačního stavu IgVH genů

Klonální přestavby IgVH genů byly vyšetřeny v laboratoři PCR diagnostiky leukemií na ÚHKT. Detailní popis metody zahrnující izolaci RNA, syntézu komplementární DNA (cDNA), PCR amplifikaci imunoglobulinových rodin VH, sekvenaci klonální přestavby a stanovení mutačního stavu je uveden v publikaci [110]. Jako mutované jsou označovány ty geny, jejichž homologie se zárodečnou linií je <98 %.

3.2.7 Průkaz sekrece imunoglobulinů

Buňky ($0,1 \times 10^6$ buněk/ml) byly inkubovány po dobu tří dnů. Třetí den kultivace byly buňky centrifugovány (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut) a supernatant ponechán pro analýzu. Imunoglobuliny a jejich volné lehké řetězce byly stanoveny rutinní metodou (nefelometrie) na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

3.2.8 Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

3.2.8.1 Dvourozměrná (2-D) elektroforéza

2-D elektroforéza byla provedena dle postupu, který byl částečně modifikován [111]. Pro odstranění kontaminujících substancí byl použit 2-D Clean-Up Kit (Amersham Bioscience, USA). Buňky (10^7 buněk) byly zpracovány dle návodu tohoto kitu. Výsledná proteinová peleta byla resuspendována v 350 μ l rehydratačního roztoku s obsahem 7M urey a 2M thiourey, který byl připraven dle návodu v příbalovém letáku 2-

D Clean-Up Kitu. Na strip (ReadyStrip IPG Strips pH 5 – 8, Bio-Rad) pro 2-D elektroforézu bylo nanášeno 650 µg proteinu. Proteiny byly rozděleny ve druhém směru pomocí SDS-PAGE na 12 % akrylamidovém gelu. Výsledný gel byl opláchnut v dostatečném množství redestilované vody a obarven v roztoku SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) dle návodu.

3.2.8.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Ke stanovení vyšších molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla použita pro analýzu vybraných proteinových spotů na 2-D elektroforéze. Proteinové spoty byly vybrány na základě porovnání s proteinovou mapou linie UHKT-893, která byla ustavena na Oddělení buněčné biochemie ÚHKT ve stejném roce jako linie UHKT-944. První spot byl vybrán na základě jeho zvýšené exprese u linie UHKT-944 a absence u linie UHKT-893. Druhý spot odpovídal pozici spotu, který byl identifikován u linie UHKT-893 jako lehký řetězec imunoglobulinu kappa. Vybrané proteinové spoty byly vyříznuty z gelu a zpracovány a měřeny v laboratoři hmotnostní spektrometrie na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Proteiny byly identifikovány na základě porovnání získaných dat s proteinovými databázemi (GenBank) pomocí programu Mascot verze 2.1 (Matrix Science, USA).

3.2.9 Detekce anti-HBsAg

Buňky ($0,2 \times 10^6$ buněk/ml) byly kultivovány po dobu tří dnů. Třetí den byly buňky centrifugovány (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut) a supernatant uchován do doby analýzy při -20°C . Testován byl také buněčný lyzát. Buňky (20×10^6) byly centrifugovány a buněčná peleta byla zlyzována v 300 µl lyzačního pufru (součást Caspase-3 colorimetric assay kit, Biovision, USA) s přidávkem 1 µl inhibitoru proteáz (Sigma-Aldrich). Buněčný lyzát byl uchován do doby analýzy při -20°C .

Možná specifická IgA protilátka linie UHKT-944 vůči viru hepatitidy B (HBsAg) byla měřena v připraveném supernatantu i buněčném lyzátu pomocí standardní metody ELISA dle návodu použitého ETI-AB-AUK-3 (antiHBs) kitu (DiaSorin, Itálie). Vzorky byly dále měřeny metodou CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) na analyzátoru Abbott Architect i1000 (Abbott, Česká republika) s použitím Architect anti-

HBs reagenčního kitu v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy (NRL) ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ) v Praze.

3.2.10 Průkaz kontaminace buněk mykoplazmou

Mykoplazmata jsou prokaryotické mikroorganismy, které mohou kontaminovat buněčné kultury a zkreslovat tak výsledky experimentů. Mykoplazmata nepřerůstají buněčné kultury, ale mohou ovlivňovat metabolismus buněk, růst či produkci cytokinů. K detekci mykoplazmat byla použita standardní fluorescenční metoda při které je DNA (testovaných buněk i mykoplazmat) barvena fluorescenčním barvivem.

Před analýzou byly buňky kultivovány 10 dní v RPMI-1640 médiu bez přídavku antibiotik, fixovány ve směsi metanol/kyselina octová v poměru 3:1 a barveny Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Buňky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (Carl Zeiss Jena Lumar).

3.2.11 Detekce EBV

K vyloučení přítomnosti EBV byly buňky zaslány k analýze virové DNA metodou PCR do Národní referenční laboratoře pro herpetické viry v SZÚ.

3.2.12 Buněčná linie UHKT-944

Buňky UHKT-944 byly kultivovány ve skleněných 50 ml nebo 100 ml Erlenmayerových baňkách v médiu RPMI-1640 s L-glutaminem (Biochrom, Německo), které bylo obohaceno 10% fetálním telecím sérem (Biochrom), rekombinantním IL-6 (1 ng/ml; Invitrogen, USA) a antibiotiky penicilinem (100 U/ml; Sigma-Aldrich) a streptomycinem (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Buňky byly uchovávány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Médium bylo měněno dle potřeby, zpravidla dvakrát týdně.

3.2.13 Stromální buňky kostní dřeně (BMSCs)

BMSCs byly získány kultivací mononukleárních buněk kostní dřeně pacientů s MM, které byly izolovány denzitní gradientovou centrifugací (viz kapitola 3.2.1). Mononukleární buňky byly kultivovány ve skleněných Erlenmayerových baňkách v médiu RPMI-1640 s L-glutaminem (Biochrom, Německo), které bylo obohaceno 10% fetálním telecím sérem (Biochrom), antibiotiky penicilinem (100 U/ml; Sigma-Aldrich) a streptomycinem (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Buňky byly uchovávány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Médium bylo měněno dle potřeby, zpravidla dvakrát týdně. Adherentní buňky s morfologií fibroblastů se objevily na dně baňky po 1 - 2 týdnech kultivace.

Neadherentní buňky byly odmyty a stromální buňky adherované na dně skleněné baňky byly kultivovány v médiu bez IL-6. Médium bylo měněno 2x týdně. Poté co buňky dosáhly 100% konfluence, tzn. zaplnily povrch dna baňky, byly opláchnuty PBS a uvolněny ze dna pomocí roztoku Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), který byl následně inaktivován přidavkem čerstvého média. Výsledná buněčná suspenze byla centrifugována (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut), 1x promyta v médiu a výsledná buněčná peleta resuspendována v čerstvém médiu. Buňky byly nasazeny ve stejné hustotě do 50 ml skleněných Erlenmeyerových baněk a kultivovány do doby než bylo dosaženo cca 80% konfluence (maximálně 1 týden).

3.2.14 Kultivace buněk v přítomnosti BMSCs

Buňky UHKT-944 (2.5×10^5 buněk/ml) byly nasazeny do 50 ml skleněných Erlenmeyerových baněk s BMSCs a bez BMSCs. Buňky UHKT-944 byly kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA (1 a 1,5 μ M) a VPA (0,5 a 1 mM).

3.2.15 Kultivace buněk v přítomnosti extracelulární matrix (ECM)

96-jamková mikrotitrační destička s povrchovou úpravou pro tkáňové kultury (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA) byla pokryta složkami extracelulární matrix. Jako zdroj těchto složek byl použit roztok MaxGel ECM (Sigma-Aldrich). MaxGel byl naředěn vychlazeným médiem v poměru 1:4 a 75 μ l takto připraveného roztoku bylo nanášeno do jamek mikrotitrační destičky. Destička byla inkubována 4 hodiny v CO₂ inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Zbylý roztok byl opatrně odsát a destička bez víčka ponechána 30 minut v laminárním boxu (HERAsafe; Heraeus) až do odpaření veškeré tekutiny. Kultivačním médiem byly UHKT-944 buňky naředěny na výslednou koncentraci 2×10^5 buněk/ml a 100 μ l buněčné suspenze bylo nanášeno do jamek mikrotitrační destičky s navázaným ECM a kontrolních neošetřených jamek. Po 48 hodinách inkubace byly buňky ošetřeny SAHA (1 a 1,5 μ M) a VPA (0,5 a 1 mM).

3.2.16 Kultivace buněk v přítomnosti různých koncentrací IL-6

Buňky UHKT-944 (2.5×10^5 buněk/ml) byly nasazeny do 50 ml skleněných Erlenmayerových baněk s různými koncentracemi IL-6: 0.2 ng/ml, 1 ng/ml a 3.3 ng/ml a do kontrolních baněk bez přídavku IL-6. Buňky byly kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA (1 a 1,5 μ M) a VPA (0,5 a 1 mM).

3.2.17 Měření buněčné proliferace pomocí AlamarBlue®

Buněčná proliferace byla měřena po 24 a 48 hodinách inkubace buněk UHKT-944 s příslušnými HDAC inhibitory (viz kapitola 3.2.14, 3.2.15 a 3.2.16) s použitím barviva AlamarBlue® (Invitrogen, USA). Pomocí metody AlamarBlue lze měřit buněčnou proliferaci a cytotoxicitu různých látek. Principem metody je schopnost metabolicky aktivních tj. živých buněk přeměňovat modré barvivo resazurin, na fluorescenční látku resorufin. Hodnota změřené fluorescence pak odpovídá celkové metabolické aktivitě respektive životnosti měřených buněk.

Buňky byly promíchány opatrným třepáním a krouživými pohyby baňky a 100 μ l buněčné suspenze z každé Erlenmeyerovy baňky bylo přeneseno do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky. Do každé jamky bylo poté pipetováno 10 μ l AlamarBlue barviva. V případě kultivace buněk v přítomnosti ECM bylo pipetováno 10 μ l AlamarBlue barviva přímo do jamek destičky pokryté MaxGel. Destička byla zabalena do alobalu z důvodu ochrany před světlem a inkubována 1 hodinu v CO₂ inkubátoru při 37 °C. Intenzita fluorescence byla měřena na destičkovém analyzátoru BMG FLUOstar Galaxy (MTX Lab Systems, USA) při excitační vlnové délce 560 nm a emisní vlnové délce 590 nm.

3.2.18 Detekce apoptózy

3.2.18.1 Měření aktivity kaspázy-3

Během procesu apoptózy dochází k aktivaci kaspáz, které se podílejí jak na přenosu signálu vedoucího k apoptóze, tak i na samotné buněčné smrti prostřednictvím štěpení celé řady substrátů. Apoptóza byla detekována na základě zjištěné aktivity efektorové kaspázy-3, která byla měřena pomocí kolorimetrické metody s použitím kitu Caspase-3/ CPP32 colorimetric assay kit (BioVision, USA). Aktivita kaspázy-3 byla měřena dle instrukcí v příbalovém letáku tohoto kitu. Buňky UHKT-944 (5×10^5 buněk) byly kultivovány v 6-jamkových destičkách v přítomnosti/nepřítomnosti 10 μ M inhibitoru kaspáz Q-VD-Oph (R&D Systems, Kanada) a ošetřeny SAHA (μ M) a VPA (mM). Buňky byly inkubovány s příslušnými HDAC inhibitory 24 hodin a následně centrifugovány (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut) a lyzovány. Koncentrace proteinů v buněčném lyzátu byla určena metodou dle Bradfordové podle návodu v příbalovém letáku použitého Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, USA). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (Bio-Rad Laboratories). Množství proteinu v každém experimentu bylo 100 μ g.

Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm na ELISA readeru Dynatech, model MRX (Dynatech Laboratories, USA).

3.2.18.2 Detekce apoptózy pomocí annexinu V a propidium jodidu

Časně apoptotické buňky lze detekovat pomocí annexinu V označeného fluorochromem, který se váže na fosfatidylserin, jež se u apoptických buněk přesouvá na vnější stranu cytoplazmatické membrány. Spolu s Annexinem V se pro odlišení pozdně apoptických a nekrotických buněk používá propidium jodid.

Apoptóza byla měřena za použití kitu Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche Diagnostics, Německo). Buňky UHKT-944 (4×10^5 buněk/ml) byly kultivovány v 6-jamkových destičkách v přítomnosti/nepřítomnosti $10 \mu\text{M}$ inhibitoru kaspáz Q-VD-OPh (R&D Systems, Kanada) a ošetřeny SAHA (μM) a VPA (mM). Buňky byly inkubovány s příslušnými HDAC inhibitory 24 hodin a následně zpracovány a měřeny dle instrukcí výrobce použitého kitu. Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru Coulter Epics XL (Beckman Coulter, USA). Naměřená data byla vyhodnocena v programu WinMDI 2.8 (BD, USA).

3.2.19 Měření adhezivity buněk UHKT-944 k ECM

Adhezivita buněk UHKT-944 k ECM byla měřena dle postupu popsaného v publikaci [112] s použitím komerčních stripů pokrytých různými proteiny ECM (Millicoat 96-well ECM Screening Kit, Millipore) a 96-jamková mikrotitrační destička pokrytá MaxGel ECM (Sigma-Aldrich) viz kapitola 3.2.15. K ověření správného pokrytí destičky MaxGel byla použita buněčná linie HEL, u které byla v Oddělení proteomiky UHKT již dříve ověřena její schopnost vázat se k lamininu i kolagenům.

3.2.20 Měření koncentrace interleukinu-6

Buňky UHKT-944 ($1,5 \times 10^6$ buněk) byly kultivovány v 50 ml skleněných Erlenmeyerových baňkách v přítomnosti BMSCs po dobu 3 dnů. Poté bylo z každé baňky odebráno 2 ml buněčné suspenze, která byla následně centrifugována (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut) a supernatant uchován v $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do druhého dne. Zároveň byla měřena produkce IL-6 stromálními buňkami bez přítomnosti myelomových buněk. Vzorky byly připraveny výše popsaným postupem bez přítomnosti buněk UHKT-944. Koncentrace IL-6 v supernatantu a kondiciovaném médiu byla měřena elektrochemiluminiscenční metodou (ECLIA) na Oddělení klinické biochemie

Thomayerovy nemocnice v Praze na analyzátoru Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Česká republika) s použitím příslušné reagenční soupravy.

3.2.21 Analýza buněčného cyklu

Analýza buněčného cyklu je jedna z aplikací průtokové cytometrie, která je založena na kvantifikaci buněčné DNA. Tato metoda využívá fluorescenční barvivo, které se váže na molekulu DNA. Po excitaci fluorescenčního barviva dochází k emisi záření, které je zaznamenáno průtokovým cytometrem. Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství DNA, které se mění v průběhu buněčného cyklu.

Buňky UHKT-944 ($2,5 \times 10^5$ buněk/ml) byly nasazeny do 50 ml skleněných Erlenmeyerových baněk s BMSCs a bez BMSCs. Buňky UHKT-944 byly kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA (1 a $1,5 \mu\text{M}$) a VPA (0,5 a 1 mM). Po 48 hodinách inkubace bylo z buněčné suspenze odebráno 5×10^5 buněk, které byly stočeny na centrifuze (Rotofix 32A, Hettich; 3000 rpm/10 minut) a 1x promyty v PBS. Buněčný sediment byl resuspendován v 4,5 ml ledového ethanolu, buňky inkubovány 30 minut při 4 °C a následně uchovány při -20°C po dobu maximálně jednoho týdne. V den analýzy byly fixované buňky promyty 2x v PBS a inkubovány 2 hodiny v 0,5 ml modifikovaného Vindelovova pufru s propidium jodidem (10 mM Tris, pH 8, 1 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 20 $\mu\text{g/ml}$ propidium jodid a 10 U (mezinárodní jednotky) ribonukleázy A). Fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru LSR Fortessa (BD Biosciences). Jednotlivé fáze buněčného cyklu byly vyhodnoceny z grafů PE vs FSC (intenzita fluorescence propidium jodidu v kanále PE a rozptylový parametr FSC) v programu BD FACSDiva 7.0. Kromě sledování množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu byl také vyhodnocen počet buněk v tzv. sub-G1 fázi (se sníženým obsahem DNA), která představuje buňky v pozdní fázi apoptózy.

3.2.22 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Buňky UHKT-944 ($2,5 \times 10^5$ buněk/ml) byly nasazeny do 50 ml skleněných Erlenmeyerových baněk s BMSCs a bez BMSCs. Buňky byly kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA (1 a $1,5 \mu\text{M}$) a VPA (0,5 a 1 mM). Po 48 hodinách inkubace s příslušnými HDAC inhibitory bylo kultivační médium odstředěno a buňky sklizeny do lyzačního pufru, kterým byl výsledný buněčný lyzát naředěn na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml proteinů. Pro určení koncentrace proteinů byla použita metoda dle Bradfordové. Míra fosforylace proteinu STAT3 byla měřena pomocí ELISA kitu PathScan® Phospho-

Stat3 (Tyr705) Sandwich ELISA kit (Cell Signaling). Analýza byla provedena dle instrukcí výrobce tohoto kitu. Absorbance byla měřena při vlnové délce 450 nm a při referenční vlnové délce 650 nm na ELISA readeru Dynatech, model MRX (Dynatech Laboratories, USA).

3.2.23 Western blotting

Buňky UHKT-944 ($2,5 \times 10^5$ buněk/ml) byly nasazeny do 50 ml skleněných Erlenmeyerových baněk s BMSCs a bez BMSCs. Buňky byly kultivovány po dobu 3 dnů a poté ošetřeny SAHA (1 a 1,5 μ M) a VPA (0,5 a 1 mM). Po 48 hodinách inkubace s HDAC inhibitory byly buňky 2x promyty v PBS a zlyzovány v lyzačním pufru NP40 (Invitrogen), s přidavkem 1mM PMSF (Roche), inhibitorů proteáz a fosfatáz (Sigma-Aldrich). Po 30 minutové inkubaci na ledu byly vzorky centrifugovány (Biofuge Pico, Heraeus; 13000 rpm/30 minut), supernatant přenesen do čistých mikrozkušavek a zamražen při -80 °C. Koncentrace proteinů byla určena metodou dle Bradfordové. Ke vzorkům byl přidán 4x Laemmli sample buffer (Bio-Rad) v poměru 1:1 který byl obohacen 5% β -merkaptoethanolem. Poté byly vzorky povařeny 4 minuty při 100°C. Proteiny byly rozděleny pomocí standardní 12% SDS-PAGE (Bio-Rad) a polosuchým blottingem přeneseny na PVDF membránu Hybond-F (GE Healthcare Life Sciences, USA). Membrány byly blokovány 3% BSA (bovine serum albumine) (Roche) v PBS-T (fosfátový pufr, 0.1% Tween-20), několikrát promyty v PBS-T a inkubovány s primární protilátkou ředěnou 3% BSA v PBS-T při 4°C přes noc. Druhý den byla membrána několikrát promyta v PBS-T a inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou 2 hodiny při pokojové teplotě. Membrána byla poté několikrát promyta v PBS-T. Proteiny byly detekovány pomocí chemiluminiscence za použití SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) podle návodu výrobce a vizualizovány a vyhodnoceny digitálním systémem G-box iChemi XT4 (Syngene Europe, Cambridge) a programem GeneTools 4.02 (Syngene Europe, Cambridge). Pro ověření stejného množství proteinu, který byl nanášen do jamek, byla použita protilátka proti β -aktinu.

3.2.24 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena v programu MedCalc verze 13 (MedCalc[®], Mariakerke, Belgie) za použití párového T-testu a Wilcoxonova párového testu.

4 VÝSLEDKY

4.1 PACIENT

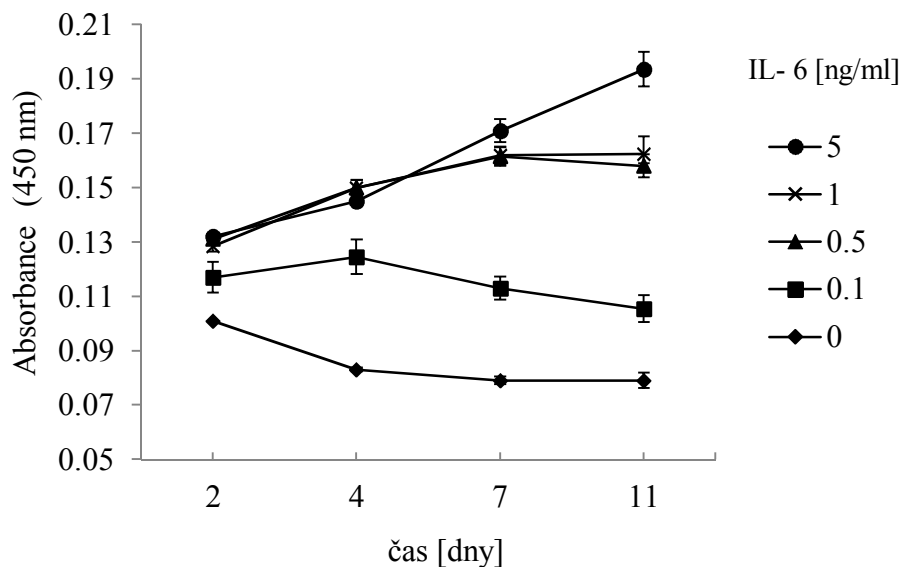
Pomocí průtokové cytometrie bylo v periferní krvi a kostní dřeni pacienta detekováno 25 % plazmatických buněk. Imunoelektroforéza moči odhalila přítomnost Bence-Jonesovy bílkoviny (volný lehký řetězec imunoglobulinů typu kappa). V séru pacienta se nacházelo 45,5 g/l IgA, poměr kappa/lambda volných řetězců byl 49,21. Dále byla v séru pacienta zjištěna koncentrace celkové bílkoviny (130 g/l), sérového albuminu (28 g/l), β 2-mikroglobulinu (11 mg/l) a kreatininu (145 μ mol/l). Koncentrace hemoglobinu v krvi byla 85 g/l. Stanovením vápníku v séru byla vyloučena hyperkalcémie. Pacient absolvoval 6 cyklů chemoterapie v režimu CD (cyklofosfamid+dexametazon) a CVD (cyklofosfamid+Velcade+dexametazon). Léčba však nebyla úspěšná a pacient zemřel s příznaky progresse onemocnění doprovázené bronchopneumonií v listopadu 2010.

4.2 USTAVENÍ BUNĚČNÉ LINIE UHKT-944

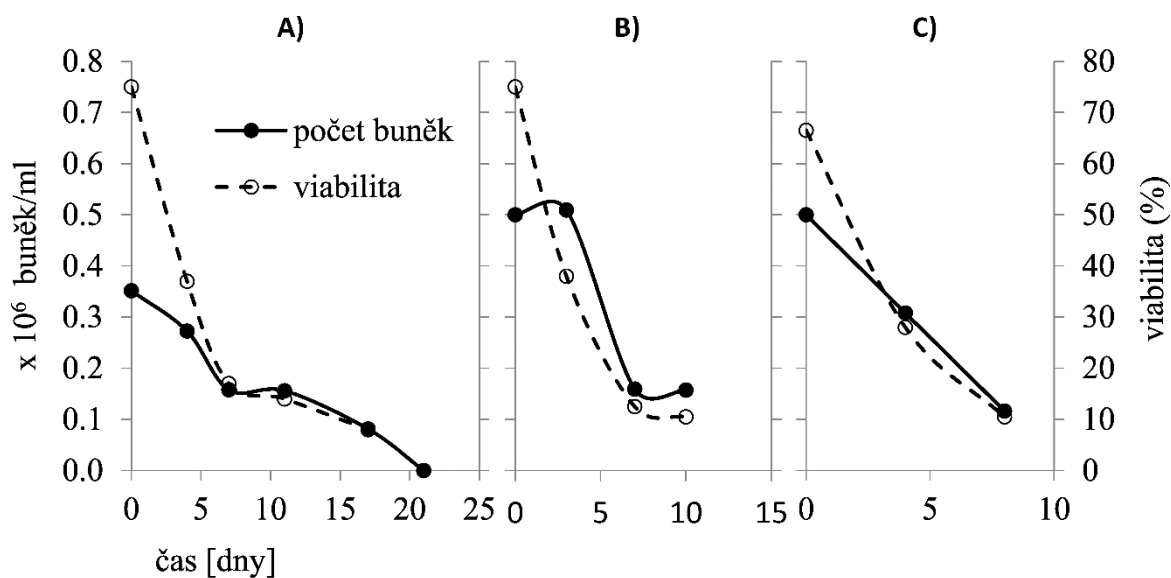
Primární kultura vzorku kostní dřene č. 944 byla založena 2. 6. 2010. Po dvou týdnech byly pozorovány na dně kultivační lahvičky a Erlenmeyerovy baňky stromální buňky s morfologií fibroblastů, které vytvářejí ideální prostředí pro podporu růstu a přežívání krvetvorných buněk [113]. Po dvou měsících kultivace jsme zaznamenali v kultuře nárůst buněk s morfologií plazmatických buněk a pojmenovali jsme nově vznikající buněčnou linii UHKT-944. Z původní primární buněčné kultury byla část buněk přenesena do nových kultivačních lahviček, kde se však již nevytvořila vrstva stromálních buněk. Stromální buňky kostní dřene jsou považovány za zdroj důležitých růstových faktorů a cytokinů [66]. Z tohoto důvodu byly buňky nadále kultivovány v médiu s IL-6, klíčového faktoru co se týče růstu a přežívání myelomových buněk.

4.3 RŮSTOVÉ CHARAKTERISTIKY

Ačkoliv jsme zjistili, že koncentrace IL-6 odpovídající 0,5 ng/ml je dostačující pro růst a přežívání buněk linie UHKT-944 (Obr. 5), byly tyto buňky nadále kultivovány v přítomnosti 1 ng/ml IL-6 jako jiné myelomové linie závislé na IL-6 [114,115]. Závislost růstu buněk na IL-6 byla v průběhu kultivace pravidelně kontrolována (Obr. 6).

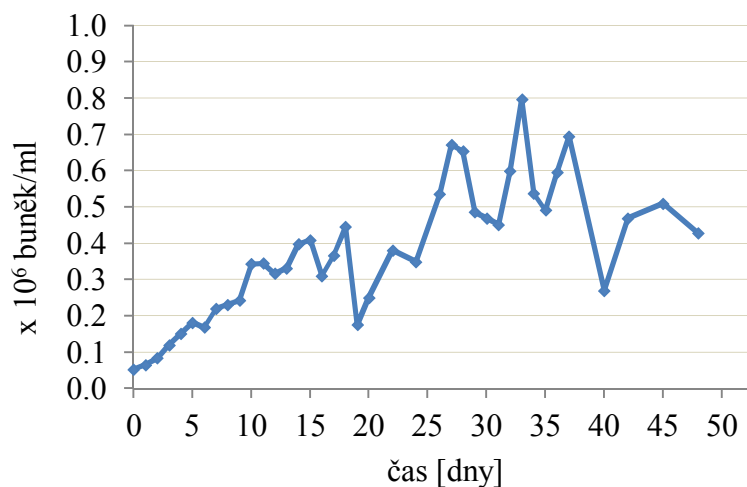


Obr. 5 – Vliv IL-6 na proliferaci buněčné linie UHKT-944. Buněčná proliferace byla měřena kolorimetrickou metodou WST-1 po 2, 4, 7 a 11 dnech inkubace s různými koncentracemi IL-6. Hodnoty jsou zobrazeny jako průměr ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 6 – Kultivace buněk UHKT-944 bez přítomnosti IL-6. Reprezentativní grafy znázorňující růst buněk UHKT-944 bez přítomnosti IL-6 dokazující závislost růstu a přežívání této linie na přítomnosti tohoto cytokinu. Buňky byly kultivovány ve skleněné 50 ml Erlenmeyerově baňce (A, B) a plastové 25 cm² kultivační lahvičce (C).

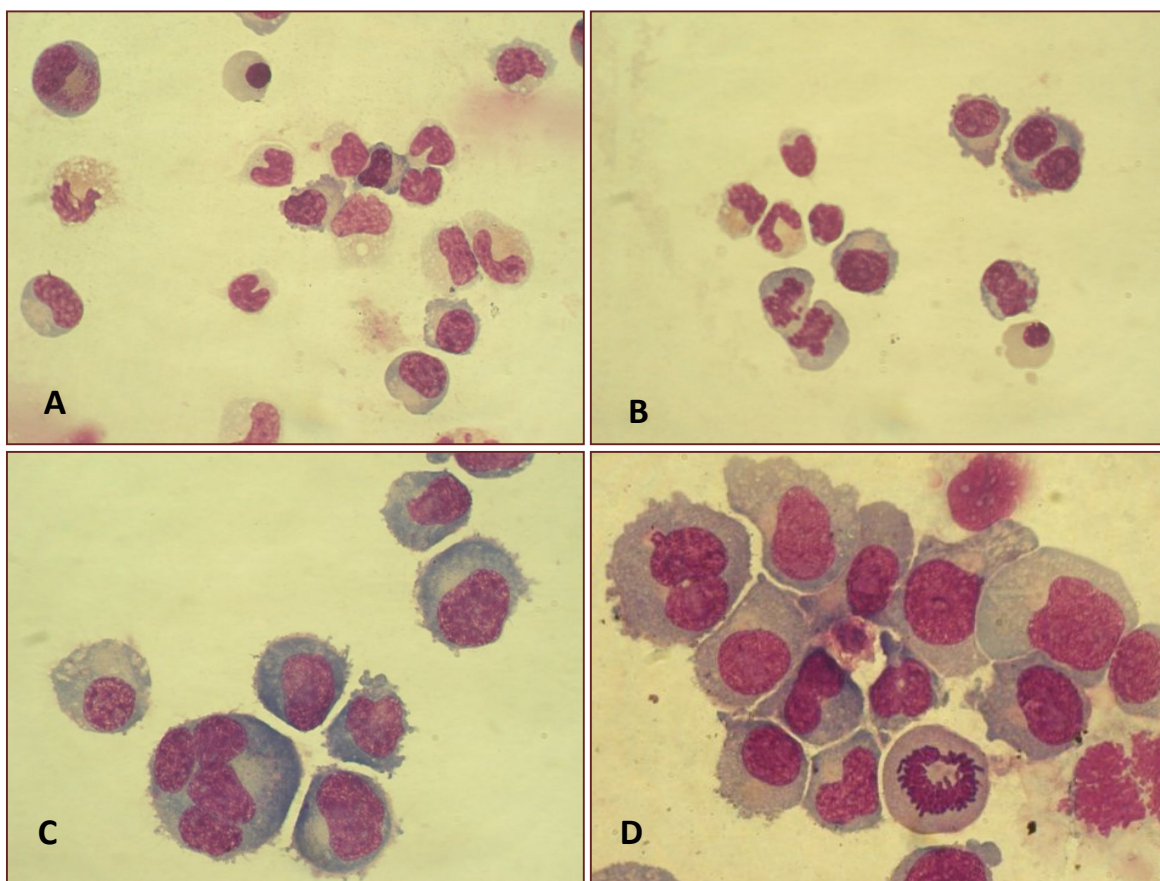
Růst buněk je také limitován jejich koncentrací v médiu. Zjistili jsme, že pro optimální růstové podmínky je nutné udržovat hustotu buněk od $0,05 \times 10^6$ buněk/ml do maximální hustoty buněk $0,6 \times 10^6$ buněk/ml (Obr. 7).



Obr. 7 – Růstová křivka linie UHKT-944 po 9 měsících kultivace. Buňky byly kultivovány v 25 cm² plastové kultivační lahvičce s počáteční koncentrací $0,05 \times 10^6$ buněk/ml. Médium bylo měněno 2x týdně opatrným odsátím vrchní vrstvy. Část odebraného média byla nahrazena stejným množstvím média čerstvého.

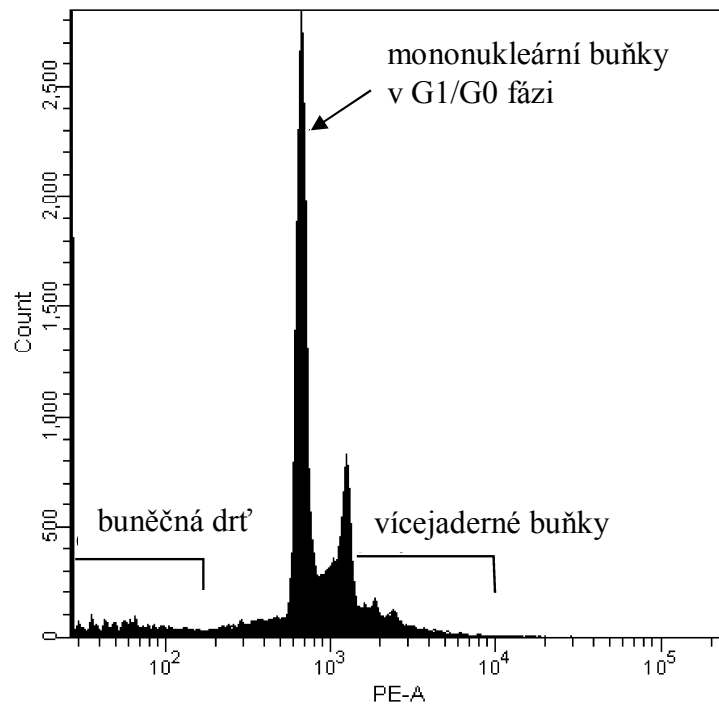
4.4 MORFOLOGIE BUNĚK LINIE UHKT-944

Morfologické vlastnosti linie UHKT-944 jsme určovali mikroskopicky na cytospinových preparátech barvených 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 (Obr. 8).



Obr. 8 – Buňky izolované z kostní dřeně pacienta č. 944 a linie UHKT-944. Buněčný nátěr primární kultury buněk izolovaných z kostní dřeně pacienta č. 944 (A, B) a buněčné linie UHKT-944 po 9 měsících v kultuře (C, D). Barvení Giemsa, zvětšení 1500x.

Všechny buňky vykazovaly morfologii plazmatických buněk. Zajímalo nás také procentuální zastoupení vícejaderných buněk, které bylo stanoveno na základě buněčného DNA obsahu metodou průtokové cytometrie. Analýza odhalila přítomnost okolo 5 % vícejaderných buněk (Obr. 9).



Obr. 9 – Ukázka histogramu fluorescenční intenzity propidium jodidu (kanál PE-A) v buňkách linie UHKT-944. Buňky byly obarveny postupem používaným pro analýzu buněčného cyklu a analyzovány na průtokovém cytometru BD FACS Fortessa. Vedle nejvíce zastoupené populace mononukleárních buněk v G1/G0 fázi je patrná populace s dvojnásobkem obsahu DNA (tj. mitotických buněk s normálním obsahem DNA nebo dvoujaderných buněk v G1/G0 fázi) a vícejaderné buňky.

4.5 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. Pro detailnější charakterizaci a odlišení normálních plazmatických buněk od nádorových monoklonálních buněk jsme analyzovali další povrchové markery uvedené v tabulce 3, kde je také uvedeno srovnání s ostatními myelomovými a plazmocelulárními liniemi. Analýzou byla také zjištěna přítomnost cytoplazmatického monoklonálního lehkého řetězce imunoglobulinu kappa.

Tab. 3 – Expresse povrchových znaků linie UHKT-944 a ostatních buněčných linií odvozených od maligních plazmatických buněk.

Povrchové znaky / diferenční skupina	UHKT-944 Expresse*	Ostatní buněčné linie					
		PCL		MM		Plazmocytom	
		Pozitivita**	n	Pozitivita	n	Pozitivita	n
<u>Povrchové znaky plazmatických buněk</u>							
CD 138	+++	82%	11	82%	28	100%	1
<u>Povrchové znaky T-/NK buněk</u>							
CD1a	+	50%	2	0%	2		0
CD3	-	0%	11	0%	37	0%	2
CD4	-	0%	5	7%	27	50%	2
CD5	-	0%	9	3%	35	0%	2
CD8	-	0%	5	0%	24	0%	2
CD28	++	67%	3	91%	23		0
<u>Povrchové znaky B-buněk</u>							
CD9	+	0%	3	46%	13		0
CD10	-	7%	15	22%	46	33%	3
CD19	-	6%	18	10%	51	0%	3
CD20	-	12%	17	13%	47	0%	3
CD21	-	25%	8	14%	29	0%	1
CD24	-	20%	5	5%	20		0
<u>Ostatní povrchové znaky</u>							
CD34	-	0%	4	0%	15	0%	1
CD38	++	83%	18	82%	50	100%	3
CD45	+	43%	7	40%	20		0
CD56	+	70%	10	41%	41	100%	1
CD85k	+++		0		0		0
CD98	+++		0		0		0
HLA-DR	+	23%	13	36%	44	67%	3
CD13	-	0%	9	0%	31	0%	2
CD15	-	0%	5	0%	20		0
CD33	++	13%	8	21%	19	0%	2
CDW65	-	0%	1	0%	7		0
<u>Cytokinové/ostatní receptory</u>							
CD25	-	0%	5	7%	27		0
CD89	-		0		0		0
CD95	-	0%	1	67%	6		0
CD105	-		0	100%	4		0
CD117	-	50%	2	0%	5		0
CD123	+++		0	0%	1		0
CD184	++		0		0		0

* Expresse CD znaku je vyhodnocena jako negativní (-), slabě pozitivní (+), pozitivní (++) a silně pozitivní (+++).

** Procentuální zastoupení buněčných linií pozitivních na daný povrchový znak z celkového počtu testovaných linií (n).

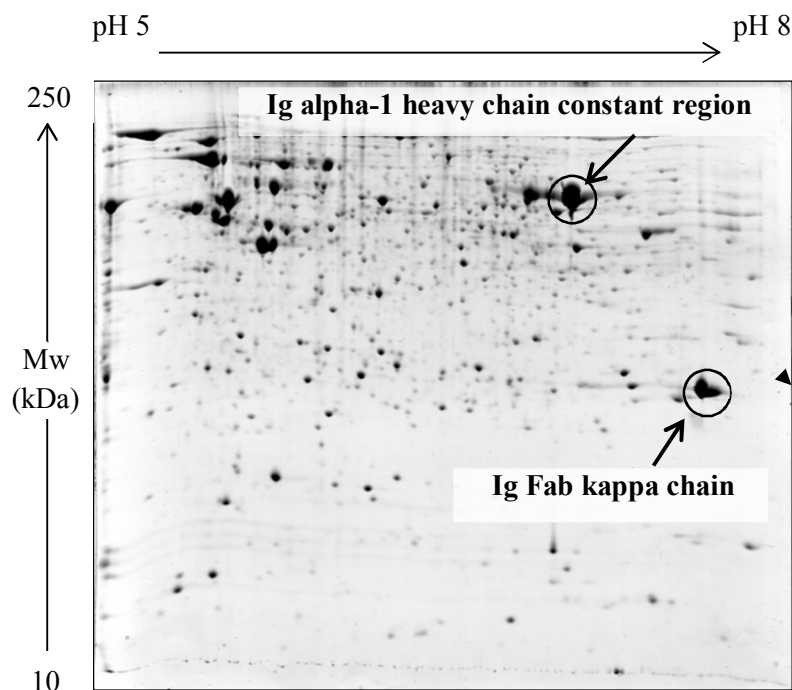
4.6 DETEKCE A ANALÝZA IMUNOGLOBULINŮ

Analýzou jsme zjistili, že buňky UHKT-944 produkují IgA1-kappa, ale nedochází k sekreci volného imunoglobulinového lehkého řetězce kappa.

Nefelometrie odhalila přítomnost IgA. V kontrolním médiu byla stanovena koncentrace IgG (<9,26 mg/l), IgA (<0,25 mg/l) a IgM (<0,3 mg/l). Koncentrace volných lehkých řetězců se nacházela pod limitem detekce. V kondiciovaném médiu bylo zjištěno <9,26 mg/l IgG, 10,5 mg/l IgA, <0,3 mg/l IgM, <0,38 mg/l volného lehkého řetězce kappa a <0,5 mg/l volného řetězce lambda.

Lehký řetězec kappa byl však detekován v cytoplazmě buněk UHKT-944 pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 3.2.4).

Jeden z vybraných proteinových spotů z gelů 2-D elektroforézy (Obr. 10) byl identifikován jako těžké řetězce lidských imunoglobulinů podtřídy IgA1. Na základě porovnání hmotnostních spekter v databázi byl druhý spot identifikován jako 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.



Obr. 10 – Proteinová mapa linie UHKT-944 získaná 2-D elektroforézou. Označené proteinové spoty byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) a identifikovány jako těžký řetězec lidského imunoglobulinu podtřídy IgA1 a lidský lehký řetězec kappa.

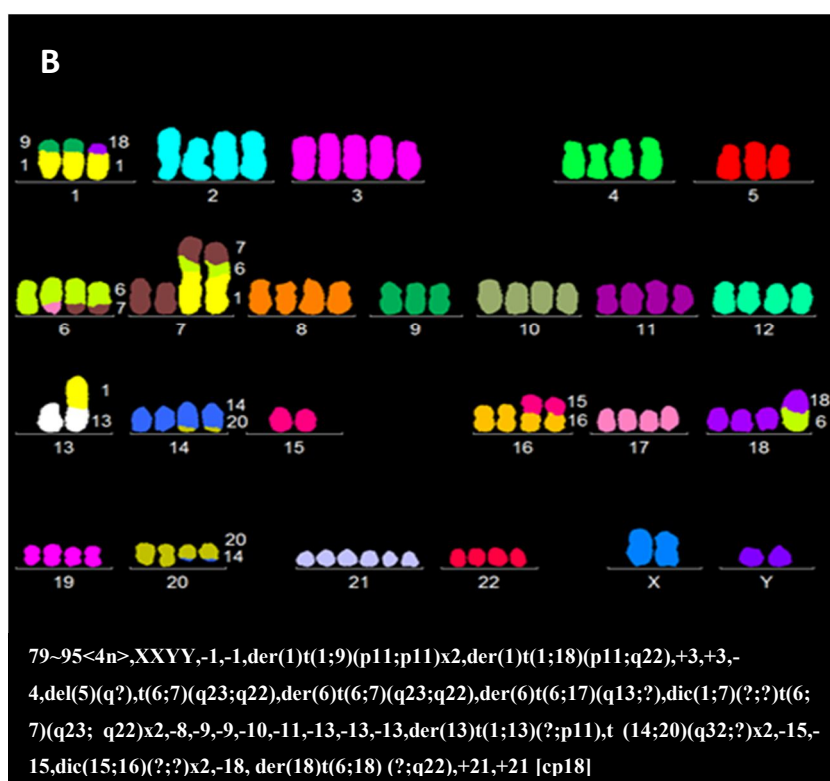
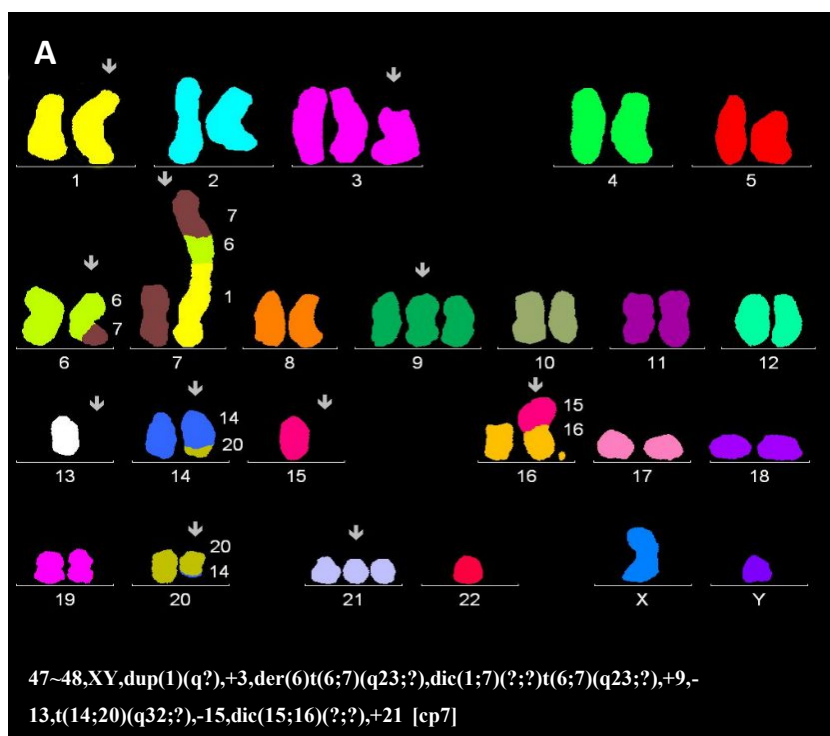
V buňkách UHKT-944 kultivovaných po dobu 9 měsíců byla prokázána přítomnost somatické hypermutace ve variabilní oblasti těžkého řetězce imunoglobulinového genu (IgVH). Byla detekována klonální přestavba VH3-9, která vykazovala 91% homologii se zárodečnou linií.

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 CYTOGENETICKÁ ANALÝZA

Pomocí techniky mFISH a klasické cytogenetické analýzy byla u linie UHKT-944 prokázána přítomnost téměř tetraploidního karyotypu s výskytem více než 75 chromozomů. Bylo zjištěno několik numerických a strukturních aberací typických pro MM a PCL včetně translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinů v oblasti 14q32. Karyotyp buněk UHKT-944 kultivovaných 9 měsíců a karyotyp pacienta č. 944 v době stanovení diagnózy je zobrazen na obrázku 11. Přítomnost identických chromozomálních aberací je nesporným důkazem toho, že linie UHKT-944 byla skutečně odvozena od výše uvedeného pacienta.



Obr. 11 – Karyotyp získaný z mitózy buňky kostní dřeně pacienta a linie UHKT-944. Karyotyp pacienta v době stanovení diagnózy (A) a linie UHKT-944 kultivované po dobu 9 měsíců (B) s početními a strukturními změnami identifikovanými metodou mFISH.

4.9 CHARAKTERIZACE BUNĚČNÉ LINIE UHKT-893

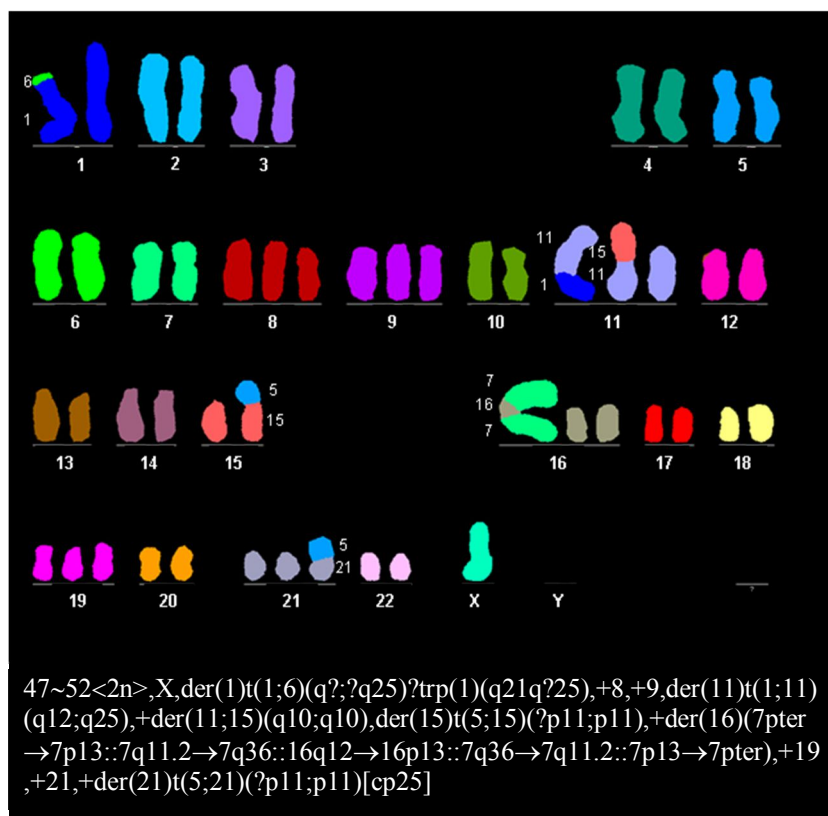
Buněčná linie UHKT-893 odvozená od pacientky s MM byla ustavena v naší laboratoři v roce 2010 a charakterizována v diplomové práci Mgr. Ireny Vančurové [116]. Níže jsou uvedeny výsledky analýz, které byly provedeny dodatečně.

4.9.1 Stanovení mutačního stavu IgVH genů

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 detekována klonální přestavba VH4-39, která vykazovala 87,8% homologii se zárodečnou linií.

4.9.2 Cytogenetická analýza

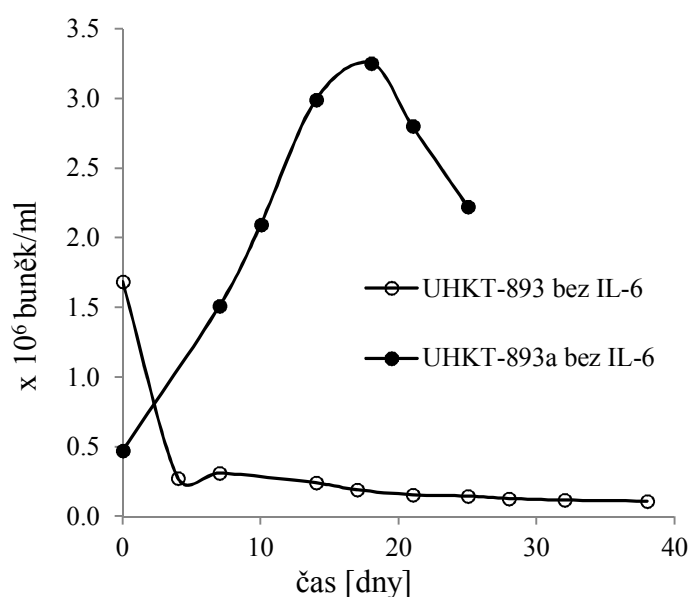
U linie UHKT-893 byl pomocí mFISH a klasické cytogenetické analýzy zjištěn hyperdiploidní karyotyp s výskytem 47-52 chromozomů (Obr. 12).



Obr. 12 – Karyotyp získaný z mitózy buňky linie UHKT-893. Karyotyp buněčné linie UHKT-893 kultivované po dobu 18 měsíců se strukturními a početními změnami identifikovanými metodou mFISH.

4.9.3 Ustavení linie UHKT-893 nezávislé na IL-6

Buňky ($0,5 \times 10^6$ buněk/ml) linie UHKT-893 byly v průběhu 14. měsíce od založení kultury (založeno 16. 2. 2010) přeneseny do Erlenmeyerovy baňky a kultivovány v médiu, kde byla postupně snižována koncentrace IL-6 [116]. Po šesti měsících kultivace, kdy byly buňky postupně adaptovány na nižší koncentraci IL-6, se podařilo ustavit linii UHKT-893, která je zcela nezávislá na IL-6. Tato sublinie byla pojmenována UHKT-893a (Obr. 13). Zjistili jsme, že pro optimální růstové podmínky je nutné udržovat hustotu buněk UHKT-893a pod 3×10^6 buněk/ml. Doba zdvojení počtu buněk byla spočítána na 4,2 až 5,4 dnů.



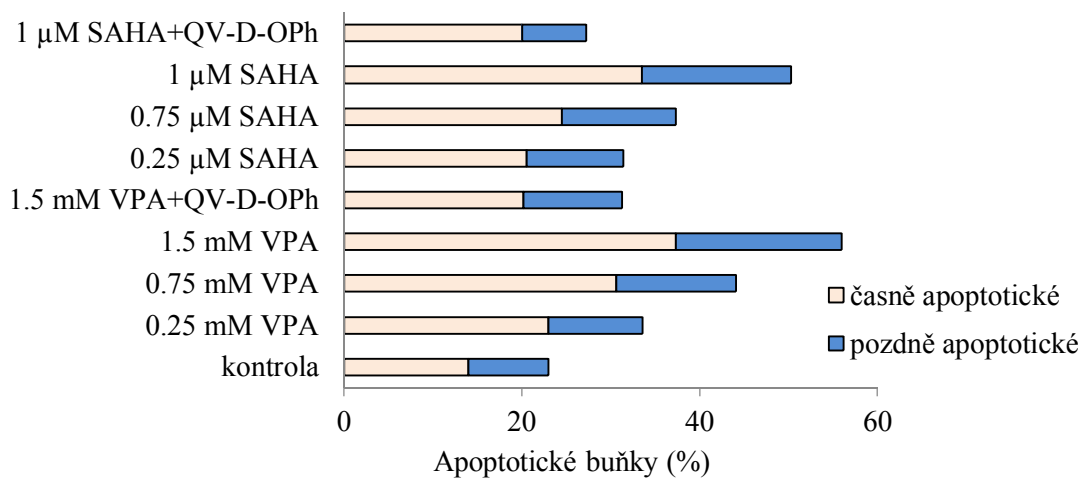
Obr. 13 – Kultivace buněk linie UHKT-893 a sublinie UHKT-893a bez přítomnosti IL-6. Graf znázorňující růst buněk linie UHKT-893, která je stále závislá na IL-6 a sublinie UHKT-893a rostoucí bez IL-6, která byla ustavena postupným snižováním koncentrace IL-6 v kultivačním médiu po dobu šesti měsíců.

4.10 VLIV SAHA A VPA NA INDUKCI APOPTÓZY LINIE UHKT-944

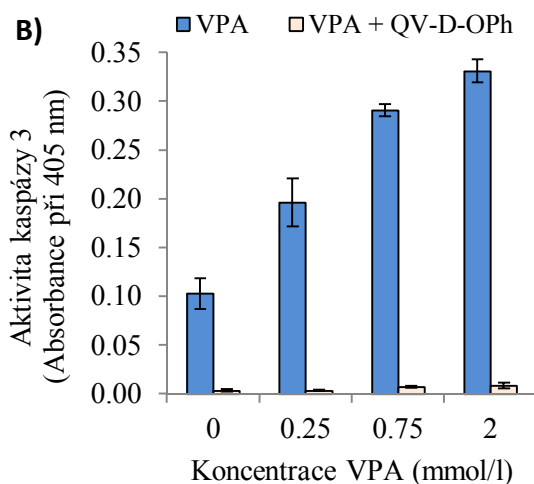
Pro detekci buněk v rané fázi apoptózy a k odlišení apoptotických buněk od nekrotických byly buňky označeny Annexinem-V a propidium jodidem a analyzovány na průtokovém cytometru. Působením obou inhibitorů docházelo k translokaci fosfatidylserinu na vnější stranu cytoplazmatické membrány a ke zvýšení 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 (Obr. 14A). Zjistili jsme, že SAHA i VPA byly schopny navodit apoptózu prostřednictvím aktivace efektorové kaspázy-3 (Obr. 14B,C).

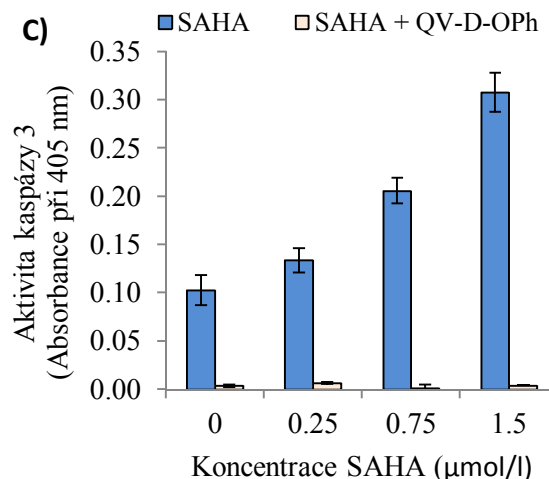
A)



B)



C)

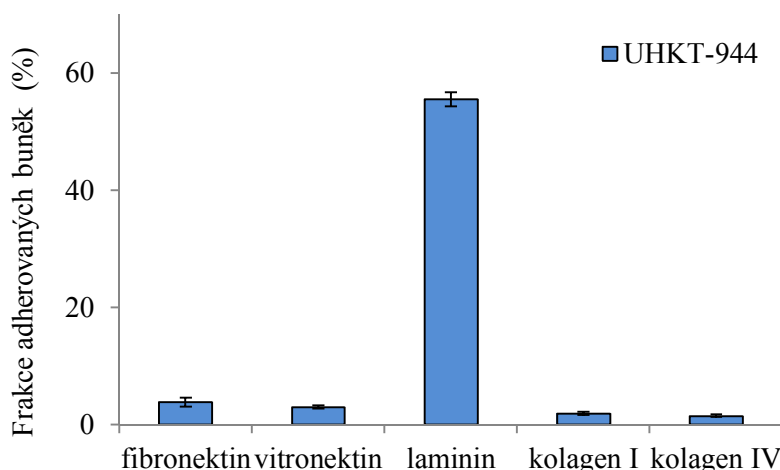


Obr. 14 – Indukce apoptózy u linie UHKT-944 působením SAHA a VPA. Reprezentativní graf ukazující vliv SAHA a VPA na indukci apoptózy u linie UHKT-944 (A). Apoptóza byla měřena pomocí průtokové cytometrie za použití Annexinu V a propidium jodidu. Vliv VPA (B) a SAHA (C) na aktivitu kaspázy 3, která byla měřena za použití Caspase-3/ CPP32 colorimetric assay kit. Buňky byly ošetřeny SAHA a VPA a inkubovány v přítomnosti/nepřítomnosti 10 μM inhibitoru kaspáz QV-D-Oph po dobu 24 hodin. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.

4.11 VLIV MIKROPROSTŘEDÍ KOSTNÍ DŘENĚ NA ANTIPROLIFERAČNÍ ÚČINEK SAHA A VPA

Abychom zjistili, zda je mikroprostředí kostní dřeně schopno ochránit buňky linie UHKT-944 před působením SAHA a VPA, simulovali jsme toto mikroprostředí prostřednictvím komerčně dostupného roztoku, který obsahuje složky ECM, stromálními buňkami získanými kultivací kostní dřeně pacientů s MM a dále různými koncentracemi IL-6. Cytotoxický účinek inhibitorů byl měřen metodou AlamarBlue. Oba inhibitory byly při dané koncentraci schopny inhibovat proliferaci, která klesala jak se zvyšující se koncentrací inhibitorů, tak také s dobou jejich působení (Obr. 16A,B).

Zjistili jsme, že přítomnost složek ECM neovlivňovala cytotoxický účinek SAHA a VPA a tudíž mikroprostředí, které bylo simulováno proteiny ECM, nemá ochranné účinky na buňky UHKT-944 (Obr. 16B). Ochranné působení ECM je dáno především schopností buněk vázat se k jeho proteinům. Z tohoto důvodu jsme chtěli ověřit schopnost linie UHKT-944 adherovat ke konkrétním složkám ECM, ale také k samotnému MaxGel, kde je dle výrobce zastoupena většina složek ECM tj. všechny typy kolagenů, laminin, fibronektin, tenascin, elastin, proteoglykany a glykosaminglykany. V případě použití Millicoat 96-well ECM Screening Kit byla zjištěna u linie UHKT-944 výraznější schopnost vázat se k lamininu (Obr. 15).

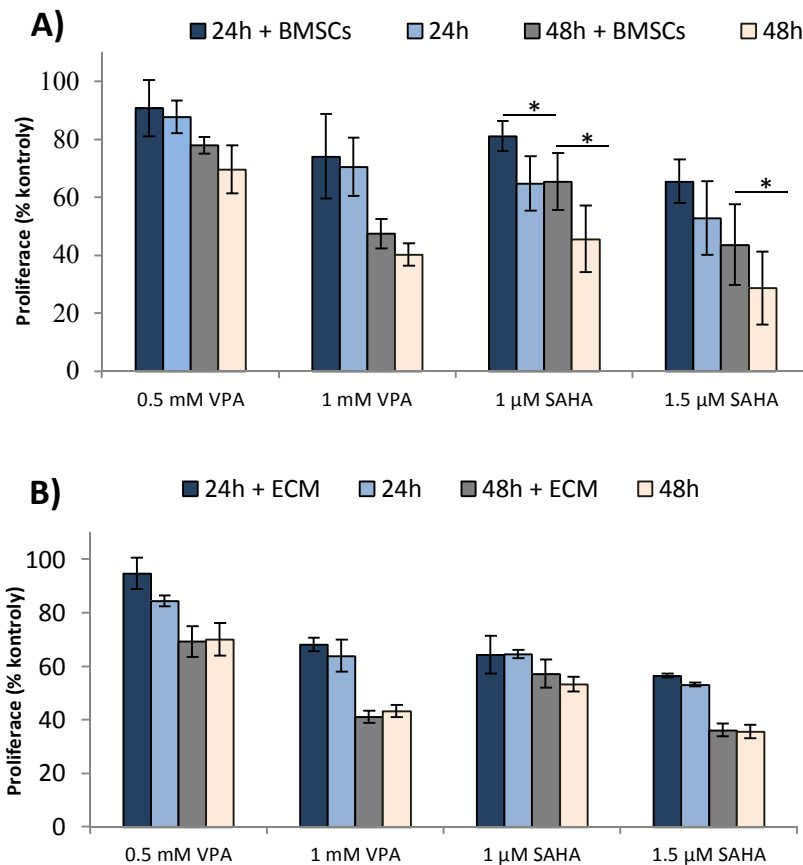


Obr. 15 – Adhezivita buněk linie UHKT-944 ke složkám ECM. K ověření schopnosti buněk linie UHKT-944 adherovat k základním složkám ECM byl použit Millicoat 96-well ECM Screening Kit. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota \pm směrodatná odchylka ze tří experimentů.

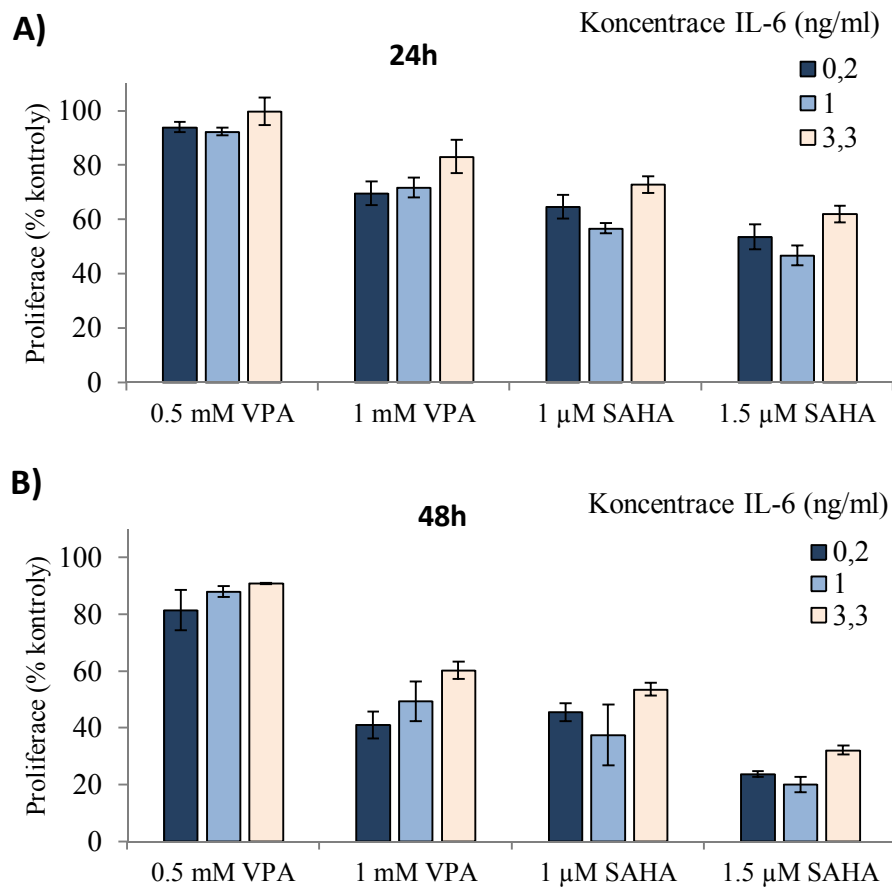
U destiček pokrytých MaxGel bylo zjištěno pouze $10,5 \pm 0,9$ % navázaných buněk. U buněčné linie HEL, která sloužila jako pozitivní kontrola, se navázalo 70 % buněk, čímž jsme ověřili správné pokrytí destičky MaxGel. Výsledky tedy poukazují na velmi nízkou schopnost linie UHKT-944 vázat se k těmto složkám.

Rozdíly v proliferaci byly detekovány mezi myelomovými buňkami kultivovanými s BMSCs a bez stromálních buněk a to v případě ošetření SAHA (Obr. 16A). Je zřejmé, že mikroprostředí kostní dřeně simulované stromálními buňkami má částečný ochranný účinek proti působení SAHA. Zajímalo nás, zda není tento efekt způsoben pouze zvýšenou koncentrací IL-6, který je produkován stromálními buňkami, a z tohoto důvodu byly buňky UHKT-944 kultivovány s různými koncentracemi IL-6, které odpovídaly koncentraci zjištěné v kultivačním médiu, která byla použita jako kontrola (0,2 ng/ml), koncentraci, která byla měřena po 3 dnech inkubace buněk UHKT-944 s BMSCs (1 ng/ml) a dále pak koncentraci, jež odpovídala zhruba patnáctinásobku koncentrace v kontrolním kultivačním médiu (3,3 ng/ml). Buňky byly poté ošetřeny SAHA a VPA a proliferace byla měřena po 24 (Obr. 17A) a 48 hodinách (Obr. 17B) inkubace metodou AlamarBlue. Naše data ukazují, že koncentrace IL-6 odpovídající 1 ng/ml neměla žádný vliv, v případě vyšší koncentrace IL-6 (3,3 ng/ml) došlo k mírnému snížení antiproliferačního účinku obou inhibitorů. Rozdíly však nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné (Obr. 17A,B).

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 pomocí elektrochemiluminiscence odpovídala 0,2 ng/ml. Koncentrace byla měřena opakovaně vždy v čerstvě připraveném médiu se shodným výsledkem.



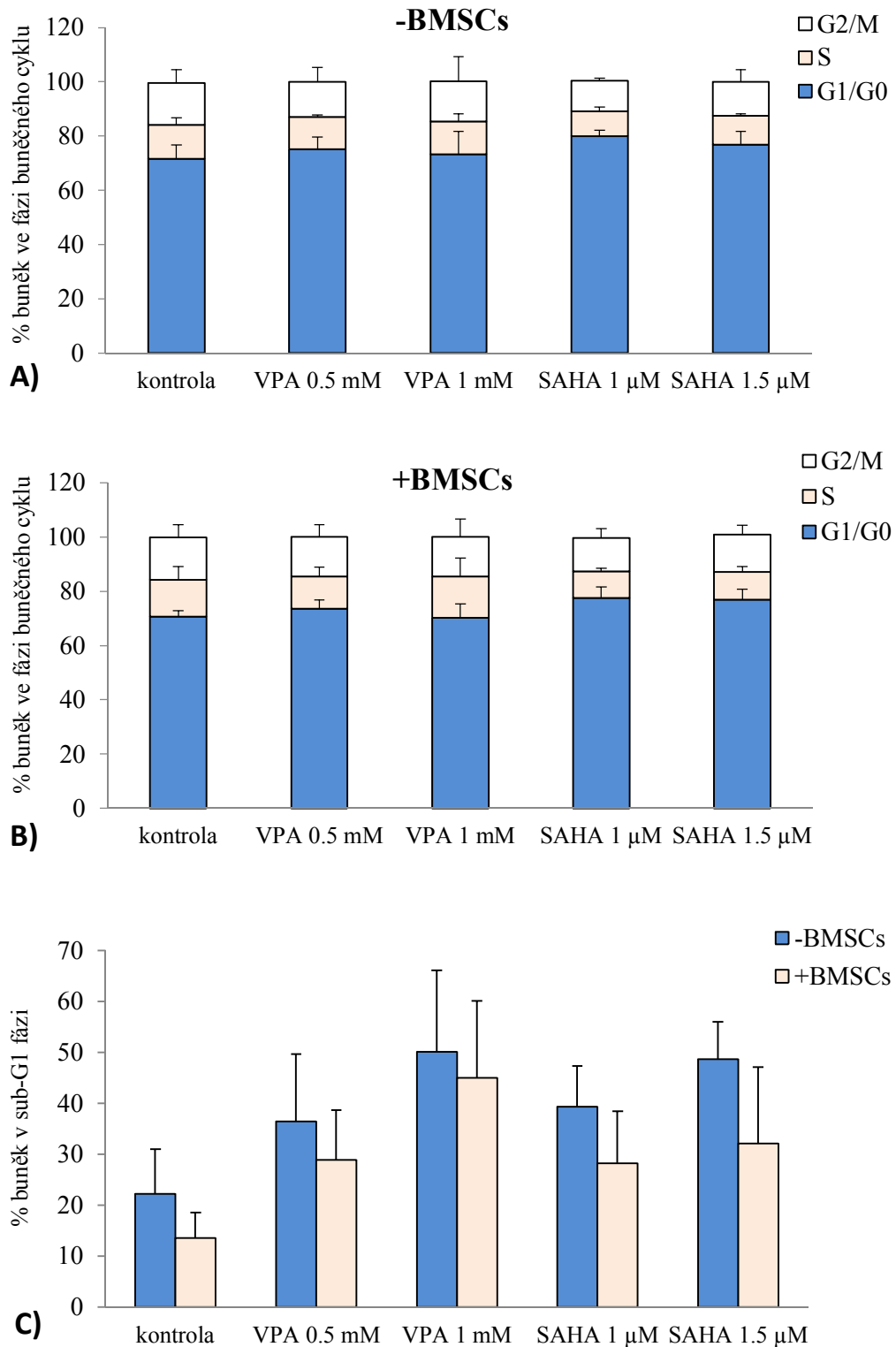
Obr. 16 – Inhibice buněčné proliferace působením SAHA a VPA. Buňky linie UHKT-944 byly kultivovány v nepřítomnosti či přítomnosti BMSCs (A) a složek ECM (B). Buňky byly ošetřeny SAHA a VPA a inkubovány po dobu 24 a 48 hodin. Proliferace byla měřena metodou AlamarBlue. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota \pm směrodatná odchylka ze šesti (A) a tří (B) nezávislých experimentů. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. * $P < 0,05$.



Obr. 17 – Inhibice buněčné proliferace působením SAHA a VPA. Buňky linie UHKT-944 byly kultivovány v přítomnosti různých koncentrací IL-6. Buňky byly ošetřeny SAHA a VPA a inkubovány po dobu 24 (A) a 48 hodin (B). Proliferace byla měřena metodou AlamarBlue. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly.

4.12 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 (Obr. 18A). Rozdíly v distribuci jednotlivých fází buněčného cyklu nebyly detekovány ani mezi buňkami kultivovanými v přítomnosti BMSCs a buňkami samotnými (Obr. 18A,B). 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 (Obr. 18C). 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. U buněk ošetřených 1 μM SAHA a kultivovaných v přítomnosti BMSCs bylo detekováno 28.3 ± 10.1 % buněk v sub-G1 fázi, v případě bez BMSCs bylo zjištěno 39.4 ± 7.9 % apoptotických buněk. U buněk ošetřených 1,5 μM SAHA pak bylo detekováno v přítomnosti BMSCs 32.1 ± 14.9 apoptotických buněk a 50.3 ± 7.1 apoptotických buněk, kultivovaných bez BMSCs. Rozdíly však nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné.

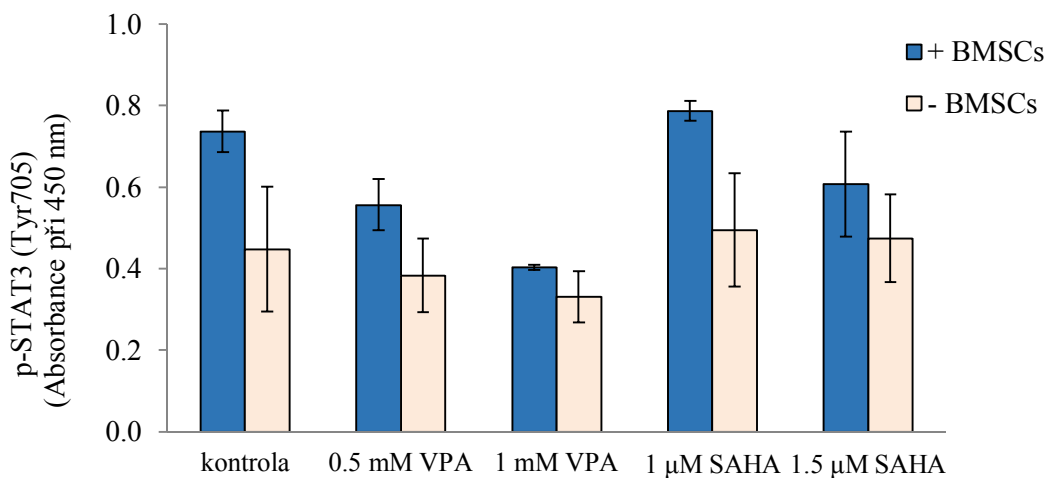


Obr. 18 – Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Buňky linie UHKT-944 byly kultivovány v nepřítomnosti BMSCs (A) či přítomnosti BMSCs (B), ošetřeny SAHA a VPA a inkubovány po dobu 48 hodin. Buňky byly barveny propidium jodidem a analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v rozložení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu kromě tzv. sub-G1 fáze, která představuje buňky v pozdní fázi apoptózy (C). Hodnoty jsou udány jako střední hodnota \pm směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.

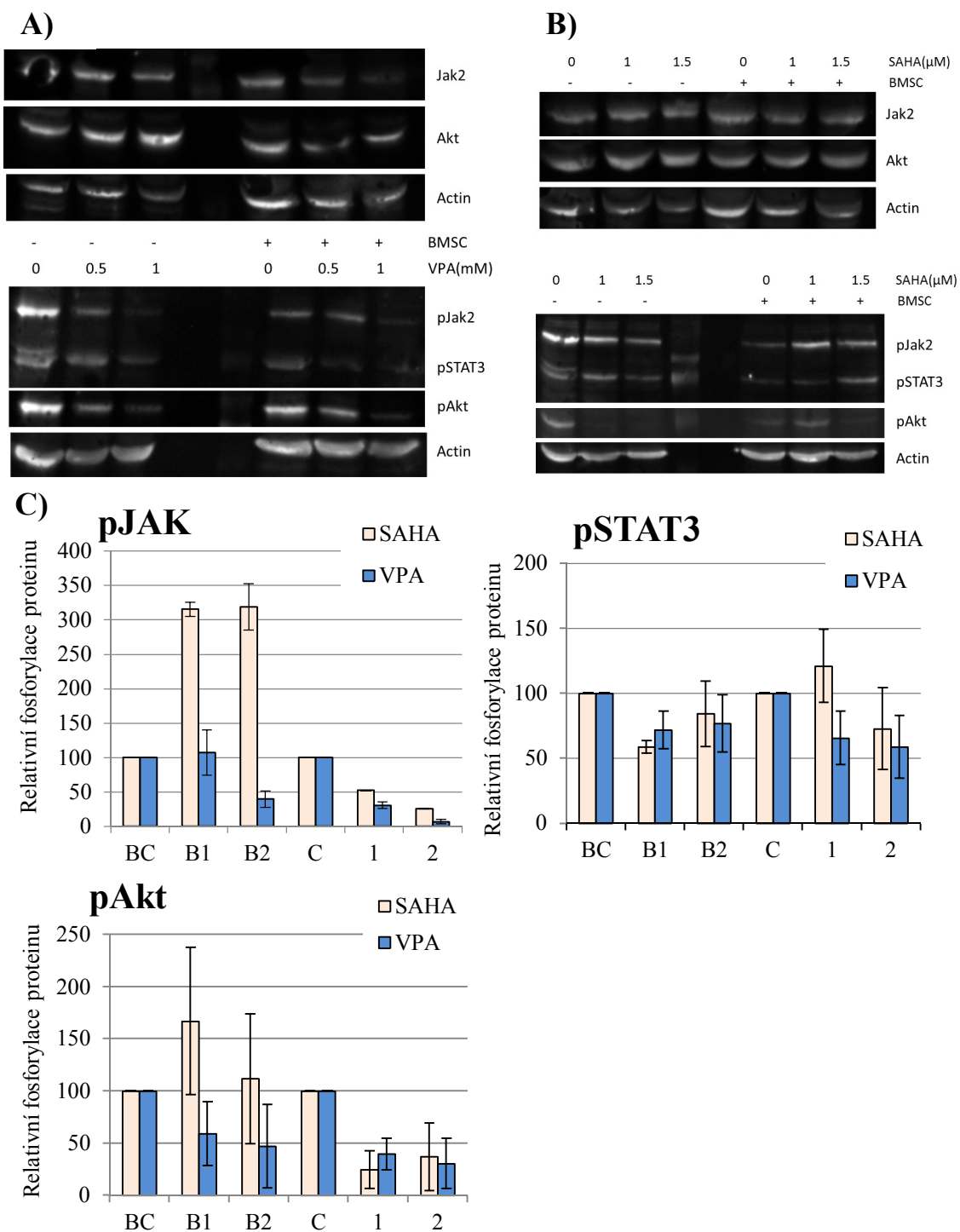
4.13 OVLIVNĚNÍ SIGNÁLNÍCH DRAH JAK/STAT A PI3K/AKT PŮSOBENÍM SAHA A VPA

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.

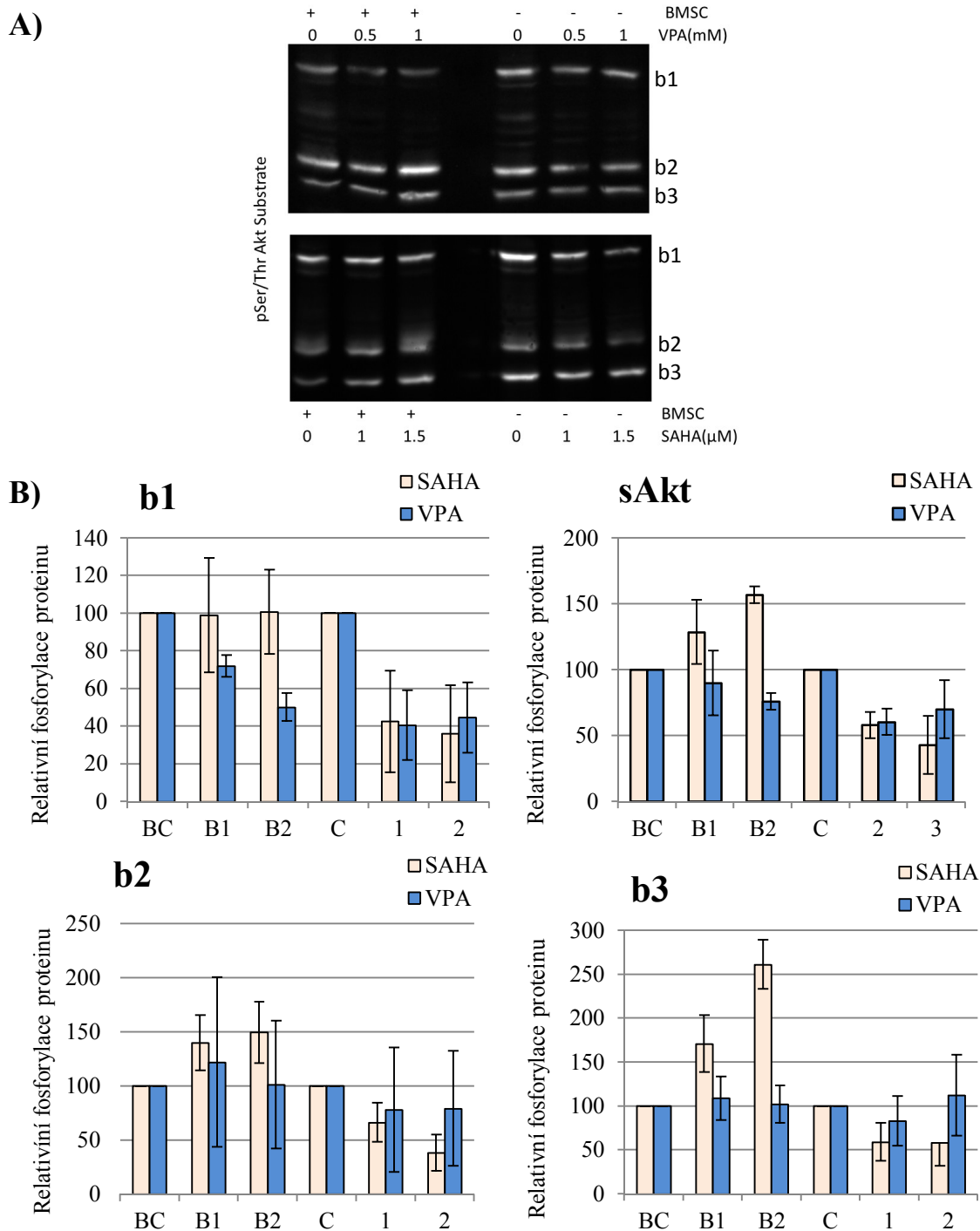
Působením VPA došlo ke snížení fosforylace STAT3, jak ukazují výsledky analýzy pomocí ELISA (Obr. 19). Překvapivě byla fosforylace STAT3 snížena i v případě kokultivace buněk s BMSCs bez ošetření VPA. Výsledky byly také potvrzeny Western blotem, kde byla testována míra fosforylace STAT3 a JAK2 (Obr. 20). Působením VPA došlo ke snížení fosforylace obou testovaných proteinů. Působením obou inhibitorů došlo také ke snížení fosforylace Akt (Obr. 20). 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 (Obr. 21).



Obr. 19 – Vliv VPA a SAHA na fosforylaci proteinu STAT3. Buňky byly kultivovány v přítomnosti/nepřítomnosti BMSCs, ošetřeny SAHA a VPA a inkubovány po dobu 48 hodin. Míra fosforylace proteinu STAT3 (Tyr705) byla měřena pomocí ELISA kitu PathScan® Phospho-Stat3 (Tyr705) Sandwich ELISA kit. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 20 – Vliv SAHA a VPA na aktivitu signálních drah JAK/STAT a PI3K/Akt. Aktivita signálních drah byla testována prostřednictvím míry fosforylace proteinů JAK2 (Tyr1008), STAT3 (Tyr705) a Akt (Ser473) u buněk linie UHKT-944 kultivovaných v přítomnosti/nepřítomnosti BMSCs. Buňky byly inkubovány po dobu 48 hodin a následně byla provedena Western blot analýza. Reprezentativní Western bloty testovaných proteinů linie UHKT-944 po působení VPA (A) a SAHA (B) a jejich grafické znázornění (C). Hodnoty jsou udány jako střední hodnota ± směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů. C/1/2 - kontrola/nízká koncentrace inhibitoru/vyšší koncentrace inhibitoru, BC/B1/B2 - kontrola/nízká koncentrace inhibitoru/vyšší koncentrace inhibitoru v přítomnosti BMSCs. Hladiny exprese proteinů byly normalizovány vůči hladině exprese β -aktinu (Actin), který byl použit jako kontrola nanášení vzorků.



Obr. 21 – Změny ve fosforylaci substrátů Akt po působení SAHA a VPA. Reprezentativní Western blot ukazující změny fosforylace substrátů Akt (b1,b2,b3) (A) a jejich grafické znázornění včetně celkového profilu (sAkt) (B) u buněk linie UHKT-944 kultivovaných v přítomnosti/nepřítomnosti BMSCs. Buňky byly inkubovány po dobu 48 hodin a následně byla provedena Western blot analýza. Hodnoty jsou udány jako střední hodnota \pm směrodatná odchylka ze tří nezávislých experimentů. C/1/2 - kontrola/nízká koncentrace inhibitoru/vyšší koncentrace inhibitoru, BC/B1/B2 - kontrola/nízká koncentrace inhibitoru/vyšší koncentrace inhibitoru v přítomnosti BMSCs. Hladiny exprese proteinů byly normalizovány vůči hladině exprese β -aktinu, který byl použit jako kontrola nanášení vzorků.

5 DISKUZE

Ustavení permanentní buněčné linie je stále náhodnou a vzácnou událostí. Přesto se nám podařilo ustavit dvě hematopoetické buněčné linie závislé na IL-6 a později také sublinii nezávislou na tomto cytokinu. Tato práce byla zaměřena především na ustavení a charakterizaci plazmocelulární linie UHKT-944, zároveň byly provedeny další analýzy, které přispěly k detailnějšímu popisu myelomové linie UHKT-893 ustavené a zčásti charakterizované v rámci diplomové práce Mgr. Ireny Vančurové.

Proliferace a přežívání myelomových buněk v závislosti na přítomnosti IL-6 byla poprvé popsána Kawanem a spol. [117]. Většina ustavených linií odvozených od maligních plazmatických buněk je závislá na IL-6 [102] včetně linie UHKT-944. Některé linie vyžadují kromě IL-6 i přítomnost dalších faktorů jako je například fibronectin [118].

Podle exprese znaků CD138 a CD38 na povrchu buněk UHKT-944 jsme prokázali plazmatické buňky. Aberantní exprese kostimulačního receptoru T-lymfocytů 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 [119].

Pro maligní plazmatické buňky pacientů s MM je typická zvýšená exprese CD56 [120]. 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. [121]. Autor také naznačuje, že absence či slabá exprese CD28 je charakteristická pro pacienty s primární PCL a pacienty s MM, naopak zvýšená exprese CD28 byla detekována u většiny pacientů se sekundární PCL. Na základě těchto dat by molekula CD28 mohla sloužit pro odlišení primární PCL od sekundární PCL. Povrchový antigen CD19 vyskytující se na B buňkách nebyl u pacientů s PCL detekován, což je také v souladu s našimi výsledky. Absence CD19 je charakteristická pro primární myelomové buňky i myelomové buněčné studie jak dokazuje ve své studii Bataille a spol. [29]. Zvýšená exprese molekul CD33, CD98 a absence či nízká exprese CD56 a CD117 jsou spojovány se špatnou prognózou [122-125]. Stejně imunofenotypizační znaky byly detekovány u buněk UHKT-944. Endoglin (CD105), který se uplatňuje při angiogenezi, buněčné adhezi a migraci, tzn. procesech, které vedou k expanzi a přežívání nádorových buněk [126], nebyl na buňkách UHKT-944 detekován. Absence exprese CD105, který byl doposud detekován na všech testovaných myelomových liniích, je však u linie UHKT-944

překvapivá [102]. 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 inhibičního receptoru z imunoglobulinové skupiny CD85k a podjednotky receptoru pro IL-3 CD123. Přítomnost těchto molekul u linie UHKT-944 je zajímavá, neboť CD85k se nachází na povrchu dendritických buněk, monocytů a makrofágů [127] a CD123 je silně exprimována pouze u plazmacytoidních dendritických buněk a bazofilních granulocytů [128]. Sano a spol. [129] ve své práci zmiňuje případ akutní myeloidní leukemie napodobující leukemii z časných plazmacytoidních dendritických buněk, která byla pacientovi nesprávně diagnostikována na základě zvýšené exprese CD4, CD56, a CD123. Transmembránový protein CD98 (LAT1) hraje významnou roli při vzniku nádorů a je u většiny nádorů silně exprimován. Silná pozitivita CD98 byla také detekována u linie UHKT-944. Zvýšená exprese LAT1 je spojována se špatnou prognózou pacientů s diagnostikovaným MM a odpovídá krátké době přežití pacienta č. 944 [123]. Chemokinový receptor 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 akumulací myelomových buněk v kostní dřeni [130]. 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.

Analýzou jsme zjistili, že buňky UHKT-944 produkují IgA1 a lehký řetězec kappa a výsledky tak souhlasí s nálezem IgA v séru pacienta a lehkého řetězce kappa v pacientově moči. Na základě nefelometrické analýzy kondiciovaného média nebyla u linie UHKT-944 detekována sekrece volného lehkého řetězce. Lehké řetězce, které jsou syntetizovány, ale nedochází k jejich sekreci, byly zjištěny i u jiných myelomových buněk [131]. Vybraný proteinový spot na 2-D elektroforéze, který byl analyzován na hmotnostním spektrometru, byl identifikován jako lehký řetězec kappa se specificitou vůči HBsAg. Přestože zjištěná data poukazují pouze na podobnost a zjištění specificity bylo nepravděpodobné, chtěli jsme si tuto skutečnost ověřit. Dle našich předpokladů byly výsledky analýz negativní a výsledná data je tedy nutné interpretovat jako lehký řetězec kappa.

U linie UHKT-944 byly cytogenetickou analýzou zjištěny četné strukturní a numerické aberace. Nejčastějšími strukturními aberacemi MM a PCL jsou chromozomové translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu. Výskyt těchto translokací

je často spojován s progresí onemocnění [132-134]. Translokace t(14;20), která byla zjištěna u linie UHKT-944 a také jiných MM a PCL linií, je spojována s horší prognózou a odpovídá pacientově krátké době přežití [135,136]. 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. Translokace IgH genu v oblasti 14q32 a ztráta chromozomu 13 patří mezi nejčastější a prognosticky nejvýznamnější cytogenetické nálezy u pacientů s MM. Zároveň je chromozom 13 nejvíce zastoupeným chybějícím chromozomem mezi buněčnými liniemi odvozenými od plazmatických buněk [18,137]. Některé chybějící nebo naopak nadpočetné chromozomy zjištěné u linie UHKT-944 lze také nalézt u plazmocelulárních, myelomových buněčných linií a linií odvozených od plazmocyтому. Translokace t(1;9), t(1;18), t(6;18), t(15;16) a delece del(5) zjištěné u linie UHKT-944 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 [138]. Zdá se, že ostatní strukturní aberace zjištěné u linie UHKT-944 nebyly dosud u buněčných linií odvozených od plazmatických buněk popsány [102,118]. U linie UHKT-893 byl cytogenetickou analýzou zjištěn hyperdiploidní karyotyp, pro který je typický nižší výskyt translokací IgH genu. Další chromozomální aberací, kterou můžeme nalézt častěji u hyperdiploidního typu myelomu je zmnožení chromozomu 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 [139], což také odpovídá nálezu trisomie 9, 19 a 21 u linie UHKT-893. Trisomie 9 a 19 jsou spojovány s lepší prognózou [19]. 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 [140]. Většina strukturních aberací zjištěných u linie UHKT-893 nebyla dosud popsána a jejich prognostický význam není znám.

Analýza přestaveb imunoglobulinových genů je významným diagnostickým a prognostickým parametrem u hematopoetických malignit a poskytuje důkaz o monoklonální proliferaci nádorových buněk [141,142]. V buňkách UHKT-944 kultivovaných 9 měsíců byla detekována klonální přestavba VH3-9, která vykazovala 91% homologii se zárodečnou linií. V buňkách UHKT-893 kultivovaných po dobu 4 a 7 měsíců byla zjištěna klonální přestavba VH4-39, která vykazovala 87,8% homologii se

zárodečnou linií. Výsledky tedy potvrzují klonální původ obou linií a přítomnost somatické hypermutace, které vznikají při fyziologickém vývoji B-lymfocytů.

Mikroprostředí kostní dřeně hraje velkou roli v patogenezi MM a PCL a v rezistenci k léčbě. Zavedení nových léků jako jsou imunomodulační látky a inhibitory proteasomu do léčebných režimů zlepšilo celkový stav pacientů a prodloužilo dobu přežití, avšak u řady z těchto léků vznikne v průběhu léčby rezistence. MM a PCL jsou stále považovány za nevyléčitelná onemocnění a je tedy nutné nadále vyvíjet a testovat nové léky, které by byly především schopny překonat vliv mikroprostředí kostní dřeně.

Z tohoto důvodu jsme testovali účinek vybraných HDAC inhibitorů SAHA a VPA, u nichž byla prokázána schopnost indukovat apoptózu, diferenciaci a inhibovat buněčnou proliferaci u různých typů malignit včetně MM [143-145]. Zjistili jsme, že SAHA i VPA jsou schopny u plazmocelulární linie UHKT-944 indukovat apoptózu, při které dochází k aktivaci kaspázy-3 a inhibovat buněčnou proliferaci. Inhibicí kaspáz pomocí inhibitoru Q-VD-OPh došlo po ošetření linie UHKT-944 SAHA a VPA ke snížení počtu buněk jak v časně tak také pozdní fázi apoptózy a je tedy zřejmé, že apoptóza indukovaná těmito inhibitory je závislá na kaspázách. Jak uvádí některé studie, kaspázy nemusejí být vždy aktivované při programované buněčné smrti. Mitsiades a spol. [146] ve své práci zjistil, že SAHA je schopna indukovat apoptózu u myelomové linie MM.1S bez aktivace kaspázy-3, -8 a -9. Apoptóza byla spuštěna i v případě inhibice kaspáz působením inhibitoru kaspáz ZVAD-FMK což dokazuje existenci apoptotické dráhy nezávislé na kaspázách [147]. 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 [98,101,148].

MM a PCL patří mezi hematologické malignity, které jsou často zmiňované v souvislosti s mikroprostředím kostní dřeně. Důvodem je interakce myelomových buněk se stromálními buňkami kostní dřeně a mimobuněčnou hmotou, která má za následek jejich zvýšenou proliferaci a přežívání. Z tohoto důvodu jsme se v práci zaměřili na studium vlivu vybraných HDACi v přítomnosti mikroprostředí kostní dřeně. Snížení antiproliferačního a antiapoptotického účinku léčiv vlivem interakcí stromálních buněk kostní dřeně s myelomovými buňkami bylo popsáno v několika studiích [58,59,61]. To je v souladu i s našimi výsledky, kdy jsme zjistili, že stromální buňky vzniklé kultivací kostní dřeně pacientů s MM jsou schopny částečně snižovat antiproliferační účinek SAHA. Dalším příkladem je snížení citlivosti myelomových buněk k bortezomibu vlivem interakcí s BMSCs jak uvádí Hao a spol. [149] ve své studii. Bortezomib je v současné době

považován za jeden z neúčinnějších léků u MM a to i přesto, že možný výskyt rezistence k tomuto léku byl popsán v několika studiích [150].

Proliferace a přežívání myelomových buněk je ovlivněno nejen jejich interakcí se stromálními buňkami kostní dřeně, ale také jejich adhezí k proteinům ECM. Adheze myelomových buněk k proteinům ECM má za následek aktivaci signálních drah, jejichž aktivace přispívá k přežívání maligních buněk nebo může docházet ke zvýšené expresi určitých proteinů, které mohou ovlivňovat buněčný cyklus nebo citlivost buněk k lékům [61,62,151]. Naše experimenty však nepotvrdily, že by adheze buněk UHKT-944 k proteinům ECM chránila buňky před antiproliferačním účinkem SAHA i VPA. Jedním z důvodů může být nízká schopnost linie UHKT-944 vázat se ke složkám použitého MaxGel. Výsledky analýzy, kde byly použity komerční stripky pokryté 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 dřeně by buňky adherovaly lépe.

Naše experimenty potvrdily schopnost stromálních buněk kostní dřeně produkovat IL-6, považovaný za stěžejní cytokin MM [66]. Předchozí studie naznačují, že adheze myelomových buněk ke stromálním buňkám stimuluje sekreci IL-6 [67,152]. Naše výsledky však tyto závěry nepotvrdily. Naopak interakcí stromálních buněk s buňkami UHKT-944 docházelo k mírnému poklesu produkce IL-6 v porovnání se stromálními buňkami kultivovanými bez přítomnosti myelomových buněk.

Abychom zjistili, zda snížení antiproliferačního účinku SAHA vlivem interakce BMSCs s buňkami UHKT-944 není pouze důsledkem zvýšené sekrece IL6, byly buňky kultivovány v přítomnosti různých koncentrací IL-6 a ošetřeny SAHA a VPA. Proliferace byla měřena po 24 a 48 hodinách inkubace metodou AlamarBlue. Koncentrace IL-6 1 ng/ml, jež byla zjištěna v případě kultivace linie UHKT-944 s BMSCs, významně neovlivňovala antiproliferační účinek SAHA i VPA, naopak působením IL-6 v koncentraci 3,3 ng/ml došlo k částečnému snížení antiproliferačního účinku obou inhibitorů. Z výsledků lze usuzovat, že k ochrannému efektu mikroprostředí kostní dřeně 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 [58,153,154].

HDAC inhibitory jsou známy svou schopností indukovat zástavu buněčného cyklu v různých typech nádorů včetně MM [148,155,156]. Analýzou buněčného cyklu jsme zjistili, že dané koncentrace SAHA i VPA nemají výrazný vliv na distribuci buněk UHKT-944 v jednotlivých fázích buněčného cyklu a ovlivňují tudíž buněčnou proliferaci jiným mechanismem účinku. Rozdíly v zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu nebyly pozorovány ani mezi buňkami kultivovanými v přítomnosti BMSCs a buňkami bez BMSCs. V souladu s našimi závěry, Du a spol. [157] dokazuje, že butyrát sodný, látka ze skupiny HDAC inhibitorů, není schopna indukovat zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. Ke stejným závěrům dospěl i Gao a spol. [158], který zjistil, že panobinostat, lék s inhibičním účinkem na HDAC, který byl v nedávné době schválený pro léčbu myelomu [94], není schopen navodit zástavu buněčného cyklu a to ani v kombinaci s inhibitorem proteazomu carfilzomibem. Rozdílná schopnost látek indukovat zástavu buněčného cyklu může být zapříčiněna především různými typy testovaných buněčných linií.

Dále jsme zkoumali vliv HDAC inhibitorů na signální dráhy JAK/STAT a PI3K/Akt, jejichž permanentní aktivace má za příčinu proliferaci a přežívání myelomových buněk. Poměrně překvapivě se VPA projevila jako inhibitor fosforylace STAT3. Zajímavé je, že k výraznému snížení fosforylace STAT3 došlo i v případě kultivace buněk UHKT-944 v přítomnosti 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 [159]. Z našich výsledků vyplývá, že inhibice signální dráhy JAK/STAT by mohla být jedním z mechanismů účinku VPA na MM či PCL. Schopnost VPA selektivně inhibovat fosforylaci STAT3 byla poprvé popsána Zhuem a spol. [160] na NK buňkách. 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 [161].

Western blot analýzou jsme zjistili, že SAHA i VPA inhibují fosforylaci Akt, což může být další z mechanismů účinku těchto inhibitorů na MM a PCL. PI3K/Akt dráha je aktivována IL-6 a IGF, [162,163] které jsou produkovány BMSCs, avšak vliv mikroprostředí, který by se projevil zvýšenou fosforylací Akt, nebyl v případě buněk ošetřených VPA detekován. Western blot analýza odhalila rozdíly ve fosforylaci proteinů JAK2, Akt a Akt substrátů a to mezi buňkami kultivovanými s BMSCs a bez BMSCs ošetřenými SAHA. Domníváme se, že tento efekt může být způsoben přítomností stromálních buněk.

6 ZÁVĚR

Ustavení permanentní buněčné linie je stále náhodnou událostí s velmi malou úspěšností. Přesto se nám podařilo ustavit dvě buněčné linie závislé na IL-6 s charakterem plazmatických buněk a později také sublinii nezávislou na IL-6. Linie UHKT-893 byla charakterizována v diplomové práci Mgr. Ireny Vančurové. V této disertační práci jsme se zaměřili na detailní charakterizaci plazmocelulární linie UHKT-944 a zároveň byly u linie UHKT-893 provedeny další analýzy zahrnující mimo jiné vyšetření klonální přestavby IgVH genů a cytogenetickou analýzu, které přispěly k detailnější charakterizaci 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. 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 VPA a 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 PCL i MM. Mikroprostředí kostní dřeně bychom neměli opomenout v případě testování nových potenciálních léků proti těmto hematologickým malignitám.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadié M, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F; HAEMACARE Working Group. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010; 116: 3724-3734.
- [2] Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J. Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada 2008. ISBN 9788024725024.
- [3] Pour L, Hájek R, Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J. Význam autologní transplantace u mnohočetného myelomu. *Vnitř Lék* 2009;767-772.
- [4] San-Miguel JF, Mateos M-V. Can multiple myeloma become a curable disease? *Haematologica* 2011; 96: 1246-1248.
- [5] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2962-2972.
- [6] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1860-1873.
- [7] Adam Z, Hájek R, Mayer J, Študla V, Vorlíček J a kolektiv. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Brno: Masarykova univerzita 1999. ISBN 80-210-2034-2.
- [8] Adam Z, Vorlíček J, Vaniček J a kolektiv. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob: Druhé, aktualizované a doplněné vydání. Praha: Grada 2004. ISBN 80-247-0896-5.
- [9] Bladé J, Kyle RA. Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 1259-1272.
- [10] Smani SZ, Nair B, Qu P, Hansen E, Zhang Q, Petty N, Waheed S, Shaughnessy JD Jr, Alsayed Y, Heuck CJ, van Rhee F, Milner T, Hoering A, Szymonifka J, Sexton R, Sawyer J, Singh Z, Crowley J, Barlogie B. Primary plasma cell leukemia: clinical and laboratory presentation, gene-expression profiling and clinical outcome with Total Therapy protocols. *Leukemia* 2012; 26: 2398-2405.
- [11] Gluzinski A, Reichenstein M. Myeloma und Leucaemia lymphatica plasmocellularis. *Wien Klin Wochensh* 1906; 18: 336-339.
- [12] Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 1974; 133: 813-818.
- [13] Noel P, Kyle RA. Plasma cell leukemia: an evaluation of response to therapy. *Am J Med* 1987; 83: 1062-1068.
- [14] Shtalrid M, Shvidel L, Vorst E. Polyclonal reactive peripheral blood plasmacytosis mimicking plasma cell leukemia in a patient with Staphylococcal sepsis. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 379-380.
- [15] Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling RP, Gertz MA, Henderson K, Greipp PR, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Bergsagel PL, Stewart AK, Fonseca R. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 1044-1052.
- [16] Adam Z, Straub J, Pour L, Krejčí M, Neubauer J, Vaniček J. Časnou diagnózou mnohočetného myelomu k lepší kvalitě života nemocných. *ČES GER REV* 2007; 5: 180-201.
- [17] van Wier S, Braggio E, Baker A, Ahmann G, Levy J, Carpten JD, Fonseca R. Hypodiploid multiple myeloma is characterized by more aggressive molecular markers than non-hyperdiploid multiple myeloma. *Haematologica* 2013; 98: 1586-1592.
- [18] Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, Callet-Bauchu E, Terré C, Lafage-Pochitaloff M, Désangles F, Ramond S, Talmant P, Bataille R. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood* 2001; 97: 822-825.
- [19] 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.
- [20] García-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.
- [21] Shin HJ, Kim K, Lee JJ, Song MK, Lee EY, Park SH, Kim SH, Jang MA, Kim SJ, Chung JS. The t(11;14)(q13;q32) translocation as a poor prognostic parameter for autologous stem cell transplantation in myeloma patients with extramedullary plasmacytoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015; 15: 227-235.
- [22] Nahi H, Sutlu T, Jansson M, Alici E, Gahrton G. Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma. *J Intern Med* 2011; 269: 137-147.

- [23] Kalf J, Spencer A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J* 2012; 2:e89.
- [24] Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 335-348.
- [25] Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, Mateo G, López A, Rasillo A, Vidriales MB, López-Berges MC, Miguel JF, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78: 239-252.
- [26] Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 293-301.
- [27] Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 2005; 105: 4845-4848.
- [28] Chang H, Samiee S, Yi QL. Prognostic relevance of CD56 expression in multiple myeloma: a study including 107 cases treated with high-dose melphalan-based chemotherapy and autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 43-47.
- [29] Bataille R, Jégo G, Robillard N, Barillé-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91: 1234-1240.
- [30] Robillard N, Jégo G, Pellat-Deceunynck C, Pineau D, Puthier D, Mellerin MP, Barillé S, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1521-1526.
- [31] Sahara N, Ihara M, Ono T, Tamashima S, Matsui H, Takeshita A, Ohno R. Multiple myeloma expressing CD19(+)CD56(-) phenotype. *Am J Hematol* 2000; 64: 311-313.
- [32] Sahara N, Ohnishi K, Ono T, Sugimoto Y, Kobayashi M, Takeshita K, Shigeno K, Nakamura S, Naito K, Tamashima S, Nara K, Tobita T, Takeshita A, Ohno R. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD33-positive multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2006; 77: 14-18.
- [33] van de Donk NW, Lokhorst HM, Anderson KC, Richardson PG. How I treat plasma cell leukemia. *Blood* 2012; 120: 2376-2389.
- [34] Moria A, Gertz and Francis K. Buadi. Plasma cell leukemia. *Haematologica* 2010; 95: 705-707.
- [35] Hayman SR, Fonseca R. Plasma cell leukemia Current Treatment Options in Oncology 2001; 2: 205-216.
- [36] Hájek R, Adam Z, Maisnar V *et al.*, Česká myelomová skupina. Souhrn doporučení 2009 „Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu“. *Transfuze a hematologie dnes* 2009; 15 (suppl. 2): 1-80.
- [37] Avigan D, Rosenblatt J. Current treatment for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2014; 371: 961-962.
- [38] Současné možnosti léčby mnohočetného myelomu. *Časopis Remedia*. [online]. 2010 leden [cit. 2016-08-01]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/>
- [39] 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.
- [40] San Miguel JF, Mateos MV, Pandiella A. Novel drugs for multiple myeloma. *Hematology* 2006; 2: 205-211.
- [41] Kamakshi V. Rao. Lenalidomide in the Treatment of Multiple Myeloma. *Am J Health Syst Pharm* 2007; 64:1799-1807.
- [42] McCurdy AR, Lacy MQ. Pomalidomide and its clinical potential for relapsed or refractory multiple myeloma: an update for the haematologist. *Ther Adv Hematol* 2013; 4: 211-216.
- [43] Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orłowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003 Jun 26;348(26):2609-17.
- [44] Vij R, Siegel DS, Jagannath S, Jakubowiak AJ, Stewart AK, McDonagh K, Bahlis N, Belch A, Kunkel LA, Wear S, Wong AF, Wang M. An open-label, single-arm, phase 2 study of single-agent carfilzomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma who have been previously treated with bortezomib. *Br J Haematol* 2012; 158: 739-748.

- [45] Gadó K, Domján G, Hegyesi H, Falus A. Role of INTERLEUKIN-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biol Int* 2000; 24: 195-209.
- [46] Shah JJ, Feng L, Thomas SK, Berkova Z, Weber DM, Wang M, Qazilbash MH, Champlin RE, Mendoza TR, Cleeland C, Orlowski RZ. Siltuximab (CNTO 328) with lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in newly-diagnosed, previously untreated multiple myeloma: an open-label phase I trial. *Blood Cancer J* 2016; 6:e396.
- [47] Richardson PG, Badros AZ, Jagannath S, Tarantolo S, Wolf JL, Albitar M, Berman D, Messina M, Anderson KC. Tanespimycin with bortezomib: activity in relapsed/refractory patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2010; 150: 428-437.
- [48] Richardson PG, Chanan-Khan AA, Lonial S, Krishnan AY, Carroll MP, Alsina M, Albitar M, Berman D, Messina M, Anderson KC. Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase 1/2 study. *Br J Haematol* 2011; 153: 729-740.
- [49] 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.
- [50] Balakumaran A, Robey PG, Fedarko N, Landgren O. Bone marrow microenvironment in myeloma genesis: its potential role in early diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10: 465-480.
- [51] Bruno B, Giaccone L, Rotta M, Anderson K, Boccadoro M. Novel targeted drugs for the treatment of multiple myeloma: from bench to bedside. *Leukemia* 2005 Oct;19(10):1729-38.
- [52] Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 1996; 87: 1104-1112.
- [53] Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001; 15: 1950-1961.
- [54] Cook G, Dumber M, Franklin IM. The role of adhesion molecules in multiple myeloma. *Acta Haematol* 1997; 97: 81-89.
- [55] Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 1993; 81: 767-774.56. Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 1998; 91: 2679-2688.
- [57] van Driel M, Gunthert U, Stauder R, Joling P, Lokhorst HM, Bloem AC. CD44 isoforms distinguish between bone marrow plasma cells from normal individuals and patients with multiple mye, (2) IL-6 regulates CD44 cell surface expression on human myeloma cells. *Leukemia* 1998; 12: 1821-8.
- [58] Cheung WC, Van Ness B. The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. *Leukemia* 2001;15: 264-271.
- [59] 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.
- [60] Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, Kim J, Werndli JE, Raschko M, Leith CP, Kahl BS, Kim K, Miyamoto S. Bortezomib-resistant nuclear factor-kB activity in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1356-1364.
- [61] 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.
- [62] Ding Y, Shen Y. Notch increased vitronectin adhesion protects myeloma cells from drug induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467: 717-722.
- [63] Hardin J, MacLeod S, Grigorieva I, Chang R, Barlogie B, Xiao H, Epstein J. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 1994; 84: 3063-3070.
- [64] Goto H, Shimazaki C, Tatsumi T, Yamagata N, Fujita N, Tsuchiya M, Koishihara Y, Ohsugi Y, Nakagawa M. Establishment of a novel myeloma cell line KPMM2 carrying t(3;14)(q21;q32), which proliferates specifically in response to interleukin-6 through an autocrine mechanism. *Leukemia* 1995; 9: 711-718.
- [65] Shirato L, Otsuki T, Yamada O, Namba M, Nakajima H, Nozawa Y, Ueki A, Yawata Y. Down regulation of protein kinase C during growth enhancement induced by interleukin-6 on a human myeloma cell line, KMS-11. *Cancer Lett* 1996; 107: 131-136.

- [66] 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.
- [67] Uchiyama H, 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.
- [68] Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000; 95: 2630-2636.
- [69] Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1574-1580.
- [70] Chatterjee M, Stühmer T, Herrmann P, Bommert K, Dörken B, Bargou RC. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood* 2004; 104: 3712-3721.
- [71] Bharti AC1, 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.
- [72] Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* 2000; 60: 6763-6770.
- [73] Sprynski A.C., Hose D., Caillot L., Réme T., Shaughnessy J.D. Jr., Barlogie B., Seckinger A., Moreaux J., Hundemer M., Jourdan M., Meissner T., Jauch A., Mahtouk K., Kassambara A., Bertsch U., Rossi J.F., Goldschmidt H., Klein B. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood* 2009, 113: 4614- 4626.
- [74] Qiang YW, Yao L, Tosato G, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 301-308.
- [75] Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B. *Blood* 1996; 87: 1104-1112.
- [76] Ni H, Ergin M, Huang Q, Qin JZ, Amin HM, Martinez RL, Saeed S, Barton K, Alkan S. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol* 2001; 115: 279-286.
- [77] von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. *Swiss Med Wkly* 2013; 143:w13799.
- [78] Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic Mechanisms in Mammals. *Cell Mol Life* 2009; 66: 596-612.
- [79] Kulis M, Esteller M DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010; 70: 27-56.
- [80] Klener P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.
- [81] Chen GH, Wu DP, Lin FR, Wang Y, Huang HW, Chang HR. Preliminary study on 5-azacytidine anti-myeloma activity in vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009; 17: 602-606.
- [82] Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 2000; 102: 463-473.
- [83] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications *Cell Res* 2011; 21: 381-395.
- [84] Whittle N, Singewald N. HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 569-581.
- [85] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81-120.
- [86] Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, and Zhou MM Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 1999; 399, 491-496.
- [87] Brownell, JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev* 1996; 6: 176-184.
- [88] Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 284-295.
- [89] Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005; 363: 15-23.
- [90] Kyrylenko S, Kyrylenko O, Suuronen T, Salminen A. Differential regulation of the Sir2 histone deacetylase gene family by inhibitors of class I and II histone deacetylases. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1990-1997.

- [91] Caron H, van Schaik B, van der Mee M, Baas F, Riggins G, van Sluis P, Hermus MC, van Asperen R, Boon K, Voûte PA, Heisterkamp S, van Kampen A, Versteeg R. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science* 2001; 291: 1289-1292.
- [92] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5459-5468.
- [93] Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 2005; 25: 261-309.
- [94] Laubach JP, Moreau P2, San-Miguel JF3, Richardson PG4 Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 4767-4773.
- [95] Xu Y, Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid down-regulates expression levels of Bcr-abl, c-Myc and HDAC3 in chronic myeloid leukemia cell lines. *Int J Mol Med* 2005; 15: 169-172.
- [96] Kaufman JL, Fabre C, Lonial S, Richardson PG. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: rationale and evidence for their use in combination therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13: 370-376.
- [97] 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.
- [98] 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.
- [99] Heo SK, Noh EK, Yoon DJ, Jo JC, Park JH, Kim H. Dasatinib accelerates valproic acid-induced acute myeloid leukemia cell death by regulation of differentiation capacity. *PLoS One* 2014; 9: e98859.
- [100] Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Bernhardt A, Hildebrandt B, Haas R, Germing U, Gattermann N. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004; 104:1266-1269.
- [101] Schwartz C1, 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.
- [102] Drexler HG. Guide to leukemia-lymphoma cell lines, 2nd ed. Braunschweig; 2010 [CD medium].
- [103] Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1964 Mar 28; 1:702-3.
- [104] Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, Mccarthy RE. Continuous Culture Of Human Lymphoblasts From Peripheral Blood Of A Child With Acute Leukemia. *Cancer* 1965 Apr; 18: 522-9.
- [105] Moore GE, Kitamura H. Cell line derived from patient with myeloma. *N Y State J Med*. 1968; 68: 2054-2060.
- [106] Nilsson K, Bennich H, Johansson SG, Pontén J. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin Exp Immunol* 1970; 7: 477-489.
- [107] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45: 321-334.
- [108] Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54: 713-733.
- [109] Drábek J. Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci 2012. ISBN 978-80-244-3002-7.
- [110] Pekova S, Markova J, Pajer P, Dvorak M, Cetkovsky P, Schwarz J. Touch – down reverse transcriptase – PCR detection of IgVH rearrangement and Sybr – green – based real – time RT – PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn* 2005; 9: 23–34.
- [111] Grebenová D, Kuzelová K, Fuchs O, Halada P, Havlíček V, Marinov I, Hrkal Z. Interferon-alpha suppresses proliferation of chronic myelogenous leukemia cells K562 by extending cell cycle S-phase without inducing apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32, 262–269.
- [112] 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.
- [113] Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:165-181.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] Vančurová I, Ustavení a charakterizace nové myelomové buněčné linie ÚHKT-893 závislé na IL-6. Praha 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Fakulta přírodovědecká.
- [117] 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-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332: 83-85.
- [118] 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.
- [119] Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 1994; 84: 2597-2603.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] Isoda A, Kaira K, Iwashina M, Oriuchi N, Tominaga H, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Asao T, Matsumoto M, Sawamura M. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci* 2014; 105: 1496-502.
- [124] 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.
- [125] Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutiérrez N, Rosiñol L, Montejano L, Bladé J, Martínez R, de la Rubia J, Diaz-Mediavilla J, Sureda A, Ribera JM, Ojanguren JM, de Arriba F, Palomera L, Terol MJ, Orfão A, San Miguel JF; PETHEMA Study Group; GEM Study Group. 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.
- [126] Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1994; 87: 503-508.
- [127] 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
- [128] 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.
- [129] 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.
- [130] Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, Spencer JA, Kimlinger T, Ghobrial JM, Jia X, Lu G, Timm M, Kumar A, Côté D, Veilleux I, Hedin KE, Roodman GD, Witzig TE, Kung AL, Hideshima T, Anderson KC, Lin CP, Ghobrial IM. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 2708-2717.
- [131] 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.
- [132] 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.

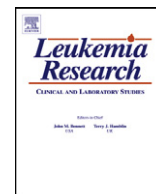
- [133] Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-1424.
- [134] Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4569-4575.
- [135] 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.
- [136] 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.
- [137] Avet-Louseau H, Daviet A, Sauner S, Bataille R. Intergroupe Francophone du Myelome. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 2000;111: 1116-1117.
- [138] 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.
- [139] 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.
- [140] Taberero D1, San Miguel JF, Garcia-Sanz M, Nájera L, García-Isidoro M, Pérez-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.
- [141] Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.
- [142] Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854.
- [143] 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.
- [144] Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene* 2007; 26: 1351-1356.
- [145] Kitazoe K, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Harada T, Nakano A, Takeuchi K, Hashimoto T, Ozaki S, Matsumoto T. Valproic acid exerts anti-tumor as well as anti-angiogenic effects on myeloma. *Int J Hematol.* 2009; 89: 45-57.
- [147] Constantinou C, Papas KA, Constantinou AI. Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy? *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 717-728.
- [148] Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, Sezer O, Heider U. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* 2006; 91: 248-251.
- [149] 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.
- [150] Dou, Q. Ping. Resistance to proteasome inhibitors in cancer: molecular mechanisms and strategies to overcome resistance. ISBN 9783319067513.
- [151] 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.
- [152] Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 1996; 87: 1104-1112.
- [153] 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.

- [154] 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.
- [155] 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.
- [156] Huang L, Pardee AB. Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Mol Med* 2000; 6: 849-866.
- [157] 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.
- [158] 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.
- [159] Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1005-1014.
- [160] Zhu S, Denman CJ, and Lee DA. Valproic Acid Selectively Inhibits STAT3 Phosphorylation. 51th ASH Annual Meeting & Exposition. Dec 5, 2009. New Orleans, LA.
- [161] 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.
- [162] Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol.* 2002; 62: 225-233.
- [163] Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008; 122: 1521-1529.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ

- 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 (viz příloha A)
- 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 (viz příloha A)
- 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 (viz příloha A)

PŘÍLOHA A



Novel human multiple myeloma cell line UHKT-893

Lenka Uherková^{a,*}, Irena Vančurová^{a,b}, Ilona Vyhliđalová^{a,c}, Markéta Pleschnerová^{a,b}, Ivan Špička^d, Romana Mihalová^e, Jana Březinová^f, Zdeněk Hodný^g, Kamila Čermáková^h, Veronika Polanská^h, Iuri Marinovⁱ, Petr L. Jedelský^{b,j}, Kateřina Kuželová^a, Petr Stöckbauer^a

^a Department of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT), Prague, Czech Republic

^b Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

^c Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

^d 1st Department of Internal Medicine, Division of Haematology, General Faculty Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic

^e Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine shared with General University Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic

^f Department of Cytogenetics, IHBT, Prague, Czech Republic

^g Department of Genome Integrity, Institute of Molecular Genetics v.v.i, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

^h Leukemia PCR Diagnostics Laboratory, IHBT, Prague, Czech Republic

ⁱ Flow Cytometry Laboratory, IHBT, Prague, Czech Republic

^j Department of Parasitology, Laboratory of Mass Spectrometry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2012

Received in revised form 4 December 2012

Accepted 7 December 2012

Available online 3 January 2013

Keywords:

Human myeloma cell line

Human multiple myeloma

Plasma cell

IL-6 dependence

Immunoglobulin

Free light chain

ABSTRACT

We established and characterized a new IL-6 dependent multiple myeloma (MM) cell line UHKT-893 from the bone marrow of a relapsed 57-year-old woman.

Results: Using nephelometry, cells with plasma cell phenotype and morphology were found to secrete IgG and free kappa (κ)-light chain of immunoglobulin. κ -Light chain was also recognized intracellularly by flow cytometry and by mass spectrometry. VH4-39 region of IgVH genes was rearranged and somatically hypermutated. Cytogenetic analysis of cells revealed new chromosome abnormalities in all breakpoints unique in both MM patients and cell lines – t(1;6), t(1;11), t(5;15), t(5;21), +der(11;15) and der(16). IL-6 independent subline UHKT-893a was established by adaptation to descending IL-6 concentration, while the original cell line keeps on maintaining its IL-6 dependency.

Conclusion: The cell line provides a suitable material for cellular and molecular studies of tumor abnormalities, with potentially unique mutagenic features of myeloma disease. It may be utilized for human hybridoma construction and vaccine development. Both IL-6 dependent and independent cell clones represent an important model for studies of myeloma cell growth and resistance emerging during targeted therapy.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematopoietic neoplasia of terminally differentiated B-cells into plasma cells. For the study of etiopathogenesis and for development of effective treatment of MM, a bulk of neoplastic cells is required exceeding the limited and temporary cell collections from patients. Permanent myeloma cell lines established from patients provide easily accessible and indispensable model material. Establishment of permanent cell lines from myelomas and other hematological neoplasias is still

a very difficult and rare event, and is rather a matter of coincidence because factors critical for the growth and survival of myeloma stem cells *in vitro* are still poorly understood. A higher success rate in the establishment of permanent malignant hematopoietic cell lines has been achieved in patients at relapse, in terminal or refractory phase rather than at diagnosis, during therapy or at blast crisis [1].

Interleukin 6 (IL-6) is a major growth and survival factor for myeloma cells *in vivo*, primary myeloma cells *in vitro* and also for myeloma cell lines [2,3]. Similarly, IL-6 acts on non-malignant human plasmablasts [4]. Several studies demonstrated or suggested that IL-6 may act by autocrine, intracrine and paracrine manner [2,5]. We could not rule out that IL-6 acts as an intracrine factor [6]. Up to date, 25% of myeloma and 47% of plasma cell leukemia cell lines have been established as IL-6 dependent [1]. During long-term cultivation, cells may become

* Corresponding author at: Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 12820 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 22197 7280; fax: +420 22197 7249.

E-mail address: Lenka.Uherkova@uhkt.cz (L. Uherková).

independent of growth and survival factors, as was documented on HL461 myeloma cell line originally dependent on stromal-cell-conditioned medium [7].

In the present study we established and characterized a new human IL-6 dependent myeloma cell line UHKT-893 and selected its IL-6 independent subclone UHKT-893a that can be utilized in both the research of multiple myeloma and other technological and therapeutic approaches.

2. Materials and methods

2.1. Patient

57-Year-old woman suffered from a backache since July 2007 and was diagnosed with multiple myeloma, clone IgG-K, stage I of International Staging System, stage IIIA according to Durie–Salmon staging system, on February 2008. The level of monoclonal immunoglobulin (mg) was 46.5 g/L. According to cytology and FACS analysis findings, 62% and 45% myeloma plasma cells was present in the bone marrow, respectively. Generalized skeletal disruption – tiny cranial and long bone focuses, several compressive fractures of vertebra on the transition between the thoracic and lumbar backbone – occurred. The patient was a chronic smoker and suffered from arterial hypertension from the spring 2008.

2.2. Patient therapy

Briefly, during the year of diagnosis the patient was treated by 4 cycles of Velcade–Thalidomid–Dexona chemotherapy, leading to a partial remission (18.4 g/L mg, 8.4% and 0.4% plasma cells, as noted above). Subsequently, the patient received mobilization chemotherapy (cyclophosphamide, 2.5 g/m²) and G-CSF (neupogen, 10 µg/kg/daily), leading to a successful separation of peripheral blood progenitor cells for autologous stem cell transplantation. This was conditioned by a single application of myeloablative dose of melphalan (200 mg/m²) resulting in a partial response. Relapse on February 2010 necessitated a second line therapy. However, before the therapeutic application, a rapid progression of cardiac insufficiency accompanied by bronchopneumonia led to the patient's death one month later.

2.3. Cell line establishment and cultivation

Bone marrow sample of the patient in relapse was obtained on 16th February 2010 with the patient's informed consent. Erythrocytes and granulocytes were removed from anticoagulated sample by separation on Histopaque®-1077 (Sigma–Aldrich) and remaining mononuclear cells in high density (approx. 1 × 10⁶ cells/mL) were cultivated in RPMI 1640 medium with 10% FBS (both from Biochrom AG), 20 ng/mL G-CSF (Filgrastim, Roche) and 100 U/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin (Sigma) in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Whenever were the cells separated from patient's autologous feeder stromal layer and transferred into a new flask, the cells required supplementation of exogenous recombinant human IL-6 (Invitrogen) at a concentration of 1 ng/mL instead of G-CSF for further growth and division.

2.4. Growth characteristics

2.4.1. Morphology

Cytospin preparations were routinely stained by Giemsa in the cytomorphological laboratory to regularly assess the cell type morphology and the presence of mitoses. The presence of senescent cells was assessed by β-galactosidase staining (Cell Signaling). The amount of senescent cells was estimated several times to check the state of the continuously growing cell line in culture.

2.4.2. Splitting

Cell cultures were passaged in a 1:3 ratio twice or once a week.

2.4.3. Doubling time

It was analyzed from cell counts during their growth phase by GraphPad Prism version 5.02 software.

2.4.4. Measurement of proliferation

Cell growth has been regularly monitored in around 10 mL of medium and numbers of living cells counted in Bürker chamber or on automated cell counter (TC10, BioRad) were normalized to this volume for comparability. Optimal IL-6 concentration stimulating the cell growth was determined based on the cell proliferation checked microscopically and using colorimetric assay employing WST-1 reagent (Roche). For colorimetric assay, cells were incubated for 3 h with WST-1 reagent and absorbance of the samples was measured at A_{450nm} with reference wavelength A_{690nm} according to the manufacturer's protocol.

2.4.5. Measurement of viability

Cells were stained with trypan blue (Sigma) and viable and dead cells were counted in Bürker chamber or cell counter. The values are given in %.

Concurrent attempts to obtain IL-6 independent cell line have been performed by gradual decreasing of IL-6 concentration, or by alternating the culture with and without IL-6 with the aid of spontaneous adherence of live cells to a layer of poly-L-lysine (Sigma) in order to easily remove the harmful bulk of floating dead cells.

2.4.6. Classical cytogenetic analysis

For the cytogenetic analysis, bone marrow cells were cultured for 24 h in RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum without stimulation. Chromosomal preparations of the patient's bone marrow and UHKT-893 cells were made according to the standard techniques using colcemide, hypotonic treatment, fixation in methanol/acetic acid and G-banding with Wright stain. For karyotyping, mitoses were analyzed using IKAROS (MetaSystems) or LUCIA (Laboratory Imaging) imaging systems.

2.4.7. FISH analysis

Interphase fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with cytoplasmic immunoglobulin light chain staining (cIg FISH) was performed on bone marrow cells. Commercial DNA probes (Abbott Molecular) were used for detection of deletions del(13)(q14) (RB1 gene)/monosomy of chromosome 13, del(17)(p13) (TP53 gene) and translocations involving IgH gene (14q32). For 1q21 gain status, cIg FISH with ON MM 1q21/SRD (1p36) DNA specific probe from Poseidon (Kreatech Diagnostics) was established.

2.4.8. mFISH analysis

Multicolor FISH (mFISH) was performed using SpectraVision (Abbott) on 18-month-old UHKT-893 cells. Image capturing and acquisition was processed using Nikon Eclipse 90i fluorescence microscope and LUCIA imaging system for FISH.

2.4.9. Immunophenotypic analysis by flow cytometry

Live cells were tested for the expression of molecules by antibodies to surface antigens CD1a, CD19, CD20, CD21, CD25 (Beckman Coulter Inc.); CD3, CD28, CD33, CD38, CD45, CD56, CD117, CD138 (Invitrogen); CD4, CD13, CD27 (eBioscience); CD5 (L17F12, gift from Prof. Ronald Levy, Stanford, CA); CD8 (BioLegend); CD9 (Hybritech); CD10, CD24 (Ortho Diagnostic System Inc.); CD15 (Becton Dickinson); CD34, CD44 (Exbio); CDw65, CD89, CD95, CD98 (Immunotech); CD96 (Abnova Corporation); CD105 (Acell); CD184 (Diaclone); HLA-DR (Orthomune); cytoplasmic κ and λ light immunoglobulin (Ig) chains (Dako). Cells incubated with unlabeled primary antibodies were stained by RPE-conjugated F(ab')₂ fragment of goat or rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO). Washing and incubation steps were carried out with PBS. Other cell lines with known antigenic expression were used as negative and positive controls – CML-T1, JURL-MK1, KARPAS-299 (DSMZ); JURKAT (ECACC), HEL (from Dr. Paul Martin, Fred Hutchinson Cancer Research Centre, Seattle, WA, USA), HL-60 (from Dr. R.C. Gallo, National Cancer Institute, Bethesda, USA), MOLM-7 (from Dr. Y. Matsuo, Fujisaki Cell Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan); KG-1 and NALM-16 (from Dr. Jun Minowada, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, USA). Intensity of fluorescence was measured by flow cytometry (FACS – Coulter Epics XL). Only the population of live cells was gated and evaluated. The used secondary antibody did not provide any nonspecific positivity.

2.4.10. Immunoglobulin secretion

Secretion of immunoglobulins and their free light chains from cells to medium was routinely measured by a nephelometric technique (Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague).

2.4.11. Mass spectrometry

2D electrophoresis was performed according to a described procedure [8]. MALDI-TOF analysis was employed to analyze protein spots randomly selected originally for the purpose of method tutorial for students. Protein spots from 2D electrophoresis gel of whole cell-lysate after standard in-gel digestion were analyzed in the Laboratory of Mass Spectrometry (Faculty of Science, Charles University, Prague). Resulting protein mass spectra were compared with Genbank non-redundant protein database by Mascot software. Proteins with significant score ($p < 0.001$) were identified and confirmed by tandem mass spectrometry.

2.4.12. Sequence analysis of IgVH gene rearrangement

RNA was isolated using TriZol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). cDNA was synthesized using SuperScript II and random hexamers (Invitrogen). Seven IgVH (immunoglobulin heavy chain variable region) families were amplified in six individual PCRs (VH1 and VH7 families in the same reaction mixture) employing primers described by Pekova et al. [9] using Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems) and "touch-down" PCR program. The temperature of annealing steps was gradually descended from 65 °C to 50 °C. PCR products were separated on 2% agarose with ethidium bromide. The bands around 300 bps were cut out and purified with QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Sequencing was performed on ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer using Big Dye Terminator 3.1 kit (Applied Biosystems). The resulting sequences were analyzed in Chromas 2.31 program and aligned to the nearest IgVH germline sequences using databases of

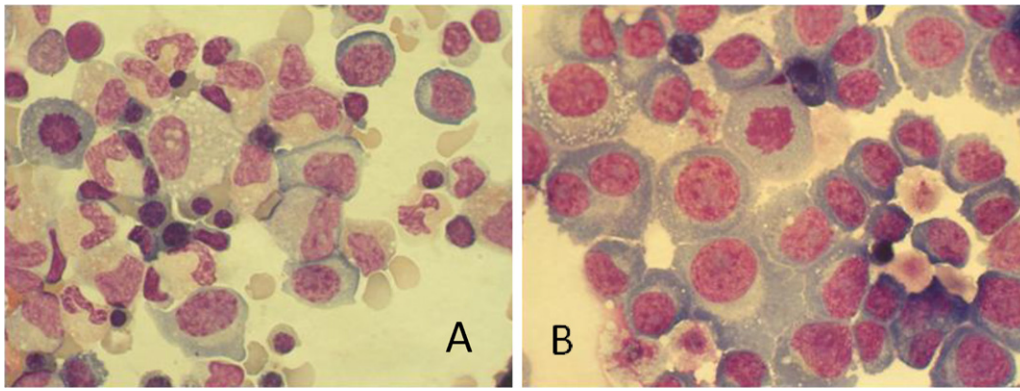


Fig. 1. Giemsa stained cytospin preparations of bone marrow at the beginning of the cultivation (A) and in 4-month old culture of emerging UHKT-893 cell line (B) (1000× magnification).

IgBlast and IMGT programs. Sequences with less than 98% homology to the closest IgVH germline sequence were considered to be mutated.

2.4.13. Detection of mycoplasma contamination

The presence of mycoplasma was assessed by fluorescent DNA staining. Before staining, cells were cultured in a medium without antibiotics for at least one week, then fixed in methanol/acetic acid and stained with Hoechst 33258 (Sigma–Aldrich Inc.). The absence of mycoplasma DNA was assessed by fluorescence microscopy.

2.4.14. EBV genome sequence

Whole cellular DNA was examined for the presence of Epstein–Barr virus (EBV) DNA sequence by PCR routinely tested at the National Reference Laboratory (NRL) for Herpesic Viruses, National Institute of Public Health (NIPH) in Prague.

2.4.15. Presence of viruses

Both live and fixed cells were routinely analyzed by electron microscopy using negative staining (NRL for Virus Evidence by Electron Microscopy, NIPH, Prague).

3. Results

3.1. Establishment of IL-6 dependent and independent myeloma cell line

After one month of cultivation of separated bone marrow mononuclear cells, the amount of plasma cells and their propagation in the culture flask was recorded and verified in Giemsa-stained preparations. Therefore, the cells were first passaged and transferred into a new flask. The presence of mitoses on Giemsa-stained cytospin preparations confirmed the active proliferation of cells with plasma cell morphology (Fig. 1). The cells grew both in small colonies and individually on syngeneic stromal cells from the original cell input at the bottom of the culture flasks. Dependence on IL-6 was revealed when overgrown cells were separated from the stromal feeder layer and transferred into the new stromal cell-free culture flask. These cells stopped their growth or grew very slowly and their early decay (on second day) was clearly visible. IL-6 was routinely added to the culture medium beginning in the fifth month after the culture initiation. During first seven months (not shown) of continuous cultivation without stromal cells, cells grew very slowly in the medium enriched with 1 ng/mL IL-6 (Fig. 2). Concentrations of IL-6 lower than 1 ng/mL were insufficient for survival and optimal propagation of the cells (Fig. 3). The stromal cell-free cultures were first passaged after 2–3 months. The amount of senescent cells fluctuated between 1 and 16%. The cells grew predominantly as single cells or in small clusters in suspension. Minimal cell density necessary for the cell growth was at least 0.05×10^6 cells/mL. The maximal cell density, when cultures reach growth plateau, was 1.5×10^6 cells/mL. In exponential growth phase, their doubling time ranged from 3.4 to 3.8 days. The

cells have been frozen in 90% FBS with 10% DMSO in liquid nitrogen and repeatedly successfully thawed and revived.

20-Month-old cell line (termed UHKT-893a) became independent of IL-6 after 6-month adaptation to IL-6 concentration gradually decreasing from 1 ng/mL to zero (not shown). At this time, culture was first passaged and further maintained without IL-6, while the original culture has further on remained IL-6 dependent till now (Fig. 4). Attempts to obtain IL-6 independent cell line by alternation of cultivation with and without IL-6 has not been successful in contrast to the new plasma cell leukemia cell line UHKT-944 that we established in the same year (manuscript in preparation). The UHKT-893a cells have been continually growing without IL-6 since September 2011, frozen in the same way as parent IL-6 dependent cells and successfully revived. UHKT-893a cells grow more slowly but with maximum cell density 3×10^6 cells/mL and with doubling time ranging from 4.2 to 5.4 days.

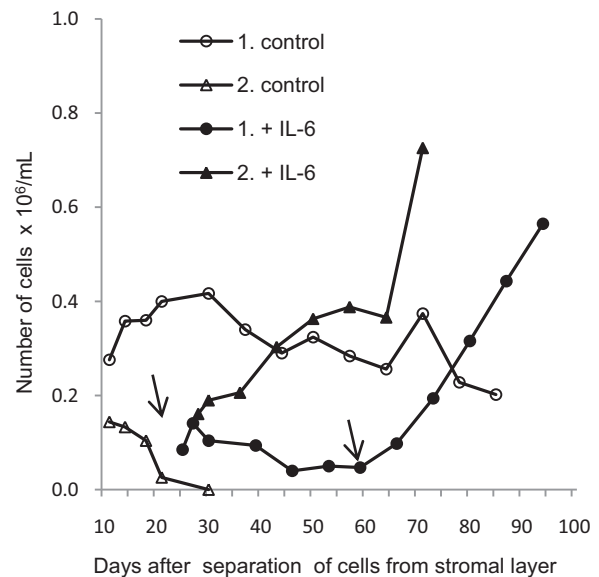


Fig. 2. Initial growth of UHKT-893 cell line. Myeloma cells without stromal feeder layer were cultivated in the medium without or with 1 ng/ml IL-6 and monitored for their growth up to the first passage. The observation was started with four months cultured control and IL-6 stimulated cells (1., IL-6 added on day 62) and 5-month old cells (2., IL-6 added on day 23). Live cells were counted in Bürker chamber using Trypan blue once a week. Control (1.) and IL-6-fed (2.) cultures were washed irregularly with PBS to reduce dead cells when they accumulated. In both control cultures the cells finally died (in control 2 after a passage). The arrow indicates the day of IL-6 addition.

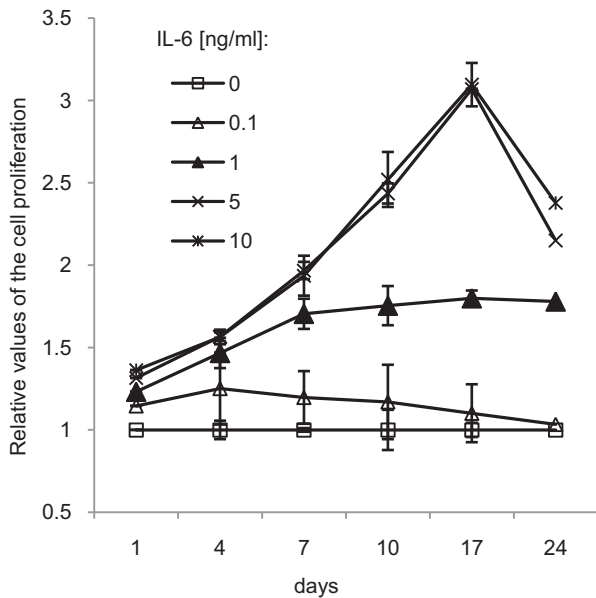


Fig. 3. The growth dependence of UHKT-893 cells on IL-6 concentration using cell proliferation assay employing WST-1 reagent for 3 h on the day of analysis. Cells were incubated at the given IL-6 concentration for indicated period as stated in the graph with a regular change of medium after 3 days. The effective IL-6 dose lies at 1 ng/mL for the proliferation and survival, as checked by microscopy of cultured cells. A duplicate culture for each sample were set up and each of the two was measured in a doublet. The bars represent standard deviations from these four values.

3.2. Cytogenetic analysis

Retrospectively, at the beginning of 2008, FISH analysis of bone marrow cells did not reveal any aberrations (see Section 2). However, at this time, 6 mitoses with normal karyotype and 10 mitoses with already multiple chromosomal changes (MCHC) with 46–54 chromosomes were found using classical cytogenetic analysis. In 2010, at the time the primary cultures were set up, similar results – 15 mitoses with normal karyotype and 6 mitoses with 38–57 chromosomes with MCHC were ascertained in bone marrow cells. After 3 months of continuous culture, 7 mitoses with 49–52 chromosomes with MCHC were recognized. In the culture cultivated for 18

months, 47–52 (modal number: 51) chromosomes were found in the karyotype of 25 mitoses with the following aberrations: 51,X,der(1)t(1;6)(q?;?q25)?trp(1)(q21q?25),+8,+9,der(11)t(1;11)(q12;q25),+der(11;15)(q10;q10),der(15)t(5;15)(p11;p11),+der(16)(7pter→7p13::7q11.2→7q36::16q12→16p13::7q36→7q11.2::7p13→7pter),+19,+21[8]/51,idem,-21,+der(21)t(5;21)(p11;p11)[17] (Fig. 5).

3.3. Immunoglobulin analysis

UHKT-893 cells were found to secrete IgG and free κ -immunoglobulin light chain. The control medium contained <9.26 mg/L IgG, <0.25 mg/L IgA, <0.3 mg/L IgM. Levels of free light chains of immunoglobulins (Igs) in this medium were not measured due to the low concentration of Igs. IgG=25.5 mg/L, IgA=0.301 mg/L, IgM=0.426 mg/L, free κ -chain=15.42 mg/L, free λ -chain <0.5 mg/L were detected in the medium from three-day-old culture of UHKT-893 cells starting with the cell concentration 0.2×10^6 cells/mL. Correspondingly, monoclonal cytoplasmic and weak surface expression of κ -light chain was detected in cells by flow cytometry. The presence of human immunoglobulin κ -light chain (JC region) in UHKT-893 cell line was confirmed by chance by mass spectrometry in one of two randomly selected protein spots on a 2D protein map (not shown).

In the 4- and 7-month cultures, the rearrangement of VH4-39 segment of IgVH genes was detected and somatically hypermutated due to 87.8% homology to the germLine sequence. No intraclonal variability between these cultures appeared (not shown).

3.4. Immunophenotypic analysis

Cell surface antigens and cytoplasmic light Ig chains of IL-6 dependent UHKT-893 cell line were analyzed by flow cytometry (Table 1). UHKT-893 cells showed plasma cell phenotype (CD38+/CD138+) distinct from other hematopoietic cell types. Changes in antigen expression during the establishment of the cell line were observed in CD28, CD45 and CD56 (Table 1). The cells expressed a low level of IL-2 receptor (CD25). Cell population was partly positive for FAS receptor (CD95) that mediates apoptosis and for CXCR-4 alpha-chemokine receptor (CD184) specific for stromal-derived-factor-1 (SDF-1).

3.5. Mycoplasma, EBV and viruses

Genomic DNA of the UHKT-893 cell line was proven to be EBV negative. The cells were confirmed to be free of *Mycoplasma* spp. and viruses.

4. Discussion

We established an IL-6 dependent myeloma cell line UHKT-893 and, later, its IL-6 independent subclone UHKT-893a from the bone marrow of a relapsed patient with myeloma. Like other leukemia and lymphoma cell lines, continuous growth of UHKT-893 cell line was recorded to be developing for up to 2 months of cultivation [1]. UHKT-893 cells were found to secrete IgG and free κ -light Ig chain in agreement with Ig isotype and light chain detected in the patient.

The multiple myeloma cells can be classified into three groups depending on exogenous IL-6: (a) both proliferation and survival of the cells are dependent on IL-6, (b) only proliferation of the myeloma cells is affected by IL-6, (c) the cells are dependent on IL-6 only for survival, but not for proliferation. There are some cell lines that are independent of IL-6 both for survival and proliferation. UHKT-893 belongs to (a) group: the cells neither proliferate nor survive in the absence of IL-6 (Figs. 2 and 4).

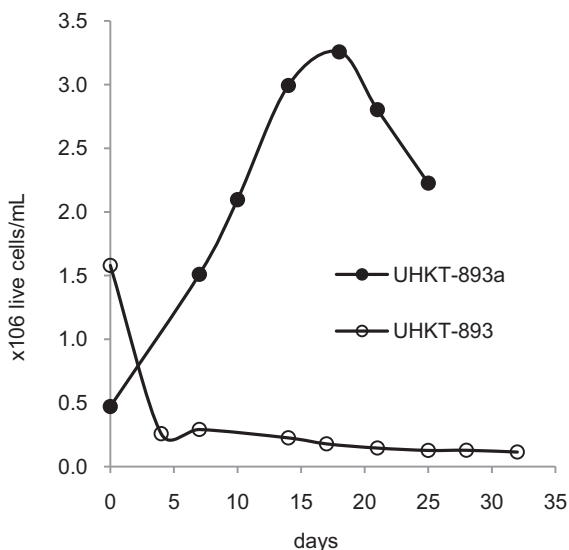


Fig. 4. The growth of IL-6 independent UHKT-893a subline compared to IL-6 dependent UHKT-893 parent cells, both cultured without IL-6.

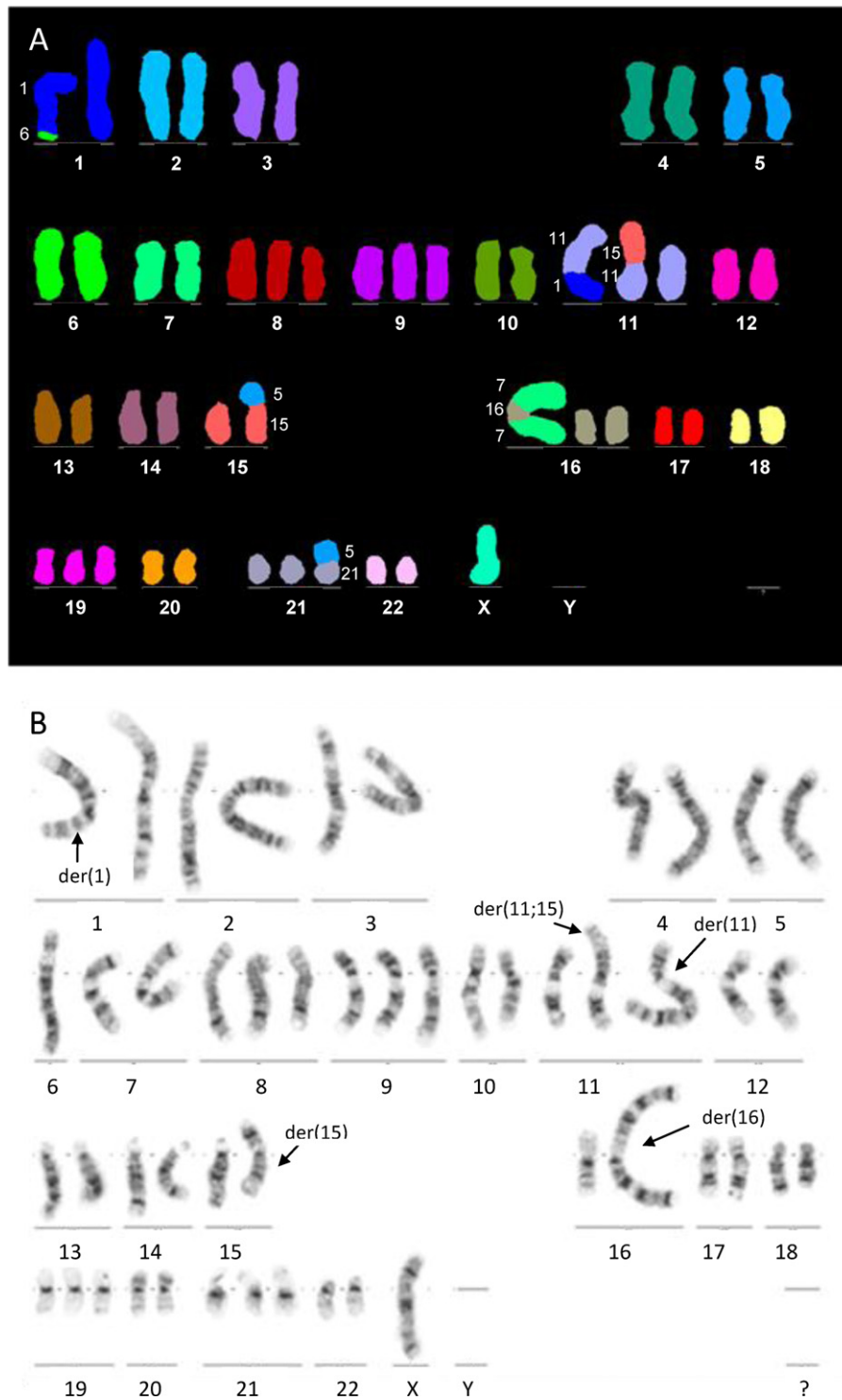


Fig. 5. The karyotype of UHKT-893 cell line. An example of typical chromosomal aberrations in one mitosis: mFISH (A) and classical cytogenetic analysis (B).

Although several cytokines have been demonstrated to stimulate the growth of human myeloma cell lines, IL-6 was found to be the only growth factor till now some of these cell lines are dependent on [1]. Accordingly, elevated serum IL-6 level is also a poor prognostic factor in MM patients [10]. GM-CSF dependent mouse plasmocytoma cell line was also established [11], but according to the following findings this cytokine dependency could indirectly reflect or substitute IL-6 dependency. GM-CSF has been demonstrated to be the factor, which acts directly on human myeloma cells by increasing their response to IL-6 [12,13]. This finding was

strengthened by another study, where GM-CSF only in co-action with IL-6 was absolutely necessary for the establishment of human “XG” myeloma and plasma cell leukemia cell lines and only IL-6, but not GM-CSF, was later required for growth of these cell lines [14]. IL-3 may represent another essential factor for growth and survival of myeloma cells, because its synergistic action with IL-6 increased the number of IL-6 receptors on plasma cell line [15]. IL-6 dependent growth could be also supported by induction of autocrine IL-6 production by IFN- α [16] and TNF- α , as was shown in IL-6 dependent XG cell lines [14]. A critical co-action of fibronectin with IL-6

Table 1
FACS analysis of UHKT-893 cell line.

		% of positivity or intensity (+ means expressed, – not expressed)
B-cell marker	CD9	neg.
	CD10	neg.
	CD19	neg.
	CD20	neg.
	CD21	neg.
	CD24	neg.
	CD138	99 (++)
	clgk	++
	clgλ	neg.
	slgk	+/-
	slgλ	neg.
T-/NK cell marker	CD1a	neg.
	CD3	neg.
	CD4	neg.
	CD5	neg.
	CD8	+/-
	CD27	neg.
	CD28	neg. → +
	CD96	neg.
Progenitor/activation/other marker	CD34	neg.
	CD38	99
	CD45	+ → 36
	CD98	99
	HLA-DR	neg.
Myelomonocytic marker	CD13	neg.
	CD15	neg.
	CD33	neg.
	CDw65	neg.
Adhesion marker	CD44	84
	CD56	+/- → 99 (++)
Cytokine or other receptor	CD25	11–18
	CD89	neg.
	CD95	46
	CD105	neg.
	CD117	+
	CD184	36

The change in antigen expression during continuous cultivation is marked with arrow. Neg. = negative: <10% of positive fluorescence related to the negative population of unstained cells.

in the establishment of MSG1 myeloma cell line was also recently demonstrated [17].

Although most of myeloma cell lines are independent of an external supply of IL-6, it appears they still require IL-6 for their growth. IL-6 is generated by these cells themselves and can act via an autocrine or intracrine loop that has been demonstrated by blocking studies with anti-IL-6 and anti-IL-6R antibodies and anti-sense oligodeoxynucleotides [2]. Several IL-6 dependent myeloma cell lines were also found to secrete this cytokine [1].

Autonomously developed independent growth of HL461 myeloma cell line, originally dependent on stromal-cell-conditioned medium, documents that myeloma cells may become independent of growth and survival factors during a long-term cultivation [7]. It has so far not happen spontaneously in UHKT-893 cell line till now (control experiments), but an adaptation to gradually decreasing IL-6 concentration for 6 months succeeded in the selection of IL-6 independent clone UHKT-893a.

Immunoanalysis of UHKT-893 cells proved a plasma cell phenotype (CD38+/CD138++ above all, [18]) distinct from that of B-, T-, NK and myelomonocytic, because the cells were nearly negative for surface markers of these cell types (Table 1). The cells were positive for CD45, but its expression declined during the continuous culture. This may suggest a shift to a more mature differentiating stage of plasma cells and such a decline is also associated with worse

overall survival of patients [18]. CD117 (C-kit) is not expressed on normal plasma cells, but on one-third of MM patients and also on UHKT-893 cells. This antigen is a hematopoietic growth factor receptor essential for hematopoietic progenitor cell survival, thus giving rise to the assumption that it could contribute to malignancy in CD117+ patients. However, the CD117+ group of patients had a better outcome [18]. During continuous cell cultivation, originally CD28– UHKT-893 cells became CD28+. CD28 is also not present in normal plasma cells, but its intensity of expression correlates with the high proliferation activity of myeloma cells and with advanced disease stage [18].

VH4-39 gene segment was recognized to be rearranged within IgVH genes, confirming the clonal origin of UHKT-893 cell line. This variable region of IgH was found to be somatically hypermutated, reflecting the fact that the plasma/myeloma cells passed through the process of antigen interaction. This was also present in myeloma cells in MM patients [19]. No intraclonal IgVH variation was noted either in these patients or in UHKT-893 cell line. Hence, this specific and stable pattern can be also used as a discrimination marker for this cell line.

The karyotype is very non-uniform and miscellaneous at least among myeloma cell lines [1]. Chromosomal translocation t(1;11), t(5;15) and t(5;21) and derivation der(11;15) and der(16) with determined breakpoints in UHKT-893 cells appear to be observed for the first time in myeloma cells (Fig. 5). Der(11;15) and t(5;21) are unique among all leukemia-lymphoma cell lines at least according to Drexler [1]. In addition to UHKT-893 cells, t(1;6) translocation was documented only in patient's myeloma cells in one study [20] and in two of 52 myeloma cell lines, but also with distinct breakpoints [1]. Another translocation t(1;11) was described only in two other myeloma cell lines. More frequent but again mutually different aberrations of chromosome 6 in myeloma cell lines were found including UHKT-893 cells [1]. The impact of these new aberrations in multiple myeloma remains to be explored.

The trisomy of chromosomes 9, 19 and 21 found in hyperdiploid UHKT-893 is often and recurrently evidenced in hyperdiploid MM [21]. Trisomy of chromosomes 9 and 19 has been shown to be associated with a favorable prognosis [22]. On the other hand, trisomy or tetrasomy of chromosome 8 has been associated with aggressive anaplastic myeloma [23,24]. Similarly, trisomy of this chromosome was found in UHKT-893 cells and the patient also underwent a rapid fatal outcome of the disease. The loss of chromosome X in a female (32%) belongs to the most frequent chromosomal losses in MM [24] and the chromosome X was also missing in UHKT-893 cells.

In conclusion, the novel IL-6 dependent UHKT-893 human multiple myeloma cell line and its IL-6 independent subline UHKT-893a were established, providing a widely useful model for basic and applied research of multiple myeloma. The UHKT-893 cell line is dependent on IL-6 both for survival and proliferation. They can be utilized in attempts to better understand the implication of this cytokine in the mechanism of drug resistance of myeloma cells. A number of unique chromosomal abnormalities of cells and other potential new cytogenetic changes open new challenges to explore the critical tumorigenic features and causative cellular mechanisms in myeloma disease.

Conflict of interest statement

Authors are without any conflict of interest.

Acknowledgements

We are very grateful to all co-authors for their kind and expert contribution to the present work. Our acknowledgements also belong to Mrs. Jitka Němcová from our Department, Dr.

Hana Hrbáčková (NRL for Viral Hepatitis, NIPH, Prague), Dr. Jana Schramlová (NRL for Viral Detection by Electron Microscopy, NIPH, Prague) and Dr. Hana Benáková (Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory, General University Hospital, Prague) for their willing help.

This study was supported by institutional grant from the Ministry of Health of the Czech Republic MZOUHKT2005 (00023736). Mass spectrometry analysis was supported by institutional grant MSM0021620858 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Contributions. IŠ and LU provided acquisition of data. LU, IrV, IV, ZH and PS contributed to the conception and design of the study. LU, IrV, IV, MP, RM, JB, KČ, VP, ZH, IM and PLJ interpreted and analyzed the data. LU, ZH, KK, and PS contributed to drafting the article or revising it critically for important intellectual content. PS and LU gave final approval of the version to be submitted.

References

- [1] Drexler HG. Guide to leukemia–lymphoma cell lines, 2nd ed. Braunschweig; 2010 [CD medium].
- [2] Goto H, Shimazaki C, Tatsumi T, Yamagata N, Fujita N, Tsuchiya M, et al. Establishment of a novel myeloma cell line KPMM2 carrying t(3;14)(q21;q32), which proliferates specifically in response to interleukin-6 through an autocrine mechanism. *Leukemia* 1995;9:711–8.
- [3] Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, et al. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood* 1991;78:1198–204.
- [4] Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 2001;97:1817–22.
- [5] Shirato L, Otsuki T, Yamada O, Namba M, Nakajima H, Nozawa Y, et al. Down regulation of protein kinase C during growth enhancement induced by interleukin-6 on a human myeloma cell line, KMS-11. *Cancer Lett* 1996;107:131–6.
- [6] Gougelet A, Mansuy A, Blay J-Y, Alberti L, Vermot-Desroches C. Lymphoma and myeloma cell resistance to cytotoxic agents and ionizing radiations is not affected by exposure to anti-IL-6 antibody. *PLoS One* 2009;4:e8026.
- [7] Scibienski RJ, Paglieroni T, Caggiano V, Lemongello D, Gumerlock PH, Mackenzie MR. Factors affecting the in vitro evolution of a myeloma cell line. *Leukemia* 1992;6:940–7.
- [8] Grebenova D, Kuzelová K, Pluskalova M, Peslova G, Halada P, Hrkal Z. The proteomic study of sodium butyrate antiproliferative/cytodifferentiation effects on K562 cells. *Blood Cell Mol Dis* 2006;37:210–7.
- [9] Pekova S, Marková J, Pajer P, Dvorak M, Cetkovsky P, Schwarz J. Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of IgVH rearrangement and Sybr-green-based real-time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn* 2005;9:23–34.
- [10] Petrucci MT, Ricciardi MR, Gregorj C, Ciapponi L, Savino R, Ciliberto G, et al. Effects of IL-6 variants in multiple myeloma: growth inhibition and induction of apoptosis in primary cells. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2369–75.
- [11] Vink A, Vandenebeele P, Uyttenhove C, Cayphas S, Van Snick J. Plasmacytoma growth factor activity of murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1988;141:1996–9.
- [12] Facon T, Lai JL, Nataf E, Preudhomme C, Zandecki M, Hammad M, et al. Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report on 46 patients. *Br J Haematol* 1993;84:743–5.
- [13] Zhang XG, Bataille R, Jourdan M, Saeland S, Banchereau J, Mannoni P, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood* 1990;76:2599–605.
- [14] Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 1994;83:3654–63.
- [15] Kobayashi M, Tanaka J, Imamura M, Maeda S, Iwasaki H, Tanaka M, et al. Up-regulation of IL-6-receptors by IL-3 on a plasma cell leukaemia cell line which proliferates dependently on both IL-3 and IL-6. *Br J Haematol* 1993;83:535–8.
- [16] Jourdan M, Zhang XG, Portier M, Boiron JM, Bataille R, Klein B. IFN-alpha induces autocrine production of IL-6 in myeloma cell lines. *J Immunol* 1991;147:4402–7.
- [17] 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.
- [18] Raja KR, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol* 2010;149:334–51.
- [19] Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 1992;80:2326–35.
- [20] Ng MH, Wong N, Tsang KS, Cheng SH, Chung YF, Lo KW. Recurrent chromosomal rearrangements involving breakpoints 3p21 and 19q13 in Chinese IgD multiple myeloma detected by G-banding and multicolor spectral karyotyping: a review of IgD karyotype literature. *Hum Pathol* 2001;32:1016–20.
- [21] Smetana J, Fröhlich J, Vranová V, Mikulášová A, Kuglík P, Hájek R. Oligonucleotide-based array CGH as a diagnostic tool in multiple myeloma patients. *Klin Onkol* 2011;24:S43–8.
- [22] Schilling G, Dierlamm J, Hossfeld DK. Prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of unknown significance. *Hematol Oncol* 2005;23:102–7.
- [23] Maslovsky I, Lugassy G, Blumental R, Ducach A, Yehuda O, Abeliovich D. Multiple chromosomal abnormalities in fulminant anaplastic myeloma. *Clin Lab Haematol* 1999;21:207–10.
- [24] Taberero D, San Miguel J, Garcia-Sanz M, Nájera L, García-Isidoro M, Peréz-Simon JA, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 1996;149:153–61.



ORIGINAL ARTICLE

Characterization of a new human plasma cell leukemia cell line UHKT-944

Ilona Vyhlídalová^{1,2}, Lenka Uherková¹, Markéta Pleschnerová³, Ivan Špička⁴, Jana Březinová⁵, Kyra Michalová⁵, Kamila Čermáková⁶, Veronika Polanská⁶, Petr L. Jedelský^{7,8}, Eva Hamšíková⁹, Kateřina Kuželová¹ and Petr Stöckbauer¹

¹Department of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT), Prague; ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague; ³Department of Immunology, Faculty of Science, Charles University, Prague; ⁴1st Department of Internal Medicine, Division of Hematology, General Faculty Hospital, Charles University, Prague; ⁵Department of Cytogenetics, IHBT, Prague; ⁶Leukemia PCR Diagnostics Laboratory, IHBT, Prague; ⁷Faculty of Science, Charles University, Prague; ⁸Faculty of Arts, Charles University, Prague; ⁹Department of Experimental Virology, IHBT, Prague, Czech Republic

Abstract

Objective: A new interleukin-6 (IL-6)-dependent plasma cell leukemia cell line UHKT-944 was established from bone marrow cells derived from a 55-yr-old man with plasma cell leukemia. **Results:** The cell line possesses phenotypic characteristics of plasma cells including the production of a monoclonal immunoglobulin IgA1-kappa. VH3-9 region of IgVH genes was rearranged and somatically hypermutated. The UHKT-944 cells were found to be negative for most of tested B-cell, T-cell, and myeloid markers. According to cytogenetic analysis, the cells were classified as near tetraploid with several numerical and structural abnormalities including the t(14;20) involving IgH locus. **Conclusion:** The established permanent plasma cell leukemia cell line is a suitable model for the study of cellular and molecular mechanisms of pathogenesis of this rare malignant disease.

Key words plasma cell leukemia; plasma cell; human plasma cell line; multiple myeloma; interleukin-6 (IL-6)

Correspondence Petr Stöckbauer, Department of Cellular Biochemistry, Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 12820 Prague 2, Czech Republic. Tel: +420 221977280; Fax: +420 221977113; e-mail: Petr.Stockbauer@uhkt.cz

Accepted for publication 11 December 2014

doi:10.1111/ejh.12505

Plasma cell leukemia (PCL) is a clonal B-cell malignancy characterized by a high level of terminally differentiated plasma cells in peripheral blood. It is considered to be a rare form of multiple myeloma (MM). PCL can either arise *de novo* (primary PCL) or as a leukemic transformation of existing MM (secondary PCL). Despite substantial progress in targeted therapy of MM and PCL comprising novel drugs such as bortezomib, thalidomide, and its analog lenalidomide, the disease still remains incurable (1, 2). The median age at PCL diagnosis ranges between 52 and 65 yr, and the median survival is counted in months (2).

Interleukin 6 (IL-6) is a key growth and survival factor for multiple myeloma cells both *in vitro* and *in vivo* (3, 4). The growth stimulatory activity of IL-6 and its role in myeloma progression was proven by blocking IL-6 activity by anti-IL-6 antibody (4–6). Since this was discovered, the number of myeloma and plasma cell leukemia cell lines has

increased (7). Seventeen plasma cell leukemia cell lines have been established to date. Each cell line may reflect heterogeneity of the disease and serves as an indispensable tool for the development and primary testing of new therapeutics.

In this study, we characterized the new plasma cell leukemia cell line UHKT-944, which is strictly dependent on exogenous IL-6.

Materials and methods

Case report

A 55-yr-old man suffering from fatigue was diagnosed with primary plasma cell leukemia of IgA- κ type in June 2010. FACS analysis showed the presence of 25% plasma cells in the bone marrow and 25% in the peripheral blood. Patient's

serum contained 45.5 g/L IgA, and Bence-Jones protein type kappa was found in his urine. In his serum, the kappa/lambda ratio was 49.21. The serum further contained 130 g/L total protein level, 28 g/L serum albumin, 11 mg/L β 2-microglobulin, 145 μ mol/L creatinine, 85 g/L hemoglobin, and normal Ca^{2+} level. 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.

Cell line establishment and cultivation

The patient's bone marrow sample was obtained in June 2010. Mononuclear cells were separated by gradient centrifugation using Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) and cultivated in a single culture flask in RPMI-1640 medium (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 1 ng/mL IL-6 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% fetal bovine serum (Biochrom), 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C. From the 9th month of cultivation, perpetual attempts to establish IL-6 independent cell line have been performed as follows. The cells were cultivated in a glass flask in the medium without IL-6. In this culture, the cells were adhered to poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) to easily remove the harmful bulk of accumulated floating dead cells, which were not able to survive without IL-6. IL-6 was added when the number of living cells strongly decreased.

Cell growth

The plasma cell morphology has been confirmed by Giemsa staining of cytopsin preparations. For viability measurement, the cells were stained with trypan blue solution (Sigma-Aldrich) and were then counted on automated cell counter (TC 10, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). In the presence of various concentrations of IL-6, the cell proliferation was measured colorimetrically using Cell Proliferation Reagent kit WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. For determination of doubling time, the cells were counted during their growth phase and analyzed by GraphPad Prism version 5.02 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Flow cytometry cell cycle analysis, based on the measurement of cellular DNA content, was used to determine the number of polynucleated cells of 4-yr-old cell line. Briefly, the cells (5×10^5) were harvested, washed once in PBS, fixed in 70% ethanol, incubated for 30 min in 4°C, and stored at -20°C. On the day of the analysis, the cells were washed twice in PBS and incubated for 2 h at 4°C in 0.5 mL of the modified Vindelov's propidium iodide buffer (10 mM Tris,

pH 8, 1 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 20 μ g/mL propidium iodide, and 10K units ribonuclease A). The fraction of cells with more than 2N DNA content was determined using LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The measurement was performed at low event rate (50 events per sec), and singlets were gated in FSC-A vs. FSC-H dotplots.

Immunophenotype FACS analysis

Surface markers on UHKT-944 cells were examined by the following primary antibodies against: CD3, CD28, CD33, CD38, CD45, CD56, CD138, CD117 (Invitrogen); CD10, CD24 (Ortho Diagnostic System Inc., NJ, USA); CD4, CD13 (eBioscience, San Diego, CA, USA); κ and λ light chains (Dako, Glostrup, Denmark); CD5 (clone L17F12, a gift from Prof. Ronald Levy, Stanford, CA); CD8 (BioLegend, San Diego, CA, USA); CD1a, CD19, CD20, CD21, CD25, CD85k, CD123 (Beckman Coulter Inc., CA, USA); CD34 (Exbio, Prague, Czech Republic); CD184 (Gen-Probe, San Diego, CA, USA); HLA-DR (clone B33.1, a gift from Dr. Bice Perrusia, Wistar Institute, Philadelphia, USA); CD98, CDw65, CD89, CD95 (Immunotech, Prague, Czech Republic); CD9 (Hybritech Inc, San Diego, CA, USA); CD15 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA); CD105 (Ansell, MN, USA). After incubation with primary antibody, the cells were stained with secondary antibody RPE-conjugated F(ab')₂ fragment of goat or rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako). Phosphate-buffered saline was used in washing and incubation steps. The following hematopoietic cell lines with known cell surface antigens were used as positive and negative controls: CML-T1, JURL-MK1, and KARPAS-299 (DSMZ); JURKAT (ECACC), HEL (from Dr. Paul Martin, Fred Hutchinson Cancer Research Centre, Seattle, WA, USA); HL-60 (from Dr. R. C. Gallo, National Cancer Institute, Bethesda, USA); MOLM-7 (from Dr. Y. Matsuo, Fujisaki Cell Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan); KG-1 and NALM-16 (from Dr. Jun Minowada, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, USA). Intensity of fluorescence was measured by flow cytometry (Coulter Epics XL). Only the population of living cells, recognized on FS/SS scattergram as a separated lower population with unaffected cell granularity, was gated and included in the assessment.

Classical cytogenetic and mFISH analysis

For cytogenetic analysis, bone marrow cells and 9-month-old UHKT-944 cell line were cultured for 24 h in RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum. Chromosomal preparations were made according to the standard techniques using colcemide, hypotonic treatment, fixation in methanol/acetic acid, and G-banding with Wright stain. For karyotyping, mitoses were analyzed using the IKAROS

imaging system (MetaSystems, Altussheim, Germany). Multicolor FISH (mFISH) analysis was performed using 24 XCyte color kit (MetaSystems). Image capturing and acquisition was performed using Zeiss Axioplan 2 optical microscope, and the ISIS imaging system (MetaSystems) was used for mFISH.

Sequence analysis of IgVH gene rearrangements

RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer. cDNA was synthesized using SuperScript II and random hexamers (Invitrogen). 7 IgVH families were amplified in 6 individual PCRs (VH1 and VH7 families in the same reaction mixture) employing primers described by Pekova *et al.* (8) using Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 'touch-down' PCR program. The temperature of annealing steps was gradually decreased from 65 to 50°C. PCR products were separated on 2% agarose gel with ethidium bromide. The band around 300 bps was cut out and purified with QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Germany). Sequencing was performed on ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer using Big Dye Terminator 3.1 kit (Applied Biosystems). The resulting sequences were analyzed in Chromas 2.31 program and aligned to the nearest IgVH germline sequences using databases of IgBLAST and IMGT programs. Sequences with <98% homology to the closest IgVH germline sequence were considered to be mutated.

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). The cells were cultivated from an initial concentration of 0.1×10^6 cells/mL, and the cell supernatant was analyzed on the third day of cultivation.

Mass spectrometry

Mass spectrometry MALDI-TOF was employed to analyze two selected protein spots from a two-dimensional (2D) electrophoresis gel of whole-cell lysate of UHKT-944 cells after standard in-gel digestion. Protein spots were selected based on the comparison with protein map of UHKT-893 cell line, which was established in our laboratory in the same year as UHKT-944 (9). One of the protein spots was chosen owing to the high protein expression in UHKT-944 cells, and its absence in UHKT-893 protein map. The second spot was selected due to its position on 2D electrophoresis protein map, which corresponded to a fragment of immunoglobulin kappa light chain as known from UHKT-893 cells. 2D electrophoresis was carried out according to

the procedure described by Grebenova *et al.* (10). To improve the quality of 2D electrophoresis results, 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, USA) was used for protein precipitation. Resulting protein mass spectra were compared with GenBank non-redundant protein database by Mascot software v. 2.1 (Matrix Science, Boston, MA, USA). Only hits that were scored as significant ($P < 0.05$) were included.

Analysis of anti-HBsAg antibody

The supernatant from UHKT-944 cells was cultivated for 3 d from a starting cell density 0.2×10^6 cells/mL and a whole-cell lysate (20×10^6 cells were tested). The cells were lysed in 300 µL of non-denaturing cell lysis buffer from Caspase-3 colorimetric assay kit (Biovision Inc., Mountain View, CA, USA) with addition of 1 µL of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich).

Potential specificity of IgA antibody against hepatitis B virus (HBsAg) was measured by a direct non-competitive ELISA using ETI-AB-AUK-3 (anti-HBs) kit (DiaSorin, Italy) according to the manufacturer's instructions. Samples were further analyzed by Architect anti-HBs assay (Abbott, Prague, Czech Republic) measured on Abbott Architect i1000 (Abbott) at the National Reference Laboratory (NRL) for Viral Hepatitis (National Institute of Public Health [NIPH], Prague).

Mycoplasma detection

Mycoplasma spp. contamination has been examined by standard fluorescent DNA staining of the cells. Before staining, the cells were cultured in antibiotic-free medium for at least 1 wk, then fixed with methanol/acetic acid at a 3 : 1 ratio and stained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). The absence of mycoplasma DNA has been verified by fluorescence microscopy.

EBV infection

DNA of UHKT-944 cell line was routinely examined for the presence of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by PCR at the NRL for Herpetical Viruses (NIPH, Prague).

Results

Cell line establishment and growth

The start of cell proliferation was noticed two months after the culture initiation. The cells proliferated on a stromal feeder layer, which developed from the original bone marrow stromal cells. The culture medium was changed twice a week. Following each transfer to stroma cell-free culture flask without IL-6, the cells stopped proliferating

and were progressively dying. IL-6 was found to be the factor responsible for the survival and growth of UHKT-944 cells (Fig. 1). Although IL-6 concentration of 0.5 ng/mL was found to be sufficient for these vital processes, the cells were permanently cultivated in the presence of 1 ng/mL IL-6. The same concentration was used in other studies involving myeloma cell lines. The cells continued to proliferate without any stromal feeder layer. Attempts to establish IL-6 independent UHKT-944 subline were unsuccessful. The dependence of UHKT-944 cells on IL-6 has been repeatedly verified. UHKT-944 cells grew predominantly individually or formed small colonies. Their doubling time ranged from 65 to 77 h. The minimal cell density necessary for the cell growth, counted in a plastic 25 cm² culture flask, was 0.05×10^6 cells/mL and the maximum 0.6×10^6 cells/mL. Cytospine preparations of UHKT-944 cells stained by Giemsa showed a mixture of mononuclear, larger binuclear, and multinuclear cells with plasma cell morphology (Fig. 2). Up to twelve nuclei in one cell were found among UHKT-944 cells. DNA content analysis by flow cytometry revealed the presence of about 5% of polynucleated cells in UHKT-944 cell line.

Immunophenotype FACS analysis

UHKT-944 cells were negative for most of the tested B-cell, T-cell, and myeloid markers. The expression of CD138 and CD38 showed plasma cell phenotype. Immunophenotype of the cell line in comparison with other plasma cell-derived cell lines (7, 11, 12) is summarized in Table 1. The analysis also revealed the presence of monoclonal cytoplasmic Ig kappa light chain.

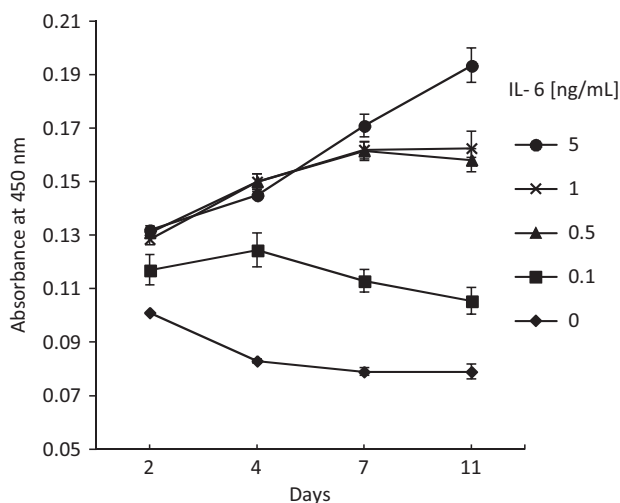


Figure 1 Effect of exogenous IL-6 on proliferation of UHKT-944 cell line. Viable cell density was measured by WST-1 assay 2, 4, 7, and 11 d after their incubation with different IL-6 concentrations. Experiments were performed in triplicate. Results represent means and standard deviations.

Immunoglobulin analysis

UHKT-944 cells were found to produce IgA1-kappa without secretion of free light chains as deduced from the following findings.

Using nephelometry, UHKT-944 cells were found to secrete IgA. The control medium contained <9.26 mg/L IgG, <0.25 mg/L IgA, and <0.3 mg/L IgM. The concentration of free light chains of immunoglobulins was below the detection limit. In the conditioned medium from UHKT-944 cells, <9.26 mg/L IgG, IgA = 10.5 mg/L, <0.3 mg/L IgM, <0.38 mg/L free kappa, and <0.5 mg/L free lambda light chains were found.

In agreement with nephelometry findings, mass spectrometry revealed the amino acid sequence of a constant region of human immunoglobulin alpha-1 (IgA1) heavy chain in the selected protein spot from the 2D electrophoresis. In keeping with the finding of monoclonal cytoplasmic kappa light chain by flow cytometry, the protein found in the second spot showed similarity to human Fab region of kappa light chain. The highest similarity was to kappa light chain with specificity to HBsAg. Based on this finding, secreted IgA and IgA from whole-cell lysate were analyzed by ELISA and Architect anti-HBs assay to verify whether the antibody produced by UHKT-944 cells really displays the affinity to HBsAg. Unfortunately, the result of both these analyses was negative (data not shown).

In 9-month-old UHKT-944 cells, the rearrangement was found of VH3-9 IgVH genes with 91% homology to the germline sequence according to IGBLAST and IMGT databases.

EBV and mycoplasma detection

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

Cytogenetic analysis

The cytogenetic analysis of UHKT-944 cells revealed a nearly tetraploid karyotype with several structural and numerical alterations. The composite karyotype of 9-month-old UHKT-944 cells was as follows:

79~95<4n>,XXYY,-1,-1,der(1)t(1;9)(p11;p11)x2,der(1)t(1;18)(p11;q22),+3,+3,-4,del(5)(q?), t(6;7)(q23;q22),der(6)t(6;7)(q23;q22), der(6)t(6;17)(q13;?), dic(1;7)(?;?)t(6;7)(q23;q22)x2,-8,-9, -9,-10,-11,-13,-13,-13,der(13)t(1;13)(?;p11),t(14;20)(q32;?)x2,-15,-15,dic(15;16)(?;?)x2,-18, der(18)t(6;18)(?;q22),+21,+21 [cp18]. Most of these aberrations reflect the karyotype of patient's bone marrow cells obtained at the time of diagnosis. The original karyotype was the following: 47~48,XY,dup(1)(q?),+3,der(6)t(6;7)(q23;?),dic(1;7)(?;?)t

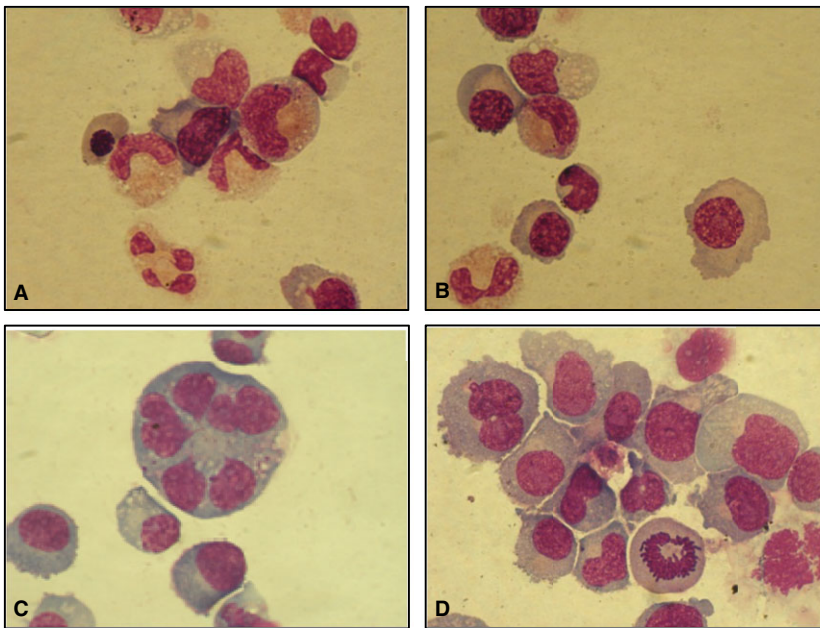


Figure 2 Giemsa staining of patient's bone marrow (A and B) and UHKT-944 cell line (C and D). The typical plasma cell line morphology is shown: Different cell size, multinuclear cells, mitosis. Magnification 1500 \times .

(6;7)(q23:?) $+$ 9,-13,t(14;20)(q32:?) $,-$ 15,dic(15;16)(?:?) $+$ 21 [cp7] (Fig. 3).

Discussion

The establishment of a hematopoietic cell line from the bone marrow is still a coincidental event. In spite of this, we succeeded in establishing the IL-6-dependent plasma cell leukemia cell line from the bone marrow of a patient with aggressive plasma cell leukemia.

Kawano *et al.* (4) first showed that myeloma cells proliferate in response to IL-6. Other factors such as fibronectin can also be critical (12). Till now, 29% and 8% of plasma cell-derived cell lines have been established with dependence on IL-6 or on stroma cells, respectively. IL-6 has been found to be nearly the only cytokine these cell lines are dependent on (7, 9). In accordance with this finding, IL-6 was found to be essential for both survival and growth of UHKT-944 cells.

UHKT-944 cells express CD38 and CD138, which distinguish them from their B-cell progenitors, and point to the plasma cell phenotype. Aberrant expression of T-cell costimulatory receptor CD28 on the surface of most of PCL and MM cell lines is very frequent and is also present on UHKT-944 cells. Indeed, this appears to be of significant importance emerging from a study where CD28-mediated ligation of CD80/CD86 on stromal dendritic cells directly transduced a prosurvival signal to myeloma cell, protecting it against chemotherapy and growth factor withdrawal-induced death, and induced the dendritic cells to produce the prosurvival cytokine IL-6 (13). The aberrant expression of CD28 and myeloid CD33 (14), the presence of CD98 (15),

and the absence of CD56 (16–18) and CD117 (19) have been shown to correlate with a poor prognosis of plasma cell-derived malignancies. The same expression pattern (except slight expression of CD56) was found in UHKT-944 cells, which is in agreement with rapid progress of the patient's disease. On the other hand, CD105 (endoglin) with crucial role in angiogenesis and therefore in tumor survival and expansion was negative in UHKT-944 cells, but positivity of all tested MM cell lines is striking. CD85k, CD98, and CD184 have not been tested in either of plasma cell-derived cell lines at least in the point of their establishment, but were positive on UHKT-944 cells. Unique and strong coexpression of CD85k (ILT-3, LIR-5) with CD123 (IL-3R alpha) is peculiar, because both are associated with and used for the detection of plasmacytoid dendritic (pDC) cells. Also peculiar case of acute myeloid leukemia mimicking plasmacytoid dendritic precursor cell leukemia appeared (20). CD1a, found on UHKT-944 cells, is also expressed on dendritic cells. CD89, the human IgA Fc receptor, should be present on myeloid cells and T lymphocytes and corresponds with its absence on UHKT-944 cells. CD98 (LAT1) plays a key role in cell growth and survival. Recent study shows LAT1 is a significant prognostic factor. Correspondingly with UHKT-944, its overexpression on myeloma cells was associated with high proliferation in patients with MM and their poor prognosis (15). Although CD184 (CXCR4, chemokine receptor) was not tested on other plasma cell-derived cell lines at their establishment, it was clearly presented on UHKT-944 cells and also on plasma cells in patients with MM (21). It was demonstrated to be involved in a homing and an expansion of MM cells (22). CD3, CD8, CD34, CD13, CD15, and CD65 were negative on

Table 1 Cell surface markers analysis of UHKT-944 cell line and their comparison with other plasma cell-derived cell lines

Cell surface marker	UHKT-944 Expression level ¹	Other cell lines					
		PCL		MM		Plasmacytoma	
		Positivity	<i>n</i>	Positivity	<i>n</i>	Positivity	<i>n</i>
Plasma cell marker							
CD 138	+++	82%	11	82%	28	100%	1
T-/NK cell marker							
CD1a	+	50%	2	0%	2		0
CD3	–	0%	11	0%	37	0%	2
CD4	–	0%	5	7%	27	50%	2
CD5	–	0%	9	3%	35	0%	2
CD8	–	0%	5	0%	24	0%	2
CD28	++	67%	3	91%	23		0
B-cell marker							
CD9	+	0%	3	46%	13		0
CD10	–	7%	15	22%	46	33%	3
CD19	–	6%	18	10%	51	0%	3
CD20	–	12%	17	13%	47	0%	3
CD21	–	25%	8	14%	29	0%	1
CD24	–	20%	5	5%	20		0
Progenitor/activation/other marker							
CD34	–	0%	4	0%	15	0%	1
CD38	++	83%	18	82%	50	100%	3
CD45	+	43%	7	40%	20		0
CD56	+	70%	10	41%	41	100%	1
CD85k	+++		0		0		0
CD98	+++		0		0		0
HLA-DR	+	23%	13	36%	44	67%	3
Myelomonocytic marker							
CD13	–	0%	9	0%	31	0%	2
CD15	–	0%	5	0%	20		0
CD33	++	13%	8	21%	19	0%	2
CDW65	–	0% ²	1	0% ²	7		0
Cytokine/other receptor							
CD25	–	0%	5	7%	27		0
CD89	–		0		0		0
CD95	–	0%	1	67%	6		0
CD105	–		0	100%	4		0
CD117	–	50%	2	0%	5		0
CD123	+++		0	0%	1		0
CD184	++		0		0		0

¹Expression level is evaluated as negative (–), weak (+), moderate (++), and strong (+++).

²CD65 has been tested. Positivity is counted from number of tested cell lines (*n*) for the given marker. Only clear positivity of plasma cell-derived cell lines is comprised.

UHKT-944 and always negative in plasma cell lines at the time of their establishment. Other markers are differently expressed among the cell lines.

UHKT-944 cells were found to produce IgA1 and κ light chain, which is in agreement with the finding of IgA and κ light chain in the patient's serum and urine, respectively. Mass spectrometry analysis showed similarity to kappa light chain with specificity to HBsAg that could be potentially utilized in the research or human medicine. Unfortunately, this anti-HBsAg specificity was not confirmed by further analyses.

Concerning genotype changes, chromosomal translocations within the IgH locus are common in MM and PCL. Several

studies have shown that the prevalence of IgH chromosomal translocations increases with the progress of the disease (23–25). More specifically, t(14;20) translocation is associated with poor prognosis in MM and was also detected in some MM and PCL cell lines including UHKT-944 (26, 27). 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. Similarly, 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 and is the

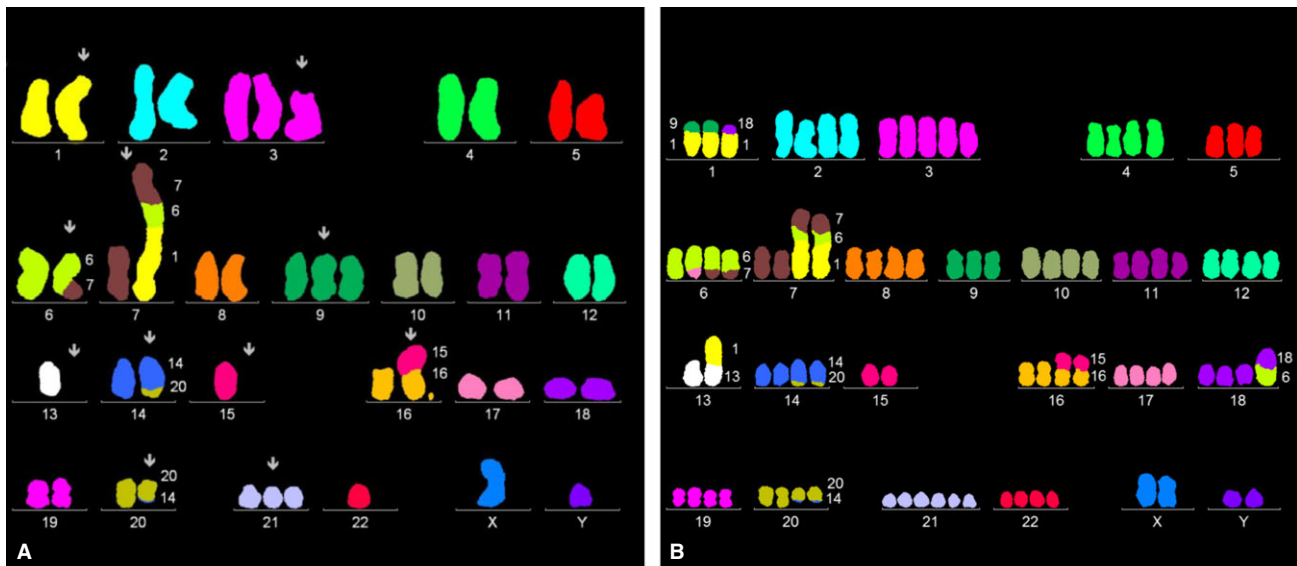


Figure 3 The karyotype of patient's bone marrow (A) and UHKT-944 cell line (B) obtained by mFISH analysis. Karyotypes show both numerical and structural chromosomal changes. The composite karyotype is described in the text.

most abundant missing chromosome among plasma cell-derived cell lines (28, 29). One or more missing or redundant chromosomes of the given chromosome detected in UHKT-944 cells have been also found in several PCL, MM, and plasmacytoma cell lines: In descending order, the most abundant numeric chromosome changes in PCL are -13, -9, -15, -10, -1/-11/-18, +3/-4/-8/+21; in all plasma cell lines: -13, -10, -15, -8/+21, -9, -1/-4, +3, -11, -18. UHKT-944 cells carry *der(13)t(1;13)*, which was also found in FR4 plasmacytoma cell line (30). *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. Other structural abnormalities in UHKT-944 karyotype appear to have been noted for the first time among plasma cell lines (7, 11, 12).

The analysis of IgVH gene rearrangements provides a prognostic tool in hematopoietic malignancies and an evidence of clonal origin of the disease (31, 32). The rearrangement of VH3-9 gene found in UHKT-944 cells was rarely found in MM, and the gene is also rarely expressed in other malignant and non-malignant B-cell populations (33).

In conclusion, the established IL-6-dependent UHKT-944 cell line can be utilized for further studies, especially those of the cytokine role, in basic and applied research of myeloma and plasma cell leukemia, and, possibly, for vaccine or hybridoma development.

Acknowledgements

We would like to acknowledge all co-authors and other contributors - Mrs. Jitka Němcová (IHBT, Prague), Dr. Hana Hrbáčková and Dr. Vratislav Němeček (NRL for Viral Hepatitis, NIPH, Prague); Dr. Hana Benáková (Institute of

Clinical Biochemistry and Laboratory, General University Hospital, Prague) for their expert and willing help.

Funding

The work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (Project for conceptual development of research organization No 00023736). The author thanks to the Ministry of Education of the Czech Republic for scholarship and to Specific University Research Project No. 33779266 awarded by Charles University Prague for additional financial support.

References

1. Field-Smith A, Morgan GJ, Davies FE. Bortezomib (Velcade™) in the treatment of multiple myeloma. *Ther Clin Risk Manag* 2006;**2**:271–9.
2. Fernández de Larrea C, Kyle RA, Durie BGM, *et al.*, on behalf of the International Myeloma Working Group. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 2013;**27**:780–91.
3. Bang XG, Klein B, Bataille R. Interleukin-6 is a potent myeloma cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* 1989;**74**:11–3.
4. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, *et al.* Autocrine generation and requirement of BSF-2fL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988;**332**:83–5.
5. Bataille R, Barlogie B, Lu ZY, Rossi JF, Lavabre-Bertrand T, Beck T, Wijdenes J, Brochier J, Klein B. Biologic effects of

- anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 1995;**86**:685–91.
6. Klein B, Widjenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, Liautaud J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B. Murine anti-IL-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. *Blood* 1991;**78**:1198–204.
 7. Drexler HG. *Guide to Leukemia–Lymphoma Cell Lines*, 2nd edn. Braunschweig: DSMZ, 2010. [CD medium].
 8. Pekova S, Markova J, Pajer P, Dvorak M, Cetkovsky P, Schwarz J. Touch – down reverse transcriptase – PCR detection of IgVH rearrangement and Sybr – green – based real – time RT – PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Diagn* 2005;**9**:23–34.
 9. Uherkova L, Vancurova I, Vyhldalova I, *et al.* Novel human multiple myeloma cell line UHKT-893. *Leuk Res* 2012;**37**:320–6.
 10. Grebenova D, Kuzelova K, Pluskalova M, Peslova G, Halada P, Hrkal Z. The proteomic study of sodium butyrate antiproliferative/cytodifferentiation effects on K562 cells. *Blood Cells Mol Dis* 2006;**37**:210–7.
 11. Hattori Y, Du W, Yamada T, Ichikawa D, Matsunami S, Matsushita M. A myeloma cell line established from a patient refractory to thalidomide therapy revealed high-risk cytogenetic abnormalities and produced vascular endothelial growth factor. *Blood Cancer J* 2013;**3**:e115.
 12. 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.
 13. Nair JR, Carlson LM, Koorella C, Rozanski CH, Byrne GE, Bergsagel PL, Shaughnessy JP Jr, Boise LH, Chanan-Khan A, Lee KP. CD28 expressed on malignant plasma cells induces a pro-survival and immunosuppressive microenvironment. *J Immunol* 2011;**187**:1243–53.
 14. 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;**2104**:8. Article ID 893243
 15. 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**:1496–502.
 16. Lima M, Teixeira M, Fonseca S, *et al.* Immunophenotypic aberrations, DNA content and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol Dis* 2000;**26**:634–45.
 17. 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**:1293–9.
 18. 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**:377–82.
 19. Mateo G, Montalbán 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**:2737–44.
 20. 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**:65–9.
 21. 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**:2708–17.
 22. Menu E, Asosingh K, Indraccolo S, *et al.* The involvement of stromal derived factor 1 alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model. *Haematologica* 2006;**91**:605–12.
 23. 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**:2185–91.
 24. 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**:1417–24.
 25. Fonseca R, Blood E, Rue M, *et al.* Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;**101**:4569–75.
 26. Boersma-Vreugdenhil GR, Kuipers J, Van Stralen E, Peeters T, Michaux L, Hagemeijer 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**:355–63.
 27. 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**:1221–5.
 28. Avet-Louseau H, Daviet A, Sauner S, Bataille R. Intergroupe Francophone du Myélome. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 2000;**111**:1116–7.
 29. Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau CH, Callet-Bauchu E, Terré CH, Lafage-Pochitaloff M, Désangles F, Ramond S, Talmant P, Bataille R. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence *in situ* hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood* 2001;**97**:822–5.

30. 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**:600–5.
31. Damle RN, Wasil T, Fais F, *et al.* Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;**94**:1840–7.
32. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;**94**:1848–54.
33. Rettig MB, Vescio RA, Cao J, *et al.* VH gene usage is multiple myeloma: complete absence of the VH4.21 (VH4-34) gene. *Blood* 1996;**87**:2846–52.

Keywords: bone marrow microenvironment; drug resistance; histone deacetylase inhibitors; multiple myeloma; plasma cell leukemia

NEOPLASMA
Manuscript draft

Title: Histone deacetylase inhibitors in plasma cell leukemia treatment: Effect of bone marrow microenvironment

Running title: Effect of HDACi on PCL cell line UHKT-944

Create date: 2016-05-02

<i>First name</i>	<i>Last name</i>	<i>Affiliations</i>
Ilona	Burianová	1. Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic 2. Clinical Biochemistry, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic 3. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic
Kateřina	Kuželová	1. Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic
Ondřej	Mitrovský	1. Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic
Ivan	Špička	1. 1st Department of Internal Medicine, Division of Hematology, General Faculty Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic
Petr	Stockbauer	1. Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic
Markéta	Žáčková	1. Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

Corresponding author: Markéta Žáčková <marketa.zackova@uhkt.cz>

Abstract

In the study we analysed the effect of histone deacetylase inhibitors (HDACi) suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and valproic acid (VPA) on human plasma cell leukemia (PCL) cell line UHKT-944 in the presence of bone marrow microenvironment (BMM). For the analysis, the cells were cultured alone, with bone marrow stromal cells (BMSCs), with extracellular matrix (ECM) components or with interleukin-6, and treated with varied concentrations of SAHA and VPA for 24/48 hours. To study the effect of HDACi, we investigated cell proliferation, apoptosis, cell cycle and changes in selected signalling pathways. We found that both SAHA and VPA induced apoptosis, but had no effect on the cell cycle distribution of UHKT-944 cells. Investigation of the antiproliferative effect of SAHA and VPA revealed that BMSCs and high concentration of interleukin-6 had partial protective effect against SAHA or both inhibitors, respectively. No effect of ECM components on the efficiency of HDACi was observed. We further revealed that VPA down-regulated STAT3 phosphorylation while both inhibitors decreased Akt phosphorylation. In conclusion, VPA and SAHA might represent an additional therapeutic strategy in the PCL treatment. Protective effect of BMM should be taken into account when investigating prospective therapeutic agents against plasma cell disorders.

1 **Histone deacetylase inhibitors in plasma cell leukemia treatment: Effect of bone marrow**

2 **microenvironment**

3
4 Iona Burianová^{1,2,3}, Kateřina Kuželová¹, Ondřej Mitrovský^{1,2}, Ivan Špička⁴, Petr Stöckbauer¹
5 and Markéta Žáčková¹

6
7 Running title: Effect of HDACi on PCL cell line UHKT-944

8
9 Original article

10
11 ¹Department of Proteomics, Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT), Prague,
12 Czech Republic

13 ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech
14 Republic

15 ³Department of Clinical Biochemistry, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

16 ⁴1st Department of Internal Medicine, Division of Hematology, General Faculty Hospital,

17 Charles University, Prague, Czech Republic

18
19 Correspondence to: Markéta Žáčková Ph.D.

20 Department of Proteomics

21 Institute of Hematology and Blood Transfusion

22 U Nemocnice I

23 12820 Prague 2 Czech Republic

24 Phone: +420 221977321, Fax: +420 221977113

25 E-mail: marketa.zackova@uhkt.cz

26 **Abstract**

27

28 In the study we analysed the effect of histone deacetylase inhibitors (HDACi) suberoylanilide
29 hydroxamic acid (SAHA) and valproic acid (VPA) on human plasma cell leukemia (PCL) cell
30 line UHKT-944 in the presence of bone marrow microenvironment (BMM). For the analysis,
31 the cells were cultured alone, with bone marrow stromal cells (BMSCs), with extracellular
32 matrix (ECM) components or with interleukin-6, and treated with varied concentrations of
33 SAHA and VPA for 24/48 hours. To study the effect of HDACi, we investigated cell
34 proliferation, apoptosis, cell cycle and changes in selected signalling pathways. We found that
35 both SAHA and VPA induced apoptosis, but had no effect on the cell cycle distribution of
36 UHKT-944 cells. Investigation of the antiproliferative effect of SAHA and VPA revealed that
37 BMSCs and high concentration of interleukin-6 had partial protective effect against SAHA or
38 both inhibitors, respectively. No effect of ECM components on the efficiency of HDACi was
39 observed. We further revealed that VPA down-regulated STAT3 phosphorylation while both
40 inhibitors decreased Akt phosphorylation. In conclusion, VPA and SAHA might represent an
41 additional therapeutic strategy in the PCL treatment. Protective effect of BMM should be
42 taken into account when investigating prospective therapeutic agents against plasma cell
43 disorders.

44

45

46 **Key words:** bone marrow microenvironment, drug resistance, histone deacetylase inhibitors,
47 multiple myeloma, plasma cell leukemia

48

49

50 **Introduction**

51 Plasma cell leukemia (PCL) is a lymphoproliferative disorder characterized by high level of
52 monoclonal plasma cells in the bone marrow and in the peripheral blood. It is considered to be
53 a rare variant of multiple myeloma (MM) and is associated with poor prognosis with median
54 survival counted in months [1,2]. PCL can arise *de novo* (primary PCL) or as a leukemic
55 transformation of existing MM (secondary PCL). Despite the progressive treatment
56 approaches comprising novel drugs like proteasome inhibitors (PI) and/or immunomodulatory
57 drugs (IMiDs) as well as combination chemotherapy [3,4,5] and stem cell transplantation, the
58 disease still remains incurable [6,7,8]
59 Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are promising therapeutic agents for cancer treatment
60 including multiple myeloma [9]. Inhibition of histone deacetylation results in an open
61 chromatin structure and subsequently in changes in the gene transcription. This leads to
62 apoptosis, differentiation and/or growth arrest of tumour cells both *in vitro* and *in vivo*
63 [10,11].
64 Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) is an HDACi approved by the U.S. Food and Drug
65 Administration for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. SAHA induces apoptosis and
66 growth arrest in other haematological malignancies including myeloma and its efficacy
67 increases in combination with other antimyeloma drugs [12,13].
68 Valproic acid (VPA) is primarily used in the treatment of epilepsy and as a mood stabilising
69 drug. It has recently been identified as a potential anticancer drug due to its activity as
70 HDACi. VPA induces apoptosis, growth inhibition and cell differentiation in several types of
71 tumours [14,15,16]. Synergistic effect of VPA and antimyeloma drugs was also reported [17].
72 Bone marrow microenvironment (BMM) plays a critical role in the pathogenesis of plasma
73 cell neoplasms including MM and PCL [18]. Adhesion of malignant plasma cells to bone

75 marrow stromal cells (BMSCs) contributes to the production of several growth factors and
76 cytokines including interleukin-6 (IL-6) which is considered to be one of the growth and
77 survival factors in MM [19,20]. Stimulation of cells by IL-6 triggers phosphorylation of the
78 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Apart from IL-6, other growth
79 factors as well as cytokines activate various signalling pathways protecting myeloma cells
80 from apoptosis such as phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt), Ras/mitogen-
81 associated protein kinase (Ras/MAPK) and NF- κ B pathways [21]. Not only BMM but
82 also oncogenic mutations are responsible for activation of signalling pathways involved in the
83 tumour cell survival. It was reported that BMSCs can protect myeloma cells from drug-
84 induced cell death and are responsible for myeloma drug resistance [22,23].
85 In this study, we investigated the effect of SAHA and VPA on plasma cell leukemia cell line
86 UHKT-944. We further focused on possible protective effect of BMM, especially myeloma
87 derived BMSCs, against the treatment with these inhibitors.

88
89
90

91 **Materials and methods**

- 92
- 93 *Chemicals and antibodies*
- 94
- 95 Valproic acid was purchased from Cayman Chemicals (Michigan, USA). SAHA was supplied
- 96 by Alexis (San Diego, USA). SAHA was dissolved as 40 mM stock solution in DMSO
- 97 (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, USA) and stored at 4 °C. VPA was dissolved in the culture
- 98 medium as 300 mM stock solution which was prepared fresh in each experiment. The general
- 99 caspase inhibitor Q-VD-OPh was purchased from R&D Systems (Minneapolis, Canada) and
- 100 dissolved in DMSO as a 10 mM stock solution and stored at -20 °C. Non-conjugated primary
- 101 antibodies against pJAK2 (Tyr 1007/Tyr 1008) (R Rabbit pAb sc-16566-R) were purchased
- 102 from SantaCruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Phospho-Akt (Ser473) Antibody
- 103 #9271, Phospho-Stat3 (Tyr705) (3E2) Mouse mAb #9138, Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate
- 104 Antibody #9611 and HRP conjugated secondary antibodies were purchased from Cell
- 105 Signaling (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). Anti-β-Actin antibody,
- 106 Mouse monoclonal (clone AC-15) A1978 was purchased from Sigma-Aldrich.
- 107
- 108 *Cell line*
- 109
- 110 IL-6-dependent plasma cell leukemia cell line UHK1-944 was established in our laboratory in
- 111 2010 [20]. Cells were cultivated in RPMI-1640 medium (Biochrom, Berlin, Germany)
- 112 supplemented with 1 ng/mL recombinant human IL-6 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% fetal bovine serum (Biochrom), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-
- 113 Aldrich) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.
- 114
- 115
- 116 *Bone marrow stromal cells (BMSCs)*
- 117
- 118 Bone marrow samples were obtained from newly diagnosed patients with MM or patients
- 119 with relapsed myeloma at the 1st Department of Internal Medicine, Division of Hematology,
- 120 General Faculty Hospital (Prague, Czech Republic). Mononuclear cells were separated by
- 121 gradient centrifugation using Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) and cultivated in a glass
- 122 Erlenmeyer flask in RPMI-1640 medium without IL-6. BMSCs were developed after 1-2
- 123 weeks from the culture initiation. Non-adherent cells were removed and adherent cells with
- 124 fibroblast-like morphology were cultured in IL-6 free medium until they reached 100 %
- 125 confluence. The medium was changed twice a week. For the experiments, MBSCs were
- 126 detached by Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), washed once in fresh medium and seeded at
- 127 equal cell density in 50 mL glass Erlenmeyer flasks.
- 128
- 129 *Cell cultivation in BMSCs surroundings*
- 130
- 131 UHK1-944 cells (2.5×10^5 cells/mL) were seeded in 50 ml glass Erlenmeyer flasks with or
- 132 without BMSCs. Cells were allowed to interact with BMSCs for 3 days and thereafter HDACi
- 133 were added to reach final concentrations of 0.5 mM or 1 mM VPA and 1 µM or 1.5 µM
- 134 SAHA.
- 135
- 136 *Cell cultivation in ECM surroundings*
- 137
- 138 A tissue culture 96-well plate was coated with MaxGel ECM (Sigma-Aldrich) which contains
- 139 human extracellular matrix components. To create a three-dimensional environment we
- 140 followed the procedure according to the manufacturer. Briefly, MaxGel was diluted 1:4 with

141 medium and 75 μ l of diluted MaxGel was added into the plate. The plate was incubated for 4
 142 hours at 37 °C in humidified 5 % CO₂ incubator. The remaining solution was removed and
 143 the plate was allowed to air-dry for 30 minutes. UHKT-944 cells were plated at 2×10^4
 144 cells/well. After 48 hours of incubation with ECM, HDACi were added to reach final
 145 concentrations of 0.5 mM or 1 mM VPA and 1 μ M or 1.5 μ M SAHA.
 146
 147 *Cell cultivation in the presence of various concentrations of interleukin-6 (IL-6)*
 148
 149 UHKT-944 cells (2.5×10^5 cells/mL) were seeded in 50 mL glass Erlenmeyer flasks with
 150 different IL-6 concentrations: 0.2 ng/mL, 1 ng/mL and 3.3 ng/mL. Cells were incubated for 3
 151 days and thereafter HDACi were added to reach final concentrations of 0.5 mM or 1 mM
 152 VPA and 1 μ M or 1.5 μ M SAHA.
 153
 154 *Cell proliferation assay*
 155
 156 Cell proliferation was measured after 24 and 48 hours of treatment using AlamarBlue® assay
 157 (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Briefly, 100 μ L of cell suspension from
 158 each Erlenmeyer flask was transferred to 96-well plate and 10 μ L of alamarBlue reagent was
 159 added to each well. In case of cell proliferation in ECM surrounding, 10 μ L of alamarBlue
 160 reagent was added directly to each well. The plate was incubated for one hour at 37 °C. The
 161 fluorescence intensity was measured on BMG FLUOstar Galaxy microplate reader (MTX Lab
 162 Systems, Inc., VA, USA).
 163
 164 *Caspase-3 activity measurement*
 165

166 Caspase-3/CPP32 colorimetric assay kit (BioVision, CA, USA) was used to detect apoptosis
 167 in UHKT-944 cells after treatment with various concentrations of SAHA and VPA, in the
 168 presence/absence of 10 μ M pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh. For the measurement, the cells
 169 (5×10^5 cells) were cultured in 6-well plates and incubated for 24 hours with various
 170 concentrations of VPA and SAHA. Cells were harvested and lysed. The protein concentration
 171 in cell lysates was determined using Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)
 172 and 100 μ g of protein was used in each experiment. The assay was performed according to
 173 manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 405 nm on Dynatech Microplate
 174 Reader Model MRX (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA).
 175
 176 *Annexin-V apoptotic assay*
 177
 178 Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used
 179 to detect apoptosis or necrosis in UHKT-944 cells. For the measurement, the cells (4×10^5
 180 cells/ mL) were cultured in 6-well plates and incubated for 24 hours with various
 181 concentrations of VPA and SAHA in the presence/absence of 10 μ M pan-caspase inhibitor Q-
 182 VD-OPh. The assay was performed according to manufacturer's instructions. Samples were
 183 analysed by flow cytometry on Coulter Epics XL (Beckman Coulter Inc., Miami, USA). Data
 184 were evaluated using WinMDI 2.8 software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).
 185
 186 *Measurement of adhesion to ECM*
 187
 188 To test the adhesion of UHKT-944 cells to MaxGel ECM, the cells were seeded into tissue
 189 culture 96-well plate coated with MaxGel ECM. Human erythroleukemic cell line (HEL) was

190 used as a positive control. The measurement was performed according to a previously
 191 described procedure [25].
 192
 193 *Cytokine measurement*
 194
 195 IL-6 produced by BMSCs in the presence of UHKT-944 cells was measured at the
 196 Department of Clinical Biochemistry (Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic) on Cobas
 197 6000 analyser (Roche Diagnostics, Prague, Czech Republic). Briefly, 6 mL of fresh media
 198 with 1.5×10^6 cells was added to Erlenmayer flask with or without BMSCs layer. After 3 days,
 199 2 mL media was centrifuged and supernatant stored at -20°C until analysis.
 200
 201 *Cell cycle analysis*
 202
 203 Cell cycle analysis was investigated after 48 hours incubation of UHKT-944 cells with
 204 indicated concentrations of SAHA and VPA (cultured alone or with BMSCs). The cells
 205 (5×10^5) were harvested, washed once in PBS, fixed in 4.5 mL of cold 70% ethanol, incubated
 206 for 30 minutes in 4°C and stored at -20°C until analysis. On the day of the analysis, the cells
 207 were washed twice in PBS and incubated for 2 h at 4°C in 0.5 mL of the modified Vindelov's
 208 propidium iodide buffer (10 mM Tris, pH 8, 1 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 209 propidium iodide and 10K units ribonuclease A). DNA content was determined using LSR
 210 Fortessa flow cytometer (BD Biosciences).
 211
 212 *ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)*
 213

214 For the determination of pSTAT3 level, UHKT-944 cells (2.5×10^5 cells/mL) were seeded in
 215 50 ml glass Erlenmayer flasks with or without BMSCs. After 48 hours, leukemic cells were
 216 harvested and lysed; the cell lysate was diluted to reach 0.1 mg/mL protein. Phosphorylated
 217 STAT3 level was measured after 48 hours treatment with SAHA and VPA using PathScan®
 218 Phospho-Stat3 (Tyr705) Sandwich ELISA kit (Cell Signaling) following manufacturer's
 219 instructions. Absorbance was measured at 450 nm/650 nm as reference wavelength on
 220 Dynatech Microplate Reader Model MRX (Dynatech).
 221
 222 *Western blot analysis*
 223
 224 For western blot analysis, the cells were incubated with indicated concentrations of SAHA
 225 and VPA for 48 hours (cultured alone or with BMSCs). The cells were washed twice in PBS,
 226 lysed in NP40 cell lysis buffer (Invitrogen) supplemented with PMSF (Roche) and protease
 227 and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Proteins were separated by 12% SDS-PAGE
 228 and transferred onto PVDF membrane (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).
 229 The membrane was blocked with 3% BSA (Roche), washed and incubated with appropriate
 230 primary antibodies at 4°C overnight. Then the membrane was washed, incubated with HRP-
 231 conjugated secondary antibodies for 2h at the room temperature. Bound antibodies were
 232 detected with enhanced chemiluminescence SuperSignal West Dura Extended Duration
 233 Substrate (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA). Anti β -Actin (Sigma-Aldrich)
 234 was used as a loading control. The chemiluminescence signal from the membranes was
 235 detected and evaluated using G-box iChem XT4 digital imaging device (Syngene Europe,
 236 Cambridge).
 237
 238 *Data evaluation*

239

240 Data were evaluated using MedCalc statistical software version 13 (MedCalc®, Mariakerke,

241 Belgium) using Student's t-test and Wilcoxon paired samples test.

242

243 **Results**

244

245 *SAHA and VPA induce apoptosis in UHKT-944 cells*

246

247 To detect an early stage of apoptosis or late apoptosis/necrosis, the cells were stained with
248 Annexin V and PI and analysed by flow cytometry. Both SAHA and VPA increased

249 phosphatidylserine externalization and the number of necrotic cells. When the cells were co-
250 treated with the pan-caspase inhibitor, the effects were largely reduced suggesting that the cell
251 death caused by these inhibitors is caspase-dependent (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B,C, both
252 VPA and SAHA induced apoptosis via caspase-3 activation in UHKT-944 cells.

253

254 *Bone marrow microenvironment (BMM) influence antiproliferative effect of SAHA and VPA*

255

256 To assess whether BMM can contribute to cell survival in the presence of the used drugs, we
257 simulated this microenvironment using commercially available components of ECM and also
258 using BMSCs derived from patients diagnosed with MM. Antiproliferative effect of SAHA
259 and VPA was analysed using alamarBlue assay. Both inhibitors at the used concentrations
260 inhibited cell proliferation after 24 and 48 hours (Fig. 2). We did not find any differences in
261 the inhibition of cell proliferation between cells cultured alone or in the presence of ECM
262 components (Fig. 2A). BMM simulated by ECM proteins had thus no protective effect. The
263 reason for that could be the fact that only $10.5 \pm 0.9\%$ cells adhered to plate coated with
264 MaxGel (data not shown). As HEL cell line, which was used as a positive control, had about
265 70 % of adherent cells, the interaction of UHKT-944 cells with ECM proteins is relatively
266 weak. On the other hand, differences in the cell proliferation were observed between the cells
267 co-cultured with BMSCs and cultured alone, especially in the presence of SAHA suggesting

268 that BMSCs have partial protective effect against SAHA treatment (Fig. 2B). Because we
269 proved that BMSCs produce IL-6 (data not shown), we further wanted to address the question
270 whether IL-6 alone could be responsible for these observations. Although the UHKT-944
271 cells were cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 1 ng/mL IL-6, the real
272 concentration of IL-6 measured by means of immunoassay (see methods) was 0.2 ng/mL.
273 Concentration of IL-6 which corresponded to the mean concentration produced by BMSCs in
274 the experiments – i.e. 1 ng/mL (5 times higher than in the culture medium from the control
275 cells) did not have any effect, however higher concentration of IL-6 (3.3 ng/mL) had a
276 tendency to decrease the antiproliferative effect of both VPA and SAHA (Fig. 2C,D). The
277 concentration of IL-6 was measured repeatedly in freshly prepared medium.
278
279 *SAHA and VPA had no effect on cell cycle distribution*
280
281 Cell cycle analysis revealed that VPA and SAHA had no significant effect on the cell cycle
282 distribution of UHKT-944 cells (Fig. 3A,B). We further observed no differences in the cell
283 cycle distribution between the cells cultured alone or with BMSCs. Using the cell cycle
284 analysis, we also quantified the percentage of the cells in sub-G1 phase which represents a
285 population of late apoptotic cells (Fig. 3C). We found that both VPA and SAHA increased
286 sub-G1 cell population. When the cells were 48 hours treated with SAHA in the presence of
287 BMSCs, the number of apoptotic cells was lower in comparison with cells cultured with
288 SAHA alone: 28.3 ± 10.1 % of cells in sub-G1 versus 39.4 ± 7.9 % (1 μ M SAHA) and $32.1 \pm$
289 14.9 versus 50.3 ± 7.1 % (1.5 μ M SAHA). However, these results were not found statistically
290 significant according to Wilcoxon paired sample test.

291
292 *VPA and SAHA influence JAK/STAT and PI3K/Akt pathways*

293
294 To find out whether SAHA and VPA target JAK/STAT or PI3K/Akt signalling pathways, we
295 investigated the phosphorylation status of JAK2, STAT3, Akt and also the profile of Akt
296 phospho - serine/threonine substrates. Results from ELISA test of pSTAT3 (Tyr 705) (Fig. 4)
297 showed that VPA down-regulated the phosphorylation of STAT3 especially when the
298 leukemia cells were co-cultured with BMSCs. This was confirmed by western blot analysis
299 showing the decrease of pJAK2 (Fig. 5A) and pSTAT3 (Fig. 5B). Both VPA and SAHA also
300 down-regulated the phosphorylation at the tested Akt phosphorylation sites (Fig. 5C). No
301 significant/minimal differences were found between the cells cultured alone or co-cultured
302 with BMSCs when VPA was present. Interestingly, co-culture of UHKT-944 cells with
303 BMSCs slightly influenced the phosphorylation changes in case of SAHA treatment. The
304 effect is more evident in Akt substrates phosphorylation changes (Fig. 5D,E).

305

306

307
308
309 **Discussion**
310 Bone marrow microenvironment promotes growth and survival of tumour cells and could be
311 also responsible for resistance to treatment [18,22,26,27]. Therefore, the search for new
312 therapeutic agents which could overcome the resistance is needed. HDACi have been shown
313 to induce apoptosis, differentiation and inhibition of cell growth of a wide variety of
314 transformed cells [28,29]. Several HDACi have also been shown as potential antimyeloma
315 agents [30,31]. In this study, we showed that VPA and SAHA are able to activate caspase-3,
316 induce apoptosis and inhibit the growth of plasma cell leukemia cell line UHKT-944. Using a
317 broad spectrum pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh, we found that inhibition of caspases
318 decreased the number of early apoptotic as well as late apoptotic/necrotic cells after VPA and
319 SAHA treatment. Contrary to our results, another study revealed that treatment of MM.1S cell
320 line with SAHA did not induce cleavage of caspase-3 and the pan-caspase inhibitor ZVAD-
321 FMK did not protect the cells against SAHA suggesting that caspases have a minor role in
322 mediating SAHA-induced apoptosis in MM cells [13]. Both VPA and SAHA have been
323 shown to induce both caspase-dependent and -independent apoptosis or even non-apoptotic
324 cell death and inhibits the proliferation in other myeloma cell lines as well as in primary
325 multiple myeloma cells [13,32,33,34].
326 MM as well as PCL represent one of the most studied hematological malignancies in
327 connection with BMM, however a lot of studies investigating the effect of new therapeutics
328 do not consider potential effect of this microenvironment. Therefore, we studied the effect of
329 HDACi in the presence of BMM and found that BMSCs derived from MM patients partly
330 decreased the antiproliferative effect of SAHA in contrast to VPA. Previous studies showed

332 that BMSCs protect myeloma cells from apoptosis induced by bortezomib which is
333 considered to be one of the most promising agents against MM [23]. Not only live stromal
334 cells, but also the interaction between MM cells and extracellular matrix components
335 including fibronectin influence the myeloma cell survival [35]. Interestingly, our data
336 revealed that extracellular matrix components had no protective effect against any of HDACi
337 used. One of the reasons could be the fact that only less than 11 % of UHKT-944 cells were
338 able to adhere to commercial MaxGel ECM which contains human ECM components.
339 UHKT-944 cells might adhere to another ECM protein which is absent from MaxGel or to a
340 component which is not present in sufficient quantities.
341 We found that MM-derived BMSCs produce IL-6 (data not shown) which can be other factor
342 responsible for myeloma cell survival [32]. Our data revealed that only high concentration of
343 IL-6 was able to partly decrease the antiproliferative effect of VPA and SAHA suggesting that
344 the protective effect of BMM may be partly due to IL-6 alone but also to the presence of
345 stromal cells or other factors they produce. These observations are consistent with previous
346 studies where IL-6 as well as insulin-like growth factors were found to inhibit the drug-
347 induced cell death in MM [36,37].
348 In several studies, HDACi have been shown to induce a cell cycle arrest in G1/G0 phase in
349 MM cell lines [32,33,38] which is in contrast to our data. Neither SAHA nor VPA had any
350 significant effect on the cell cycle distribution of UHKT-944 cells cultured alone or in the
351 presence of BMSCs. Hence, these compounds can influence the cell growth without causing
352 cellcycle arrest. In agreement with our data, Du et al reported that another HDACi, sodium
353 butyrate, did not arrest the cell cycle in the G1 phase, however, this occurred when sodium
354 butyrate was combined with the demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine [39]. Similarly,
355 panobinostat, one of promising HDACi for combined therapy [40,41] showed no effect on
356 MM cell cycle distribution while used alone or in combination with the proteasome inhibitor

357 carfilzomib [42]. Reasons for discrepancies in studies are unclear, but different type of
358 treatment involving different cell lines may be responsible for these different results.
359 In our study, we further focused on JAK/STAT and PI3K/Akt signaling pathways whose
360 dysregulation is associated with myeloma cell survival. Our data showed that VPA inhibited
361 STAT3 phosphorylation even when the cells were co-cultured with BMSCs where we had
362 assumed only partial effect. The reason for this assumption was the fact that BMSCs produce
363 high concentration of IL-6 which is one of the factors responsible for JAK/STAT pathway
364 activation. Our results suggest that inhibition of JAK/STAT pathway represents one of the
365 mechanisms of action of VPA in PCL or MM. In consistency with our data, VPA has been
366 shown to inhibit STAT3 phosphorylation in natural killer cells as reported by Zhu et al. [43].
367 Apart from VPA, a novel JAK inhibitor AZD1480 was shown to block JAK/STAT3
368 signalling in myeloma cells cultured alone, or even when co-cultured with BMSCs, similarly
369 as in our experimental system [44]. Western blot analyses revealed that both SAHA and VPA
370 were able to affect the phosphorylation of Akt and Akt substrates, thus both inhibitors
371 influence more pathways important to cell survival. Other drugs have been shown to inhibit
372 Akt phosphorylation leading to myeloma cell death [45]. When the cells were co-cultured
373 with BMSCs in the presence of SAHA, we found some differences in the phosphorylation
374 status of proteins involved in important survival pathways in MM. We suppose this might be
375 attributed to the presence of BMSCs and points to the need of testing the potential
376 anti-myeloma drugs in the presence of BMM as evidenced by several studies [46,18].
377 Concerning molecular mechanisms of the antitumor activity of SAHA, Mitsiades et al
378 showed that SAHA down-regulated the expression of receptor genes involved in proliferation
379 and survival, such as the insulin-like growth factor receptor and IL-6 receptor, antiapoptotic
380 molecules, DNA synthesis/repair enzymes etc [47]. However, when we focus on IL-6,

381 HDACi can induce apoptosis of MM cell lines independently of decreased IL-6 receptor
382 expression as reported by Lavelle et al. [48].
383 In conclusion, based on our results/observations and on published results by others, it is
384 evident that VPA and SAHA could be used in the treatment of MM and PCL. The influence
385 of these inhibitors depends on the cell type and also on the microenvironment which should
386 be taken into account when novel therapeutic drugs against plasma cell disorders are
387 investigated.
388

389 **Authorship contributions:**

- 390
391 IB, MZ - conception and design, performance of experiments and data analyses and
392 manuscript drafting; KK – performance of experiments, data analyses, critical revision of
393 manuscript, OM - performance of experiments; IS - provision of patient samples and critical
394 revision of manuscript; PS critical revision of manuscript
395
396

397 **References**

- 398 JIMÉNEZ-ZEPEDA VH, DOMÍNGUEZ VJ. Plasma cell leukemia: a rare condition. *Am*
399 *Hematol* 2006; 85: 263-267.
400 TIEDEMANN RE, GONZALEZ-PAZ N, KYLE RA, SANTANA-DAVILA R, PRICE-
401 TROSKA T et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia* 2008;
402 22: 1044-1052.
403 OGAWA Y, OGIURA M, TOBINAI K, ANDO K, SUZUKI T. et al. A phase I study of
404 vorinostat combined with bortezomib in Japanese patients with relapsed or refractory multiple
405 myeloma. *Int J Hematol* 2016;103:25-33.
406 TOTANI H, RI M, KATO C, NAKASHIMA T, SUZUKI N et al. Phase I study of once
407 weekly treatment with bortezomib in combination with lenalidomide and dexamethasone for
408 relapsed or refractory multiple myeloma. *Int J Hematol* 2016;103:316-21.
409 KIKUCHI J, KOYAMA D, MUKAI HY, FURUKAWA Y. Suitable drug combination with
410 bortezomib for multiple myeloma under stroma-free conditions and in contact with
411 fibronectin or bone marrow stromal cells. *Int J Hematol* 2014;99:726-36.
412 ESPARÍS-OGANDO A, ALEGRE A, AGUADO B, MATEO G, GUTIERREZ N et al.
413 Bortezomib is an efficient agent in plasma cell leukemias. *Int J Cancer* 2005; 114: 665-667.
414 JOHNSTON RE, ABDALLA SH. Thalidomide in low doses is effective for the treatment of
415 resistant or relapsed multiple myeloma and for plasma cell leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2002;
416 43: 351-354.
417 KIM SJ, KIM J, CHO Y, SEO BK, KIM BS. Combination chemotherapy with bortezomib,
418 cyclophosphamide and dexamethasone may be effective for plasma cell leukemia. *Jpn J Clin*
419 *Oncol* 2007; 37: 382-384.
420 HIDEHIMA T, ANDERSON KC. Histone deacetylase inhibitors in the treatment for
421 multiple myeloma. *Int J Hematol* 2013;97:324-32.
422 KIM HJ, BAE SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and
423 clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res*. 2011; 3: 166-179.
424 LANE AA, CHABNER BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*.
425 2009; 27: 5459-5468.
426 CHERYATH V, GLASER KB, HEALAN-GREENBERG C, WARING JF, KALAYCIO M
427 AND BORDEN EC. Epigenetic regulation of IFN- 2b in multiple myeloma by a hydroxamic
428 acid histone deacetylase (HDAC) inhibitor (SAHA) and a non-hydroxamic acid HDAC
429 inhibitor (A-423378). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*; 2007; 25: No 18S: 14048.
430 MITSIADES N, MITSIADES CS, RICHARDSON PG, MCMULLAN C, POULAKI V et al.
431 Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood* 2003;
432 101:4055-4062.
433 TANG R, FAUSSAT AM, MAJDAK P, PERROT JY, CHAOUI D et al. Valproic acid
434 inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp
435 and MRP1. *Leukemia* 2004;18: 1246-1251.
436 LI XN, SHU Q, SU JM, PERLAKY L, BLANEY SM, LAU CC. Valproic acid induces
437 growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone

438 hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 1912-1922.

439

440 NERI P, TAGLIAFERRI P, DI MARTINO MT, CALIMERI T, AMODIO N et al. 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.

441

442

443 WANG AH, WEI L, CHEN L, ZHAO SQ, WU WL, SHEN ZX and LI JM. Synergistic effect of bortezomib and valproic acid treatment on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome cells. *Annals of Hematology.* 2011; 90(8), pp. 917-931.

444

445

446

447 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.

448

449

450

451 CHAUHAN D, UCHIYAMA H, AKBARALI Y, URASHIMA M, YAMAMOTO K et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF- κ B. *Blood* 1996; 87: 1104-1112.

452

453

454 LAUTA VM. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 2003; 97: 2440-2452.

455

456 LENTZSCH S, CHATTERJEE M, GRIES M, BOMMERT K, GOILLASCH H et al. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2004; 18:1883-1890.

457

458

459

460 CHEUNG WC, VAN NESS B. The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. *Leukemia.* 2001; 15: 264-271.

461

462 HAO M, ZHANG L, AN G, MENG H, HAN Y, XIE Z, et al. Bone marrow stromal cells protect myeloma cells from bortezomib induced apoptosis by suppressing microRNA-15a expression. *Leuk Lymphoma.* 2011; 52: 1787-1794.

463

464

465 VYHLÍDALOVÁ I, UHERKOVÁ L, PLESCHNEROVÁ M, ŠPÍČKA I, BŘEZINOVÁ J et al. Characterization of a new human plasma cell leukemia cell line UHK1-944. *Eur J Haematol.* 2015; 95: 352-360.

466

467

468 KUŽELOVÁ K, PLUSKALOVÁ M, BRODSKÁ B, OTEVŘELOVÁ P, ELKNEROVÁ K et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) at subtoxic concentrations increases the adhesivity of human leukemic cells to fibronectin. *J Cell Biochem* 2010; 109: 184-195.

469

470

471 MUNK PEDERSEN I, REED J. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 2004;45: 2365-2372.

472

473 MEADS MB, HAZLEHURST LA, DALTON WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2519-2526.

474

475 GÖTTLICHER M, MINUCCI S, ZHU P, KRÄMER OH, SCHIMPF A et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001; 20: 6969-6978.

476

477

478 MARKS PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene* 2007; 26: 1351-1356.

479

480 KITAZOE K, ABE M, HIASA M, ODA A, AMOUH H et al. Valproic acid exerts anti-tumor as well as anti-angiogenic effects on myeloma. *Int J Hematol.* 2009; 89: 45-57.

481

482 BAI LY, OMAR HA, CHIU CF, CHI ZP, HU JL, WENG JR. Antitumor effects of (S)-HDAC42, a phenylbutyrate-derived histone deacetylase inhibitor, in multiple myeloma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68: 489-496.

483

484 KAISER M, ZAVRSKI I, STERZ J, JAKOBC C, FLEISSNER C et al. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica* 2006; 91: 248-251.

485

486 SCHWARTZ C, PALISSOT V, AOUALI N, WACK S, BRONS NH et al. Valproic acid induces non-apoptotic cell death mechanisms in multiple myeloma cell lines. *Int J Oncol* 2007; 30: 573-382.

487

488 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.

489

490 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.

491

492 XU FH, SHARMA S, GARDNER A, TU Y, RAITANO A et al. 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.

493

494 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.

495

496 CATLEY L, WEISBERG E, TAI YT, ATADJA P, REMISZEWSKI S et al. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood.* 2003; 102: 2615-2622.

497

498 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.

499

500 RICHARDSON PG, SCHLOSSMAN RL, ALSINA M, WEBER DM, COUTRE SE et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood.* 2013 Oct 3;122(14):2331-7.

501

502 SAN-MIGUEL JF, HUNGRIA VT, YOON SS, BEKSAC M, DIMOPOULOS MA et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Oct;15(11):1195-206.

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517. GAO L, GAO M, YANG G, TAO Y, KONG Y et al. Synergistic Activity of Carfilzomib and Panobinostat in Multiple Myeloma Cells via Modulation of ROS Generation and ERK1/2. *Biomed Res Int* Volume 2015; 2015: 1-9.
518. ZHU S, DENMAN CJ, AND LEE DA. Valproic Acid Selectively Inhibits STAT3 Phosphorylation. 51th ASH Annual Meeting & Exposition. Dec 5, 2009. New Orleans, LA.
519. SCUTO A, KREICI P, POPPLEWELL L, WU J, WANG Y et al. 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.
520. HARVEY RD, LONIAL S. PI3 kinase/AKT pathway as a therapeutic target in multiple myeloma. *Future Oncol* 2007; 3: 639-647.
521. TABE Y, JIN L, TSUTSUMI-ISHII Y, XU Y, MCQUEEN T et al. Activation of integrin-linked kinase is a critical pro-survival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res* 2007; 67: 684-694.
522. MITSIADES CS, MITSIADES NS, MCMULLAN CJ, et al. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 540-545.
523. LAVELLE D, CHEN YH, HANKEWYCH M, DESIMONE J. Histone deacetylase inhibitors increase p21(WAF1) and induce apoptosis of human myeloma cell lines independent of decreased IL-6 receptor expression. *Am J Hematol* 2001; 68: 170-178.
524. 536

Conflict of Interest and Sources of Funding

537. The authors declare that they have no conflict of interest.
538. The work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (Project for conceptual development of research organization No 00023736) and by European Union (grants ERDF OPPK CZ.2.16/3.1.00/24001 and CZ.2.16/3.1.00/28007).

543 **Figure legends**

544

545

546 Figure 1. Apoptosis induction by SAHA and VPA.

547 Representative graph showing the effect of SAHA and VPA on apoptosis in UHKIT-944 cells

548 (A). Apoptosis was measured using flow cytometry with Annexin V and propidium iodide

549 (PI) staining. Cells were treated for 24 hours with indicated concentrations of SAHA and

550 VPA in the presence/absence of 10 μ M pan-caspase inhibitor QV-D-OPh. The effect of

551 SAHA (B) and VPA (C) on caspase-3 activity was measured with Caspase-3/CPP32

552 colorimetric assay kit. The results represent mean \pm standard deviation of three independent

553 experiments.

554

555 Figure 2. Antiproliferative effect of SAHA and VPA.

556 UHKIT-944 cells were cultivated alone or with ECM components (A), BMSCs (B), or various

557 IL-6 concentrations (low -0.2 ng/mL, middle -1 ng/mL, high -3.3 ng/mL) (C,D). Cells

558 were treated with indicated concentrations of SAHA and VPA for 24 (C) and 48 hours (D).

559 Cell proliferation was measured using alamarBlue assay. The results represent mean \pm

560 standard deviation of six (B) or three (A, C and D) independent experiments. *P<0.05.

561

562 Figure 3. Cell cycle analysis of UHKIT-944 cells +/- BMCS.

563 UHKIT-944 cells were cultured alone (A) or with BMSCs (B) after treatment with indicated

564 concentrations of SAHA and VPA for 48 hours. Cell cycle distribution was analysed by flow

565 cytometry using propidium iodide. Cells show no significant differences in cell cycle phases

566 after SAHA and VPA treatment except sub-G1 phase representing late apoptosis/necrosis (C).

567 Data represent mean \pm standard deviation of three independent experiments.

568

569 Figure 4. Effect of VPA and SAHA on STAT3 phosphorylation.

570 pSTAT3 (Tyr705) level was measured by means of ELISA in UHKIT-944 cells. Cells were

571 co-cultured with or without BMSCs and incubated with indicated concentrations of SAHA

572 and VPA for 48 hours. Data represent mean \pm standard deviation of three independent

573 experiments.

574

575 Figure 5. Effect of SAHA and VPA on the activity of JAK/STAT and PI3K pathways.

576 Phosphorylation status of JAK2 (A), STAT3 (B) and Akt (C) proteins in cells cultivated with

577 or without BMSCs is shown in graphs summarizing three independent experiments.

578 Representative western blot showing changes in phosphorylation Phospho (Ser/Thr) Akt

579 substrates profiles (D) is presented together with graphs of intensities of bands 1 (b1), 2 (b2),

580 3 (b3) and of the whole signal (sAkt) (E). C/1/2 - control/lower inhibitor concentration/higher

581 inhibitor concentration, BC/B1/B2 - control/lower inhibitor concentration/higher inhibitor

582 with BMSCs. The results represent mean \pm standard deviation of three independent

583 experiments. Activity of JAK/STAT pathway has been tested via phosphorylation of JAK2

584 (pTyr 1008) and STAT3 (pTyr705), PI3K/Akt pathway via pAkt (pSer473) and Ser/Thr

585 phosphorylated Akt substrates. Relative protein phosphorylation was normalized to β -actin

586 used as a loading control.

Fig. 1A [Download full resolution image](#)

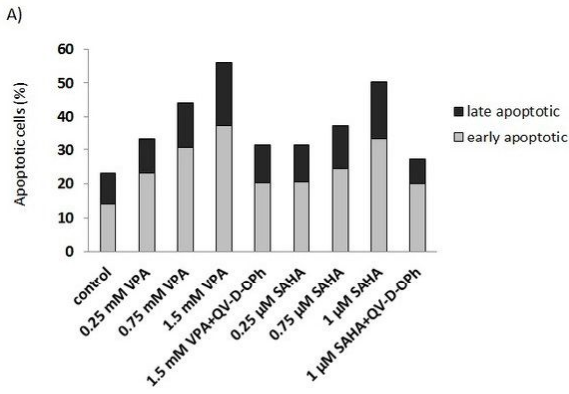


Fig. 1B [Download full resolution image](#)

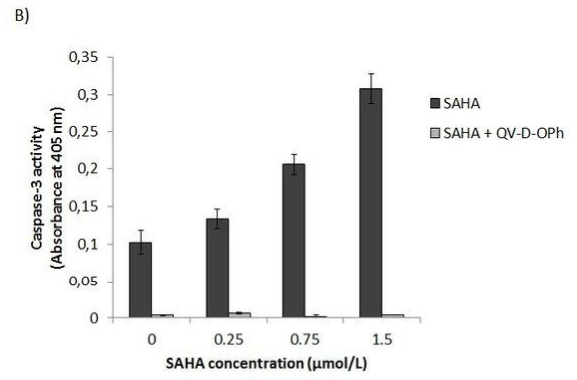


Fig. 1C [Download full resolution image](#)

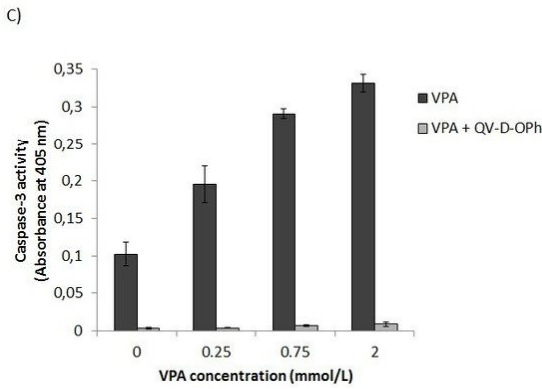


Fig. 2A [Download full resolution image](#)

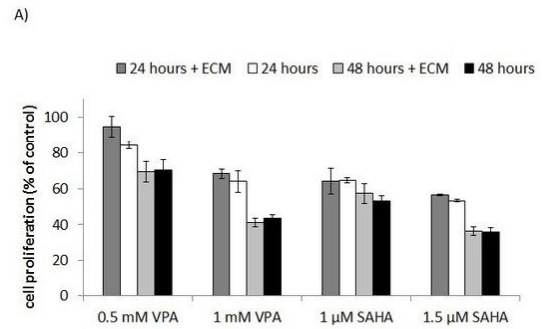


Fig. 2B [Download full resolution image](#)

B)

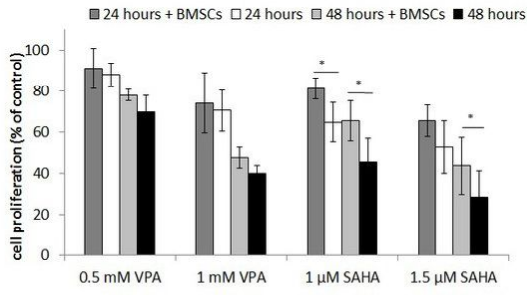


Fig. 2C [Download full resolution image](#)

C)

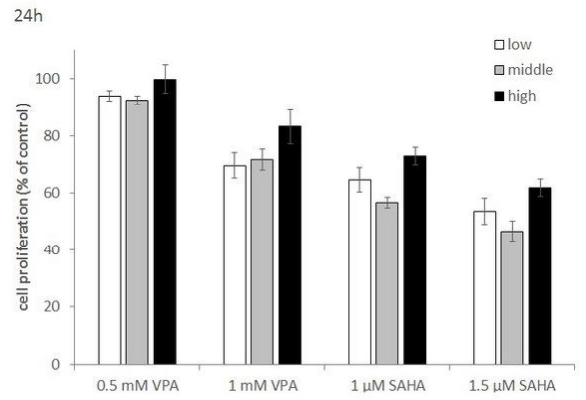


Fig. 2D [Download full resolution image](#)

D)

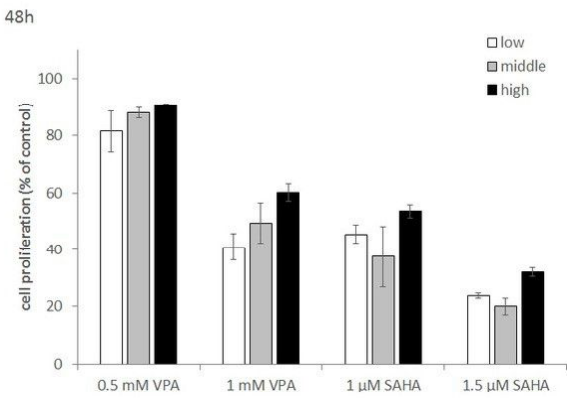


Fig. 3A [Download full resolution image](#)

A)

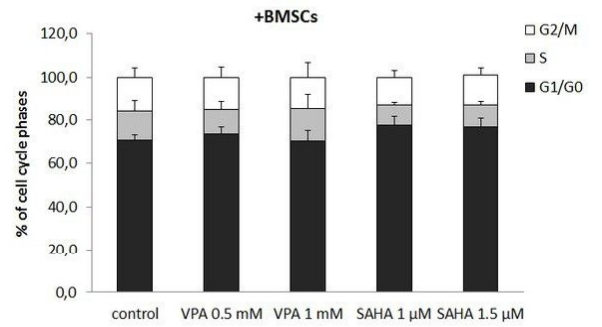


Fig. 3B [Download full resolution image](#)

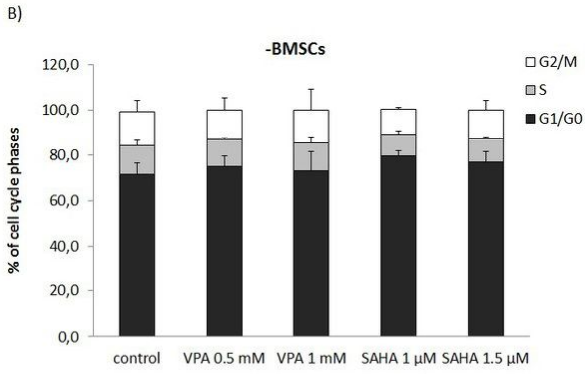


Fig. 3C [Download full resolution image](#)

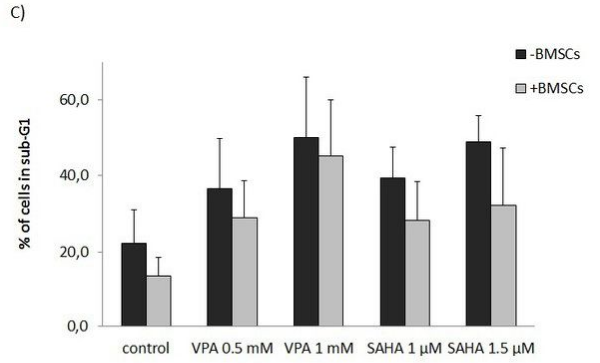


Fig. 4 [Download full resolution image](#)

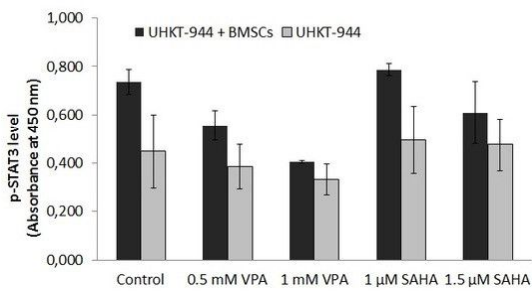


Fig. 5A [Download full resolution image](#)

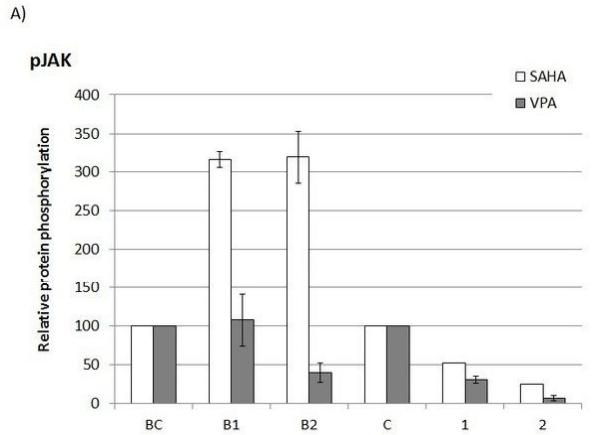


Fig. 5B [Download full resolution image](#)

B)

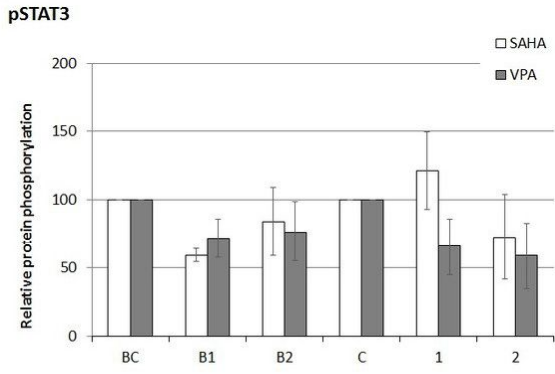


Fig. 5C [Download full resolution image](#)

C)

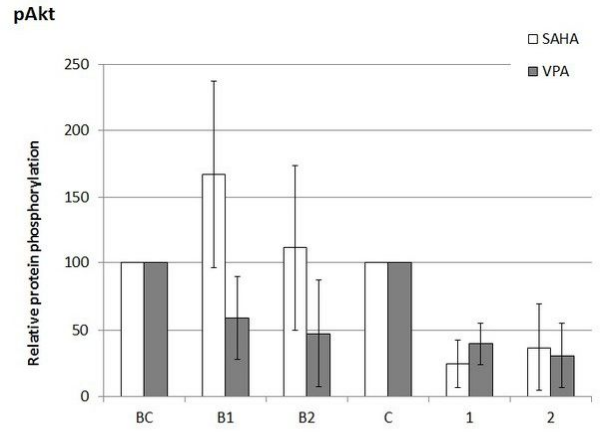


Fig. 5D [Download full resolution image](#)

D)

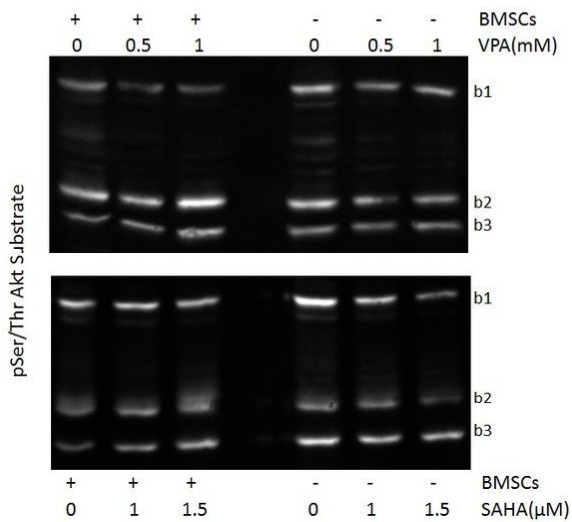


Fig. 5E [Download full resolution image](#)

E)

