

**VYUŽITÍ GENOMICKÝCH DAT K NALEZENÍ A DETAILNĚJŠÍ
ANALÝZE KLÍČOVÝCH MOLEKUL U DĚTSKÉ AKUTNÍ LEUKÉMIE**

Dizertační práce v oboru „imunologie“

Autor: Mgr. Martina Vášková

Školitel: Doc. MUDr. Ondřej Hrušák, PhD.

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Ústav imunologie a Klinika dětské hematologie a onkologie

2008

PODĚKOVÁNÍ

Mému školiteli Ondřeji Hrušákovi bych chtěla poděkovat za skvělé vedení, které pro mě bylo velmi obohacující po odborné i po osobní stránce. Ester Mejstříková, Tomáš Kalina, Jana Šmerdová, Klára Pospíšilová, Lucie Gondorčínová, Pavel Semerák, Daniel Thürner a Martin Kováč z laboratoře CLIP cytometrie zaslouží velký dík za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Julii Starkové a Evě Froňkové děkuji za pomoc při experimentech a všem dalším kolegům z Laboratoře molekulární genetiky CLIP za mnoho poskytnutých rad. Patřičii Martínkové a Markovi Omelkovi děkuji za pomoc při statistických analýzách. Jiřině Bartůňkové a Anně Šedivé z Ústavu imunologie patří dík za zajištění kvalitního pracovního zázemí. Stejně tak Janu Starému na Klinice dětské hematologie a onkologie. Za podporu děkuji také své rodině.

PŘEDMLUVA

Dizertační práce je napsána jako všeobecný úvod a diskuze výsledků, které byly publikovány v příložených článcích (příloha 1: Vaskova et al., Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia, příloha 2: výsledky přímo navazující na tuto publikaci, po jejímž vydání studie dále pokračovala, příloha 3: Vaskova et al., CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis, příloha 4: Kalina et al., Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens, příloha 5: Zuna et al., TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first?). Každé publikaci je věnována samostatná část dizertační práce, s výjimkou práce, která je obsahem přílohy 5. Zde jsem se podílela na části statistické analýzy, proto nekomentuji celý její obsah, ale část výsledků je citována v návaznosti na výsledky ostatních publikací.

OBSAH

<u>ČÁST I: NOVÉ DIAGNOSTICKY A PROGNOSTICKY VÝZNAMNÉ ZNAKY DĚTSKÉ AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE</u>	4
Úvod:	4
Cíle:	9
Metody:	9
Výsledky a diskuze:	12
<u>ČÁST II: CD44 A CD27 – NOVÉ ZNAKY CHARAKTERIZUJÍCÍ DIFERENCIAČNÍ STÁDIA B BUNĚK</u>	22
Úvod:	22
Cíle:	24
Metody:	24
Výsledky a diskuze:	24
<u>ČÁST III: CD66C</u>	28
Úvod:	28
Cíle:	28
Metody:	28
Výsledky a diskuze:	29
<u>ZÁVĚRY</u>	30
<u>SEZNAM ZKRATEK</u>	32
<u>LITERATURA</u>	33
<u>PŘÍLOHA č. 1 až 5</u>	

ČÁST I: NOVÉ DIAGNOSTICKY A PROGNOSTICKY VÝZNAMNÉ ZNAKY DĚTSKÉ AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE

ÚVOD:

AKUTNÍ LEUKÉMIE

Akutní leukémie jsou heterogenní skupinou onemocnění tvořenou podskupinami s různou prognózou a odpovědí na léčbu. Základními typy akutní leukémie jsou akutní myeloidní (AML) a akutní lymfoblastická leukémie (ALL). ALL je u dětí podstatně častější než AML, která tvoří pouze 15% leukémií dětského věku. ALL je nejčastější maligní onemocnění u dětí vůbec. Dělí se na ALL z B řady a z T řady. Z imunofenotypového hlediska se ALL z B řady člení na B prekurzorovou (BCP ALL), která tvoří 80% ALL a zralou B ALL (2% ALL). BCP ALL se dále dělí na nezralou CD10^{neg} proB ALL, na CD10^{pos} common ALL (cALL), u které není přítomen intracelulární řetězec IgM a na preB ALL, kde již intracelulární řetězec IgM přítomen je. ALL z T řady (15% ALL) se dělí podle stupně zralosti na proT, preT, intermediární a zralou T ALL.

Úspěšnost léčby ALL roste od 60. let 20. století. Zatímco dříve měla šanci na vyléčení méně než pětina dětí (1), od 80. let žije na různých protokolech téměř 80% dětí a 40% dospělých 5 let po diagnóze bez známek onemocnění (2). Právě dobře zvolená léčba je významným prognostickým faktorem. Má čtyři základní součásti. Začíná se indukcí remise, při které se podává prednison, vinkristin, daunorubicin a L-asparagináza. Po indukční léčbě následuje konsolidační fáze zahrnující cytosinarabinosid, merkaptopurin, cyklofosamid a vysokodávkový metotrexát. 6 měsíců od diagnózy je zkráceně zopakována indukční léčba (pozdní intenzifikace). Další součástí léčby je prevence infiltrace centrálního nervového systému, při které se intratekálně podává metotrexát v průběhu celé intenzivní terapie. V poslední části - udržovací léčba - se podává kombinace merkaptopurinu a metotrexátu. Snahy o zintenzivnění existující terapie vedou spíše než ke zvýšení úspěšnosti léčby k úmrtím na toxicitu léčby a riziku vzniku sekundárních malignit. Velkou nadějí pro další zlepšení léčebných výsledků je poznání etiopatogeneze ALL. Tak jako u ostatních maligních onemocnění i u leukémie se má za to, že její vznik je dvoustupňový proces, kdy postupně

dochází ke změnám v genomu hematopoetických kmenových buněk nebo časných vývojových stádií jednotlivých linií hemopoézy. Jedná se o změny v rozsahu od bodových mutací až po změny v počtu chromozómů. K odhalování mechanismů této tzv. teorie dvou zásahů postupně přispívá analýza genetických změn leukemických buněk. Mezi tyto změny patří deregulovaná exprese protoonkogenů a chromozomální translokace vedoucí ke vzniku fúzních genů kódujících např. aktivní kinázy a změněné transkripční faktory. Genetické aberace přispívají k leukemické transformaci hematopoetických kmenových buněk nebo jiných progenitorů tak, že ovlivňují buněčné funkce jako je regulace proliferace, diferenciaci a apoptóza. Příčiny, které vedou ke vzniku těchto změn, nejsou dosud zcela objasněny. Uvažuje se o vlivu ionizujícího záření, některých chemikálií a infekčních agens. Jednoznačná souvislost se však pojí až s vysokou dávkou ionizujícího záření. Ani chemickou či klasickou infekční etiologii nelze prokazatelně spojit s leukémií obecně. Specifické podtypy mohou ale být spojeny buď s expozicí některým chemikáliím (leukémie s přestavbami *MLL* po expozici inhibitorům topoisomérázy) nebo s infekcí (HTLV-I asociovaný lymfom). S poruchami imunity jsou spojené některé lymfomy (ne-hodgkinské lymfomy u AIDS). Vyšší incidence některých typů leukémie u Downova syndromu je spojena s mutací genu pro *GATA1*. Vzácné poruchy reparace DNA mohou způsobit i leukémie, ale častější jsou u nich jiné malignity.

Velká pozornost se věnuje vlivu socioekonomických podmínek, protože obecně vyšší incidence ALL je typická pro vyvinuté země (3, 4). Pro tyto země je typické věkové rozložení výskytu onemocnění s vyšším počtem případů u dětí předškolního věku (5, 6). U méně vyvinutých zemí tento jev pozorován nebyl nebo byl méně výrazný (4, 7). Akumulace leukémie v předškolním věku může být výsledkem pozdějšího kontaktu s infekcí, který vyvolá nepřiměřenou imunitní odpověď spojenou s proliferací B řady (8, 9).

Genotypové podskupiny

Kromě výše uvedeného imunofenotypového členění se ALL dělí také podle genotypových změn leukemických buněk. Genová změna, která pravděpodobně souvisí s etiologií daného typu ALL, se projeví řadou změn na buněčné úrovni. Jejich výsledkem je exprese řady proteinů, proto měla naše studie přispět k nalezení dosud nepopsaných znaků, které jsou spojeny specificky s danou genotypovou podskupinou. Tato část práce je věnována korelaci exprese proteinů s genotypými podskupinami pouze v rámci ALL z B řady, proto nejsou uvedeny genotypové změny T ALL.

BCR/ABL

Blasty 2-5% dětí s ALL mají translokaci t(9;22), která je podkladem tzv. Ph chromozomu. Produktem této translokace je gen *BCR/ABL* (*Breakpoint cluster region/c-abl oncogene 1*). Ten je přítomen také u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). U pacientů s CML se gen *BCR* láme v oblasti nazývané Major bcr a následně vzniklý fúzní protein má hmotnost 210 kilodaltonů. Zlom *BCR* v oblasti minor bcr, který vede ke vzniku 190 kilodaltonů velkého proteinu je typický pro většinu dětských ALL s Ph chromozomem. Protoonkogen *ABL* kóduje tyrozinovou proteinkinázu, která je při vzniku fúzního proteinu konstitutivně aktivována a narušuje tak signální dráhy kontrolující proliferaci, přežívání a sebeobnovování buněk. Pacienti s tímto genotypem špatně odpovídají na léčbu a jsou zařazováni do nejrizikovější větve léčebného protokolu s nejintenzivnější chemoterapií. Významný posun v léčbě *BCR/ABL*^{pos} leukémií znamenal zařazení tyrozinokinázového inhibitoru imatinibu (Glivec), který inhibuje funkci fúzního proteinu BCR/ABL.

TEL/AML1

Translokací t(12;21) vzniká fúzní gen, který je tvořen 5' částí genu *TEL* (*ETV6 = ETS variant gene 6*; člen *ETS* rodiny transkripčních faktorů) a genem *AML1* (*Acute myeloid leukemia 1 gene*) kódujícím DNA vázající α podjednotku heterodimerického transkripčního faktoru (CBF α a CBF β). Tento genotyp má asi 25% dětských ALL. Chimerický transkripční faktor TEL/AML1 má z transkripčního faktoru TEL zachovalou funkční doménu zajišťující interakce protein-protein a z transkripčního faktoru AML1 komponentu vázající DNA a regulující transkripci. TEL je důležitý při homingu hematopoetických progenitorů do kostní dřeně (10), AML1 spouští transkripci řady genů důležitých v hematopoeze (11). Za fyziologických podmínek jsou součástí proteinového komplexu tvořeného AML1 a transkripčními faktory také histonové acetylázy způsobující konformační změny DNA vedoucí ke zvýšení transkripce. V případě fúzního proteinu TEL/AML1 jsou součástí tohoto komplexu histonové deacetylázy, které naopak strukturu chromatinu mění tak, že transkripci znemožňují. Tyto změny v kaskádě zprostředkované AML1 narušují sebeobnovovací a diferenciací kapacitu hematopoetických kmenových buněk.

Skupina *TEL/AML1*^{pos} pacientů byla spojována s dobrou prognózou, ale ukázalo se, že to platí u klinických studií s intenzivní chemoterapií, hlavně asparaginázou (12). Vysoká senzitivita k asparagináze byla prokázána i v *in-vitro* podmínkách (13).

MLL

Translokace genu *MLL* (*Mixed-lineage leukemia*, někdy nazývaný též *ALL1*) je přítomna u 8% pacientů. Protein MLL je jaderný protein, který udržuje expresi genů z rodiny *HOX*. Translokace *MLL* sestávají z jeho N-terminální části, která fúzuje s C-terminální částí jednoho z více než 40 možných partnerů. Gen *MLL* je tak pravděpodobně nejpromiskuitnějším genem účastnícím se vzniku chromozomálních aberací. Přestavby genu *MLL* se vyskytují také u akutní myeloidní leukémie. U ALL je nejčastějším fúzním partnerem gen *AF4*, který je přítomen asi u 50% ALL kojenců do 6 měsíců věku. Leukémie s touto translokací t(4;11) je nejagresivnější variantou dětské ALL. Přestavby genu *MLL* se vyskytují u více než 80% kojeneckých leukémií. Fúzní proteiny mají zvýšenou transkripční aktivitu vedoucí ke změnám v sebeobnovování a růstu hematopoetických kmenových buněk. ALL s *MLL* translokací mají některé imunofenotypové odlišnosti od ostatních ALL. Neexprimují antigen CD10 (Pui, Blood 1991), exprimují proteoglycan NG2 (Behm, Blood 1996) a často exprimují myeloidní antigeny CD15 a CD65 (Pui, Blood 1991). Odtud název genu *mixed-lineage leukemia*.

E2A/PBX1

U 5% ALL se vyskytuje translokace t(1;19), jejímž výsledkem je vznik fúzního genu *E2A/PBX1* (*TCF3*, transcription factor 3/ pre-B-cell leukemia homeobox 1) na chromozomu 19.

Hyperdiploidní leukémie

Skupiny s různými změnami genotypu mají odlišnou prognózu, která je spojena se senzitivou nebo rezistencí leukemických buněk na léčbu. Příkladem výborné senzitivity na léčbu jsou leukémie s hyperdiploidním genotypem. Skupina vysoce hyperdiploidních ALL je definována přítomností 51-65 chromozómů na leukemickou buňku. Mechanismus způsobující hyperdiploidii není znám. Pacienti, kterých je 25% z dětských ALL, mají příznivou prognózu, je-li jejich léčba založena na antimetabolitech. Jejich senzitivita na léčbu koreluje s tendencí ke spontánní apoptóze v *in-vitro* kultuře a s vyšší intracelulární koncentrací metotrexátu a jeho polyglutamátových metabolitů po léčbě (14). To může být částečně způsobeno tím, že většina hyperdiploidních blastů má tři nebo čtyři kopie chromozómu 21, který nese gen pro transportér metotrexátu do buněk (15).

Hypodiploidie a přestavby genu *MYC*

Tyto změny genotypu patří v rámci nenáhodných změn u ALL mezi nejméně frekventované. Hypodiploidních (<45 chromozómů) je 1% ALL. Translokace genu *MYC* je přítomná u 2% ALL a obvykle se pojí s fenotypem zralých B buněk.

Diagnostické metody – současnost a budoucnost

Úspěchu v léčbě leukémie se částečně dosáhlo upravením léčby pacienta podle rizika relapsu. Protože je leukémie heterogenní onemocnění, kdy se jednotlivé podtypy liší odpovědí na chemoterapii, je důležité přizpůsobit tomu intenzitu léčby. Určení přesného typu leukémie vyžaduje použití širokého spektra metod. Průtoková cytometrie umožňuje odlišení AML a ALL a v rámci ALL dále určit, zda se jedná o T ALL, BCP ALL nebo zralou B ALL. Dalšími používanými diagnostickými metodami je mikroskopické vyšetření, cytogenetika a molekulární biologie.

Diskutuje se o tom, zda by jediná technika – expresní profilování – mohla nahradit všechny tyto zavedené diagnostické metody a současně vylepšit prognostická kritéria. Yeoh et al. (16), vyšetřili 360 diagnostických vzorků ALL pomocí oligonukleotidových čipů, které umožňují analýzu exprese 12 600 genů (probe setů). Prvním krokem bylo zjistit, zda expresní profilování umožní identifikaci známých podtypů onemocnění, proto byla provedena analýza, která měla identifikovat skupiny genů, které jsou exprimovány podobně a leukemické vzorky s podobnou expresí genů. Tato analýza jasně identifikovala 6 základních podtypů leukémie: T-ALL, hyperdiploidní s více než 50 chromozómy, a ALL s genovými přestavbami *BCR/ABL*, *E2A/PBX1*, *TEL/AML1* a *MLL*. Dále byla identifikována skupina pacientů s pseudodiploidním, hyperdiploidním nebo normálním karyotypem a bez fúzních genů, kteří měli podobnou genovou expresi. Zbývající část pacientů (20% ze všech, bez identifikovaných genotypových abnormalit) analýza nezařadila do žádné z podskupin, což zřejmě odráží velkou heterogenitu této skupiny pacientů. U jednotlivých podtypů bylo statisticky vyhodnoceno, které geny s danou skupinou korelují nejlépe. Skupina vysoce hyperdiploidních pacientů (>50 chromozómů) je klinicky odlišná od skupiny se 47-50 chromozómy. To potvrzují i rozdíly v expresních profilech těchto skupin. Asi 70% genů, jejichž exprese koreluje s hyperdiploidí, se nachází na chromozomech X a 21. Je zajímavé, že geny ležící na chromozomu X mají vyšší expresi i u pacientů, kteří nemají trizomii tohoto chromozomu. Autoři studie dosáhli při určení podtypů ALL 96% diagnostické přesnosti, což je podle nich více než při používání dosavadních diagnostických přístupů. Je zajímavé, že i přes relativně homogenní morfologii leukemických buněk jsou expresní profily podskupin ALL tolik rozdílné. Velká odlišnost expresního profilu skupiny s přestavěným genem *MLL*

od ostatních ALL už byla popsána (Armstrong, Nature Genetics 2002), ale velké rozdíly jsou i mezi ostatními skupinami. Yeoh et al. (16) na základě stanovených expresních profilů ALL a dříve publikovaných studií u dalších malignit (17, 18) konstatují, že mezi expresními profily podtypů ALL jsou dokonce výraznější rozdíly než mezi expresními profily adenokarcinomu plic či melanomu a karcinomu močového měchýře. Takto rozdílné expresní profily podtypů ALL svědčí o tom, že se jedná o různé biologické a klinické jednotky a měly by být dostatečné pro spolehlivou diagnostiku podtypů ALL. Existuje však hypotéza, že ke správnému zařazení pacienta např. do genotypové podskupiny by mohly být dostatečné mnohem nižší počty genů (kolem 20 pro určení všech základních podtypů) (19), než jsou popsány sady (tvořené i 100 geny na podskupinu) v expresním profilu těchto podtypů. Kdyby se v expresních profilech podařilo identifikovat toto menší množství spolehlivých prediktorů, mohla by se jejich exprese vyšetřovat zavedenými a standardizovanými metodami jako je RT-PCR (reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce) nebo průtoková cytometrie.

CÍLE:

Cílem bylo najít mezi geny, které odhalilo expresní profilování nové diagnosticky a prognosticky významné molekuly, které by bylo možné vyšetřovat pomocí průtokové cytometrie.

METODY:

Metody, které byly použity ke zpracování této části práce, jsou popsány v příloze 1. Vzhledem k tomu, že hlavním tématem práce je bioinformatické využití potenciálu expresního profilování k výběru nových diagnostických znaků pro vyšetřování pomocí průtokové cytometrie, principy těchto dvou technik jsou podrobněji rozebrány v této kapitole.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie slouží k analýze buněk v suspenzi. Buněčná suspenze se označí pomocí monoklonálních protilátek (mAb) s navázanou fluorescenční molekulou (fluorochromem). Molekuly mAb se specificky vážou na antigeny na povrchu nebo uvnitř vyšetřovaných buněk. Kromě mAb se v některých případech používají další fluorescenční látky, které značí např. DNA. Označená buněčná suspenze je v průtokovém cytometru přetlakem stříkána přes trysku, čímž se vytvoří úzký proud, ve kterém jsou buňky

uspořádány za sebou. Tento proud pak protíná laserový paprsek a detektory následně zaznamenávají, jak se od částic odráží (optický parametr Side scatter – SSc, který představuje granularitu buňky; světlo snímané kolmo k laserovému paprsku) a rozptýlí světlo (optický parametr Forward scatter - FSc, který představuje velikost buňky; světlo lomené pod nízkým úhlem vzhledem k laserovému paprsku). Jsou-li na buňce navázány fluorochromy, laserový paprsek je excituje a fluorescence excitovaného světla je také zaznamenána. Pomocí speciálních filtrů je spektrum rozděleno do rozhraní vlnových délek, která odpovídají emisním spektrům jednotlivých fluorochromů. Tím je umožněno snímat několik fluorescenčních parametrů z jedné částice. Všechny snímané signály jsou amplifikovány a digitalizovány, což umožňuje jejich následnou analýzu. Při analýze využíváme různé formy grafického zobrazení intenzity fluorescence jednotlivých událostí (buněk). Výsledkem základního typu analýzy jsou údaje o procentuálním zastoupení buněk nesoucích sledovaný antigen, navíc je možné též kvantifikovat intenzitu jeho exprese.

EXPRESNÍ PROFILOVÁNÍ

DNA čipy (DNA microarrays, expresní profilování) jsou metodou, která umožňuje určení exprese až 30 000 genů v jednom vzorku. Za 1. publikaci o čípech je považována práce Augenlichta et al. (20), který použil nylonovou membránu se 4000 cDNA sekvencemi k určení expresního profilu normální a nádorové tkáně tlustého střeva. DNA čip je skleněné mikroskopické sklíčko, silikon nebo nylonová membrána, na kterých jsou umístěny DNA próby. Próby mohou být tvořeny také cDNA nebo oligonukleotidy, a na podklad jsou roboticky nanesené v definovaných pozicích. cDNA nebo cRNA získaná z RNA vzorku a označená fluorescenčně nebo biotinem se hybridizuje na čipu. Fluorescence každé próby je poté změřena pomocí laserů. U DNA prób je potenciálním problémem jejich variabilní množství na čipu, proto se RNA ze vzorku hybridizuje spolu s referenční RNA, která je označena jinou fluorescenční značkou. V případě cDNA prób je riziko zkřížené hybridizace vzorku, protože často obsahují neunikátní nebo repetitivní sekvence. Tento problém je vyřešen u oligonukleotidových prób, které jsou tvořeny 25-60 nukleotidy, jejichž unikátní sekvence byly vybrány porovnáním s celým genomem. Specificita próby tvořené 25 nukleotidy, které používá firma Affymetrix, Inc., se kontroluje použitím další próby, která má změněný 13. nukleotid a použitím více různých prób, které reprezentují jeden transkript. U tohoto typu čipu se používá pouze jedna fluorescenční značka.

Hodnoty získané změřením intenzity fluorescence se použijí ke klastrové analýze. To je statistický přístup, který slouží k identifikaci genů se stejným vzorcem (pattern) exprese. V současné době již existuje široké spektrum různých typů analýzy těchto dat, ale

základními podtypy jsou tzv. “supervised learning“ a “unsupervised learning“. “Supervised learning“ je kontrolovaná analýza, která se používá k identifikaci genů korelujících se známými faktory (jako je podtyp malignity atd.), zatímco “unsupervised learning“ je analýza zcela automatická sloužící k identifikaci nových podskupin se společnou expresí genů.

VÝBĚR MOLEKUL Z EXPRESNÍCH PROFILŮ

První výběr molekul jsme provedli z veřejně dostupných expresních profilů dětských ALL provedených v St. Jude Children’s Research Hospital v Memphisu (16, 21). Vybírali jsme molekuly korelující s genotypovou podskupinou nebo s rizikem relapsu onemocnění. Vybrali jsme geny, které vyšly jako korelující v původních statistických analýzách a v případě těchto studií jsme provedli také vlastní reanalýzu primárních dat, do které jsme zařadili pouze data získaná ze vzorků BCP ALL. Vynechali jsme tedy vzorky pacientů s T ALL, které byly v původní analýze zahrnuty. Pro tuto reanalýzu jsme vytvořili vlastní způsob zobrazení, který umožňuje identifikaci genů nejlépe korelujících s jednotlivými podtypy leukémie. Tato analýza také umožňuje srovnat prediktivní hodnotu určité molekuly při stanovení pomocí expresního profilování a pomocí průtokové cytometrie. Princip analýzy je nejnázorněji pochopitelný na obr. 1c, příloha 1. Grafické znázornění korelace všech probe setů s genotypovými podskupinami bylo vytvořeno na základě stanovení optimálního cut offu genové exprese nejlépe oddělujícího dvě skupiny pacientů. Tento cut off byl vypočítán pomocí softwaru R (<http://www.r-project.org>). Pro každý gen (probe set) byla pro všechny možné hodnoty cut offu stanovena frekvence pozitivních (např. TEL/AML1^{pos}) a negativních pacientů (TEL/AML1^{neg}) s genovou expresí vyšší než je testovaný cut off. Jako optimální cut off byla zvolena hodnota, která vedla k nejlepší separaci dvou skupin, tzn. že bylo nejvyšší procento TEL/AML1^{pos} a nejnižší procento TEL/AML1^{neg} pacientů s expresí genu vyšší než tato hodnota cut offu. Při takovém cut offu je v grafickém zobrazení gen v co největší vzdálenosti od diagonály. Na ose x je znázorněno procento pozitivních (TEL/AML1^{pos}) pacientů s hodnotou genové exprese vyšší než je cut off, na ose y procento negativních (TEL/AML1^{neg}) s hodnotou genové exprese pacientů vyšší než je cut off. V pravém dolním rohu je pak možné identifikovat nejlepší prediktory sledovaného genotypu s vysokou expresí a v levém horním rohu prediktory, které mají u sledovaného genotypu expresi nízkou. Na úhlopříčce leží geny, které s tímto genotypem nekorelují.

Další molekuly byly vybrány ze studie Cario et al. (22), jejímž cílem bylo odhalit geny předpovídající odpověď na léčbu. Jako parametr vypovídající o tom, jak pacient odpovídá na léčbu, byla zvolena hladina minimální reziduální nemoci (MRN), takže byly srovnány expresní profily pacientů s nízkou a s vysokou hladinou MRN v den 33 a v týden 12 léčby.

Aby byla zajištěna homogenita souboru pacientů a eliminován vliv prognosticky odlišných genotypů, byli zařazeni pouze pacienti s DNA indexem 1 a bez přítomných fúzních genů *BCR/ABL*, *MLL/AF4* nebo *TEL/AML1*. Použity byly nekomerční cDNA čipy se 43 000 spoty, které reprezentují 30 000 genů.

Práce Maia et al. (23) byla využita pro výběr molekul, jejichž exprese je vyšší u leukemických buněk než u normálních prekurzorů. V této studii bylo provedeno srovnání expresního profilu buněk B prekurzorové ALL a normálních B prekurzorů (definovány jako CD19^{pos} Igκ/Igλ^{neg} buňky) za účelem nalézt potenciální cíle pro imunoterapii leukémií.

Z korelujících genů jsme vybírali ty s vhodnou buněčnou lokalizací příslušného proteinu (tzn. nesecernované). Nejvíce byl výběr omezen komerční dostupností mAb nutných na detekci exprese vybraných molekul pomocí průtokové cytometrie. Reaktivita dostupných mAb byla testována na buněčných liniích a v periferní krvi. Exprese molekul s vhodnou mAb byla vyšetřována v diagnostických vzorcích kostní dřeně společně v kombinaci znaků, které umožňují odlišit v kostní dřeni leukemické buňky od buněk nemaligních.

VÝSLEDKY A DISKUZE:

MOLEKULY VYBRANÉ Z EXPRESNÍCH PROFILŮ A JEJICH STANOVENÍ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Přehled molekul korelujících s genotypovými podskupinami a vyšetřovaných v diagnostických vzorcích kostní dřeně je s výsledky analýzy podle vzdálenosti od úhlopříčky uveden v tabulce 1 a na obr.1a-f, příloha 2.

Tabulka 1.

gen	studie	probe set	vzdálenost od úhlopříčky			
			x	y	x	y
			<i>TEL/AML1</i>		<i>MLL</i>	
CD44	Yeoh et al.	40493_at	17,72	82,44	70	30,3
		2036_s_at	12,66	66,83	60	23,5
	Ross et al.	204489_s_at	10,00	88,78	90	13,27
		204490_s_at	0,00	86,73	65	3,06
		212014_x_at	5,00	85,71	80	14,29
		229221_at	10,00	42,86	80	28,57
CD27	Yeoh et al.	38578_at	96,2	11,22		
	Ross et al.	206150_at	95,00	11,22		
CD135	Ross et al.	206674_at	90	25,51		
			<i>BCR/ABL</i>			
CD103	Ross et al.	205055_at	0	62,14		
CD49f	Yeoh et al.	41266_at	86,67	25,28		
	Ross et al.	201656_at	93,33	20,39		
CD99	Yeoh et al.	41138_at	93,33	15,24		
	Ross et al.	201029_s_at	93,33	14,56		
		201028_s_at	86,67	6,8		
IL-10RB	Yeoh et al.	33228_g_at	46,67	86,99		

CD44 (Hermes, Pgp-1)

CD44 je transmembránový glykoprotein, jehož gen je tvořen dvěma skupinami exonů. Exony 1-5 a 16-20 jsou vždy společně exprimovány jako standardní forma. 10 variabilních exonů (exony 6-15) může být alternativně sestřihováno (24, 25). Přítomnost CD44 byla původně popsána u hematopoetických buněk (26), ale dále byla nalezena na mnoha dalších typech buněk (27-29). Tato molekula slouží hlavně jako receptor pro kyselinu hyaluronovou (30), ale může vázat i jiné složky extracelulární matrix. Funguje tedy především jako adhezivní molekula, ale účastní se i přenosu signálu. Její interakce se stromálními buňkami kostní dřeně jsou důležité v průběhu lymfopoézy a hematopoézy (31, 32). CD44 se vyskytuje i v solubilní formě (sCD44), která vzniká hlavně odštěpením z buněčného povrchu (33). Popsána byla i exprese alternativně sestřižené formy CD44 bez transmembránové a cytoplasmatické domény, tedy mechanismus *de novo* syntézy sCD44 (34). CD44 je přítomna u mnoha solidních nádorů, kde je její zvýšená exprese spojována se špatnou prognózou např. karcinomu plic (35), prsu (36), ovariálního (37) a kolorektálního karcinomu (38). Se zvýšeným metastatickým potenciálem a horší prognózou je často spojována jedna ze sestřihových variant, CD44v6. Vyšší exprese byla popsána u karcinomu žaludku s vysokým

metastatickým potenciálem (39), u pacientů s akutní myeloidní leukémií s kratším přežitím (40), u ALL ze skupiny středního nebo vysokého rizika (41) a u mnohočetného myelomu s vysokým rizikem (42).

Podle expresních profilů mají mít vysokou expresi CD44 pacienti s přestavěným *MLL* genem a pacienti s T ALL, kteří budou relabovat. Naopak nízkou expresi mají mít *TEL/AML1^{pos}* pacienti.

CD44 a *TEL/AML1*

Prokázali jsme, že exprese CD44 je u *TEL/AML1^{pos}* pacientů statisticky významně nižší (obr.1a, příloha 1) než u ostatních pacientů s BCP ALL. V publikovaném souboru 56 pacientů mělo 20 z 21 *TEL/AML1^{pos}* pacientů méně než 30% CD44^{pos} blastů. Mezi 35 *TEL/AML1^{neg}* pacienty měli pouze tři méně než 30% CD44^{pos} blastů (obr.1a., příloha 1). Nejvýrazněji se od tohoto pravidla odchýlil *TEL/AML1^{pos}* pacient s 51% CD44^{pos} buňkami, věk 3 roky, který byl dále netypický i tím, že měl vysokou leukocytózu, což je u tohoto genotypu výjimečné. Odlišoval se i výjimečně vysokou expresí CD66c (25% CD66c^{pos} blastů je u *TEL/AML1^{pos}* genotypu vysoká hodnota). Nakonec u něj nemoc relabovala v centrálním nervovém systému, což je další neobvyklý fenomén u tohoto genotypu. Tento případ dobře koresponduje s publikovanými daty o špatné prognóze malignit s vysokou expresí CD44. To, že *TEL/AML1^{pos}* leukémie jako prognosticky příznivá skupina se pojí s nízkou expresí CD44 a další prognosticky příznivá skupina hyperdiploidních leukémií ji má vysokou, naznačuje, že napříč jednotlivými genotypy není korelace s prognózou lineární a určitě se zde uplatňují i další faktory.

CD44 a *MLL*

MLL^{pos} pacienti mají skutečně vysokou expresi CD44, ale nejedná se o vyšší intenzitu exprese, než mají ostatní *TEL/AML1^{neg}* pacienti (obr.2a, příloha 1). Vysoká exprese CD44 v expresním profilu skupiny pacientů s přestavěným *MLL* genem byla popsána ve více studiích (43, 44). Proto jsme studovali také hladinu sCD44, abychom zjistili, jestli koreluje s expresí povrchové formy. Mezi vyšetřenými 76 pacienty se podařilo stanovit sCD44 pouze u 2 *MLL^{pos}* pacientů, ale vzhledem k tomu, že exprese sCD44 má podobný profil jako exprese povrchové formy (včetně statisticky významně nižší hladiny u *TEL/AML1^{pos}* pacientů; obr.3, příloha 2), je pravděpodobné, že předpokládaná vyšší exprese u *MLL^{pos}* pacientů není zkreslena zvýšeným uvolňováním solubilní formy. *MLL^{pos}* leukémie mají pozitivní většinu blastů, proto mají statisticky významně vyšší expresi než *MLL^{neg}* leukémie, které často exprimují CD44 pouze na části blastů nebo jsou negativní (*TEL/AML1^{pos}* pacienti). Tímto způsobem je pravděpodobně ovlivněna i statistika dat z expresních profilů. Je však třeba vzít v úvahu i variantu, že vzhledem k nízkému počtu vyšetřených *MLL^{pos}*

pacientů se v našem souboru náhodně vyskytli ti, kteří mají nižší expresi CD44 než je pro tuto skupinu ve skutečnosti typické.

CD44 a T ALL

Vzhledem ke krátké době sledování není zatím možné analyzovat vztah k riziku relapsu u pacientů s T ALL, ale vyšší expresi mají pacienti zařazení na protokolu ALL IC-BFM 2002 do skupiny s vysokým rizikem (obr.2b, příloha 1).

CD27 (TNFRSF7, T cell activation antigen)

CD27 je transmembránový glykoprotein, který patří do rodiny TNF receptorů. U lidí je exprimován na většině T buněk, dřeňových thymocytů (45) a na NK buňkách (46). Vzhledem k jeho expresi na somaticky mutovaných B buňkách je považován za znak paměťových B buněk (47). Expresie CD27 se zvyšuje při diferenciaci paměťových buněk do buněk plazmatických, které jsou vysoce pozitivní (48). Ligandem CD27 je molekula CD70 (49), jejíž expresie je více regulována a nachází se pouze přechodně na aktivovaných T a B buňkách (50, 51). Signalizace přes CD27 je důležitá při kostimulaci T buněk, kterou spouští právě interakce s ligandem CD70 (52-54). Interakce CD27 a CD70 také reguluje syntézu IgG a IgM (53). CD27 na svém povrchu nesou také chronické B lymfocytární leukémie, folikulární lymfomy, lymfomy z plášťové zóny, lymfomy z marginální zóny sleziny (55) a leukémie z plazmatických buněk (56). CD27 je prognostickým znakem mnohočetného myelomu, kde je nízká expresie spojena s vysokým rizikem (57).

Podle expresních profilů mají mít vysokou expresi CD27 *TEL/AML1*^{pos} pacienti (16), což jsme potvrdili i na úrovni proteinu (58). V publikovaném souboru 56 pacientů mělo 20 z 21 *TEL/AML1*^{pos} pacientů více než 30% CD27^{pos} blastů. Mezi 35 *TEL/AML1*^{neg} pacienty měli pouze dva více než 30% CD27^{pos} blastů (obr.1a., příloha 1). CD27 tak tvoří spolu s molekulou CD44 dvojici velmi silných prediktorů tohoto genotypu, což jsme potvrdili i na další kohortě pacientů (obr.2, příloha 2). Analýza podle vzdálenosti od úhlopříčky navíc ukázala, že tyto dvě molekuly jsou jedněmi z nejsilnějších prediktorů tohoto genotypu vůbec (obr.1c, příloha 1). Je zde také zobrazena prediktivní hodnota CD44 a CD27 při stanovení pomocí průtokové cytometrie. Při tomto srovnání je vidět, že v případě těchto molekul je jejich prediktivní hodnota dostatečně silná na to, aby byla zachována i při jejich samostatném měření jinou metodou.

Ukázalo se, že informace o expresi těchto molekul má význam i pro správné stanovení genotypu molekulárně genetickými metodami. Dva pacienti, jejichž fenotyp podle exprese CD44 a CD27 ukazoval na pozitivitu *TEL/AML1*, vyšli molekulárně geneticky (podle RT

PCR) *TEL/AML1^{neg}*. Tento rozpor nás vedl ke konfrontaci s výsledky FISH (Fluorescence *in situ* hybridization), která přítomnost fúzního genu prokázala. Následná sekvenace cDNA prokázala, že oba pacienti měli blasty s dosud nepopsanými zlomovými místy v genu *TEL*, takže buňky nebyly zachytitelné běžně používanými diagnostickými systémy PCR. Tyto výsledky ukazují dosud často přehlíženou korelaci mezi genotypem maligních buněk a procentuálním složením jednotlivých subpopulací. Nově objevená varianta fúze *TEL/AML1* navíc ukazuje, že i zkrácená varianta fúzní molekuly *TEL/AML1* je dostačující k zachování tohoto imunofenotypu. Kromě toho, že jsme CD27 a CD44 pro jejich význam při diagnostice leukémií zařadili do panelu antigenů rutinně vyšetřovaných při diagnóze, zkoumali jsme i biologický význam jejich exprese na nemaligních buňkách (viz další část této dizertační práce).

CD135 (FLT3, fms-related tyrosine kinase 3)

CD135 má extracelulární doménu složenou z 5 imunoglobulinových domén, transmembránové části a dvou cytoplazmatických kinázových domén. Receptor je aktivován vazbou ligandu na extracelulární doménu, což vede k tvorbě homodimeru a autofosforylaci receptoru. Aktivovaná kináza dále fosforyluje a aktivuje efektorové molekuly v apoptotických, proliferačních a diferenciačních drahách hematopoetických buněk v kostní dřeni. Flt3 ligand se vyskytuje v membránové nebo solubilní formě a na úrovni proteinu byl detekován v T buňkách a stromálních fibroblastech mikroprostředí kostní dřene. CD135 je přítomna na CD34^{pos} buňkách kostní dřene a to především na těch, které diferencují do myelomonocytární linie. CD135^{pos} je i část CD34^{neg} buněk: kromě malé části CD10^{pos} prekurzorů B buněk jsou to hlavně nezralé CD115^{pos}CD14^{neg} monocytární buňky (59). Za fyziologických podmínek je CD135 protoonkogen, který může zvyšovat přežívání a proliferaci leukemických blastů. Je exprimován u řady hematologických malignit jako ALL a 70-80% AML (60, 61). Aberantně aktivovaná dráha v důsledku mutace CD135 byla pozorována u 30% AML (62).

Vysoká exprese CD135 byla identifikována v expresním profilu pacientů s přestavěným genem *MLL* (44, 63). Pacienti s přestavěným genem *MLL* mají statisticky významně vyšší expresi CD135, ale pozitivní jsou i někteří *MLL^{neg}* pacienti (obr.4a, příloha 2.). Výrazně pozitivní jsou *MLL^{neg}* pacienti s proB leukémií (obr.4b, příloha 2), což může znamenat, že mají přestavbu *MLL* genu, která nebyla vyšetřena nebo identifikována, ale spíše to odráží původ proB leukémií z časnějších diferenciačních stádií. Naopak nižší expresi CD135 mají *TEL/AML1^{pos}* pacienti, jak už bylo popsáno dříve (64). U ALL byla vysoká exprese CD135 kromě pacientů s přestavěným genem *MLL* popsána i u hyperdiploidních ALL. Tito pacienti

mají konstitutivně aktivovanou flt3 kinázu. V našem souboru pacientů jsme u hyperdiploidních pacientů také pozorovali vyšší expresi CD135, ale byla variabilnější a u části pacientů byla pozitivní jen část blastů.

CD247 (CD3/T-cell receptor zeta)

CD3 zeta podjednotka tvoří společně s podjednotkami CD3 gama, delta a epsilon a s alfa/beta nebo gama/delta heterodimery T buněčný receptorový komplex. CD3 zeta řetězec je exprimován také v NK buňkách (65), ale ne v nemaligních B buňkách. V rámci hyperdiploidní ALL by exprese CD247 měla být vyšší u pacientů, kteří budou relabovat. CD247 je u BCP ALL přítomna v různých intenzitách exprese (obr.5, příloha 2) Korelaci s rizikem relapsu bude možné analyzovat až po dostatečně dlouhé době sledování.

CD49f (integrin alfa-6)

CD49f se vyskytuje jako součást heterodimeru integrinů alfa-6/beta-4 (TSP180) nebo alfa-6/beta-1 (VLA6). Heterodimer alfa-6/beta-4 se nachází hlavně na epiteliálních buňkách a slouží jako ligand pro většinu známých lamininů (66). Jeho hlavní funkcí je především udržování integrity epitelů, hlavně epidermis (67). Integrin alfa-6/beta-4 je důležitý pro tvorbu hemidesmozómů. Jeho exprese také zvyšuje invazivní vlastnosti buněk kolorektálního karcinomu (68). Protože v kostní dřeni jsou přítomny některé isoformy lamininů (69-71) a u progenitorů hematopoetických buněk byla prokázána exprese CD49f (72), předpokládá se, že vazba mezi CD49f a těmito lamininy reguluje některé funkce hematopoetických buněk. Úloha CD49f při homingu hematopoetických kmenových buněk do kostní dřene již byla popsána na myším modelu (73).

Podle expresních profilů by měli CD49f více exprimovat *BCR/ABL*^{pos} pacienti (21). Průtoková cytometrie sice ukázala statisticky významně vyšší expresi než u *BCR/ABL*^{neg} pacientů, ale i mezi těmi je řada s vysokou expresí CD49f (obr.6a, příloha 2). Velmi heterogenní expresi mají *TEL/AML1*^{pos} pacienti. Naopak vždy negativní jsou pacienti s přestavěným genem *MLL*, a to bez ohledu na to, zda se jedná o proB leukémie, které naopak v rámci *MLL*^{neg} pacientů CD49f exprimují (obr.6b, příloha 2). Podle studie Caria et al. (22) má vysoká exprese CD49f korelovat se špatnou odpovědí na léčbu. Podle našich předběžných výsledků pacienti, kteří špatně odpovídají na prednison (PPR) mají skutečně vyšší expresi CD49f než pacienti s dobrou odpovědí na léčbu (PGR) (obr. 6c, příloha 2). Je tedy možné, že analýza dat Ross et al. (21), která tuto molekulu označila jako prediktor *BCR/ABL* genotypu je zkreslena faktem, že téměř všichni tito pacienti odpovídají špatně na léčbu.

Interleukin 10 receptor beta (IL10RB, IL-10R2)

Tato molekula je přídatný řetězec receptoru pro IL-10 nezbytný pro aktivní receptorový komplex. Koexprese tohoto proteinu a IL10RA je nutná pro přenos signálu spuštěného vazbou IL-10. Tento gen a geny pro interferonové receptory jsou lokalizovány na malém úseku chromosomu 21. Vazba interleukinu-10 spouští signalizaci přes tyrozinové Janus kinázy (JAK)1 a Tyk2. JAK1 je asociovaná s IL-10R1 a Tyk2 s IL-10R2. IL-10R2 tvoří také společně s IL-22R1 receptor pro IL-22, s IL-20R1 receptor pro IL-26 a s IFN- λ R1 receptor pro IFN- λ (74).

Nižší exprese IL-10RB měla podle expresního profilu korelovat s přítomností fúzního genu *BCR/ABL*. Tuto korelaci jsme na úrovni proteinu nepotvrdili, protože exprese IL-10RB je poměrně nízká i u dalších podskupin BCP ALL (obr.7, příloha 2).

CD99 (MIC2)

Tato molekula je přítomná na thymocytech, T buňkách a dalších hematopoetických buňkách. Účastní se mezibuněčné adheze a aktivace. Ligace CD99 na CD4^{pos}CD8^{pos} thymocytech stimuluje jejich homotypickou agregaci (75). Ligace CD99 na periferních T buňkách spouští kostimulační signál (76, 77). V rámci B řady byla exprese CD99 popsána na časných progenitorech v kostní dřeni a v průběhu diferenciaci se postupně snižuje (78). 77% BCP ALL a 13% zralých B leukémií jsou pozitivní (79), proto byla tato molekula v naší laboratoři zařazena mezi znaky vyšetřované při sledování minimální reziduální nemoci. Nezralé thymocyty mají nižší exprese než zralé T buňky. U T ALL je intenzita exprese vyšší než u normálních T buněk (80).

Pacienti s fúzním genem *BCR/ABL* měli mít vyšší expresi CD99, což jsme potvrdili i pomocí průtokové cytometrie (obr.8, příloha 2).

CD103 (integrin alfa E)

Tento integrin tvoří komplex s beta7 podjednotkou a nachází se na intraepiteliálních T buňkách, monocyttech z periferní krve a aktivovaných T a B buňkách (81, 82). Podle Ross et al. (21) měla být exprese CD103 snižena u *BCR/ABL*^{pos} pacientů, ale na úrovni proteinu nebyla detekována jeho exprese u žádné z vyšetřených BCP ALL (obr 9, příloha 2).

Inducible T-cell co-stimulator ligand (ICOS-L)

Ligand jedné z kostimulačních molekul (ICOS) důležité při regulaci proliferace T buněk je exprimován na monocytech (83).

Vysoká exprese ICOS-L měla korelovat s dobrou odpovědí na léčbu, ale na leukemických buňkách ji nebylo možné na úrovni proteinu detekovat vůbec (obr 10, příloha 2). Pozitivitu v expresních profilech mohla způsobit kontaminace nemaligními buňkami.

TNFR2 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B)

TNFR2 je jeden z proteinů z receptorové superrodiny TNF. Tento protein a TNF-receptor 1 tvoří heterokomplex, který zprostředkuje aktivaci dvou antiapoptotických proteinů (c-IAP1 a c-IAP2). Účastní se kostimulace aktivace T buněk (84, 85).

Vysoká exprese TNFR2 měla podle expresního profilu korelovat s dobrou odpovědí na léčbu, ale podobně jako v případě molekuly ICOS-L byla na úrovni proteinu negativní (obr 10, příloha 2). I zde je možné, že analýza byla zkreslena kvůli kontaminaci vzorku pro expresní profilování nemaligními buňkami.

CD97 (TM7LN1)

CD97 patří do EGF-TM7 rodiny (EGF=epidermální růstový faktor). Je to glykoprotein přítomný na povrchu většiny aktivovaných leukocytů (lymfocyty, granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky) (86). Exprese CD97 byla již popsána u různých typů malignit jako karcinom štítné žlázy (87), kolorektální karcinom (88), karcinom žaludku, pankreatu a jícnu (89). Exprese CD97 je spojována se zvýšenou schopností migrace nádorových buněk (88, 89). Exprese CD97 má být podle expresních profilů vyšší u leukemických buněk než na nemaligních prekurzorech (23) a podle této studie má být tato molekula u leukémií jedním z nově odhalených antigenů specifických pro maligní buňky. Většina vyšetřených pacientů tuto molekulu exprimuje, ale v některých případech jen na části blastů ($56\pm 32\%$, $n=24$). Navíc je CD97^{pos} také malá část nemaligních CD10^{pos} B prekurzorů v kostní dřeni. Pouze částečná exprese na leukemických buňkách společně s možností exprese na nemaligních prekurzorech znemožňuje použití této molekuly např. při detekci minimální reziduální nemoci. Jedním z problému analýzy expresních dat je právě fakt, že označí rozdílně exprimované znaky, ale nelze dobře odhadnout, jakou povahu bude mít exprese. Stačí totiž, aby byla molekula exprimována jen malou částí nemaligních buněk,

tak jako v případě této molekuly a už je značně omezeno či znemožněno její využití jako znaku maligních buněk.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE VS. EXPRESNÍ PROFILOVÁNÍ

Cílem naší studie bylo najít mezi korelujícími geny, které odhalilo expresní profilování, takové, jejichž expresi na úrovni proteinů lze vyšetřovat pomocí průtokové cytometrie. Ta je v diagnostice leukémií spolu s cytologickou morfologií, cytogenetikou a molekulární genetikou standardně používanou metodou.

Do vyšetřování u diagnostických vzorků dětské ALL bylo dosud zařazeno 11 molekul vybraných podle dat z expresního profilování. Dvě z nich jsou použitelné jako velmi dobré prediktory přítomnosti fúzního genu *TEL/AML1* (CD44, CD27). U třech molekul byla sice také potvrzena korelace, která vyšla v expresních profilech, ale nejedná se o tak spolehlivé znaky (CD49f, CD135, CD99). Poměrně časté jsou totiž případy, kdy jsou exprimovány i na buňkách pacientů z jiných genotypových podskupin, než u těch, se kterými mají korelovat. U dalších třech molekul jsme zjistili, že na úrovni proteinu nejsou na leukemických buňkách exprimovány (CD103, ICOS-L a TNFR2). Může se jednat o problém interpretace dat z expresních profilů, kdy je v analyzovaných diagnostických vzorcích kostní dřeň přítomna příměs nemaligních buněk, které tyto molekuly exprimují. Prediktivní hodnoty molekul CD247 pro relaps hyperdiploidní ALL a molekuly CD44 pro relaps T ALL nebyly dosud zhodnoceny vzhledem ke krátké době sledování. Nejlepší prediktory jsme našli pro genotyp *TEL/AML1*. Zdá se, že tyto pacienti tvoří homogennější skupinu, než je tomu u ostatních genotypů. Je to dobře patrné z naší reanalýzy dat podle vzdálenosti od úhlopříčky. V grafu, který ukazuje geny nejlépe definující *TEL/AML1^{pos}* genotyp se jich nachází podstatně více ve větší vzdálenosti od úhlopříčky, než je tomu u ostatních skupin (obr.1a-f, příloha2). Právě kvůli větší heterogenitě ostatních podtypů může být problém najít molekuly, jejichž exprese je bude spolehlivě definovat. U *BCR/ABL^{pos}* pacientů bylo popsáno ve studii Fine et al.(43), že při klastrové analýze se jedna skupina odděluje zvlášť a druhá tvoří klastr s pacienty nesoucími fúzní gen *MLL*. Výhodou naší metody, která umožňuje identifikaci korelujících genů podle vzdálenosti od úhlopříčky je, že všechny geny (probe sety) vidíme v jednom grafickém zobrazení a proto je možné se vyjádřit k množství korelujících genů ve srovnání s ostatními podskupinami. Tato metoda byla v naší pracovní skupině následně použita i v analýze expresních dat ve studii Starkové et al., která se zabývala identifikací genů regulovaných fúzním genem *TEL/AML1* (90). Zatímco naše studie směřuje k využití dostupných dat z expresních profilů pro nalezení nových diagnostických znaků, laboratoře,

kteře se na tuto metodu u leukemií specializují, se pokoušejí o její standardizaci. Ta má vést k zavedení této metody do diagnostiky leukemií. Standardizace probíhá ve dvou fázích. Nejprve mají být identifikovány geny klíčové pro určení podtypu leukemie, případně geny, jejichž exprese bude předpovídat odpověď na léčbu a riziko relapsu. Tím by se zúžil počet genů, jejichž exprese se pomocí expresního profilování vyšetřuje z tisíců na stovky. Takto zúžený počet genů by měl být přítomný na čipu určeném speciálně pro diagnostiku leukemií. Splnění tohoto cíle je pravděpodobně reálné. Těžko si lze ale v praxi představit, že tato metoda by měla nahradit všechny stávající techniky používané v diagnostice leukemií. Velkou překážkou by pravděpodobně byla časová náročnost provedení. Tu by ještě prodloužilo sortování leukemických buněk z diagnostického vzorku, který kromě maligních buněk obsahuje i různé množství buněk nemaligních. Práce zabývající se vlivem kontaminace na falešně identifikované geny, určila jako kritickou hranici v případě leukemického vzorku 90% maligních buněk (91). Např. v diagnostických vzorcích zpracovaných v naší laboratoři bylo průměrně $75 \pm 21\%$ leukemických buněk ($n=360$) a 74% pacientů mělo méně než kritických 90% blastů. Kontaminace nemaligními buňkami je tedy častým jevem. Po odebrání vzorku dochází k postupné degradaci RNA, proto je třeba zpracovat ho co nejdříve. Vzhledem k tomu, že vzorky kostní dřeně jsou do specializovaných laboratořích přepravovány a často zpracovávány až druhý den, v běžné klinické praxi by se při použití expresního profilování jako diagnostické metody jednalo o významný problém. Pro zpracování vzorku pro průtokovou cytometrii není tak kriticky důležitá jeho kvalita, což je spolu s rychlostí provedení této metody její velkou výhodou. Také následná statistická analýza používaná pro analýzu dat z expresního profilování by mohla způsobit přehlédnutí některých výjimečně se vyskytujících znaků, nebo vést ke špatnému zařazení pacienta např. v případě hybridních leukemií.

ČÁST II: CD44 A CD27 – NOVÉ ZNAKY

CHARAKTERIZUJÍCÍ DIFERENCIAČNÍ STÁDIA

B BUNĚK

ÚVOD:

NEMALIGNÍ HEMATOPOEZA – VÝVOJ B LYMFOCYTŮ

Hematopoetické buňky jsou odvozeny z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk. Z nich vznikají myeloidní a lymfoidní prekurzory. Myeloidní prekurzory diferencují do erytroidní, megakaryocytární, granulocytární a monocytární řady. Z lymfoidních prekurzorů se vyvíjí NK, T a B buňky. Objevují se studie, které toto dlouho používané schéma různě modifikují. Např. Adolfsson et al. (92) identifikovali prekurzor, který má potenciál dát vznik granulocytární, monocytární a lymfoidní linii, ale nemohou se z něj vyvíjet erytrocyty a megakaryocyty.

Vývoj lidských B buněk z hematopoetických kmenových buněk se odehrává nejprve ve fetálních játrech a později v kostní dřeni. Prostředí kostní dřene, ve kterém dochází k diferenciaci, je tvořeno stromálními buňkami. Pro stimulaci diferenciaci směrem k B buňkám je klíčová exprese transkripčních faktorů jako je Pax-5 a EBF (early B cell factor). Výsledkem diferenciaci má být vznik buňky nesoucí na svém povrchu antigenně specifický B buněčný receptor. Tento proces, při kterém dochází k přeskupování V, D a J segmentů imunoglobulinových genů začíná již v časném stádiu vývoje B buněk. V(D)J rekombinace začíná v genech pro těžké imunoglobulinové řetězce (*IGH*). Nejprve dochází k přeskupení D_H k J_H oblastí. Pomocí enzymů RAG-1 a RAG-2 vznikají dvouřetězcové zlomy DNA. Protože enzymy RAG štěpí DNA asymetricky, ke kratšímu řetězci jsou přidány nukleotidy komplementární s koncem delšího řetězce, aby mohlo dojít k ligaci zlomu. Tyto tzv. P nukleotidy jsou jedním z mechanismů vzniku receptorové diverzity. Dalším mechanismem je připojení až 20 tzv. N nukleotidů, které zprostředkuje enzym terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT). Dalším krokem V(D)J rekombinace je přeskupení V_H k DJ_H oblastí, které vede ke vzniku VDJ_H exonu. Výsledkem úspěšného přeskupení *IGH* je exprese pre-B

receptoru. Tento proteinový komplex tvoří těžký řetězec imunoglobulinu, náhradní lehký řetězec sestávající z proteinů VpreB (CD179a) a $\lambda 5$ (CD179b) a heterodimer $Ig\alpha$ a $Ig\beta$, který slouží k přenosu signálu (93). Podle publikovaných modelů není pro spuštění signalizace nutná vazba ligandu, ale agregace alespoň dvou receptorů na buněčném povrchu (94-96). Signalizace zprostředkovaná pre-B receptorem vede k proliferaci buněk a k potlačení exprese enzymů rekombinačního aparátu, které je důležité k eliminaci vzniku náhodných DNA zlomů při replikaci. Následně se přeskupují geny pro lehké imunoglobulinové řetězce (*IGL*). Toho se stejně jako při přestavování *IGH* účastní enzymy RAG, ale už ne enzym TdT, který už není v tomto diferenciačním stádiu téměř přítomen (97). Pokud je výsledkem přeskupení *IGL* exprese funkčního lehkého imunoglobulinového řetězce, který vytvoří komplex s těžkým imunoglobulinovým řetězcem, buňka na svém povrchu exprimuje B buněčný receptor tvořený molekulou imunoglobulinu. Buňka je v tomto stádiu vývoje připravena opustit kostní dřeň jako naivní B buňka.

V názvosloví vývojových stádií B buněk dosud nepanuje shoda. Používá se jich několik v rámci vývoje lidských B buněk a další pak u myšího modelu. Nejpoužívanější názvosloví u lidí jsou podle prací LeBiena (98) a Lokena et al. (99), která jsou shrnuta v tabulce 1 (str. 62, příloha 3). Tabulka obsahuje i přehled molekul, jejichž exprese jednotlivá stadia provází. Důležité je nalezení paralely mezi výše popsányými kroky diferenciace a expresí těchto molekul, které pak lze využít k analýze diferenciačních stádií např. pomocí průtokové cytometrie, tak jako v naší práci.

Jako znak nejčasnějšího diferenciačního stadia se využívá molekula CD34. CD34 je povrchový glykoprotein typu sialomucinu, který se účastní buněčné adheze. Tato molekula je přítomna na hematopoetických kmenových buňkách, proto se využívá k posuzování kvality štěpů kostní dřeně před jejich transplantací. Tato molekula přetrvává i na časných vývojových stádiích B řady, kdy buňky získávají molekuly CD10 a CD19.

CD19 je obecným znakem B řady ve všech stádiích vývoje B buněk, které ho ztrácí až jako zralé plazmatické buňky. Její extracelulární část je tvořena dvěma doménami s imunoglobulinovou strukturou. Koligace CD19 a B buněčného receptoru hraje důležitou úlohu při signalizaci přes tento receptor.

CD10, jak napovídá její alternativní název (CALLA, z common acute lymphocytic leukemia antigen), je molekula vysoce exprimovaná u většiny BCP ALL, což z ní činí důležitý znak využívaný v diagnostice leukémií. Její exprese provází také časná stadia vývoje B buněk, na kterých se objevuje pravděpodobně ještě o něco dříve než molekula CD19 (100). V hematopoetickém systému je přítomná také na granulocytech (101), ale nachází se i na dalších tkáních, např. na epitelu glomerulů. Tento glykoprotein je membránová

metaloendopeptidáza (též známá jako enkefalináza), která štěpí a tím inaktivuje několik peptidových hormonů jako glukagon, enkefaliny, oxytocin a další (102, 103).

Ke ztrátě molekuly CD34 dochází po přestavění genů pro těžké imunoglobulinové řetězce. Buňky s přestavěnými geny pro lehké imunoglobulinové řetězce již nenesou molekulu CD10, jejíž exprese se v průběhu diferenciaci postupně snižuje a buňky získávají molekulu CD20. Tento povrchový protein z rodiny MS4A je na B buňkách přítomen, dokud se z nich v konečném stádiu jejich diferenciaci nestanou plazmatické buňky. CD20^{pos}CD10^{neg} subpopulace v kostní dřeni představuje buňky s přestavěnými *IGH* a *IGL*, exprimující B buněčný receptor a připravené opustit kostní dřeň a částečně také recirkulující B buňky. Vyšetření kombinace výše uvedených povrchových molekul v kostní dřeni umožňuje sledování nemaligní i maligní B lymfopoézy.

CÍLE:

Cílem bylo zjistit, jestli je molekula CD27 přítomna na nemaligních B prekurzorech a dále zmapovat expresi molekul CD44 a CD27 v průběhu diferenciaci B buněk v kostní dřeni.

METODY:

Metody použité v této části práce jsou podrobně rozebrány v příloze 3.

VÝSLEDKY A DISKUZE:

Vzhledem k tomu, že CD27 je v rámci B řady považována za znak paměťových B buněk, zajímalo nás, zda je její přítomnost na leukemických B prekurzorech (viz kapitola Molekuly vybrané z expresních profilů a jejich stanovení pomocí průtokové cytometrie) případem asynchronní exprese. Jako asynchronní expresi označujeme situaci, kdy leukemická buňka exprimuje molekulu, která se normálně vyskytuje v jiném stádiu vývoje, než ze kterého je leukémie odvozena. Použití polychromatické průtokové cytometrie nám umožnilo zjistit, zda je tato molekula přítomna v průběhu diferenciaci B buněk v kostní dřeni. Překvapivě se ukázalo, že na části CD19^{pos}CD10^{pos} B prekurzorů se molekula CD27 skutečně nachází. Naše práce tedy jako první ukázala, že CD27 není u lidí v rámci B řady výhradně znakem paměťových buněk, ale nachází se už v časném stádiu jejich vývoje. Expresí CD27 v časném stádiu diferenciaci byla popsána na myších hematopoetických kmenových buňkách (104). U leukemických a nemaligních prekurzorů ji po nás popsala také Nilsson et al. (105). Expresí CD27 jsme v nemaligní kostní dřeni vyšetřili v kombinaci s molekulou CD44, abychom zjistili, jestli jsou zde přítomné CD44^{neg}CD27^{pos} (27SP) imunofenotypové

protějšky *TEL/AML1*^{pos} leukemických buněk. Tuto subpopulaci jsme mezi B prekurzory identifikovali. Rovněž jsme identifikovali CD44^{pos}CD27^{neg} (44SP) imunofenotypové protějšky *TEL/AML1*^{neg} leukemických buněk a dále CD44^{pos}CD27^{pos} (27/44DP) a CD44^{neg}CD27^{neg} (27/44DN) buňky, které jsou u leukémií vzácné (obr.1, příloha 3). V zastoupení těchto subpopulací v rámci CD19^{pos}CD10^{pos} B prekurzorů dominuje 27/44DN subpopulace, méně je 44SP buněk a minoritní zastoupení mají 27SP a 27/44DP subpopulace (obr.2, příloha 3). Polychromatická průtoková cytometrie nám dále umožnila přesněji zjistit, v jakých stádiích diferenciace se tyto subpopulace náchází. Expresi CD44 a CD27 jsme stanovili společně se známými výše popsányými diferenciačními znaky B buněk CD19, CD34, CD10, CD20, intracelulární TdT (iTdT), intracelulární VpreB (iCD179a) a intracelulární IgM (iIgM). Nejvyšší zastoupení CD34^{pos} buněk je v 27SP subpopulaci a dále klesá v 27/44DP, 44SP a 27/44DN subpopulacích (obr.3A,B, příloha 3). Podobnou dynamiku má přítomnost CD10⁺⁺ buněk, která je nejvyšší ve 27SP subpopulaci, nižší ve 27/44DP a velmi nízká ve 44SP a 27/44DN subpopulacích (obr.3C,D, příloha 3). Podle exprese CD34 a CD10 se jednotlivé subpopulace náchází v různých diferenciačních stádiích, což potvrdila i exprese intracelulárních diferenciačních antigenů. Postupně se snižuje exprese iTdT a iCD179a a zvyšuje se exprese intracelulárního iIgM (obr.4, příloha 3). Stanovili jsme také expresi enzymů rekombinačního aparátu (TdT a RAG-1) na úrovni mRNA v sortovaných subpopulacích pomocí reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-RT-PCR). Stejně jako na proteinové úrovni klesá se ztrátou exprese CD27 hladina TdT (obr.5A, příloha 3). Nejvyšší expresi *RAG-1* mají 27SP buňky, nejnižší je ve 27/44DP buňkách a dále stoupá ve 44SP a 27/44DN buňkách (obr.5B, příloha 3). Exprese *RAG-1* se v průběhu diferenciace B buněk snižuje po přestavění genů pro těžký imunoglobulinový řetězec ve stádiu velkých proliferujících buněk. Domníváme se, že tento mechanismus má utlumit aktivitu rekombinačního aparátu a zabránit tak poškození DNA v proliferujících buňkách. Analýza velikosti buněk ve sledovaných subpopulacích stanovená jako zastoupení buněk s vysokým FSc ukázala, že mezi 27/44DP buňkami je nejvyšší zastoupení velkých buněk (obr.6, příloha 3). To koresponduje s nízkou hladinou *RAG-1* v těchto buňkách a s naším předpokladem, že 27/44DP subpopulace odpovídá stádiu velkých proliferujících buněk. To považujeme za poměrně významné zjištění, protože toto stádium nebylo dosud dostatečně imunofenotypově definováno. Bylo sice popsáno, že tyto buňky exprimují povrchový VpreB, ale pouze jejich určitá část(97). Enzymy rekombinačního aparátu se účastní přestavování genů pro těžké a lehké imunoglobulinové řetězce. Pomocí multiplexové RQ-PCR byla zjištěna přítomnost kompletních přestaveb genů pro těžké imunoglobulinové řetězce ve všech sortovaných subpopulacích. To znamená, že přestavování *IGH* probíhá nebo bylo dokončeno už v nejčasnějším sledovaném

diferenciačním stádiu, 27SP buňkách. Přestavby genů pro lehké imunoglobulinové řetězce, které byly stanoveny pomocí detekce *intron RSS-Kde* jsou přítomny až ve 44SP a 27/44DN buňkách (obr.7, příloha 3). Tyto výsledky korespondují s expresí enzymů rekombinačního aparátu. 27SP subpopulaci tedy tvoří buňky představující nebo s přestavěným *IGH*, 27/44DP se nachází ve stádiu velkých proliferujících buněk a 44SP a 27/44DN jsou buňky představující *IGL*.

Podle exprese molekul CD44 a CD27 jsou nemaligními protějšky *TEL/AML1^{pos}* leukémií buňky v časnějším stádiu diferenciaci než v případě *TEL/AML1^{neg}* leukémií. Je zajímavé, že u *TEL/AML1^{pos}* leukémií byla zjištěna vyšší četnost přestaveb genů pro T buněčný receptor (TCR) a imunoglobuliny (tabulka 1, příloha 5) (106). Tento imunogenotyp nemusí nutně odrážet původ ze zralejších buněk, ale je možné ho vysvětlit vysokou aktivitou rekombinačního aparátu v *TEL/AML1^{pos}* leukemických buňkách. Podle naší reanalýzy dat z expresních profilů (16) mají tyto leukémie vyšší expresi genu pro *RAG-1* (odstavec 4.3, příloha 5). Také jejich imunofenotypové protějšky založené na expresi CD44 a CD27 mají vyšší expresi *RAG-1* a *TdT* než imunofenotypové protějšky *TEL/AML1^{neg}* leukémií. Leukemické buňky s vysokou rekombinační aktivitou tak mohou dále přestavovat geny pro TCR a imunoglobulinové řetězce.

Souvislost exprese CD27 a změn v genech pro imunoglobuliny podporuje fakt, že u B buněk se CD27 znovu objevuje v průběhu somatických hypermutací a zůstává přítomna na povrchu paměťových buněk. My jsme v kostní dřeni mezi CD20^{pos}CD10^{neg} (nejvíce diferencované buňky v kostní dřeni) buňkami detekovali buňky nesoucí molekulu CD27. Pravděpodobně se jedná o recirkulující paměťové B buňky. Možnost migrace paměťových buněk do kostní dřeni byla popsána již dříve (107).

Nilsson et al. (105) popsala vysokou expresi CD27 na CD34^{pos} buňkách, které ještě nenesou CD19, tedy na hematopoetických kmenových buňkách, stejně jako bylo popsáno u myší. My jsme však takových buněk pozorovali jen velmi málo a ty navíc byly CD10^{pos} tedy pravděpodobně již patřily k buňkám B řady (100). Procento CD27^{pos} buněk významně vzrostlo na CD34^{pos} buňkách nesoucích CD19. Naše data tedy ukazují, že u lidí provází exprese CD27 časnou fázi diferenciaci buněk směrem k B řadě a dynamika její exprese v těchto fázích vývoje se zcela neshoduje s expresí u myšího modelu.

Možná úloha CD27 na prekurzorech je regulace apoptózy, protože zapojení CD27 v apoptotických kaskádách už bylo popsáno. Podle některých modelů je antiapoptotické, podle jiných naopak proapoptotické. Stimulace CD27 v primární kultuře leukémie z plazmatických buněk měla antiapoptotický efekt (56). Byla také popsána asociace CD27 s TRAF2 a TRAF7 vedoucí k aktivaci NF-κB (108). Apoptóza hraje navíc v časném stádiu

vývoje B buněk významnou roli, protože takto umírají buňky, které nejsou úspěšné při přestavování genů pro imunoglobulinové řetězce. Nolte et al., kteří se zabývali úlohou exprese CD27 na myších progenitorech, vyslovili hypotézu, že může hrát úlohu při regulaci vzniku autoreaktivních B buněk (109). Pokud je imunitní systém vystaven antigenní stimulaci (např. v průběhu infekce), zvýší se exprese CD70 na T buňkách. Vzhledem k tomu, že tato molekula je ligandem CD27, domnívají se, že aktivované T buňky nesoucí CD70 mohou při recirkulaci v kostní dřeni blokovat proliferaci B prekurzorů prostřednictvím interakce CD70 s CD27. Tento předpoklad mají experimentálně podložený pouze pozorováním, že $CD27^{-/-}$ progenitory proliferují rychleji, extrapolace k fyziologickým mechanismům je jinak pouze spekulativní.

Podle našich výsledků se v průběhu vývoje B buněk dvakrát snižuje exprese CD44. Zatímco většina $CD34^{pos}$ buněk je $CD44^{pos}$, její exprese klesá společně se získáním CD10 a CD27 (obr.8, příloha 3). Nejčasnější B prekurzory tedy tuto molekulu na svém povrchu nenesou až do doby, kdy úspěšně přestaví *IGH* a stanou se velkými proliferujícími buňkami, které jsou $CD44^{pos}$. U buněk s přestavěnými *IGL* její exprese opět klesá. Buňky jí však pravděpodobně potřebují v době, kdy opouští kostní dřeň, protože všechny $CD20^{pos}CD10^{neg}$ buňky (tedy nejvíce diferencované B buňky před opuštěním kostní dřene, nebo recirkulující B buňky) ji na svém povrchu opět nesou. Dynamika exprese CD44 je pravděpodobně výsledkem migrace buněk mezi takzvanými niche ve stromatu kostní dřene, ve kterých procházejí buňky různými stádii diferenciaci. Experimentálně bylo prokázáno, že zablokování CD44 pomocí monoklonální protilátky vede k inhibici hematopoézy (110). Dworzak et al., označili ve své práci tuto molekulu jako vhodný znak ke sledování minimální reziduální nemoci. U BCP ALL totiž popsali aberantně nižší expresi než u normálních prekurzorů (111). Tato data jsou v rozporu s naším pozorováním, které nám umožnilo použití polychromatické průtokové cytometrie. Z našich výsledků je patrné, že intenzita exprese se v průběhu diferenciaci mění od negativy do pozitivy přibližně ve stejném rozsahu v jakém ji exprimují leukemické buňky (od negativy u *TEL/AML1^{pos}* až po různé stupně pozitivy *TEL/AML1^{neg}* pacientů).

Podle našich výsledků tedy přítomnost molekul CD44 a CD27 na B prekurzorech v kostní dřeni provází stádia diferenciaci B prekurzorů. Stanovení jejich exprese lze tedy dobře využít k přesnějšímu určení, v jakém stádiu vývoje se B buňka nachází. Prokázaná přítomnost molekuly CD27 v časném stádiu vývoje B prekurzorů znemožňuje využití této molekuly ke sledování minimální reziduální nemoci u *TEL/AML1^{pos}* pacientů, kteří tuto molekulu typicky exprimují. $CD44^{neg}CD27^{pos}$ imunofenotyp těchto leukémií by mohl svědčit o tom, že jsou odvozeny z časnějšího stádia diferenciaci než *TEL/AML1^{neg}* leukémie.

ČÁST III: CD66c

ÚVOD:

Molekuly přítomné na buňkách BCP ALL se z velké části shodují s povrchovými molekulami normálních lymfoidních prekurzorů. Maligní lymfoblasty však často exprimují některé znaky myeloidních buněk. Mechanismus vzniku tohoto jevu, který označujeme jako aberantní exprese, nebyl dosud zcela objasněn. Existují hypotézy, podle kterých je výsledkem původu leukémie z buněk, které ještě nebyly zcela diferencované směrem k lymfoidní linii. Podle jiných může jít o přímý důsledek genetických změn v leukemických buňkách.

Jedním z myeloidních znaků často přítomných u BCP ALL je molekula CD66c. Je přítomná u většiny BCP ALL nesoucích fúzní gen *BCR/ABL* a u většiny hyperdiploidních leukémií. Naopak u většiny leukémií s fúzním genem *TEL/AML1* molekula CD66c přítomná není (112). Jedná se o nejčastější popsany myeloidní antigen u ALL vůbec (113)

CD66c (CEACAM6 – carcinoembryonic antigen- related cell adhesion molekule 6) je členem rodiny karcinoembryonálních antigenů a je tvořena dvěma doménami se strukturou podobnou imunoglobulinům a je silně glykosylována. V buněčné membráně je zakotvena glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou. V rámci hematopoetických buněk ji normálně exprimují granulocyty a jejich prekurzory (114, 115). Těmto buňkám slouží k homotypické a heterotypické adhezi a jejím prostřednictvím se spouští signalizace závislá na uvolňování vápenatých iontů (116). Skladována je v intracelulárních granulách a po aktivaci se na buňkách zvyšuje povrchová exprese (117). Je přítomna i na jiných než hematopoetických buňkách, hlavně na epiteliálních buňkách různých orgánů, např. střeva. Její exprese je zvýšena na buňkách kolorektálního karcinomu (118).

CÍLE:

Cílem bylo zjistit, jak je u lymfoblastů regulována exprese molekuly CD66c a jak je stabilní od diagnózy k relapsu onemocnění.

METODY:

Metody jsou podrobně rozebrány v příloze 4.

VÝSLEDKY A DISKUZE:

Sugita et al. navrhli, že CD66c je intracelulárně exprimována ve všech testovaných leukemických buněčných liniích bez ohledu na její přítomnost na povrchu buněk (119). Toto zjištění je v rozporu s našimi výsledky, podle kterých je molekula intracelulárně přítomná pouze v buňkách, u kterých byla zjištěna též povrchová exprese. To jsme prokázali na úrovni proteinu pomocí průtokové cytometrie (obr.3, příloha 4.) a negativitu buněk bez povrchové exprese jsme potvrdili i citlivější metodou Western Blot (obr.5, příloha 4). Byla vyloučena též přítomnost mRNA (obr.4, příloha 4.). Tyto výsledky svědčí spíše pro regulaci exprese CD66c na úrovni transkripce než pro model Sugity et al. (119), podle kterého skladují všechny leukemické lymfoblasty molekulu intracelulárně a jen u některých je vystavována na buněčný povrch.

Sledovali jsme také vývoj exprese CD66c od diagnózy k relapsu nemoci. Mezi těmito body se exprese molekuly zcela neztrácela a ani nedocházelo k jejímu získání, zaznamenány byly pouze kvantitativní rozdíly (obr.6, příloha 4). Podle našich dat nemá exprese CD66c prognostický význam (obr.7, příloha 4). Ten byl však prokázán u některých solidních tumorů, např. u karcinomu pankreatu. U *in vitro* modelu tohoto onemocnění a kolorektálního karcinomu CD66c zabraňuje anoikis, tedy apoptóze buněk, ke které normálně dochází při abnormální adhezi k substrátu (120-122).

ZÁVĚRY

ČÁST I

- Provedli jsme analýzu expresních profilů dětské ALL a vybrali potenciální prediktory genotypových podskupin a rizika relapsu.
- Do vyšetřování u diagnostických vzorků dětské ALL bylo dosud zařazeno 11 molekul.
- Dvě z nich jsou použitelné jako velmi dobré prediktory přítomnosti fúzního genu *TEL/AML1* (CD44, CD27).
- U třech molekul byla sice také potvrzena korelace, která vyšla v expresních profilech, ale nejedná se o tak spolehlivé znaky (*BCR/ABL*: CD49f, CD99, *MLL*: CD135).
- U dalších třech molekul jsme zjistili, že na úrovni proteinu nejsou na leukemických buňkách exprimovány (CD103, ICOS-L a TNFR2).
- Prediktivní hodnoty molekul CD247 pro relaps hyperdiploidní ALL a molekuly CD44 pro relaps T ALL nebyly dosud zhodnoceny vzhledem ke krátké době sledování.
- Vytvořili jsme statistický přístup, který umožňuje srovnání prediktivní hodnoty exprese jednotlivých molekul při stanovení různými metodami.
- Expresi některých genů se nepodařilo potvrdit na úrovni proteinu.
- Molekuly CD44 a CD27 považujeme za kandidáty zařazení do diagnostického panelu rutinně vyšetřovaných molekul.

ČÁST II

- Jako první jsme popsali expresi molekuly CD27 na prekurzorech B buněk v kostní dřeni.
- Na základě exprese molekul CD44 a CD27 jsme v kostní dřeni identifikovali nemaligní protějšky *TEL/AML1*^{pos} leukemických buněk (CD44^{neg}CD27^{pos}), které se

nachází v časnějším stádiu diferenciaci než imunofenotypové protějšky *TEL/AML1^{neg}* leukemických buněk.

- Na základě exprese diferenciačních antigenů, enzymů rekombinačního aparátu a přítomnosti přestaveb imunoglobulinových genů tvoří $CD44^{neg}CD27^{pos}$ subpopulaci buňky představující nebo s přestavěným těžkým imunoglobulinovým řetězcem, $CD44^{pos}CD27^{pos}$ subpopulace se nachází ve stádiu velkých proliferujících buněk a $CD44^{pos}CD27^{pos}$ a $CD44^{neg}CD27^{neg}$ jsou buňky představující lehký imunoglobulinový řetězec.

ČÁST III

- Molekula CD66c je intracelulárně přítomná pouze v buňkách, u kterých byla zjištěna též povrchová exprese.
- Od diagnózy k relapsu se exprese CD66c neztrácí ani nedochází k jejímu získání.
- Podle našich dat nemá exprese CD66c prognostický význam.

SEZNAM ZKRATEK

ALL	(akutní lymfoblastická leukémie)
AML	(akutní myeloidní leukémie)
BCP ALL	(B prekurzorová akutní lymfoblastická leukémie)
cALL	(common akutní lymfoblastická leukémie)
CML	(chronická myeloidní leukémie)
FSc	(forward scatter)
IGH	(geny pro těžké imunoglobulinové řetězce)
IgL	(geny pro lehké imunoglobulinové řetězce)
mAb	(monoklonální protilátka)
MRN	(minimální reziduální nemoc)
RQ-RT-PCR	(reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase)
RT PCR	(reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce)
SSc	(side scatter)
TCR	(T buněčný receptor)
TdT	(terminální deoxynukleotidyl transferáza)

LITERATURA

1. Birch, J. M., R. Swindell, H. B. Marsden, and P. H. Morris Jones. 1981. Childhood leukaemia in North West England 1954-1977: epidemiology, incidence and survival. *Br J Cancer* 43:324-329.
2. Pui, C. H., M. V. Relling, and J. R. Downing. 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350:1535-1548.
3. Greaves, M. F., and F. E. Alexander. 1993. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia* 7:349-360.
4. Greaves, M. F., S. M. Colman, M. E. Beard, K. Bradstock, M. E. Cabrera, P. M. Chen, P. Jacobs, P. R. Lam-Po-Tang, L. G. MacDougall, C. K. Williams, and et al. 1993. Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the collaborative group study. *Leukemia* 7:27-34.
5. Gurney, J. G., R. K. Severson, S. Davis, and L. L. Robison. 1995. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer* 75:2186-2195.
6. Hrusak, O., J. Trka, J. Zuna, A. Polouckova, T. Kalina, and J. Stary. 2002. Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years. *Leukemia* 16:720-725.
7. Williams, C. K. 1984. Some biological and epidemiological characteristics of human leukaemia in Africans. *IARC Sci Publ*:687-712.
8. Greaves, M. 1999. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 35:1941-1953.
9. Kinlen, L. J. 1995. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *Br J Cancer* 71:1-5.
10. Wang, L. C., W. Swat, Y. Fujiwara, L. Davidson, J. Visvader, F. Kuo, F. W. Alt, D. G. Gilliland, T. R. Golub, and S. H. Orkin. 1998. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12:2392-2402.
11. Lorschach, R. B., and J. R. Downing. 2001. The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. *Int J Hematol* 74:258-265.

12. Loh, M. L., and J. E. Rubnitz. 2002. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr Opin Hematol* 9:345-352.
13. Ramakers-van Woerden, N. L., R. Pieters, A. H. Loonen, I. Hubeek, E. van Drunen, H. B. Beverloo, R. M. Slater, J. Harbott, J. Seyfarth, E. R. van Wering, K. Hahlen, K. Schmiegelow, G. E. Janka-Schaub, and A. J. Veerman. 2000. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96:1094-1099.
14. Ito, C., M. Kumagai, A. Manabe, E. Coustan-Smith, S. C. Raimondi, F. G. Behm, K. G. Murti, J. E. Rubnitz, C. H. Pui, and D. Campana. 1999. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood* 93:315-320.
15. Belkov, V. M., E. Y. Krynetski, J. D. Schuetz, Y. Yanishevski, E. Masson, S. Mathew, S. Raimondi, C. H. Pui, M. V. Relling, and W. E. Evans. 1999. Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood* 93:1643-1650.
16. Yeoh, E. J., M. E. Ross, S. A. Shurtleff, W. K. Williams, D. Patel, R. Mahfouz, F. G. Behm, S. C. Raimondi, M. V. Relling, A. Patel, C. Cheng, D. Campana, D. Wilkins, X. Zhou, J. Li, H. Liu, C. H. Pui, W. E. Evans, C. Naeve, L. Wong, and J. R. Downing. 2002. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1:133-143.
17. Su, A. I., J. B. Welsh, L. M. Sapinoso, S. G. Kern, P. Dimitrov, H. Lapp, P. G. Schultz, S. M. Powell, C. A. Moskaluk, H. F. Frierson, Jr., and G. M. Hampton. 2001. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 61:7388-7393.
18. Ramaswamy, S., P. Tamayo, R. Rifkin, S. Mukherjee, C. H. Yeang, M. Angelo, C. Ladd, M. Reich, E. Latulippe, J. P. Mesirov, T. Poggio, W. Gerald, M. Loda, E. S. Lander, and T. R. Golub. 2001. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15149-15154.
19. Carroll, W. L., D. Bhojwani, D. J. Min, E. Raetz, M. Relling, S. Davies, J. R. Downing, C. L. Willman, and J. C. Reed. 2003. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:102-131.

20. Augenlicht, L. H., M. Z. Wahrman, H. Halsey, L. Anderson, J. Taylor, and M. Lipkin. 1987. Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro. *Cancer Res* 47:6017-6021.
21. Ross, M. E., X. Zhou, G. Song, S. A. Shurtleff, K. Girtman, W. K. Williams, H. C. Liu, R. Mahfouz, S. C. Raimondi, N. Lenny, A. Patel, and J. R. Downing. 2003. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 102:2951-2959.
22. Cario, G., M. Stanulla, B. M. Fine, O. Teuffel, N. V. Neuhoff, A. Schrauder, T. Flohr, B. W. Schafer, C. R. Bartram, K. Welte, B. Schlegelberger, and M. Schrappe. 2005. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105:821-826.
23. Maia, S., W. N. Haining, S. Ansen, Z. Xia, S. A. Armstrong, N. P. Seth, P. Ghia, M. L. den Boer, R. Pieters, S. E. Sallan, L. M. Nadler, and A. A. Cardoso. 2005. Gene expression profiling identifies BAX-delta as a novel tumor antigen in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 65:10050-10058.
24. Screaton, G. R., M. V. Bell, D. G. Jackson, F. B. Cornelis, U. Gerth, and J. I. Bell. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12160-12164.
25. Goodison, S., and D. Tarin. 1998. Clinical implications of anomalous CD44 gene expression in neoplasia. *Front Biosci* 3:e89-109.
26. Jalkanen, S. T., R. F. Bargatze, L. R. Herron, and E. C. Butcher. 1986. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* 16:1195-1202.
27. Cooper, D. L., G. Dougherty, H. J. Harn, S. Jackson, E. W. Baptist, J. Byers, A. Datta, G. Phillips, and N. R. Isola. 1992. The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem Biophys Res Commun* 182:569-578.
28. Fox, S. B., J. Fawcett, D. G. Jackson, I. Collins, K. C. Gatter, A. L. Harris, A. Gearing, and D. L. Simmons. 1994. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54:4539-4546.

29. Mackay, C. R., H. J. Terpe, R. Stauder, W. L. Marston, H. Stark, and U. Gunthert. 1994. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124:71-82.
30. Aruffo, A., I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, and B. Seed. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313.
31. Miyake, K., K. L. Medina, S. Hayashi, S. Ono, T. Hamaoka, and P. W. Kincade. 1990. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 171:477-488.
32. Moll, J., S. Khaldoyanidi, J. P. Sleeman, M. Achtnich, I. Preuss, H. Ponta, and P. Herrlich. 1998. Two different functions for CD44 proteins in human myelopoiesis. *J Clin Invest* 102:1024-1034.
33. Okamoto, I., Y. Kawano, H. Tsuiki, J. Sasaki, M. Nakao, M. Matsumoto, M. Suga, M. Ando, M. Nakajima, and H. Saya. 1999. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* 18:1435-1446.
34. Yu, Q., and B. P. Toole. 1996. A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44. *J Biol Chem* 271:20603-20607.
35. Le, Q. T., E. Chen, A. Salim, H. Cao, C. S. Kong, R. Whyte, J. Donington, W. Cannon, H. Wakelee, R. Tibshirani, J. D. Mitchell, D. Richardson, K. J. O'Byrne, A. C. Koong, and A. J. Giaccia. 2006. An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 12:1507-1514.
36. Watanabe, O., J. Kinoshita, T. Shimizu, H. Imamura, A. Hirano, T. Okabe, M. Aiba, and K. Ogawa. 2005. Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 24:75-82.
37. Cho, E. Y., Y. Choi, S. W. Chae, J. H. Sohn, and G. H. Ahn. 2006. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol Int* 56:62-70.
38. Zavrides, H. N., A. Zizi-Sermpetzoglou, D. Panousopoulos, G. Athanasas, I. Elemenoglou, and G. Peros. 2005. Prognostic evaluation of CD44 expression in

- correlation with bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 43:31-36.
39. Joo, M., H. K. Lee, and Y. K. Kang. 2003. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 23:1581-1588.
 40. Legras, S., U. Gunthert, R. Stauder, F. Curt, S. Oliferenko, H. C. Kluin-Nelemans, J. P. Marie, S. Proctor, C. Jasmin, and F. Smadja-Joffe. 1998. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 91:3401-3413.
 41. Magyarosy, E., A. Sebestyén, and J. Timar. 2001. Expression of metastasis associated proteins, CD44v6 and NM23-H1, in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 21:819-823.
 42. Liebisch, P., S. Eppinger, C. Schopflin, G. Stehle, G. Munzert, H. Dohner, and M. Schmid. 2005. CD44v6, a target for novel antibody treatment approaches, is frequently expressed in multiple myeloma and associated with deletion of chromosome arm 13q. *Haematologica* 90:489-493.
 43. Fine, B. M., M. Stanulla, M. Schrappe, M. Ho, S. Viehmann, J. Harbott, and L. M. Boxer. 2004. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103:1043-1049.
 44. Armstrong, S. A., J. E. Staunton, L. B. Silverman, R. Pieters, M. L. den Boer, M. D. Minden, S. E. Sallan, E. S. Lander, T. R. Golub, and S. J. Korsmeyer. 2002. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 30:41-47.
 45. van Lier, R. A., J. Borst, T. M. Vroom, H. Klein, P. Van Mourik, W. P. Zeijlemaker, and C. J. Melief. 1987. Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *J Immunol* 139:1589-1596.
 46. Sugita, K., M. J. Robertson, Y. Torimoto, J. Ritz, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1992. Participation of the CD27 antigen in the regulation of IL-2-activated human natural killer cells. *J Immunol* 149:1199-1203.
 47. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188:1679-1689.

48. Avery, D. T., J. I. Ellyard, F. Mackay, L. M. Corcoran, P. D. Hodgkin, and S. G. Tangye. 2005. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J Immunol* 174:4034-4042.
49. Goodwin, R. G., M. R. Alderson, C. A. Smith, R. J. Armitage, T. VandenBos, R. Jerzy, T. W. Tough, M. A. Schoenborn, T. Davis-Smith, K. Hennen, and et al. 1993. Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* 73:447-456.
50. Hintzen, R. Q., S. M. Lens, M. P. Beckmann, R. G. Goodwin, D. Lynch, and R. A. van Lier. 1994. Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the TNF gene family. *J Immunol* 152:1762-1773.
51. Lens, S. M., P. A. Baars, B. Hooibrink, M. H. van Oers, and R. A. van Lier. 1997. Antigen-presenting cell-derived signals determine expression levels of CD70 on primed T cells. *Immunology* 90:38-45.
52. Kobata, T., K. Agematsu, J. Kameoka, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1994. CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA⁺ naive T cell costimulation. *J Immunol* 153:5422-5432.
53. Agematsu, K., T. Kobata, F. C. Yang, T. Nakazawa, K. Fukushima, M. Kitahara, T. Mori, K. Sugita, C. Morimoto, and A. Komiyama. 1995. CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur J Immunol* 25:2825-2829.
54. Agematsu, K., T. Kobata, K. Sugita, T. Hirose, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1995. Direct cellular communications between CD45R0 and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70. *J Immunol* 154:3627-3635.
55. Forconi, F., D. Raspadori, M. Lenoci, and F. Lauria. 2005. Absence of surface CD27 distinguishes hairy cell leukemia from other leukemic B-cell malignancies. *Haematologica* 90:266-268.
56. Guikema, J. E., E. Vellenga, W. H. Abdulahad, S. Hovenga, and N. A. Bos. 2004. CD27-triggering on primary plasma cell leukaemia cells has anti-apoptotic effects involving mitogen activated protein kinases. *Br J Haematol* 124:299-308.
57. Guikema, J. E., S. Hovenga, E. Vellenga, J. J. Conradie, W. H. Abdulahad, R. Bekkema, J. W. Smit, F. Zhan, J. Shaughnessy, Jr., and N. A. Bos. 2003. CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high-risk disease. *Br J Haematol* 121:36-43.

58. Vaskova, M., E. Mejstrikova, T. Kalina, P. Martinkova, M. Omelka, J. Trka, J. Stary, and O. Hrusak. 2005. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19:876-878.
59. Rappold, I., B. L. Ziegler, I. Kohler, S. Marchetto, O. Rosnet, D. Birnbaum, P. J. Simmons, A. C. Zannettino, B. Hill, S. Neu, W. Knapp, R. Alitalo, K. Alitalo, A. Ullrich, L. Kanz, and H. J. Buhning. 1997. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90:111-125.
60. Birg, F., M. Courcoul, O. Rosnet, F. Bardin, M. J. Pebusque, S. Marchetto, A. Tabilio, P. Mannoni, and D. Birnbaum. 1992. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 80:2584-2593.
61. Birg, F., O. Rosnet, N. Carbuccia, and D. Birnbaum. 1994. The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 13:223-227.
62. Levis, M., and D. Small. 2003. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 17:1738-1752.
63. Ferrando, A. A., S. A. Armstrong, D. S. Neuberg, S. E. Sallan, L. B. Silverman, S. J. Korsmeyer, and A. T. Look. 2003. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 102:262-268.
64. De Zen, L., A. Orfao, G. Cazzaniga, L. Masiero, M. G. Cocito, M. Spinelli, A. Rivolta, A. Biondi, L. ZanESCO, and G. Basso. 2000. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia* 14:1225-1231.
65. Anderson, P., M. Caligiuri, J. Ritz, and S. F. Schlossman. 1989. CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341:159-162.
66. Mercurio, A. M. 1995. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol* 5:419-423.
67. Dowling, J., Q. C. Yu, and E. Fuchs. 1996. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol* 134:559-572.

68. Chao, C., M. M. Lotz, A. C. Clarke, and A. M. Mercurio. 1996. A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 56:4811-4819.
69. Siler, U., P. Rousselle, C. A. Muller, and G. Klein. 2002. Laminin gamma2 chain as a stromal cell marker of the human bone marrow microenvironment. *Br J Haematol* 119:212-220.
70. Siler, U., M. Seiffert, S. Puch, A. Richards, B. Torok-Storb, C. A. Muller, L. Sorokin, and G. Klein. 2000. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* 96:4194-4203.
71. Gu, Y., L. Sorokin, M. Durbeej, T. Hjalt, J. I. Jonsson, and M. Ekblom. 1999. Characterization of bone marrow laminins and identification of alpha5-containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP-Mix cells. *Blood* 93:2533-2542.
72. Gu, Y. C., J. Kortessmaa, K. Tryggvason, J. Persson, P. Ekblom, S. E. Jacobsen, and M. Ekblom. 2003. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* 101:877-885.
73. Qian, H., K. Tryggvason, S. E. Jacobsen, and M. Ekblom. 2006. Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. *Blood* 107:3503-3510.
74. Donnelly, R. P., F. Sheikh, S. V. Kotenko, and H. Dickensheets. 2004. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol* 76:314-321.
75. Bernard, G., D. Zoccola, M. Deckert, J. P. Breittmayer, C. Aussel, and A. Bernard. 1995. The E2 molecule (CD99) specifically triggers homotypic aggregation of CD4+ CD8+ thymocytes. *J Immunol* 154:26-32.
76. Waclavicek, M., O. Majdic, T. Stulnig, M. Berger, R. Sunder-Plassmann, G. J. Zlabinger, T. Baumruker, J. Stockl, C. Ebner, W. Knapp, and W. F. Pickl. 1998. CD99 engagement on human peripheral blood T cells results in TCR/CD3-dependent cellular activation and allows for Th1-restricted cytokine production. *J Immunol* 161:4671-4678.
77. Wingett, D., K. Forcier, and C. P. Nielson. 1999. A role for CD99 in T cell activation. *Cell Immunol* 193:17-23.

78. Dworzak, M. N., G. Fritsch, P. Buchinger, C. Fleischer, D. Printz, A. Zellner, A. Schollhammer, G. Steiner, P. F. Ambros, and H. Gadner. 1994. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood* 83:415-425.
79. Dworzak, M. N., G. Fritsch, C. Fleischer, D. Printz, G. Froschl, P. Buchinger, G. Mann, and H. Gadner. 1999. CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis. *Br J Haematol* 105:690-695.
80. Dworzak, M. N., G. Froschl, D. Printz, L. D. Zen, G. Gaipa, R. Ratei, G. Basso, A. Biondi, W. D. Ludwig, and H. Gadner. 2004. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 18:703-708.
81. Cerf-Bensussan, N., A. Jarry, N. Brousse, B. Lisowska-Grospierre, D. Guy-Grand, and C. Griscelli. 1987. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 17:1279-1285.
82. Shaw, S. K., K. L. Cepek, E. A. Murphy, G. J. Russell, M. B. Brenner, and C. M. Parker. 1994. Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution. *J Biol Chem* 269:6016-6025.
83. Aicher, A., M. Hayden-Ledbetter, W. A. Brady, A. Pezzutto, G. Richter, D. Magaletti, S. Buckwalter, J. A. Ledbetter, and E. A. Clark. 2000. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 164:4689-4696.
84. Kim, E. Y., and H. S. Teh. 2001. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol* 167:6812-6820.
85. Kim, E. Y., and H. S. Teh. 2004. Critical role of TNF receptor type-2 (p75) as a costimulator for IL-2 induction and T cell survival: a functional link to CD28. *J Immunol* 173:4500-4509.
86. Jaspars, L. H., W. Vos, G. Aust, R. A. Van Lier, and J. Hamann. 2001. Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor. *Tissue Antigens* 57:325-331.
87. Mustafa, T., T. Klonisch, S. Hombach-Klonisch, A. Kehlen, C. Schmutzler, J. Koehrl, O. Gimm, H. Dralle, and C. Hoang-Vu. 2004. Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Oncol* 24:285-294.

88. Steinert, M., M. Wobus, C. Boltze, A. Schutz, M. Wahlbuhl, J. Hamann, and G. Aust. 2002. Expression and regulation of CD97 in colorectal carcinoma cell lines and tumor tissues. *Am J Pathol* 161:1657-1667.
89. Aust, G., M. Steinert, A. Schutz, C. Boltze, M. Wahlbuhl, J. Hamann, and M. Wobus. 2002. CD97, but not its closely related EGF-TM7 family member EMR2, is expressed on gastric, pancreatic, and esophageal carcinomas. *Am J Clin Pathol* 118:699-707.
90. Starkova, J., J. Madzo, G. Cario, T. Kalina, A. Ford, M. Zaliova, O. Hrusak, and J. Trka. 2007. The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells. *Clin Cancer Res* 13:1726-1735.
91. de Ridder, D., C. E. van der Linden, T. Schonewille, W. A. Dik, M. J. Reinders, J. J. van Dongen, and F. J. Staal. 2005. Purity for clarity: the need for purification of tumor cells in DNA microarray studies. *Leukemia* 19:618-627.
92. Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, and S. E. Jacobsen. 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121:295-306.
93. Benschop, R. J., and J. C. Cambier. 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol* 11:143-151.
94. Gauthier, L., B. Lemmers, V. Guelpa-Fonlupt, M. Fougereau, and C. Schiff. 1999. Mu-surrogate light chain physicochemical interactions of the human preB cell receptor: implications for VH repertoire selection and cell signaling at the preB cell stage. *J Immunol* 162:41-50.
95. Minegishi, Y., L. M. Hendershot, and M. E. Conley. 1999. Novel mechanisms control the folding and assembly of lambda5/14.1 and VpreB to produce an intact surrogate light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3041-3046.
96. Melchers, F. 1999. Fit for life in the immune system? Surrogate L chain tests H chains that test L chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2571-2573.
97. Ghia, P., E. ten Boekel, E. Sanz, A. de la Hera, A. Rolink, and F. Melchers. 1996. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase

- chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med* 184:2217-2229.
98. LeBien, T. W. 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96:9-23.
 99. Loken, M. R., V. O. Shah, K. L. Dattilio, and C. I. Civin. 1987. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70:1316-1324.
 100. Galy, A., M. Travis, D. Cen, and B. Chen. 1995. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3:459-473.
 101. Bene, M. C. 2005. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett* 98:9-21.
 102. Trebbien, R., L. Klarskov, M. Olesen, J. J. Holst, R. D. Carr, and C. F. Deacon. 2004. Neutral endopeptidase 24.11 is important for the degradation of both endogenous and exogenous glucagon in anesthetized pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E431-438.
 103. Plamboeck, A., J. J. Holst, R. D. Carr, and C. F. Deacon. 2005. Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig. *Diabetologia* 48:1882-1890.
 104. Wiesmann, A., R. L. Phillips, M. Mojica, L. J. Pierce, A. E. Searles, G. J. Spangrude, and I. Lemischka. 2000. Expression of CD27 on murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Immunity* 12:193-199.
 105. Nilsson, A., A. de Milito, F. Mowafi, G. Winberg, O. Bjork, E. Z. Wolpert, and F. Chiodi. 2005. Expression of CD27-CD70 on early B cell progenitors in the bone marrow: implication for diagnosis and therapy of childhood ALL. *Exp Hematol* 33:1500-1507.
 106. Zuna, J., O. Krejci, J. Madzo, E. Fronkova, L. Sramkova, O. Hrusak, T. Kalina, M. Vaskova, J. Stary, and J. Trka. 2005. TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first? *Leuk Res* 29:633-639.
 107. Paramithiotis, E., and M. D. Cooper. 1997. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:208-212.
 108. Akiba, H., H. Nakano, S. Nishinaka, M. Shindo, T. Kobata, M. Atsuta, C. Morimoto, C. F. Ware, N. L. Malinin, D. Wallach, H. Yagita, and K. Okumura. 1998. CD27, a

member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273:13353-13358.

109. Nolte, M. A., R. Arens, R. van Os, M. van Oosterwijk, B. Hooibrink, R. A. van Lier, and M. H. van Oers. 2005. Immune activation modulates hematopoiesis through interactions between CD27 and CD70. *Nat Immunol* 6:412-418.
110. Ghaffari, S., G. J. Dougherty, A. C. Eaves, and C. J. Eaves. 1997. Diverse effects of anti-CD44 antibodies on the stromal cell-mediated support of normal but not leukaemic (CML) haemopoiesis in vitro. *Br J Haematol* 97:22-28.
111. Dworzak, M. N., F. Stolz, G. Froschl, D. Printz, T. Henn, S. Fischer, C. Fleischer, O. A. Haas, G. Fritsch, H. Gadner, and E. R. Panzer-Grumayer. 1999. Detection of residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by comparative phenotype mapping: a study of five cases controlled by genetic methods. *Exp Hematol* 27:673-681.
112. Hrusak, O., J. Trka, J. Zuna, J. Houskova, J. Bartunkova, and J. Sary. 1998. Aberrant expression of KOR-SA3544 antigen in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts TEL-AML1 negativity. The Pediatric Hematology Working Group in the Czech Republic. *Leukemia* 12:1064-1070.
113. Kalina, T., M. Vaskova, E. Mejstrikova, J. Madzo, J. Trka, J. Sary, and O. Hrusak. 2005. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer* 5:38.
114. Bocconi, P., R. Di Noto, C. Lo Pardo, M. R. Villa, F. Ferrara, B. Rotoli, and L. Del Vecchio. 1998. CD66c antigen expression is myeloid restricted in normal bone marrow but is a common feature of CD10+ early-B-cell malignancies. *Tissue Antigens* 52:1-8.
115. Mori, T., K. Sugita, T. Suzuki, T. Okazaki, A. Manabe, R. Hosoya, S. Mizutani, A. Kinoshita, and S. Nakazawa. 1995. A novel monoclonal antibody, KOR-SA3544 which reacts to Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells with high sensitivity. *Leukemia* 9:1233-1239.
116. Klein, M. L., S. A. McGhee, J. Baranian, L. Stevens, and S. A. Hefta. 1996. Role of nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster antigen, in activation of human granulocytes. *Infect Immun* 64:4574-4579.

117. Skubitz, K. M., K. D. Campbell, and A. P. Skubitz. 1996. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol* 60:106-117.
118. Jantscheff, P., L. Terracciano, A. Lowy, K. Glatz-Krieger, F. Grunert, B. Micheel, J. Brummer, U. Laffer, U. Metzger, R. Herrmann, and C. Rochlitz. 2003. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 21:3638-3646.
119. Sugita, K., T. Mori, S. Yokota, M. Kuroki, T. O. Koyama, T. Inukai, K. Iijima, K. Goi, T. Tezuka, S. Kojika, K. Shiraishi, M. Nakamura, N. Miyamoto, N. Karakida, K. Kagami, and S. Nakazawa. 1999. The KOR-SA3544 antigen predominantly expressed on the surface of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells is nonspecific cross-reacting antigen-50/90 (CD66c) and invariably expressed in cytoplasm of human leukemia cells. *Leukemia* 13:779-785.
120. Duxbury, M. S., H. Ito, M. J. Zinner, S. W. Ashley, and E. E. Whang. 2004. CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 23:465-473.
121. Duxbury, M. S., E. Matros, T. Clancy, G. Bailey, M. Doff, M. J. Zinner, S. W. Ashley, A. Maitra, M. Redston, and E. E. Whang. 2005. CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg* 241:491-496.
122. Ordonez, C., R. A. Screaton, C. Ilantzis, and C. P. Stanners. 2000. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 60:3419-3424.

PŘÍLOHA Č.1

CORRESPONDENCE

Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia

Leukemia advance online publication, 10 March 2005;
doi:10.1038/sj.leu.2403706

TO THE EDITOR

Expression profiling studies have provided data on an unprecedented number of genes that are expressed in malignant cells.^{1–4} The critical number of genes which can predict a particular genotype is a matter of discussion. Downing pointed out that as few as 20 genes may be necessary for an accurate prediction of subsets and prognosis; these genes should be specifically studied, perhaps by methods like reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or flow cytometry (FC) (Downing in Carroll *et al.*⁵). FC, which shows the expression of molecules in mutual context on individual cells, appears optimal for such analysis.

The present study (*Microarray-guided FC*) is designed to systematically screen for genes within the existing expression profiling studies on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).^{1,3} The genes, which are identified as best correlating with the pediatric ALL subgroups (E2A/PBX1, MLL, TEL/AML1, BCR/ABL, 'novel' and hyperdiploid genotypes; patients who later relapsed and those who developed therapy-induced acute myeloblastic leukemia), are selected. After recalculation just for the B precursor ALL cases, we select the genes in which the difference in expression is likely to be observed at the protein level. Next, we select molecules with suitable cellular localization (nonsecreted proteins) and with an available mAb. Reactivity and specificity of mAbs are tested in healthy peripheral blood cells and/or in cell lines. The respective molecules are investigated by four-color FC in diagnostic bone marrow (BM) samples. Five molecules have proceeded into this step (CD44, CD27, CD49f, CD247 and CD103). We present here the results of CD44 and CD27 expression, which are investigated in the largest cohort.

A total of 66 patients with B-cell precursor ALL and 14 patients with T lineage ALL were considered to enter CD44 and CD27 investigation. These patients represent all Czech children (age lower than 18 years) diagnosed with ALL between 03/2003 and 02/2004. Five patients (four B-cell precursor and one T lineage ALL) were excluded due to low sample volume. CD44 expression was investigated in 62 B-cell precursor ALL patients (21 TEL/AML1^{pos}, 18 hyperdiploid, four BCR/ABL^{pos}, two MLLR^{pos} and 17 with none of the above-mentioned genotype) and CD27 expression in 56 B-cell precursor ALL patients (21 TEL/AML1^{pos}, 15 hyperdiploid, four BCR/ABL^{pos}, one MLLR^{pos} and 15 with none of the above-mentioned genotype). Informed consent was obtained from patients and/or their guardians. Patients were treated according to ALLIC BFM 2002 or Interfant

99 protocols. The presence of TEL/AML1, BCR/ABL fusion genes and MLL gene rearrangement (MLLR) was detected by two-round nested PCR; hyperdiploidy was assessed using DNA index flow-cytometric measurement. CD44 and CD27 antigens were stained with an anti-CD44 FITC and anti-CD27 FITC (BD, San Jose, CA, USA) in four-color combinations with antigens from a standard panel (anti-CD10 PE, anti-CD19 PC5 or PC7, anti-CD34 APC, Immunotech, Marseille, France). Data were acquired using a FACS Calibur flow cytometer (BD). Antigen positivity was analyzed on gated malignant cells according to the isotype control. To evaluate differences of expression between the subgroups, a nonparametric Mann–Whitney test was performed using StatView software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Expression profiling found the gene for CD44 (Hermes, Pgp-1) to be one of the best correlating with the MLL genotype and with the subgroup of T-ALL patients who later developed hematological relapse.^{1,3} Although MLLR^{pos} blasts in our cohort did show CD44 positivity, so far we have not observed a higher CD44 expression compared to other CD44^{pos} B-cell precursor ALL cases (Figures 1a, 2a). In addition, CD44 expression significantly correlated with higher risk T-ALL ($P=0.032$) (Figure 2b). This also indicates that the current risk stratification of the T-ALL patients within the ALL-IC BFM2002 protocol (based on age, leukocyte count at presentation, early treatment response and unfavorable molecular genetics, as in other major frontline therapy protocols) corresponds to the true biological risk. Furthermore, CD44 expression was significantly lower in TEL/AML1^{pos} ALL ($P<0.0001$), which is in line with the observation of one of the two expression profiling studies.³

The association with TEL/AML1 genotype was also found in CD27 (TNFRSF7) gene expression,¹ but another expression profiling study³ showed only a correlation with BCR/ABL genotype. We found a strong correlation of CD27 with TEL/AML1 positivity. CD27^{pos} blasts above 30% were detected in 20/21 and 2/35 patients with TEL/AML1^{pos} and TEL/AML1^{neg} ALL, respectively ($P<0.0001$) (Figure 1a). Since the opposite correlations with TEL/AML1 were observed for CD27 and CD44, we analyzed the composite picture of the expression of these two molecules simultaneously (Figure 1a, b). Most cases in both expression profiling studies and in our cytometric study can be considered either CD44^{pos} or CD27^{pos}. Dual CD27^{pos}CD44^{pos} blasts are typically seen in BCR/ABL^{pos} ALL and a subset of TEL/AML1^{pos} patients exists with CD44^{pos}CD27^{pos} blasts. In our cohort, the TEL/AML1^{pos} case with 51% CD44^{pos} cells presented with an unusually high blast count (peripheral leukocytosis 109×10^6 per ml) and higher percentage CD66c^{pos} blasts (25%) compared to the typical TEL/AML1^{pos} patients⁶ – other presentation parameters corresponded well with the genotype.

CD27 has been considered to be a general marker for memory B-cells in humans and so far its expression in human B-cell precursors has not been reported. Here we show that this antigen is indeed expressed in malignant B precursors at a protein level. Moreover, an experiment with seven-color FC on nonmalignant BM (FACS Aria, BD, data not shown) did confirm

Correspondence: Dr O Hrusak, Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Immunology, Charles University 2nd Medical School, V uvalu 84, 150 06 Praha 5, Prague, Czech Republic; Fax: +42 02 2443 5962; E-mail: Ondrej.Hrusak@lfmotol.cuni.cz
Received 25 August 2004; accepted 12 January 2005

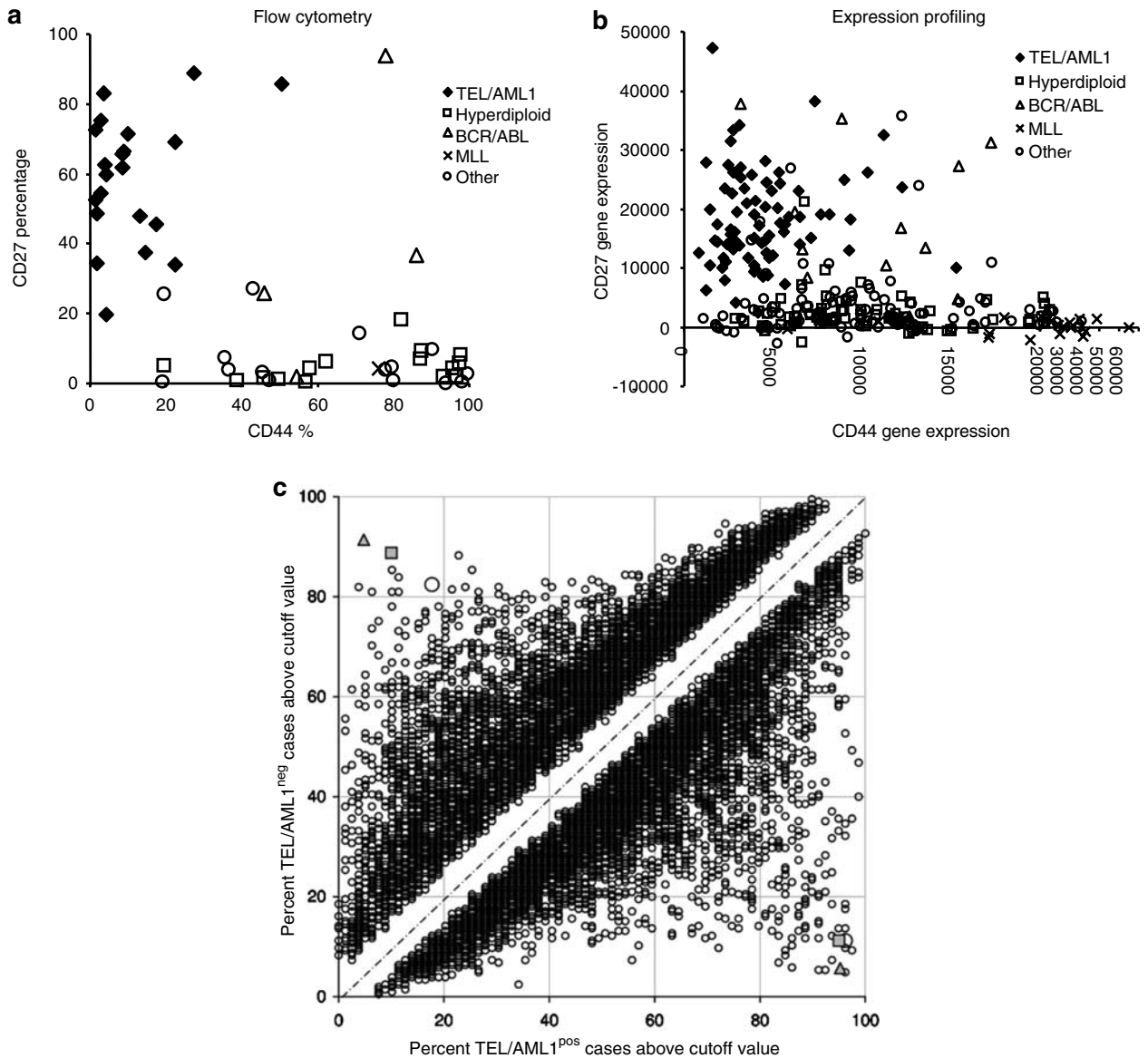


Figure 1 Clustering of ALL genotypic subgroups according to CD44 and CD27 expression. (a) FC data. (b) Expression profiling data from Yeoh *et al.*¹ Probe set numbers 40493_at (CD44) and 38578_at (CD27). (c) The TEL/AML1 predictive value of CD44 and CD27, detected by FC or in two expression profiling studies. Comparison to the other 12 623 probe sets analyzed in Yeoh *et al.*¹ Noncorrelating genes are near the hatched diagonal. An optimal cutoff value was found for each probe set based on the best discrimination of TEL/AML1^{pos} from other B-precursor ALL cases (largest distance from the noncorrelating diagonal). Circles represent individual probe sets (values corresponding to the best CD44 and CD27 probe sets are enlarged). Squares represent CD44 and CD27 from Ross *et al.*³ (probe set numbers 212063_at for CD44 and 206150_at for CD27), triangles show CD44 and CD27 by FC, this cohort. In expression profiling studies, the best correlating probe sets were used in both instances.

CD27^{pos} cells in all four specimens ($12 \pm 2.2\%$ among DAPI^{neg}CD19^{pos}CD10^{pos}CD20^{neg} cells, among these CD27^{pos} cells $45 \pm 13\%$ were CD34^{pos}). The dynamics of CD44 expression on developing B-cells during hematopoiesis was already reported. We are going to analyze the recombination status of Ig genes in subpopulations of precursor B-cells with CD44 and CD27 expression corresponding to lymphoblasts.

To compare the value of CD44 and CD27 with the other expression profiling data for the prediction of TEL/AML1 status, we used the same plot as described previously in the FC metaanalyses⁶ (Figure 1c). This format depicts graphically the predictive value of each probe set or molecule for the TEL/AML1

status. Each probe set or molecule is separately compared to its optimal cutoff value in all BCP ALL patients of the respective cohort. The probe-set-specific optimal cutoff value was determined using a statistical software R (<http://www.r-project.org>). The optimal cutoff value is the one that leads to the best resolution between TEL/AML1^{pos} and TEL/AML1^{neg} subsets, judging by the distance from a noncorrelating diagonal. The percentage of TEL/AML1^{neg} patients above the cutoff value is compared to the respective value in TEL/AML1^{pos} patients. The overall predictive values for CD44 and CD27 are 93 and 95% in FC, 82 and 91% in Yeoh,¹ and 90 and 90% in Ross,³ respectively. The difference in predictive values is in compli-

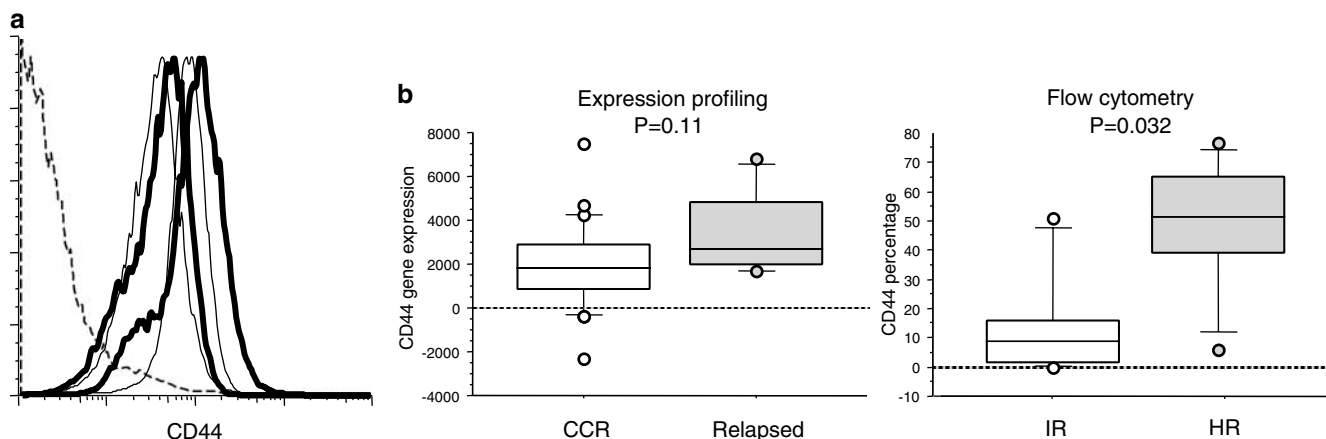


Figure 2 Significance of CD44 expression in specific subsets. (a) Intensity of CD44 expression in B-cell precursor ALL. Histograms represent MLLR^{POS} (thick lines), together with typical hyperdiploid (thin lines) and TEL/AML1^{POS} (dashed line) cases. Y-axis shows frequency. (b) CD44 expression in T-ALL patients. Expression profiling data of patients in clinical complete remission (CCR) and relapsed patients.¹ Probe set number 1126_at is shown (left panel). FC data of patients in the intermediate (IR) and high-risk (HR) groups (right panel).

ance with the fact that FC can investigate the expression of tested molecules on pure ALL cells. We studied the other molecules (CD49f, CD247 and CD103) in specimens of fewer patients and thus it would be too early to establish their predictive values.

The principle that class-defining genes may be selected within microarray data has been suggested previously (Downing in Carroll *et al*⁵). The results of the presented screening strategy prove this principle. Lack of information on protein expression appeared to be the most limiting factor reducing the number of candidate genes in the final FC testing. Improbability of the cell-bound form also excluded molecules during the screening for FC – these secreted molecules may be studied by protein biochemistry. Although cytometric studies on molecules that came from a systematic screening strategy in microarrays have not been presented yet, one new molecule (CD58) has been introduced into FC testing based on expression profiling.⁷ The presented data not only show that information from microarrays can be transferred to cell-based investigation by FC, but also that the composite microarray information can be successfully replaced by strong predictors like CD44 and CD27. The ongoing project *Microarray-guided FC* tests whether other molecules can be found with comparable or better predictive values for ALL genotype and prognosis.

Acknowledgements

We thank the cytometric technicians Jana Ridoskova, Klara Pospisilova and Lucie Gondorcina, and the molecular genetic technicians Katka Muzikova and Leona Reznickova and Marketa Kalinova. MV highly appreciates the practical and theoretical experience in the laboratory of Z Trajanoski (Institute of Biomedical Engineering and Christian Doppler Laboratory for Genomics and Bioinformatics, Graz University of Technology, Austria), as well as the friendly atmosphere. The collaboration of all Czech Pediatric Hematology (CPH) centers (leaders: B Blazek (Ostrava), Z Cerna (Plzen), J Hak (Hradec Kralove), Y Jabali (Ceske Budejovice), V Mihal (Olomouc), D Prochazkova (Usti nad Labem), J Stary (Praha) and J Sterba (Brno)) is appreciated. The

work was supported by Grants Nos. GA UK 80/2004, MSM0021620813, IGA MZ CR 7430-3 and 6929-3.

M Vaskova^{1,2}
E Mejstrikova^{1,2}
T Kalina^{1,2}
P Martinkova³
M Omelka³
J Trka^{1,4}
J Stary⁴
O Hrusak^{1,2}

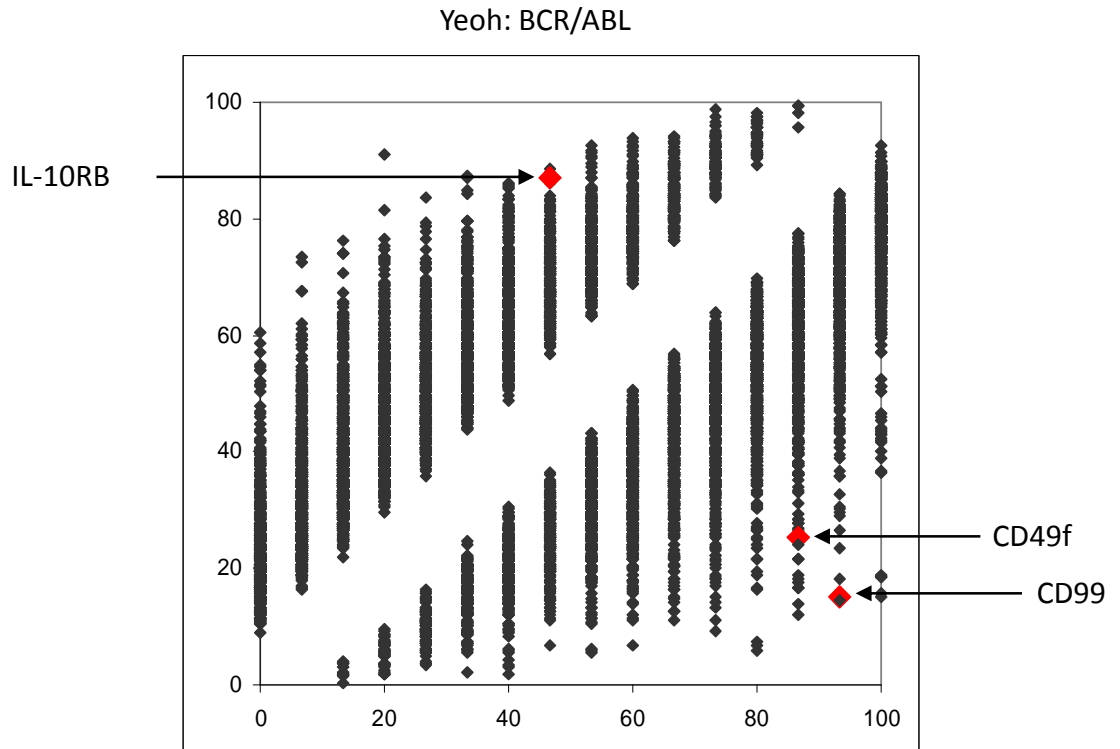
¹CLIP – Childhood Leukemia Investigation
Prague, 2nd Medical School, Charles University,
Prague, Czech Republic;
²Department of Immunology, 2nd Medical
School, Charles University, Prague, Czech
Republic;
³Department of Probability and Mathematical
Statistics, Faculty of Mathematics and Physics,
Charles University, Prague, Czech Republic; and
⁴Pediatric Hematology and Oncology, 2nd
Medical School, Charles University, Prague,
Czech Republic

References

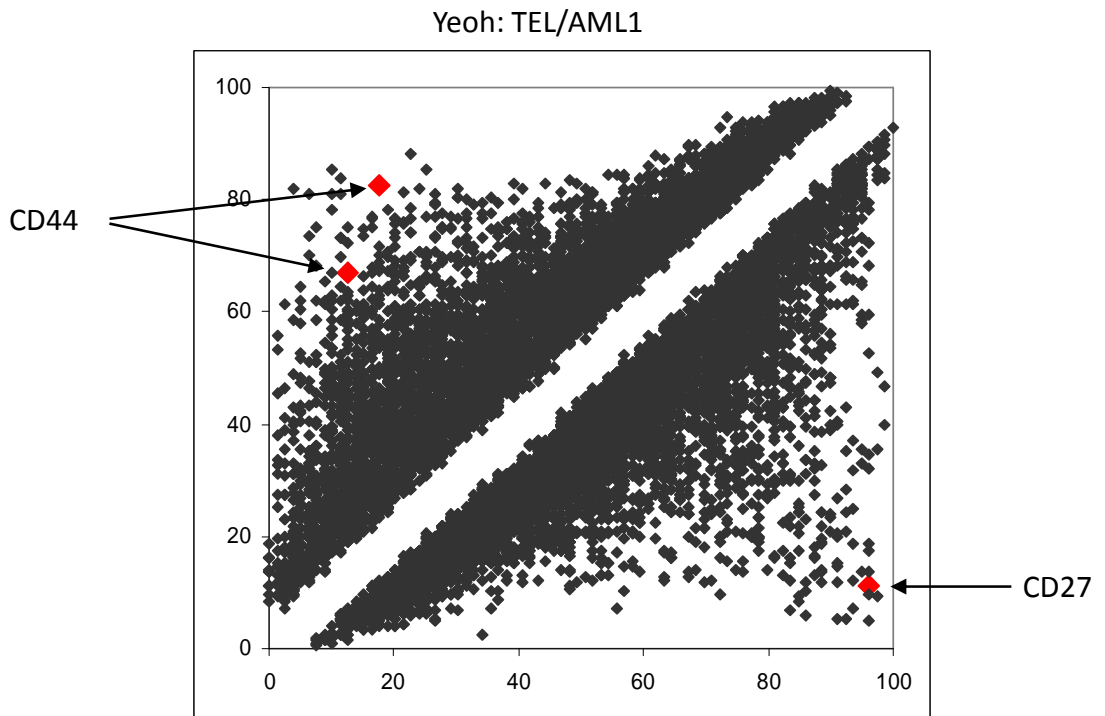
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R *et al*. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; **1**: 133–143.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD *et al*. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; **30**: 41–47.
- Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK *et al*. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003; **102**: 2951–2959.
- Fine BM, Stanulla M, Schrappe M, Ho M, Viehmann S, Harbott J *et al*. Gene expression patterns associated with recurrent chromosomal translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004; **103**: 1043–1049.
- Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S *et al*. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003, 102–131.
- Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002; **16**: 1233–1258.
- Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH *et al*. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2115–2120.

PŘÍLOHA Č.2

obr.1a

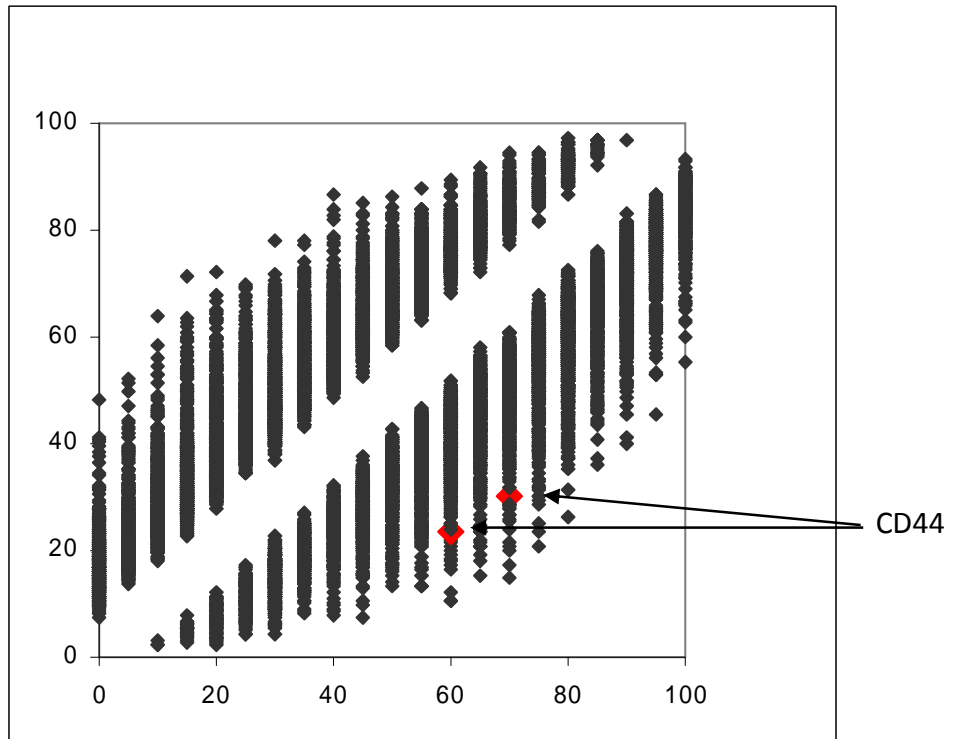


obr.1b



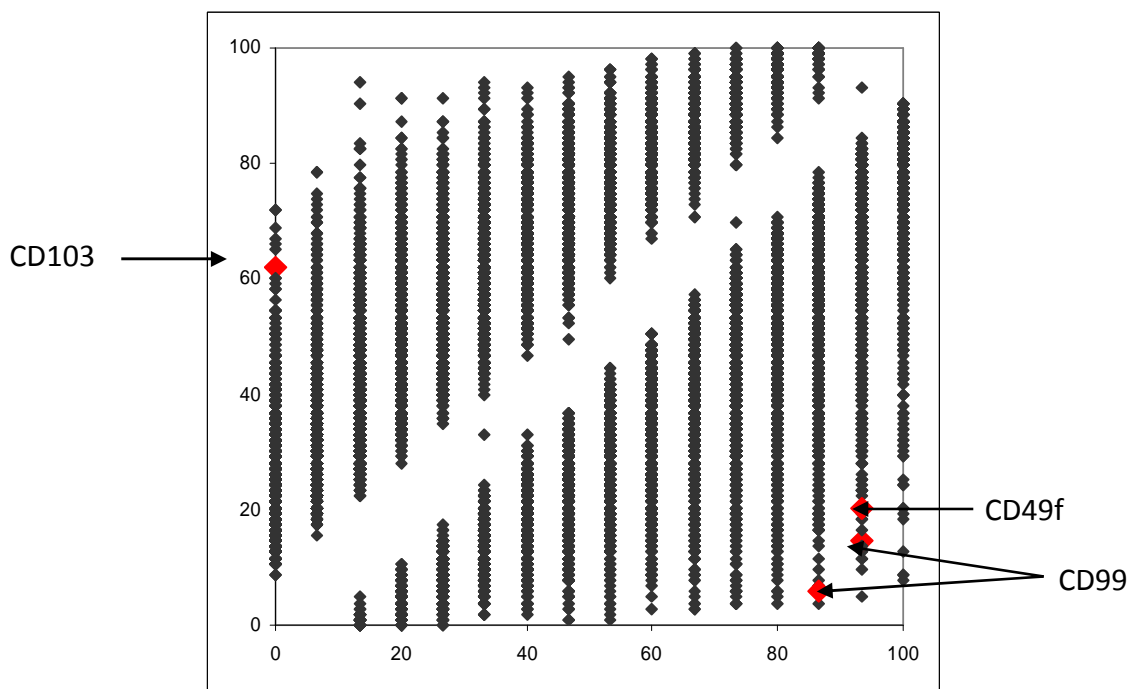
obr.1c

Yeoh: MLL



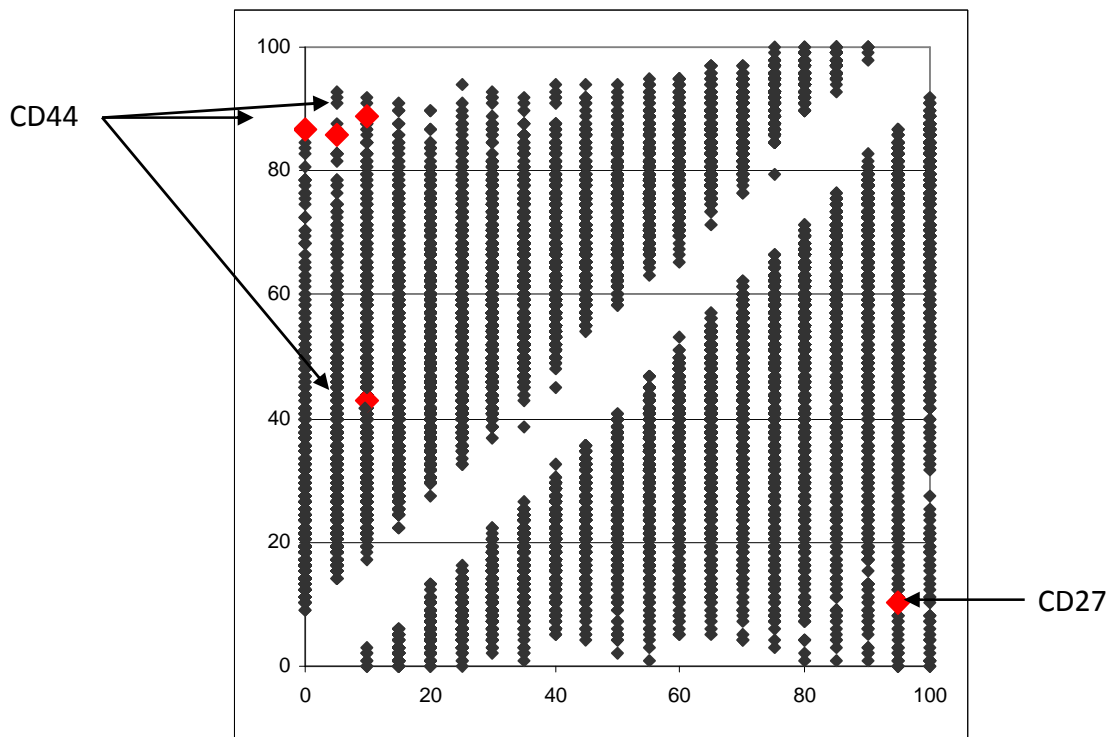
obr.1d

Ross: BCR/ABL



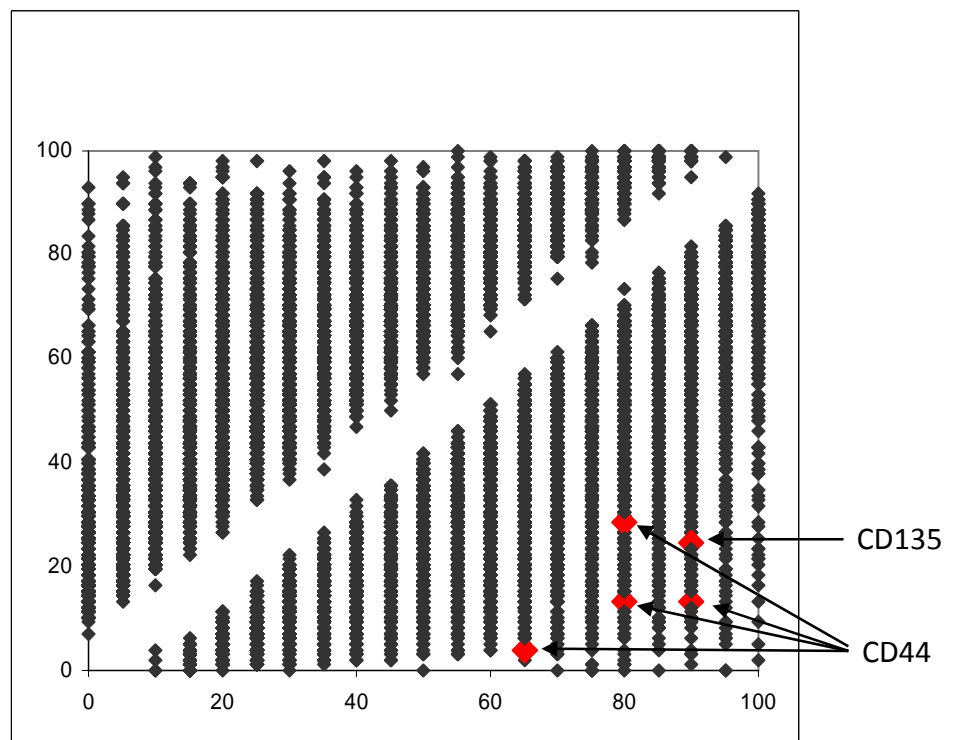
obr.1e

Ross: TEL/AML1

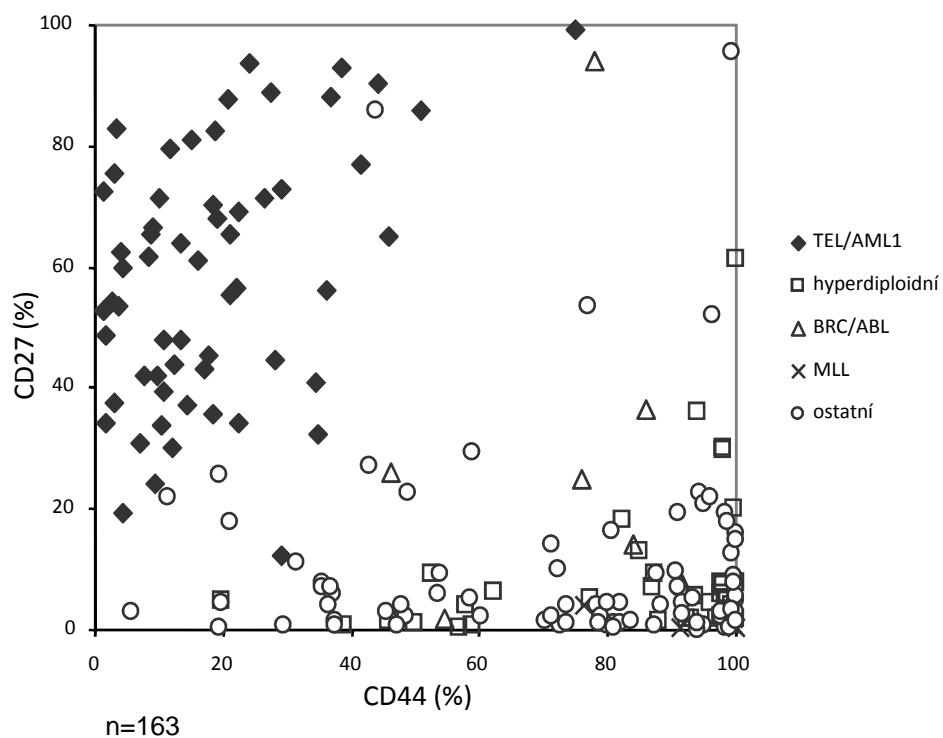


obr.1f

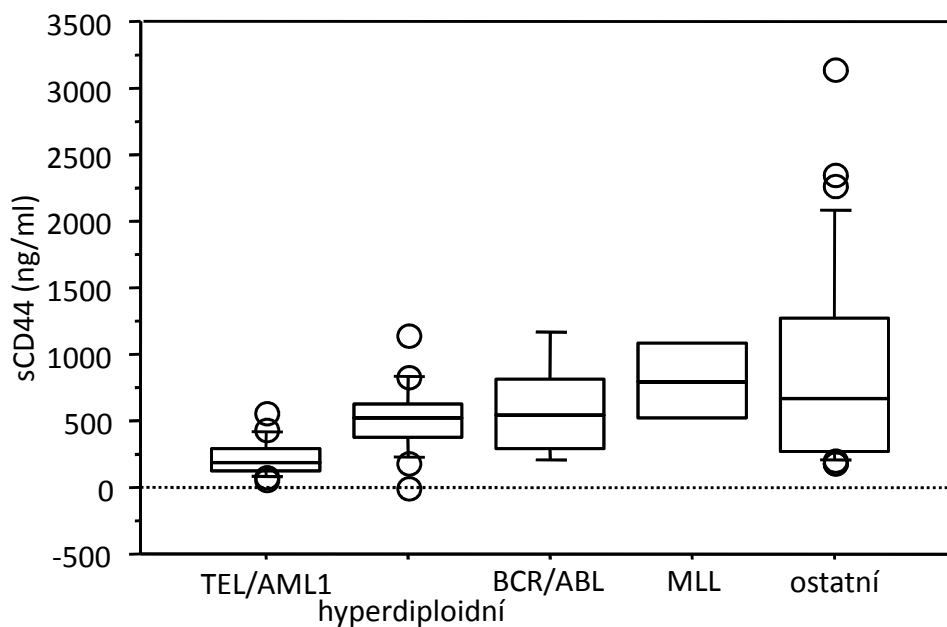
Ross: MLL



obr.2

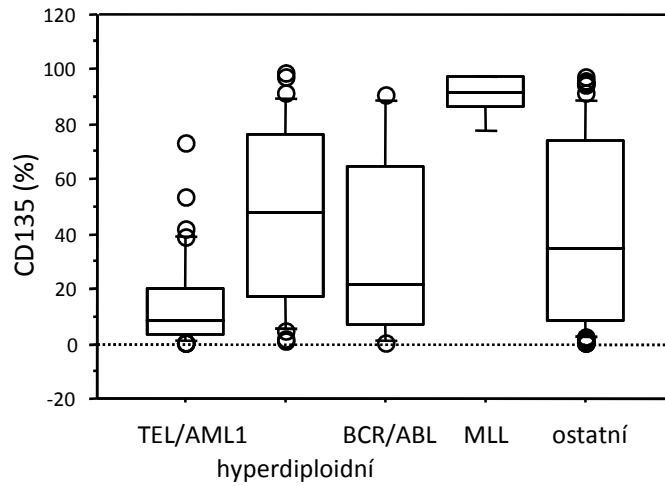


obr.3



TEL/AML1^{pos}: n=22
TEL/AML1^{neg}: n=54
test Mann-Whitney: p<0,0001

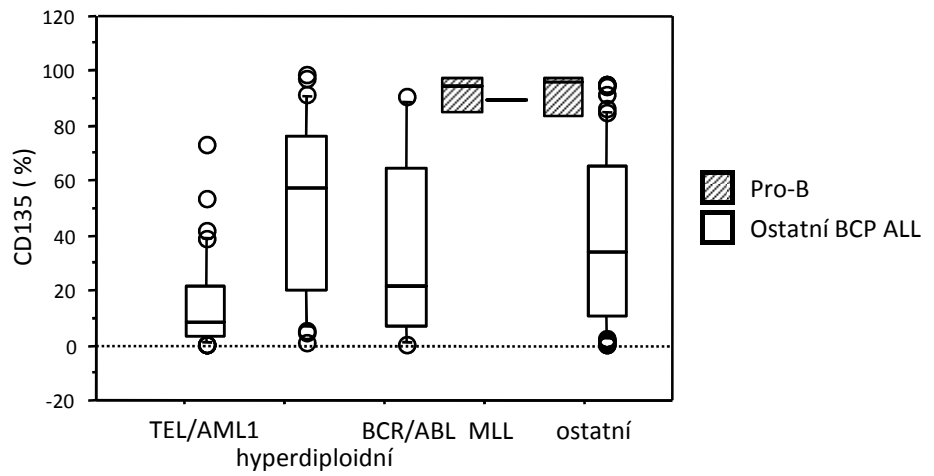
obr.4a



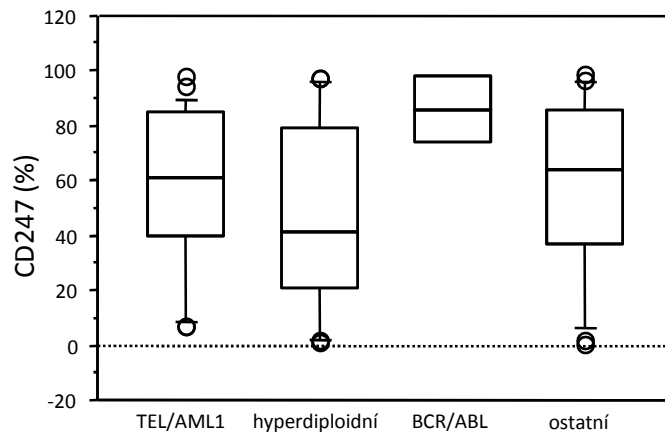
TEL/AML1^{pos}: n=44
TEL/AML1^{neg}: n=112
test Mann-Whitney: p<0,0001

MLL^{pos}: n=5
MLL^{neg}: n=151
test Mann-Whitney: p=0,0002

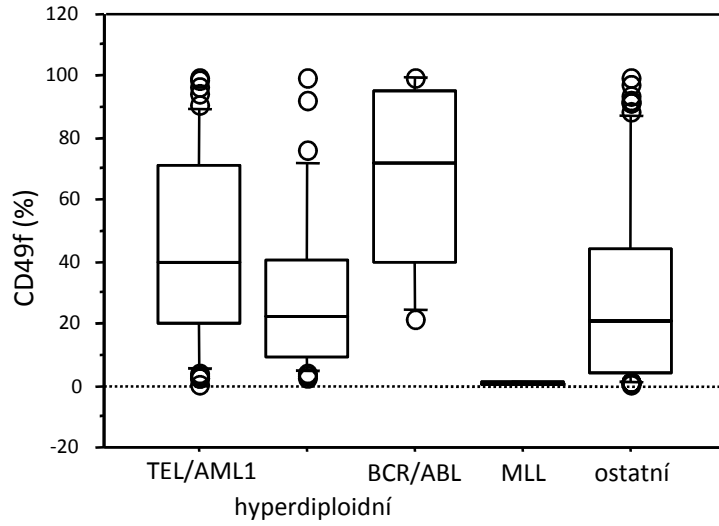
obr.4b



obr.5



obr.6a



BCR/ABL^{pos}: n=7
BCR/ABL^{neg}: n=159

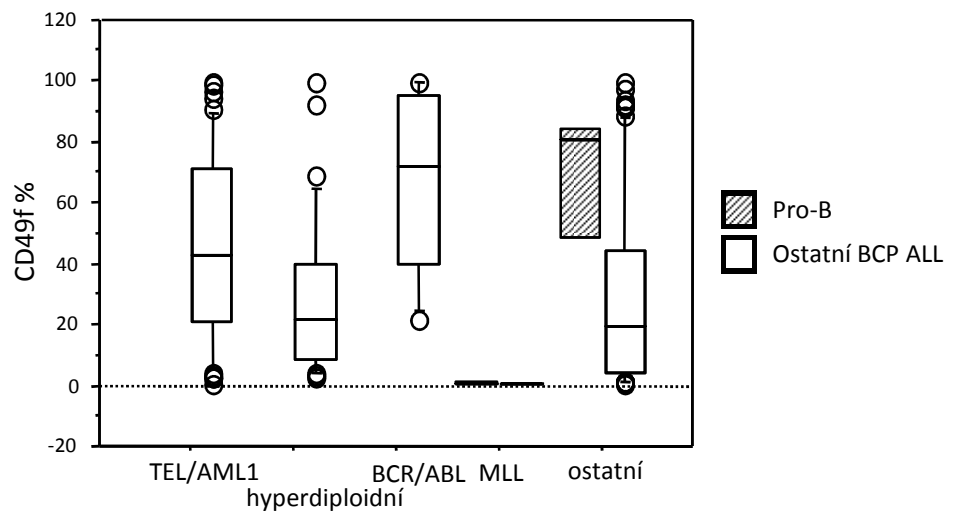
test Mann-Whitney: p=0,01

MLL^{pos}: n=5

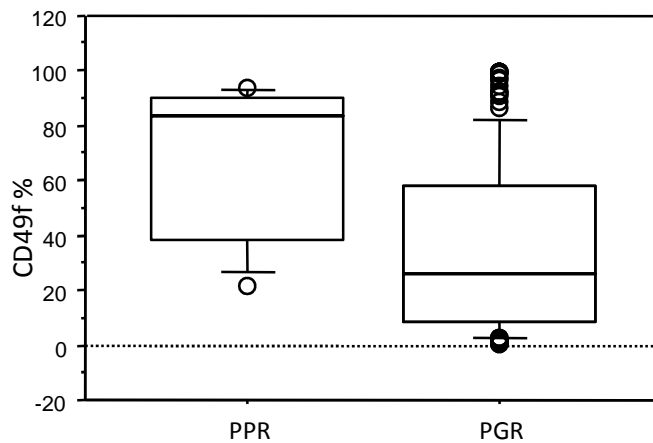
MLL^{neg}: n=161

test Mann-Whitney: p=0,0002

obr.6b



obr.6c

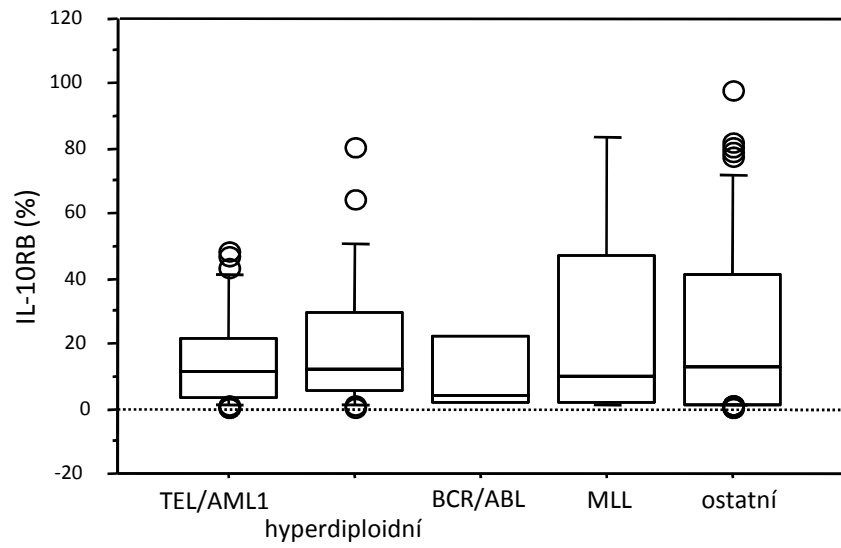


PPR: n=8

PGR: n=152

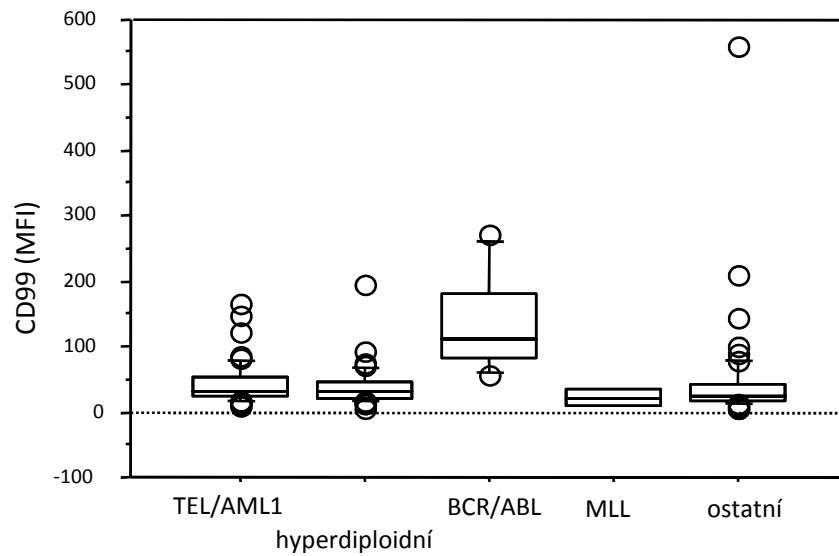
test Mann-Whitney: p=0,0071

obr.7



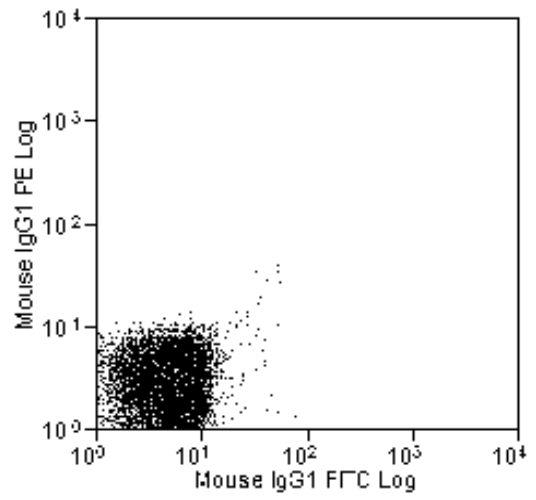
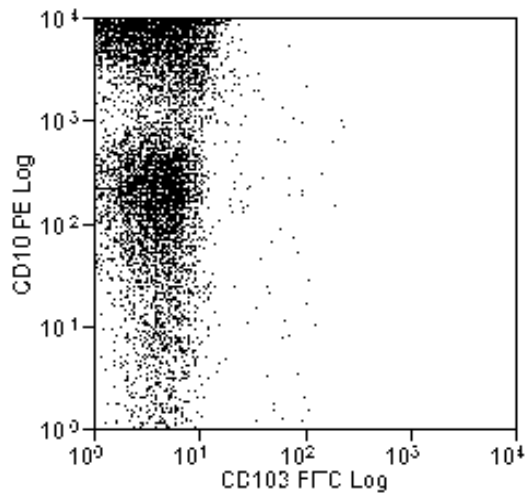
BCR/ABL^{pos}: n=3
BCR/ABL^{neg}: n=112
test Mann-Whitney: p>0,05

obr.8

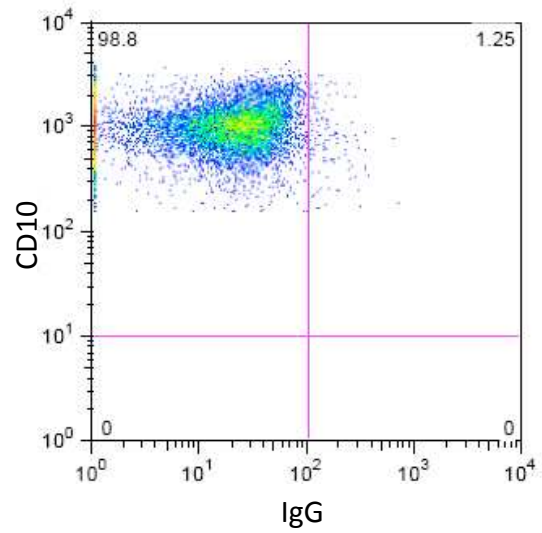
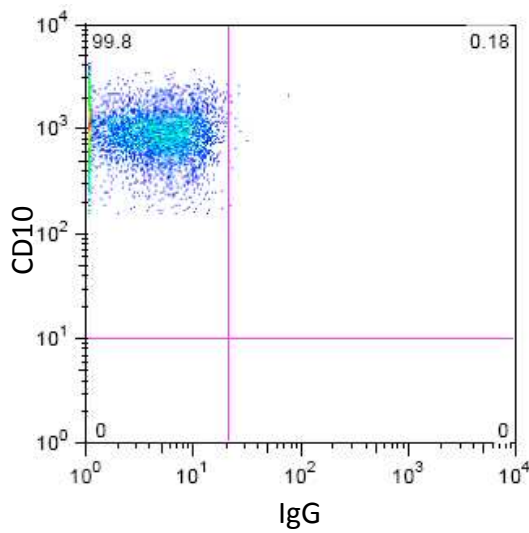
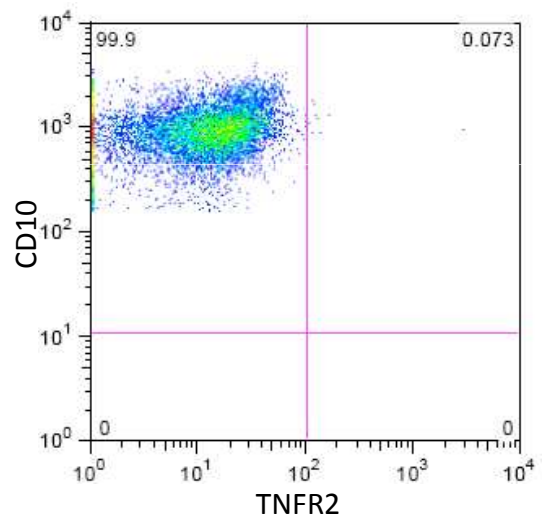
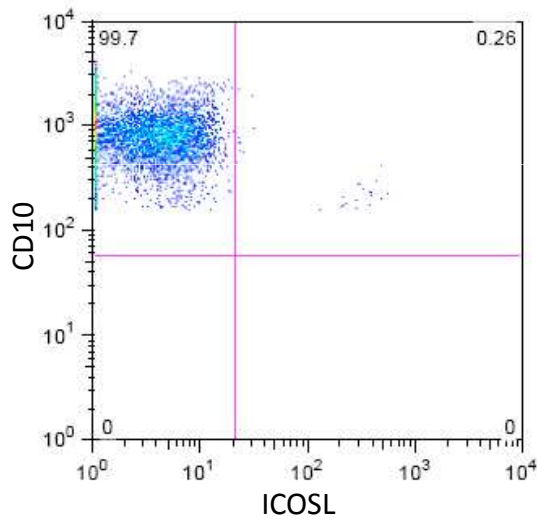


BCR/ABL^{pos}: n=6
BCR/ABL^{neg}: n=147
test Mann-Whitney: p=0,0003

obr.9



obr.10



PŘÍLOHA Č.3

CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis

M. Vaskova^{1,2}, E. Fronkova^{1,2}, J. Starkova^{1,2}, T. Kalina^{1,2}, E. Mejstrikova^{1,2} & O. Hrusak^{1,2}

1 Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Medical School, Charles University Prague, Prague, Czech Republic

2 Childhood Leukemia Investigation Prague, Prague, Czech Republic

Key words

acute lymphoblastic leukemia; B-cell development; CD27; CD44

Correspondence

Martina Vaskova
Childhood Leukemia Investigation Prague
V Uvalu 84
150 06 Prague
Czech Republic
Tel: +420 2 2443 6477
Fax: +420 2 2443 6413
e-mail: martina.vaskova@lfmotol.cuni.cz

Received 22 March 2007; revised 14 August 2007, 10 October 2007; accepted 21 October 2007

doi: 10.1111/j.1399-0039.2007.00968.x

Abstract

The expression of CD27 and CD44 correlate with the genotype of B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL). Based on the expression of these antigens, we identified counterparts of *TEL/AML1*^{pos} and *TEL/AML1*^{neg} leukemic cells in nonmalignant bone marrow. Although CD27 is known as a marker of mature memory B cells, we recently showed that CD27 is also expressed by malignant and nonmalignant B precursors. Here, we show that CD27 and CD44 delineate stages of B-precursor development. Well-established differentiation markers showed that the developmental sequence starts from undetermined progenitors, expressing CD44. Upon B-lineage commitment, cells gain CD27 and lose CD44. The CD27^{pos}CD44^{neg} (CD27 single positive, 27SP) cells are the earliest stage within CD10^{pos}CD19^{pos} B precursors and express *RAG-1* and *TDT*. These cells correspond to *TEL/AML1*^{pos} ALL (1/4 pediatric B-precursor ALL). The development follows to CD27/CD44 double-positive (27/44DP) stage, 44SP stage and CD27/CD44 double-negative (27/44DN) stage. Before exit to periphery, CD44 is reexpressed. The 27/44DP cells are mostly large and profoundly suppress *RAG-1*. Despite their presumably high proliferation potential, 27/44DP cells rarely dominate in leukemia. At 44SP stage, which corresponds to *TEL/AML1*^{neg} leukemias, *RAG-1* is reexpressed and Ig light chain gene starts to be rearranged.

Introduction

By making the lineage decision, human progenitor cells start the B-lineage development in the bone marrow (BM) [reviewed in (1, 2)]. This early stage is accompanied by the upregulation of B-cell-specific transcriptional regulators Pax-5 and very likely also early B-cell factor. Since the earliest stage, the B-lineage-committed cells start to rearrange the genes for Ig heavy chain (*IGH*). Upon successful *IGH* rearrangement, the recombination machinery is suppressed and cells quickly proliferate. In the following stage, Ig light-chain (*IGL*) genes are rearranged. Cells that complete both *IGH* and *IGL* are ready to be functionally competent and develop into naïve mature B cells. Such cells leave the BM environment.

On cell surface level, the first B-committed cells express CD34, which disappears in the course of maturation. Very

early after B-lineage decision, CD10 is expressed and continues to be present on the cell surface until *IGH* and *IGL* are rearranged. An important surface marker of B lineage, CD19, is expressed since the very early stage when *IGH* rearranges. Experimental evidence shows that CD10 precedes the expression of CD19, perhaps in majority of cells. The CD10^{pos}CD34^{pos}CD19^{neg} cells are mostly committed to B lineage, although they can develop also to other lineages (3). However, the most immature B-precursor leukemia stage called pro-B is defined as CD19^{pos}CD34^{pos}CD10^{neg} (4, 5). Leukemia nomenclature, reflecting the current understanding of malignant transformation during lymphopoiesis, therefore assumes CD19 expression before CD10. At CD10^{pos}CD19^{pos} stages of development, important events occur including *IGH* rearrangement completion, cell expansion and *IGL* rearrangement. This

CD10^{pos}CD19^{pos} immunophenotype is found in the majority of B-cell-precursor acute lymphoblastic leukemias (BCP ALLs). Our previous study showed that major genotypic BCP ALL subsets strictly correlate with the surface CD27 and CD44 expression (6) (updated results are in http://clip.lf2.cuni.cz/files/archiv/CD44_and_CD27_updated_results.pdf), thus confirming RNA genomics data on protein level (7). Interestingly, *TEL/AML1*^{pos} BCP ALL corresponds to CD27^{pos} phenotype, in the absence of CD44. Although CD27 was considered to be a general marker for memory B cells in humans, we showed its expression also on CD10^{pos}CD19^{pos} B-cell precursors (6). Its expression in BCP ALL and in nonmalignant B precursors was then confirmed in another study (8). CD27 (TNFRSF7, T-cell activation antigen) is a 110-kDa transmembrane glycoprotein composed of disulfide-linked 55-kDa monomers, and it is a member of the tumor necrosis factor receptor family. In humans, it is expressed on the large subset of peripheral T cells, on most medullary thymocytes (9) and on natural killer cells (10). In more mature stages of B-lineage development, it is expressed on somatically mutated B cells (11).

CD44 (Hermes, Pgp-1) is a cell surface glycoprotein coded by 10 standard exons found in all CD44 isoforms; the other 10 are variably spliced (12). CD44 was originally identified on hematopoietic cells (13), but it was also found on a wide range of other tissues (14–16). The CD44 mediates cellular adhesion. It is a receptor for hyaluronate (17), but it binds other compounds of extracellular matrix also. It is involved in the process of lymphocyte activation (18), and its interaction with stromal cells is important during lymphopoiesis and myelopoiesis (19, 20). The CD44v6 splice variant is often associated with metastatic potential of nonhematopoietic neoplasias, for example, in gastric adenocarcinoma (21). Its expression also correlates with shorter survival of patients with acute myeloblastic leukemia (22) and is more frequently expressed in medium- or high-risk group in pediatric ALL (23). We searched for cells with CD27 and CD44 expression corresponding to leukemia subtypes in nonmalignant BM. Among CD10^{pos}CD19^{pos} cells, we found CD27^{pos}CD44^{neg} B precursors (CD27 single positive, 27SP) corresponding to *TEL/AML1*^{pos} leukemia and CD27^{neg}CD44^{pos} (44SP) cells that correspond to most other ALL subtypes and double-positive (27/44DP) and double-negative (27/44DN) cells, which are rarely seen in BCP ALL. We tested the hypothesis that the expression of CD44 and CD27 nonrandomly correlates with the differentiation stage of B precursors. Therefore, we investigated differentiation markers with known dynamics during B-cell development [CD10, CD34, intracellular IgM, intracellular VpreB (CD179a), terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT), RAG-1 and Ig gene rearrangements] in immunophenotypic subpopulations defined by CD44 and CD27.

Materials and methods

Patients

BM specimens of children without any evidence of malignant or residual malignant disease (patients 1 and more years after BM transplant, after the end of the ALL therapy and patients investigated to exclude hematological malignancy) were used. Specimens were collected according to the Czech law and institutional regulations and with informed consent. Only leftover material from specimens after completed diagnostic investigations was used.

Flow cytometry

Cell suspension of the unseparated BM or peripheral blood (PB) was stained with four- to eight-color combinations of monoclonal antibodies (mAbs). The following fluorochrome-labeled mAbs were used: anti-CD44 fluorescein isothiocyanate (FITC) (reacting with the standard isoform of CD44) and anti-CD27 phycoerythrin (PE) (BD, San Jose, CA), anti-CD10 ECD, anti-CD179a PC5, anti-CD19 PC7 and anti-CD34 allophycocyanin (APC) (Immunotech, Marseille, France), anti-TdT FITC (Dako, Glostrup, Denmark), anti-CD20 Alexa405 (Serotec, Kidlington, Oxford, UK) and anti-IgM Dyomics647 (Exbio, Prague, Czech Republic). In addition, DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) and FIX&PERM cell permeabilization kit (An der Grub, Vienna, Austria) were used. Nonmalignant BM samples were analyzed using FACS Aria (BD) and BD LSR II (BD) flow cytometers and sorted using FACS Aria flow cytometer (BD). For polychromatic flow cytometry experiments, photomultiplier (PMT) voltage was set above electronic noise threshold and automated compensation matrix calculation was performed using single-color-stained tubes (DIVA 4.1.2 or SUMMIT 4.3). Gating strategy of compensated data was determined using Fluorescence Minus One controls (24). Analysis was performed using FLOWJO 8.1.1 software (TreeStar, Ashland, OR) using the same strategy of positivity determination. For each sample, 4×10^5 to 4×10^6 events were recorded. Gating strategy was used for the analysis and sorting of the cells with a given immunophenotype as follows: CD10^{pos} cells were selected from the gate of CD19^{pos}DAPI^{neg} cells (live B-lineage cells). Four subpopulations based on CD44 and CD27 positivity and negativity were identified according to Fluorescence Minus One controls among these cells (Figure 1). The cells falling above or below a threshold of fluorescence intensity set by these controls are called *positive* or *negative subpopulations* throughout the paper. The experiments with sorted subpopulations were performed in duplicates or triplicates. The purity of sorted subpopulations was always more than 95%. Therefore, the

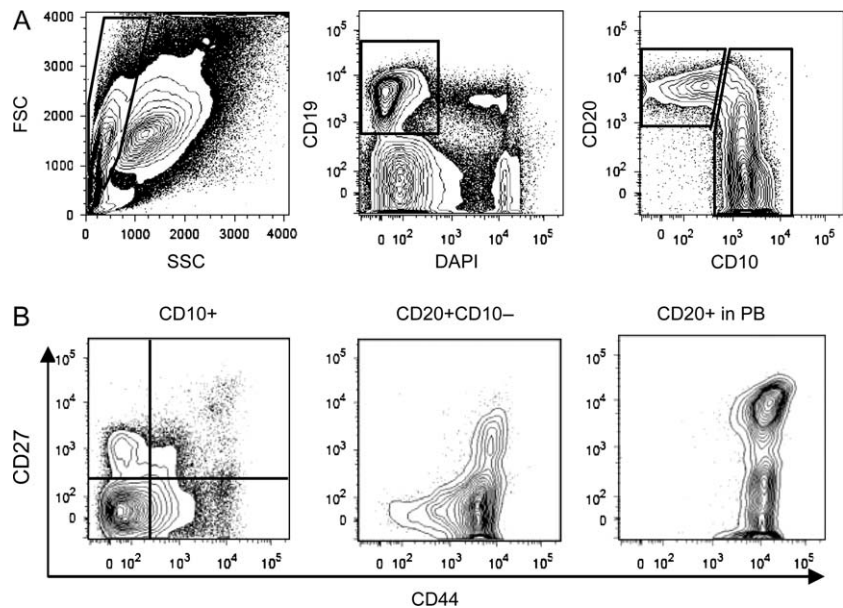


Figure 1 CD27 and CD44 expression in non-malignant BM and PB. Gating strategy used in seven-color staining of one BM specimen for analysis of the differentiation markers in particular subpopulations and for their sorting. (A) CD10^{pos} cells were selected from the gate of CD19^{pos} DAPI^{neg} cells (live B-lineage cells). (B) CD27 and CD44 expression in CD10^{pos}CD19^{pos} cells in BM, in CD19^{pos}CD20^{pos}CD10^{neg} cells in BM and in CD20^{pos} cells in PB of different patients. BM, bone marrow; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; FSC, forward scatter; PB, peripheral blood; SSC, side scatter.

results of the mRNA and DNA analyses indeed describe the sorted subpopulations.

Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Complete RNA from sorted cells was isolated by RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. RNA was converted into complementary DNA (cDNA) using MoMLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Carlsbad, TX). Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) analyses were performed using LightCyclerTM rapid thermal cycler system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Fluorescent DNA-binding dye SYBR Green (FMC BioProducts, Rockland, MA) was used for quantification of *RAG-1* and *TDT* gene expression. Control gene beta-2-microglobulin (*b2m*) was measured using hybridization probes as described previously (25). The primer sequences were as follows – for *TDT*: forward 5'-gTCgTgCCTTTgCCCTgTT-3', reverse 5'-TC-CgCTCATgTgTggCATAg-3' and for *RAG-1*: forward 5'-TgAgTAATATCAACCAAATTgCAgACA-3', reverse 5'-ggATCTCACCCggAACAgC-3'. The composition of PCR mix was as follows: 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase in the PCR buffer provided by the manufacturer (Gibco BRL – Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD), MgCl₂ 3 mM (for *RAG-1*) or 2 mM (for *TDT*), deoxynucleotide triphosphate 0.2 mM each, bovine serum albumin 0.25 µg/µl, primers 0.5 µM each; fluorescent signal was generated using 0.2 µl SYBR Green (2×10^{-4} of the stock concentration, diluted by dimethyl sulfoxide; for *RAG-1*

and *TDT*). One microliter of cDNA was added in a final volume of 20 µl. The LIGHTCYCLER program for *RAG-1* and *TDT* consisted of the initial denaturing at 94°C for 90 s, followed by 40 PCR cycles: 95°C for 5 s, 62°C for 40 s (single fluorescence measurement), 72°C for 12 s. The melting curve analysis was performed to confirm specific amplification and to identify nonspecific templates after each run. *RAG-1* and *TdT* mRNA expression was shown as a ratio to *b2m* expression; this value was normalized to 1 in the most immature subset investigated.

Real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin gene rearrangements

DNA from sorted cells was isolated by QIAamp DNA Blood Micro Kit (Qiagen GmbH). Multiplex real-time quantitative PCR (RQ-PCR) for *IGH* detecting virtually all complete *IGH* rearrangements and RQ-PCR for intron recombination signal sequence to kappa deleting element (RSS-Kde) was performed using family-specific V segment forward primers and J segment-specific reverse primers and probes as described previously (26, 27) in the iCycler IQTM thermal cycler system (Bio-Rad, Hercules, CA). The starting concentration of template was measured against the dilution series of positive-control DNA in germ-line (unrearranged) Hela DNA. REH cell line served as a positive control for intron RSS-Kde recombination. Samples of patients with ALL containing 87% and 97% of clonal cells with monoallelic rearrangements were used for standard curve preparation in *VH1-3-JH1-6* and *VH4-7-JH1-6* assays, respectively. The cycling conditions were as follows: initial denaturing at 95°C for 10 min, 50 cycles of

denaturing at 94°C for 15 s, annealing extension at 64°C (*IGH*) or 62°C (intron RSS-Kde) for 1 min; DNA at a concentration of 0.01–0.2 µg/µl was used for each PCR reaction. All the assays reached sensitivity of at least 1% of rearranged alleles in the germ-line background. Each sample was run in duplicate, and a mean value was used for further analysis. Albumin gene was used to normalize the DNA concentration and quality (28). ICYCLER IQ Optical System software version 3.0a was used for quantification, and a final value was shown as a percentage of rearranged alleles relative to the respective clonal control DNA, which was set as 100%.

Results

CD27 and CD44 expression define phenotypic stages in B precursor development

As CD44 negativity in combination with CD27 positivity is found exclusively in one subtype of leukemia (*TEL/AML1*^{pos}) (6), we searched for such cells among B precursors in nonmalignant BM. Within CD10^{pos}CD19^{pos} cells, such 27SP cells were present in all 14 specimens. In addition, 44SP cells as well as 27/44DP and 27/44DN cells were found (Figure 2). Next, markers of B-precursor differentiation were investigated by polychromatic flow cytometry. The expression of CD44, CD27 and a B precursor defining the combination of CD19 and CD10 was studied together with the differentiation markers CD34, TdT, cytoplasmic IgM and cytoplasmic VpreB (CD179a). The percentage of CD34^{pos} cells is the highest in 27SP and decreases gradually in 27/44DP, 44SP and 27/44DN subpopulations (Figure 3A,B). A similar trend is found in the percentage of CD10^{bright} cells, which become virtually missing in CD27^{neg} B-precursor stages (Figure 3C,D). This sequence of developmental stages was further supported by

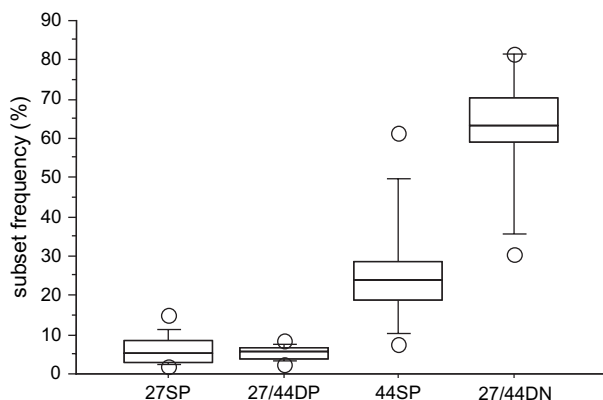


Figure 2 Frequencies of subpopulations defined by CD27 and CD44 expression within CD10^{pos}CD19^{pos} B precursors. Fourteen specimens were used for this analysis. DN, double negative; DP, double positive; SP, single positive.

a gradual loss of intracellular TdT and VpreB (Figure 4A,B) and by the increase of intracellular IgM^{pos} cells (Figure 4C). The observed sequence of developmental stages of B precursors is thus: 27SP, 27/44DP, 44SP and 27/44DN. We fit these subpopulations into two well-established models of B-cell development (Table 1) (2, 29).

27/44DP cells downregulate the key recombination enzymes

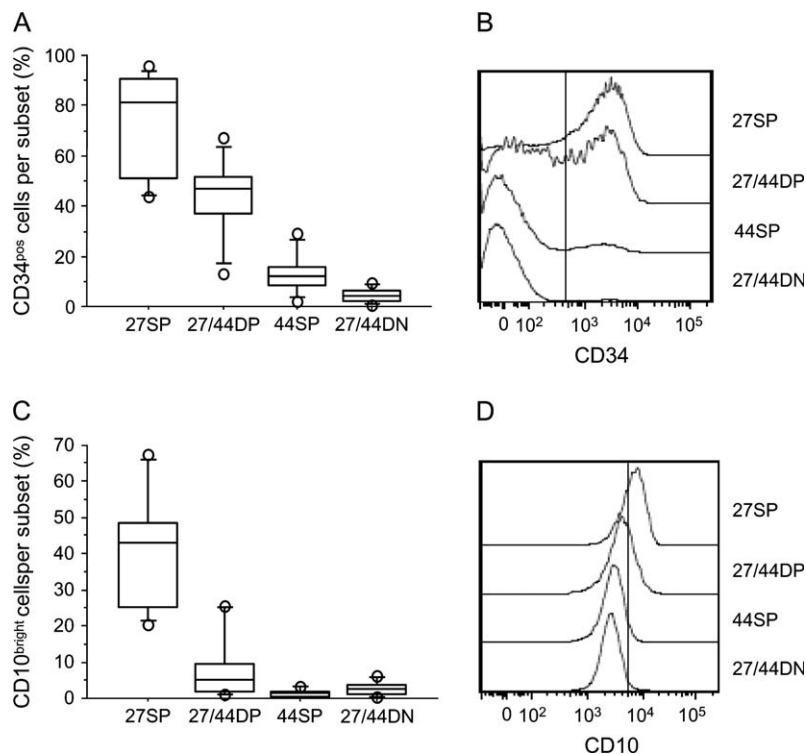
We sorted subpopulations based on the CD44 and CD27 expression to compare their recombination potential by measuring TdT and RAG-1 mRNA expression by RQ-PCR. Similar to the protein level, TdT mRNA expression decreases in concordance with the suggested developmental stages (Figure 5A). Interestingly, the 27/44DP cells express the lowest amount of RAG-1 transcripts (Figure 5B), suggesting that these cells are in the stage of suppressed RAG-1 expression after completed *IGH* rearrangement. RAG-1 is reexpressed during *IGL* rearrangement, as proven by the reappearance in the 44SP cells. Because the cells with a downregulated *RAG-1* are known to be frequent among the large proliferating cells, we analyzed the percentage of large cells (estimated by cytometry as the proportion of cells with a higher forward scatter). The 27/44DP subpopulation appears to be composed mostly by the large cells, based on the highest percentage of cells with high forward scatter (Figure 6A,B).

Immunoglobulin gene rearrangement

After a successful rearrangement of *IGH* genes in early B precursors, cells proliferate and *IGL* genes start to rearrange. In all four subpopulations, heavy-chain genes (both segments *VH1-3-JH* and *VH4-7-JH*) were rearranged (data not shown), proving that heavy chains start to rearrange at or before the earliest stage of differentiation among the analyzed subpopulations. The low quantitative range of the system for *VH1-3-JH* and *VH4-7-JH* detection did not enable the exact quantification, mainly because of a limited DNA concentration obtained from sorted cells. Next, we investigated the *IGL* rearrangement. The system detected the intron RSS-Kde rearrangements, which appear in the late phase of *IGL* rearrangement. As shown in Figure 7, *IGL* genes begin to be rearranged at the 44SP stage, whereas intron RSS-Kde rearrangements are virtually missing at earlier stages.

Both CD27 and CD44 reappear at CD20^{pos}CD10^{neg} stages

As reported earlier, mature PB B lymphocytes are CD44^{pos} (15). Our data show that majority of CD20^{pos}CD10^{neg} cells express CD44 already in BM, while PB B lymphocytes are almost exclusively CD44^{pos} (Figure 1B), contrasting with BM CD10^{pos} cells, which contain a greater fraction of



CD44^{neg} cells. Thus, immature, naïve B cells reexpress CD44 in BM, before they exit to periphery.

Lack of CD27 expression in stem cells

Within CD34^{pos} cells, Nilsson et al. reported higher proportion of CD27^{pos} cells in CD19^{neg} subpopulation compared with CD19^{pos} subpopulation, which was interpreted that B-lineage-committed CD34^{pos} cells express less CD27 (8). Although we used fluorochrome (PE) with higher fluorescence intensity and a higher resolution than FITC used in Nilsson's study, we found only $1.9 \pm 1.7\%$ of CD27^{pos} cells ($n = 14$) among CD19^{neg}CD34^{pos} cells.

As we used a reliable cytometric system acquiring millions of events and selecting exclusively viable cells for the analysis, we could further divide these CD19^{neg}CD34^{pos} cells. We used CD10 for finer division of the CD19^{neg}CD34^{pos} cells because it is known that the CD19^{neg}CD10^{pos}CD34^{pos} cells are biased towards B lineage, although they can develop also into other lineages (30, 31). The CD10^{neg} and CD10^{pos} fractions of CD19^{neg}CD34^{pos} cells contained $0.23 \pm 0.21\%$ and $38.8 \pm 26.3\%$ CD27^{pos} cells ($n = 14$), respectively. In comparison, CD19^{pos}CD34^{pos} cells contain $67 \pm 14.1\%$ CD27^{pos} cells ($n = 14$). In CD34^{pos}CD19^{neg} subpopulation, the acquisition of CD10 is accompanied by CD44

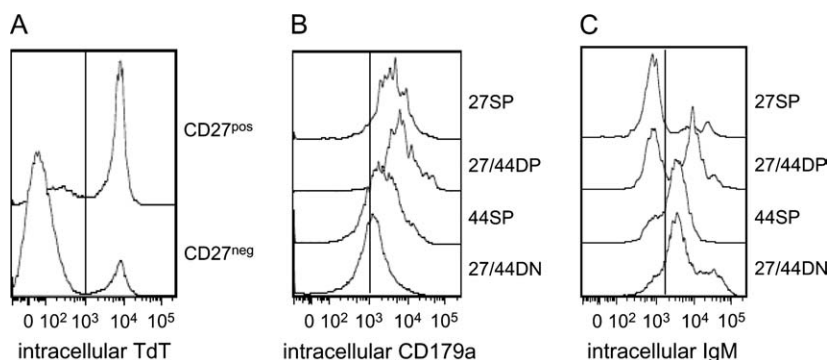


Table 1 The models of B-cell development^a

	LeBien (2)	Loken <i>et al.</i> (29)	CD27 and CD44
Pro-B (I)	CD19, CD10, CD34, CD24, IL-7R, RAG, VpreB, Ig- α , VDJ _H	CD10 ^{high} , CD34, TdT	27SP
Pre-BI (II)	CD19, CD10, CD24, pre-B receptor, low RAG, IgM HC	CD10	27/44DP
Pre-BII (III)	CD19, CD10, CD24, pre-B receptor, RAG, IgM HC, VJ _K		44SP, 27/44DN
Immature B (III) (IV)	CD19, CD10, CD20, CD21, CD22, CD24, CD40, IgM	CD10+, IgM IgM	27/44DN

DN, double negative; DP, double positive; HC, heavy chain; SP, single positive; TdT, terminal deoxyribonucleotidyl transferase.

^a We show CD27- and CD44-defined differentiation stages in the context of two published models. The stages in the model by Loken *et al.* (29) and LeBien (2) are assigned by numerals and their names, respectively, in the first column.

downregulation (Figure 8), which is in line with our results that CD44 negativity together with CD27 positivity is found in the earliest CD19^{POS} cells.

Discussion

We previously reported that CD27 and CD44 define ALL subtypes (6). The data presented here show that the expression of these molecules correlates nonrandomly with several independent markers of B-precursor differentiation. Among CD10^{POS}CD19^{POS} cells, both maturity of *IG* rearrangements and the expression of differentiation markers prove the following developmental sequence: 27SP, 27/44DP, 44SP and 27/44DN. The data showing heavy chain gene rearrangements in 27SP, 27/44DP, 44SP as well as 27/44DN cells indicate that *IGH* rearrange at stages up to 27SP. Upon transition to the 27/44DP stage, in which the large cells dominate, *RAG-1* expression is suppressed. Afterwards, CD27 disappears and cells enter the next stage, 44SP. This stage is characterized by restarting the recombination machinery (shown by *RAG-1* reexpression). Only at this stage, cells start to contain completed *IGL* rearrangements (shown by *KDE* detection). Cells apparently attain smaller size at 44SP stage. This process is finished by loss of CD44. The resulting 27/44DN phenotype dominates among the CD10^{POS} B precursors in human BM. The 27/44DN cells complete the differentiation process before the cells lose CD10, regain CD44 and are allowed to exit to periphery.

Interestingly, whereas *RAG-1* is profoundly suppressed at 27/44DP stage, TdT expression decreases gradually

throughout the differentiation. The suppression of *RAG-1* may be important during the cell proliferation as *RAG-1* (unlike TdT) may cause unwanted DNA recombination during replication. This may explain the differences between TdT and *RAG-1* expression at the 27/44DP stage, containing large proliferating cells.

The knowledge on B-precursor development can be combined with the leukemia diagnostics to discover the counterparts of the dominant leukemia population. The 27SP cells are physiological counterparts of *TEL/AML1*^{POS} ALL, and the 44SP cells are the principal counterparts of all other B-precursor ALL subtypes. The 44/27DP and 44/27DN immunophenotype is rarely seen among B-precursor leukemias. This contradicts a logical expectation that the proliferating compartment (large pre-B, mostly found in 44/27DP stage) might be more likely to transform into malignancy.

Because the nonmalignant counterparts of *TEL/AML1*^{POS} ALL are less mature than the counterparts of *TEL/AML1*^{NEG} ALL, it is possible to speculate that the differentiation of *TEL/AML1*^{POS} leukemic cells is blocked in earlier stage than in other leukemias.

After exit to periphery, a subset of B cells reexpresses CD27 during the process of somatic hypermutation and it is then constitutively present as a marker of memory cells (32). In line with this, we observed a CD27^{POS} subpopulation among CD20^{POS}CD10^{NEG} cells not only in PB but also in BM. The BM CD27^{POS}CD20^{POS}CD10^{NEG} B cells are probably recirculating memory cells. Migration of memory cells to BM was proven by the analysis of BM cells with preferential

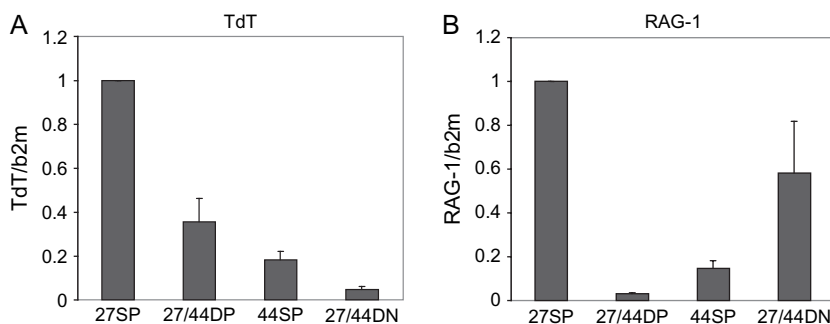
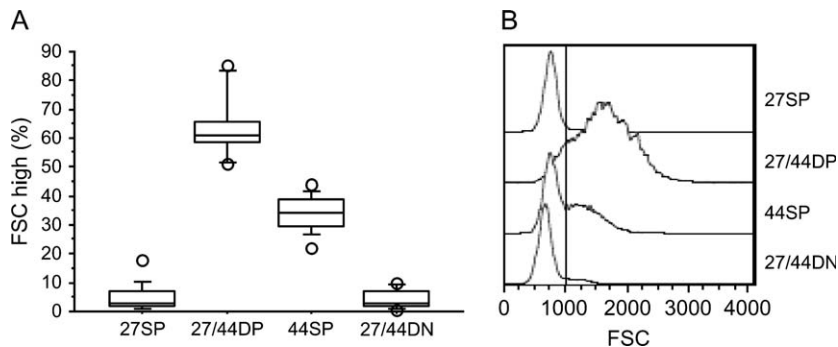


Figure 5 Recombination enzyme terminal deoxyribonucleotidyl transferase (A) and *RAG-1* (B) mRNA expression. Expression levels are shown as ratio to control gene expression; this value was normalized to 1 in the most immature subset investigated. Experiments were performed in duplicates. DN, double negative; DP, double positive; SP, single positive; TdT, terminal deoxyribonucleotidyl transferase.

Figure 6 Frequencies of large cells defined as the subpopulation with the high FSC (A) and representative sample of FSC intensity. Fourteen specimens were used for this analysis. DN, double negative; DP, double positive; SP, single positive. DN, double negative; DP, double positive; FSC, forward scatter; SP, single positive.



mutations in the complementarity determining regions (CDR) (33) of the V(D)J regions, which is the pattern that evolves during the antigen selection in germinal centers. Interaction of CD27 with its ligand CD70 expressed on activated T and B cells regulates B-cell growth and differentiation to IgG- and IgM-producing cells (34, 35).

At the early developmental stages, CD27 expression was reported on murine hematopoietic stem cells (36), and Nilsson et al. reported a high CD27 expression in human CD34^{pos} cells even before CD19, similar to mice (8). Although we did observe such cells, they were almost always CD10^{pos} and their percentage increases only after B-lineage commitment. Because the CD27 and CD44 are known to play a role in apoptotic or adhesion processes, it can be speculated that their expression merely reflects the functional status of the precursor B cell, regardless of its developmental stage. However, our data clearly show that CD27 and CD44 are expressed in an organized fashion during the precursor development. Consequently, this

forms a basis for a further research into functional similarities between normal precursor and the leukemia cell.

Although the straightforward explanation of the presented data is that the observed subpopulations reflect consequent developmental stages, alternative scenarios may be provided. We may hypothesize that the following phenomena may not represent regular features in B-precursor differentiation at CD10^{pos}CD19^{pos} stage: (i) CD27 expression, (ii) the decrease in CD44 expression or (iii) the reappearance of CD44 seen in 27/44DP and 44SP cells. The scenario (i) is definitely possible in transgenic animals because B cells do develop in CD27^{-/-} mice (37). However, our data do not support this scenario as a major pathway in healthy humans. The CD10^{pos}CD19^{pos} B precursors would start from the 27/44DN phenotype, which contains only few CD34^{pos} and TdT^{pos} cells – to the contrary, most cells have a more mature phenotype with rearranged *IgL*. Such immature cells would differentiate into the 44SP phenotype, which contains at least some large pre-B cells. The explanation of the fact that we do see majority of immature (CD34^{pos}, TdT^{pos}, *IgL*-unrearranged, i-IgM^{neg}, i-VpreB^{pos} and CD10^{briht}) cells among CD27^{pos} cells would require a complicated assumption that some immature cells may express CD27 for a prolonged time, thus increasing the apparent frequency. According to the

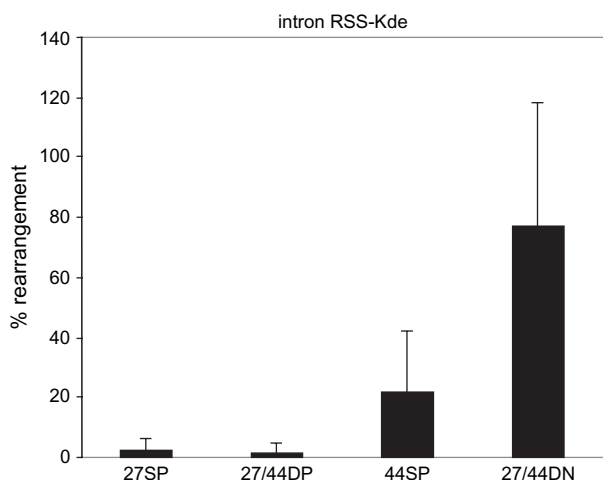


Figure 7 Immunoglobulin light-chain gene rearrangement. The percentage of intron RSS-Kde rearrangements is shown. The experiment was performed in triplicate. DN, double negative; DP, double positive; SP, single positive.

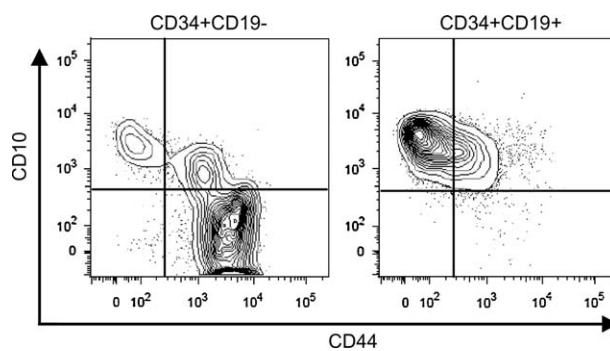


Figure 8 CD44 expression in CD10^{pos}CD34^{pos}CD19^{neg} and in CD19^{pos}CD34^{pos} cells.

scenario (ii), the most immature cells would enter the 27/44DP stage. Therefore, the cells would need to have completed *IGH* prior to the CD10^{pos}CD19^{pos} stage. Analogically to the scenario (i), we would need to accept that some cells might still lose CD44 and acquire the 27SP phenotype. Our observation of high RAG-1 expression at the 27SP cells makes this scenario very unlikely as we would assume that the cells with completely rearranged *IGH* reexpress RAG-1 upon losing CD44 before returning back to the RAG-1^{neg} 27/44DP phenotype. The scenario (iii) also appears unlikely as differentiating from 27SP directly to 27/44DN phenotype would circumvent the large pre-B stage with suppressed RAG-1. If this scenario occurred in a significant fraction of cells, it would contradict the current understanding of B-precursor differentiation. A possible role of CD27 is the regulation of apoptosis because association with apoptotic cascades was reported. Data from different models illustrate that the net effect of CD27 may be either negative or positive. Nolte et al. showed that murine CD27^{-/-} progenitors proliferated more rapidly, suggesting a regulatory role of CD27 in the growth of these cells. They propose that such a regulatory role may be triggered by the interaction of CD27 on B precursors with CD70 on activated T cells. This could be beneficial during infection as the presence of foreign antigen in the BM could induce an unwanted selective tolerance (37). CD27 triggering on primary plasma cell leukemia has antiapoptotic effect (38). Overexpression of CD27-binding protein Siva induces apoptosis in cell lines (39). It was also shown that CD27 associates with tumor necrosis factor-receptor-associated factor (TRAF)2 and TRAF5 signal transducers responsible for NF- κ B activation (40). Apoptosis plays an important role during B-cell development when cells unsuccessfully rearranging Ig genes die by apoptosis. The question is whether CD27 on B precursors could mediate proapoptotic or antiapoptotic signal because the published data concerning CD27 role in apoptosis are diverse in different cell types. Although our data do not answer this question, it is obvious that among B precursors, CD27 identifies mainly the earliest stages at or before the start of *IG* rearrangement. The specificity of the early-stage detection is strengthened when CD27 positivity is combined with CD44 negativity.

Our data show that during B-cell development, CD44 undergoes two waves of downregulation. If the uncommitted CD34^{pos} cells are mostly CD44^{pos}, then CD44 expression decreases together with the two-step acquisition of CD10 (Figure 7). The CD44^{neg} cells have been described previously among CD34^{pos} BM cells and have been, in line with our results, shown as CD10^{pos}CD19^{pos} B precursors (41). These CD44^{neg} cells are 27SP. The following reemergence of CD44, resulting in 27/44DP stage corresponds with one of its supposed functions, which is regulation of cell proliferation. While suppressing *RAG-1* expression, cells

proliferate at the 27/44DP. The expression of CD44 again ceases only two stages down, at the 27/44DN stage, in which *IgL* are fully rearranged and the cells do not proliferate and are not dependent on CD44-mediated contact with stromal cells. The role of CD44 during hematopoiesis was experimentally shown by the addition of anti-CD44 mAbs that inhibit or enhance stromal cell-dependent hematopoiesis (42).

There are more models of B-lymphocyte development, and the nomenclature of B-cell developmental stages is still unsettled. Any nomenclature should be based on fitting surface markers with *IG* gene rearrangement status. CD27 and CD44 extend the B-cell development model because their expression also reflects not only the *IG* rearrangements status but also a different likelihood to transform into leukemia and/or to block the differentiation in different genetic subsets of ALL.

Acknowledgments

We thank the cytometric technician Pavel Semerak. The collaboration of all Czech Pediatric Hematology centers [leaders: B. Blazek (Ostrava), Z. Cerna (Plzen), J. Hak (Hradec Kralove), Y. Jabali (Ceske Budejovice), V. Mihal (Olomouc), D. Prochazkova (Usti nad Labem), J. Stary (Praha) and J. Sterba (Brno)] is appreciated. This work was supported by grant nos GAUK 80/2004, IGA MZ CR NR/8269-3, VZ MSMT MSM0021620813 and GACR 301/06/P162.

References

- Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**: 287–320.
- LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000; **96**: 9–23.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; **3**: 459–73.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**: 1783–6.
- Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Review. *Leukemia* 2002; **16**: 1233–58.
- Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 876–8.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; **1**: 133–43.
- Nilsson A, de Milito A, Mowafi F et al. Expression of CD27-CD70 on early B cell progenitors in the bone marrow:

- implication for diagnosis and therapy of childhood ALL. *Exp Hematol* 2005; **33**: 1500–7.
9. van Lier RA, Borst J, Vroom TM et al. Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. *J Immunol* 1987; **139**: 1589–96.
 10. Sugita K, Robertson MJ, Torimoto Y, Ritz J, Schlossman SF, Morimoto C. Participation of the CD27 antigen in the regulation of IL-2-activated human natural killer cells. *J Immunol* 1992; **149**: 1199–203.
 11. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; **188**: 1679–89.
 12. Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 12160–4.
 13. Jalkanen ST, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* 1986; **16**: 1195–202.
 14. Cooper DL, Dougherty G, Harn HJ et al. The complex CD44 transcriptional unit; alternative splicing of three internal exons generates the epithelial form of CD44. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **182**: 569–78.
 15. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994; **54**: 4539–46.
 16. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 1994; **124**: 71–82.
 17. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; **61**: 1303–13.
 18. Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Prieur AM, Bernard A. CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol* 1989; **143**: 798–801.
 19. Miyake K, Medina KL, Hayashi S, Ono S, Hamaoka T, Kincade PW. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 1990; **171**: 477–88.
 20. Moll J, Khaldoyanidi S, Sleeman JP et al. Two different functions for CD44 proteins in human myelopoiesis. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1024–34.
 21. Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003; **23**: 1581–8.
 22. Legras S, Gunthert U, Stauder R et al. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1998; **91**: 3401–13.
 23. Magyarosy E, Sebestyen A, Timar J. Expression of metastasis associated proteins, CD44v6 and NM23-H1, in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res* 2001; **21**: 819–23.
 24. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 2001; **45**: 194–205.
 25. Zuna J, Muzikova K, Madzo J, Krejci O, Trka J. Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cyclers significantly affects real-time PCR. *Biotechniques* 2002; **33**: 508, 510, 512.
 26. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D et al. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol* 2005; **175**: 5912–22.
 27. Langerak AW, Nadel B, De Torbal A et al. Unraveling the consecutive recombination events in the human IGK locus. *J Immunol* 2004; **173**: 3878–88.
 28. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998; **12**: 2006–14.
 29. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987; **70**: 1316–24.
 30. Ryan DH, Nuccie BL, Ritterman I, Liesveld JL, Abboud CN, Insel RA. Expression of interleukin-7 receptor by lineage-negative human bone marrow progenitors with enhanced lymphoid proliferative potential and B-lineage differentiation capacity. *Blood* 1997; **89**: 929–40.
 31. Haddad R, Guardiola P, Izac B et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 2004; **104**: 3918–26.
 32. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al. Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **987**: 166–72.
 33. Paramithiotis E, Cooper MD. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 208–12.
 34. Agematsu K, Kobata T, Yang FC et al. CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 2825–9.
 35. Kobata T, Jacquot S, Kozlowski S, Agematsu K, Schlossman SF, Morimoto C. CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11249–53.
 36. Wiesmann A, Phillips RL, Mojica M et al. Expression of CD27 on murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Immunity* 2000; **12**: 193–9.
 37. Nolte MA, Arens R, van Os R et al. Immune activation modulates hematopoiesis through interactions between CD27 and CD70. *Nat Immunol* 2005; **6**: 412–8.
 38. Guikema JE, Vellenga E, Abdulahad WH, Hovenga S, Bos NA. CD27-triggering on primary plasma cell leukaemia cells has anti-apoptotic effects involving mitogen activated protein kinases. *Br J Haematol* 2004; **124**: 299–308.
 39. Prasad KV, Ao Z, Yoon Y et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6346–51.
 40. Akiba H, Nakano H, Nishinaka S et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates

- NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13353–8.
41. Deguchi T, Komada Y, Sugiyama K *et al.* Expression of homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM/CD44) on human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1999; **27**: 542–52.
42. Ghaffari S, Dougherty GJ, Eaves AC, Eaves CJ. Diverse effects of anti-CD44 antibodies on the stromal cell-mediated support of normal but not leukaemic (CML) haemopoiesis in vitro. *Br J Haematol* 1997; **97**: 22–8.

PŘÍLOHA Č.4

Research article

Open Access

Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens

Tomas Kalina^{1,3}, Martina Vaskova^{1,3}, Ester Mejstrikova^{1,3}, Jozef Madzo^{2,3}, Jan Trka^{2,3}, Jan Stary² and Ondrej Hrusak*^{1,3}

Address: ¹Department of Immunology, Charles University 2nd Medical School, Prague, Czech Republic, ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University 2nd Medical School, Prague, Czech Republic and ³CLIP – Childhood Leukemia Investigation Prague Czech Republic

Email: Tomas Kalina - tomas.kalina@lfmotol.cuni.cz; Martina Vaskova - martina.virtova@lfmotol.cuni.cz; Ester Mejstrikova - Ester.Mejstrikova@lfmotol.cuni.cz; Jozef Madzo - jozef.madzo@lfmotol.cuni.cz; Jan Trka - jan.trka@lfmotol.cuni.cz; Jan Stary - jan.stary@lfmotol.cuni.cz; Ondrej Hrusak* - ondrej.hrusak@lfmotol.cuni.cz

* Corresponding author

Published: 12 April 2005

Received: 16 November 2004

BMC Cancer 2005, 5:38 doi:10.1186/1471-2407-5-38

Accepted: 12 April 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/38>

© 2005 Kalina et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Aberrant expression of myeloid antigens (MyAgs) on acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells is a well-documented phenomenon, although its regulating mechanisms are unclear. MyAgs in ALL are interpreted e.g. as hallmarks of early differentiation stage and/or lineage indecisiveness. Granulocytic marker CD66c – Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) is aberrantly expressed on ALL with strong correlation to genotype (negative in TEL/AML1 and MLL/AF4, positive in BCR/ABL and hyperdiploid cases).

Methods: In a cohort of 365 consecutively diagnosed Czech B-precursor ALL patients, we analyze distribution of MyAg⁺ cases and mutual relationship among CD13, CD15, CD33, CD65 and CD66c. The most frequent MyAg (CD66c) is studied further regarding its stability from diagnosis to relapse, prognostic significance and regulation of surface expression. For the latter, flow cytometry, Western blot and quantitative RT-PCR on sorted cells is used.

Results: We show CD66c is expressed in 43% patients, which is more frequent than other MyAgs studied. In addition, CD66c expression negatively correlates with CD13 ($p < 0.0001$), CD33 ($p = 0.002$) and/or CD65 ($p = 0.029$). Our data show that different myeloid antigens often differ in biological importance, which may be obscured by combining them into "MyAg positive ALL". We show that unlike other MyAgs, CD66c expression is not shifted from the onset of ALL to relapse ($n = 39$, time to relapse 0.3–5.3 years). Although opposite has previously been suggested, we show that CEACAM6 transcription is invariably followed by surface expression (by quantitative RT-PCR on sorted cells) and that malignant cells containing CD66c in cytoplasm without surface expression are not found by flow cytometry nor by Western blot in vivo. We report no prognostic significance of CD66c, globally or separately in genotype subsets of B-precursor ALL, nor an association with known risk factors ($n = 254$).

Conclusion: In contrast to general notion we show that different MyAgs in lymphoblastic leukemia represent different biological circumstances. We chose the most frequent and tightly genotype-associated MyAg CD66c to show its stable expression in patients from diagnosis to relapse, which differs from what is known on the other MyAgs. Surface expression of CD66c is regulated at the gene transcription level, in contrast to previous reports.

Background

Although expression of surface markers in acute lymphoblastic leukemia (ALL) parallels that of normal hematopoietic precursors, several markers of myeloid lineage are found on ALL lymphoblasts. This phenomenon is referred to as "aberrant expression". The issue of the regulatory mechanisms that allow it has been addressed repeatedly throughout the recent 40 years [1,2]. Although several hypotheses stressing either possible lineage indecisiveness or genetic misprogramming have been raised, the phenomenon is still not fully understood. We and others have shown that the myeloid antigen CD66c is very frequently aberrantly expressed in B-precursor ALL, however, a large study showing its frequency in the light of other myeloid antigens has been missing. CD66c expression was found on cases of childhood and adult ALL in strong correlation with nonrandom genetic changes (BCR/ABL positivity [3], hyperdiploidy and TEL/AML1 negativity [4], reviewed in [5]).

CD66c (CEACAM6, previously called Nonspecific cross-reacting antigen, NCA 90/50 and KOR-SA3544 antigen) is a member of the carcinoembryonic antigen family. This heavily glycosylated molecule consists of two constant Ig-like domains and one variable Ig-like domain and it is anchored to the membrane via its glycosylphosphatidylinositol (GPI). Within the hematopoietic system, CD66c expression is limited to granulocytes and its precursors [3,6], where it serves homotypic and heterotypic adhesion [7], Ca²⁺ mediated signaling [8] and is markedly upregulated from intracellular stores after activation [9].

It is also found in epithelia of various organs [7]. Upregulation of CD66c is an early molecular event in transformation leading to colorectal tumors [10]. It was also confirmed to inhibit anoikis (apoptotic response induced in normal cells by inadequate or inappropriate adhesion to substrate) in the *in vitro* model of carcinoma of colon [11] and specific silencing of this gene led to decreased metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma [12].

Surprisingly, Sugita et al [13] reported intracellular presence of CD66c in all leukemic cell lines examined, regardless of surface presence or absence, with a different antigen distribution in cytoplasm that determined surface expression. They speculated that presence of an undisclosed transporter would target this molecule to granules and for surface expression, whereas surface CD66c^{neg} cell lines lack this transporter. This intriguing hypothesis prompted us to test whether transcription of CEACAM6 gene and/or intracellular CD66c expression is always followed by surface expression.

Uniqueness of aberrant expression of CD66c on malignant lymphoblast is exploited for diagnosis of ALL and

follow-up of a minimal residual disease (MRD) using flow cytometry [14,15]. To use a marker for a MRD assessment a critical question must be addressed, whether the aberrant expression is a stable property of the malignant clone or whether it can be subject to immunophenotype shift.

In the present study we set out to address the frequency of CD66c molecule expression in childhood ALL, the regulation of CD66c expression from gene transcription to cytoplasmic and surface expression, and we follow immunophenotype stability from diagnosis to relapse. We also discuss relevance of CD66c for prognosis prediction.

Methods

Patients

The cohort of all Czech children (<18 years) diagnosed with B-precursor ALL investigated in our reference laboratory from 1.5.1997 to 23.7.2004 was used for current study (n = 381). Informed consent was obtained from patients and/or their guardians. The presence of TEL/AML1, BCR/ABL and MLL/AF4 fusion genes was detected by two-round nested PCR, hyperdiploidy was assessed using DNA index flow cytometric measurement as described previously [4]. Patients' genotype and corresponding surface CD66c expression is shown in Figure 1 (genotype available in 98% of patients). For intracellular staining and FACS sorting, only samples with enough material were selected.

Cell lines

Surface CD66c negative cell lines with typical translocation found in childhood ALL: TEL/AML1pos (REH) was kindly provided by R. Pieters (University Hospital Rotterdam), MLL/AF4pos (RS4;11) translocation and with no fusion (NALM-6) were obtained from German Cell Line collection (DSMZ, Braunschweig, Germany)

Flow Cytometry

Flow cytometry immunophenotyping of bone marrow (BM) aspirates was performed in at diagnosis and at relapse. Routine immunophenotypic classification using panel of monoclonal antibodies (moAbs) was performed as described previously [4]. Briefly, BM samples were stained with 2-, 3- and 4-color combinations of moAbs for 15 min in darkness, erythrocytes were lysed with NH₄Cl-containing lysing solution for 15 min, washed and data were acquired using single FACS Calibur instrument throughout the study (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer. Anti-CD66c (CEACAM6) moAb used in all diagnostic and relapse measurements in this study was clone KOR-SA3544 directly labeled to FITC (Immunotech, Marseille, France). Intracellular staining was performed using Fix & Perm kit (Caltag, Burlingame, CA,

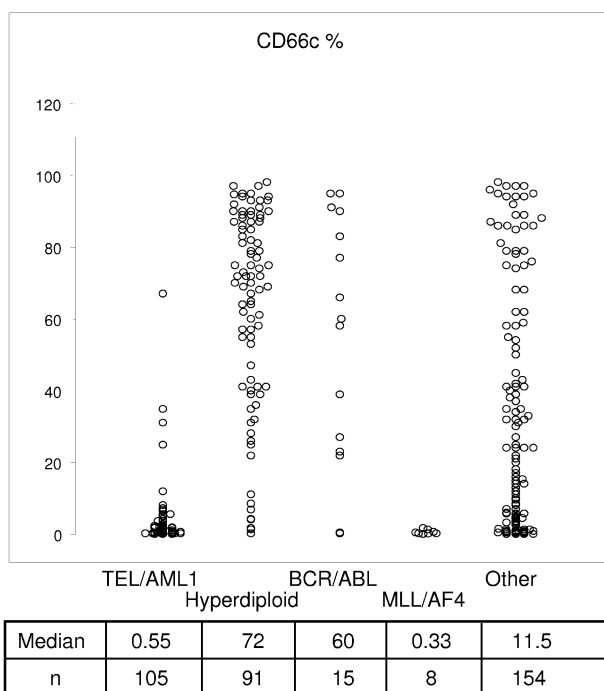


Figure 1
Correlation of ALL genotype categories and percentage of CD66c positivity. Median percentage of CD66c^{pos} blasts is listed below each genotype group. Data of consecutive unselected patients with BCP ALL (n = 373) are shown.

USA) according to manufacturer's protocol. Acquired data was analyzed with Cell Quest (BD Biosciences) or Flow Jo (Tree Star, Ashland, OR, USA) software, lymphoblast gate was drawn based on optical scatter and CD19^{pos} blast population was selected for further analysis.

Value of 20% was chosen as a threshold of positivity as recommended by EGIL [16]. For robust prognostic significance testing, other threshold values were also tested as indicated in results.

Cross-blocking of CD66c moAbs

Bone marrow samples of CD66c positive blasts were stained with anti-CD66c moAb clone 9A6 (Genovac, Freiburg, Germany) moAb for 15 min, erythrocytes were lysed with NH₄Cl-containing lysing solution for 15 min, washed and sample was incubated with anti-CD66c moAb KOR-SA3544 PE moAb conjugate.

Western blot

Samples containing 5 × 10⁶ cells were lysed for 30 min at 4 °C in 100 µl lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 10 mM

pyrophosphate (Na₄P₂O₇) and Complete Mini EDTA-Free (protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Debris was sedimented by centrifugation for 3 min at 13000 rpm, 0 °C. Supernatants were mixed with 100 µl 2× Laemmli's SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample loading buffer, and heated for 5 min at 100 °C. Proteins were fractionated by SDS-PAGE on 12.5% gels and electrophoretically transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked for 1 h in PBS (pH 7.4) containing 0.5% Tween-20 and 5% nonfat dried milk. Blots were then incubated for 1 h at room temperature with anti-KOR-SA3544 (Immunotech, Marseille, France) or anti-beta-actin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) moAbs and then developed using goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate (Bio-Rad). Immunoreactive material was then revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions.

Isolation of RNA and Real-Time Quantitative PCR analysis (RQ-PCR)

For RQ-PCR analysis, leukemic blasts were FACS sorted using sorting option on FACS Calibur or on FACS Aria instrument (1.1 × 10⁴ - 4.7 × 10⁵ cells from one patient). Isolation of RNA from FACS-sorted cells was performed using Trizol-reagent (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions [17]. Complementary DNA was prepared using M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco) according to manufacturer instructions. Glycogen (Gibco) 250 µg/mL was added when initial cell number was lower than 10⁵. Quality of cDNA was verified by PCR on beta-2-microglobulin (B2M) housekeeping gene.

RQ-PCR was performed in the LightCycler™ rapid thermal cycler system (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), according to manufacturer's instructions, using SYBR green intercalating dye. CEACAM6 specific primers 3'-CGCCTTTGTACCAGCTGTAA and 5'-GCATGTCCCCT-GGAAGGA designed by Baranov [18] were used for CEACAM6 amplification and B2M specific primers 3'-GATGCTGCTTACATGTCTCG 5'-CCAGCAGAGAAT-GGAAAGTC [19] were used for total cDNA quantification.

PCR amplification was carried out in 1× reaction buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; 50 mmol/L KCl); and 2.0 mmol MgCl₂ containing 200 µmol/L of each dNTP, 0.2 µmol/L of each primer, 5 µg bovine serum albumin per reaction, and 1 U of Platinum Taq DNA polymerase (all from Gibco) in a final reaction volume of 20 µL. For each PCR reaction, 2 µL of cDNA template and 2 µL of SYBR Green 5 × 10⁻⁴ (FMC BioProducts, Rockland, MA, USA) fluorescent dye was included. The cycling conditions were 2.0 minutes at 95 °C followed by 45 cycles of

Table 1: Frequency of CD66c and myeloid antigen expression. Cases with >20% blasts are regarded positive, coexpression of CD66c and other MyAg is tested by Fisher's exact test.

Molecule	No of cases (total = 365)	Proportion [%]	Coexpression with CD66c	
CD66c	156	43		
CD33	85	23		
CD15	72	20		
CD13	57	16		
CD65	14	3.8		
CD66c and CD33	21	5.8	mutually exclusive	p = 0.002
CD66c and CD15	30	8.2	random	NS
CD66c and CD13	9	2.5	mutually exclusive	P < 0.0001
CD66c and CD65	2	0.55	mutually exclusive	p = 0.029

denaturation at 94°C for 5 seconds, annealing at 59°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 15 seconds. CEACAM6 and B2M gene were amplified separately from the same cDNA, and all experiments were performed in duplicate. Melting curve analysis was performed after each run; in case of peak melting temperature shift, PCR products were verified on agarose gel electrophoresis.

Normalized CEACAM6 Expression (CEACAM6n)

Amplification and calibration curves were generated by using affiliated software (LightCycler 3 data-analysis software; version 3.5.28; Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA). A calibration curve for the B2M and CEACAM6 housekeeping gene was generated using the series of 10× diluted cDNA from peripheral blood granulocytes as a standard for both reactions. Crossing point (Cp) value was calculated with LightCycler 3 software using second derivative maximum method. CEACAM6n value is relative and represents a ratio of CEACAM6 to B2M (CEACAM6n = CEACAM6/ B2M). Standard cDNA from granulocytes was assigned CEACAM6n value of 1, the same aliquot of granulocytes cDNA was used throughout of study.

Statistics

Statistical evaluation was done with Statview software, (SAS Institute Inc, NC, USA). We used Fisher's exact test, regression coefficient, Mann-Whitney test and Logrank (Mantel-Cox) test as described in text.

Results

Frequency of CD66c and myeloid antigen (MyAg) expression

We selected 365 patient's samples obtained at diagnosis of B-precursor ALL with available information on the expression of MyAg CD13, CD15, CD33, CD65 and CD66c. This subcohort represents 96% of all B-precursor

ALL diagnosed in the study period. The CD66c molecule was expressed on 43% cases (Table 1, cases with >20% positive blasts were considered positive). For the fraction of positive cells and correlation with genotype see [5], of note, 29% of patients expressed CD66c on more than 50% blasts. Comparison with other MyAg showed that CD66c is more frequently expressed. Coexpression of CD66c with other MyAg was not a usual finding (Table 1, Figure 2). Expression of CD13, CD33 and CD65 tended to be non-random (mutually exclusive) with CD66c (Table 1). Coexpression of CD66c with any 2 of the other MyAg was found in fewer than 4 cases in each combination. Interestingly, mutual relationship of other MyAg was random, with the exception of CD13 and CD33 coexpression (p < 0.0001) and CD15 and CD65 coexpression (p = 0.0002). The analysis was performed also at different cut-off values (10, 30 and 50 %; data not shown). The same or less significant correlations were also observed at different cutoff values.

Cross-blocking of KOR-SA3544 clone with 9A6 clone

The moAb clone KOR-SA3544 was not included in Human Leukocyte Differentiation Antigens workshop, but was characterized by Sugita et al [13]. To prevent ambiguous interpretation of our data we extended characterization of KOR-SA3544 clone of CD66c moAb by blocking experiments on CD66c^{pos} blasts. Pretreatment of cells with workshop-typed clone 9A6 moAb completely blocked binding of KOR-SA3544 clone in all 9 leukemic specimens and in granulocytes (data not shown).

Cytoplasmic presence of CD66c in ALL blasts

We have studied surface and cytoplasmic expression of CD66c in 20 ALL diagnostic samples by flow cytometry. In contrast to findings of Sugita et al [13], we have detected CD66c exclusively in all 8 surface positive cases. None of the 12 surface negative cases stained in cytoplasm

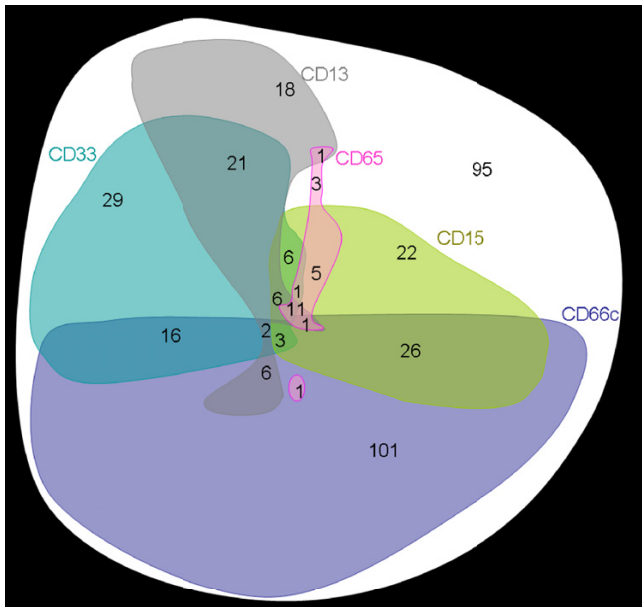


Figure 2
Graphical illustration of myeloid antigen positivity in childhood B-precursor ALL. For each antigen, positive cases are represented by a colored form. The areas of the forms roughly correspond to the frequency of positive cases (observed numbers of patients are marked in red) while the shapes are constructed to illustrate the respective coexpressions. An arbitrary cutoff value of 20% is used for all antigens. The CD66c positivity correlates with negativity of any of the following: CD33 ($p = 0.002$), CD13 ($p < 0.0001$) and CD65 ($p = 0.029$). There was a significant correlation between CD33 and CD13 positivity ($p < 0.0001$) and between CD15 and CD65 positivity ($p = 0.0002$) whereas the positivity of no other two antigens of the ones shown correlated significantly with each other. Total number of B-precursor cases illustrated is 365.

(Figure 3). The probable cause of the opposite finding in several cases (lower percentage after permeabilization than on surface) is a higher background after permeabilization (isotypic control mean fluorescence intensity was 4.3 ± 2.0 and 9.7 ± 3.7 for surface and permeabilized staining, respectively), which covers borderline events.

Transcription of CEACAM6 gene

To extend the above findings, we used Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR (RQ-RT-PCR) to quantitatively assess presence of specific CEACAM6 mRNA. We FACS-sorted CD19^{pos}CD66c^{neg} or CD19^{pos}CD66c^{pos} blast cells for RQ-RT-PCR analysis. We didn't find significant amount of CEACAM6 transcript in surface CD66c^{neg} lymphoblasts, whereas CD66c^{pos} cells contained CEACAM6. When CD66c^{neg} and positive fraction was

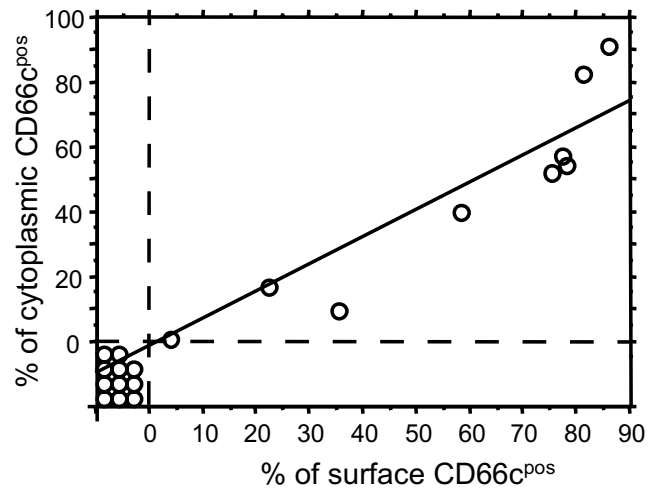


Figure 3
Relationship of surface and cytoplasmic expression of CD66c. Percentage of surface expression of CD66c in ALL blasts is plotted against cytoplasmic expression (after cell membrane permeabilization). Samples of 20 patients at ALL diagnosis are shown, 12 CD66c negative and 8 CD66c positive. Regression coefficient $R^2 = 0.927$

FACS-sorted of heterogeneous specimens (lymphoblasts partly positive for CD66c) the level of CEACAM6 was observed higher in CD66c^{neg} cells and lower in CD66c^{pos} cells as compared to uniform populations (Figure 4). In one specimen (ALL patient with Down syndrome), CEACAM6 wasn't increased in CD66c^{pos} fraction.

Western blot

We further question the intracellular CD66c positivity in surface CD66c negative cell lines. We performed Western blot as described by Sugita et al. [13] on REH (TEL/AML1^{pos}) and RS4;11 (MLL/AF4^{pos}) cell lines and found no CD66c protein (Figure 5). Furthermore we found NALM-6 (surface CD66c^{neg}, no translocation) cell line negative. Two BCR/ABL and four hyperdiploid (all surface CD66c^{pos}) diagnostic samples used as positive controls were positive, with the similarly narrow band contrasting to broad band detected in granulocytes (Figure 5), suggesting different glycosylation in keeping with report by Sugita.

Stability of surface expression from diagnosis to relapse

All relapsed patients up till 12/2003 with available information on CD66c expression at diagnosis and at relapse were used to assess stability of CD66c expression. Comparison of CD66c expression in 39 cases of relapsed childhood ALL cases to their immunophenotype at diagnosis

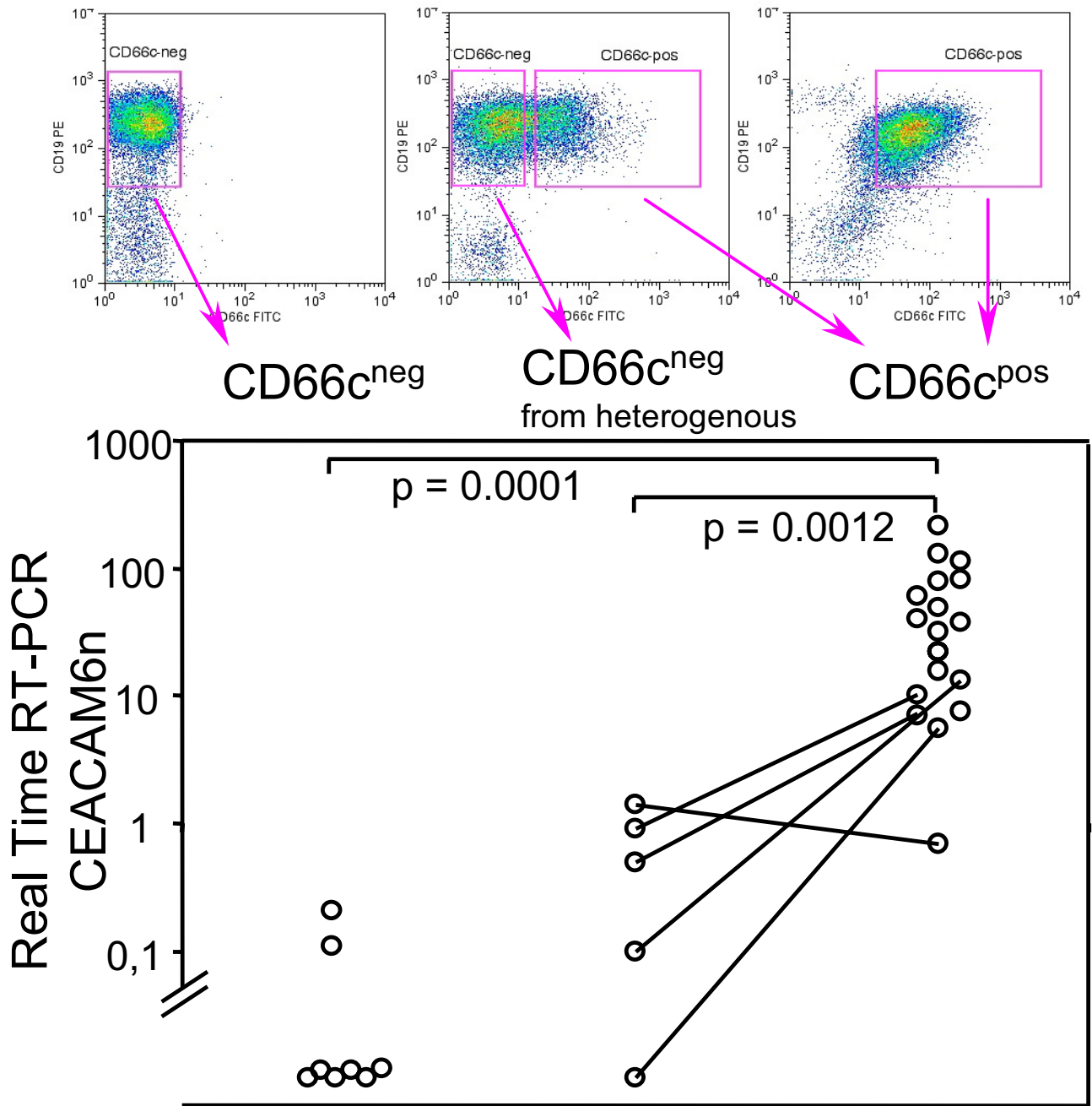


Figure 4
Transcription of CEACAM6 versus surface CD66c expression on sorted cells. FACSsorted CD66c surface negative (CD66c^{neg}) or positive (CD66c^{pos}) ALL lymphoblasts, five patients with heterogeneous CD66c expression were sorted into both CD66c negative and CD66c positive fraction (lines connect sorted fractions from the same specimen). Mann-Whitney test was used to compare groups (n = 32). CEACAM6n value is normalized to beta-2-microglobulin (see Methods).

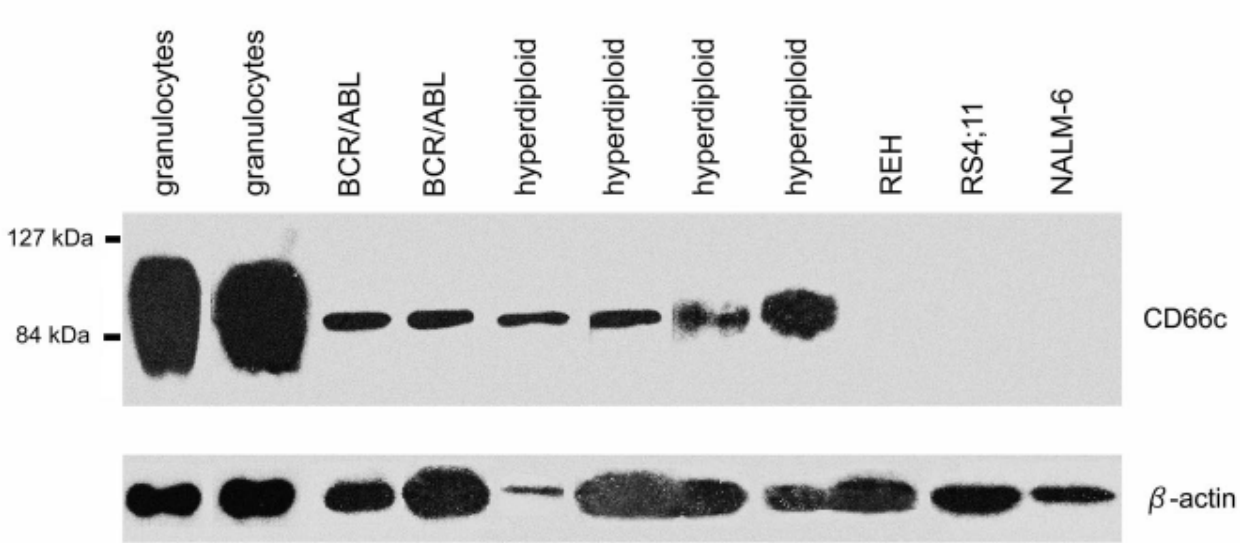


Figure 5
Western blot of granulocytes, ALL samples of CD66c positive cases and surface CD66c^{neg} cell lines with TEL/AML1 pos (REH), MLL/AF4pos (RS4;11) translocation and with no fusion (NALM-6).

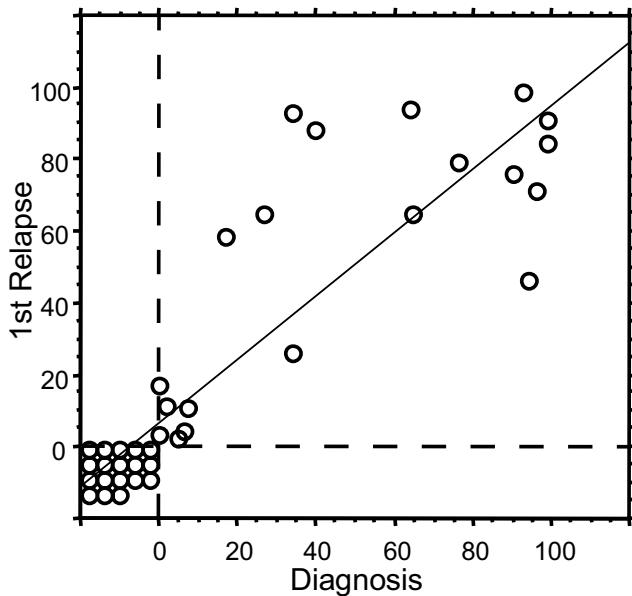


Figure 6
Stability of CD66c from diagnosis to relapse. Each circle represents one patient (n = 39). Percentage of CD66c^{pos} blasts at diagnosis is plotted against percentage of CD66c^{pos} blasts at relapse. Regression line with 95% confidence R² = 0.755

revealed that both negativity and positivity of this antigen was retained from diagnosis to relapse (Figure 6; median time to relapse 2.5y min 0.3y, max 5.3y). Although the quantitative levels of CD66c expression differed in some patients (median difference 0.0%, standard deviation 21%), no case of CD66c complete loss or gain was found in our cohort.

Prognostic significance of CD66c expression

Only B-precursor ALL patients treated on the same ALL BFM 95 treatment protocol [20] (n = 254) were evaluated for prognostic impact. The prognosis did not differ for cases with either CD66c^{pos} blasts exceeding either 20% (Figure 7) or any other cutoff value tested (5%, 10% and 50%, data not shown).

Next, we asked whether CD66c expression correlated with the risk factors used in ALL BFM-95 protocol for stratification into risk groups [21]. No difference in relapse free survival (RFS) was noted when analyzed separately for each risk group or higher and lower initial leukocytosis (cutoff value: 2 × 10⁴ cells per ml), age group or response to prednisone (groups as in Table 2).

When analyzed with respect to a genotype, we found no prognostic value of CD66c in any defined group (BCR/ABL^{pos}, TEL/AML1^{pos}, hyperdiploid ALL and none of the above-mentioned genetic changes, Figure 7 and Table 2).

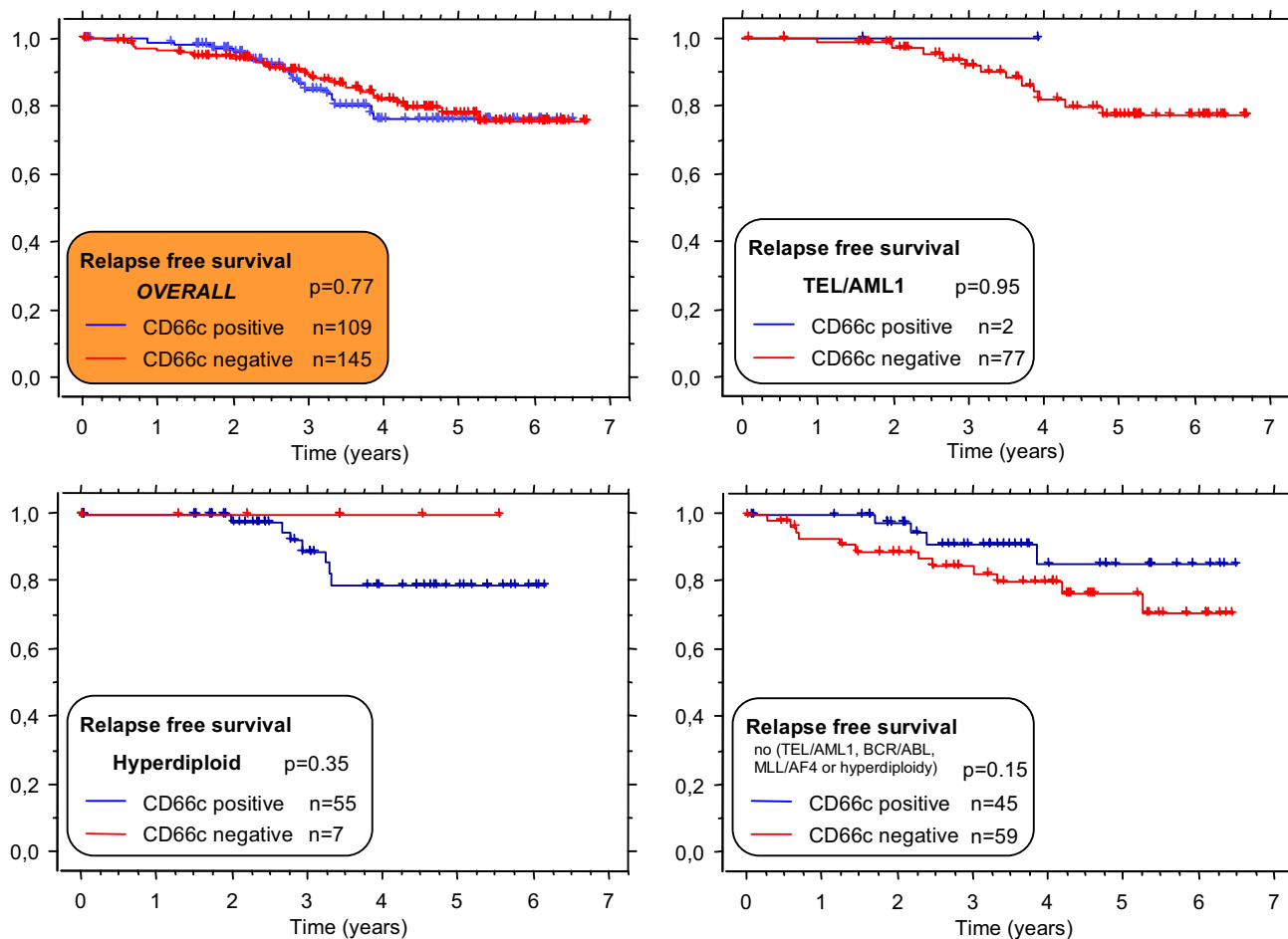


Figure 7
Relapse free survival of cases with CD66c^{pos} (blue line) or CD66c^{neg} (red line) B-precursor ALL. Unselected consecutive patients treated on ALL BFM95 protocol (median follow up 3.64 years). Since surface CD66c associates with genotype, separate analyses for distinct genotype subgroups are shown.

In contrast to the study by Hanenberg et al [22], there was no correlation between initial leukocytosis and CD66c in our cohort (Table 2).

Discussion

Our data on childhood B-precursor ALL show that CD66c is more frequently expressed than the myeloid antigens included in the standard immunophenotyping panels for ALL. To our knowledge, CD66c is the most frequent myeloid marker in childhood ALL. This, together with the tight correlations between CD66c and genotype [5], makes CD66c a pertinent object of research on aberrant expression regulation.

In line with the data from Sugita, we confirm the specificity of KOR-SA3544 clone moAb for CD66c by CEACAM6

mRNA detection and by cross-blocking of KOR-SA3544 binding by representative 9A6 clone, that suggests a spatial proximity of the two epitopes recognized. Furthermore we show that all CD66c^{pos} ALL specimens show a similar extent of glycosylation as cell lines analyzed by Sugita, which differs from the extent of glycosylation in granulocytes.

Since there is a strong correlation of ALL genotype and CD66c expression, we hypothesized that surface CD66c expression would be controlled by gene transcription rather than by targeting to surface from intracellular stores as proposed by Sugita [13]. In accordance with this, both intracellular staining and Western blot failed to identify cytoplasmic CD66c protein in any surface CD66c^{neg} cells. Down the same line, no CEACAM6 transcript was

Table 2: Correlation between risk factors and CD66c expression. The distribution of CD66c^{pos} and CD66c^{neg} cases (cutoff 20%) is shown. In addition, no difference was observed in the RFS of the risk-defined subsets based on the CD66c expression (log-rank test p-value > 0.05 in all analyses). Only patients treated by a single ALL BFM-95 protocol are shown here (n = 254).

	CD66c ^{pos} cases	CD66c ^{neg} cases	p-value (chi-square)
All patients	109	145	N/A
Prednisone poor responder	9	12	n.s.
Prednisone good responder	100	133	
Initial leukocytosis = > 20 × 10 ⁹ /L	28	44	n.s.
Initial leukocytosis < 20 × 10 ⁹ /L	81	101	
TEL/AML1	2	77	P < 0.0001
BCR/ABL	7	1	
MLL/AF4	0	1	
Hyperdiploid	55	7	
Other genotype (not TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4 or hyperdiploidy)	45	59	
Age 1–5	59	88	n.s.
Age >5	50	57	
Standard risk group	40	58	n.s.
Intermediate risk group	54	72	
High risk group	15	15	

detected in surface CD66c^{neg} lymphoblasts. Overall our data suggest that transcription is the checkpoint that leads to surface expression, rather than the former model, which proposed that all malignant lymphoblasts generate the CD66c molecule but only some of them target it for the cell membrane.

Interestingly, importance of this molecule was shown in a model of colorectal carcinoma where transfection with CEACAM6 inhibited anoikis (10), high CEACAM6 predicted high risk patients with resectable colorectal cancer (9) and CEACAM6 gene silencing decreased resistance to anoikis in vitro leading to inhibition of metastatic ability in mouse model (11). Although the function of CEACAM6 in ALL blasts is still unknown, this molecule's function has been recently associated with pathogenesis of other types of cancer in man [10-12,23,24]. Study of anti-CEACAM6 immunotoxin-based therapy in mouse model of pancreatic carcinoma was published recently [25].

So far, prognostic significance of expression of myeloid antigens CD13, CD14, CD33, CD65w, CD11b and CD15 has been studied with conflicting results (summarized in [26]). As determined in our large cohort of patients treated on ALL BFM 95 protocol, no prognostic significance of CD66c could be revealed in general, nor when we analyzed separate risk groups or TEL/AML1^{pos}, BCR/ABL-

^{pos}, hyperdiploid and other B-precursor ALL cases separately. Furthermore, instability of aberrant expression was reported for most myeloid markers (CD13, CD14, CD15, CD33 and CD65).

Stability of expression is a major concern of flow cytometric studies of MRD. In present, use of multiple CD markers is widely recommended to prevent MRD underestimation due to the immunophenotype shift (discussed in [15,27]). In current study we show for the first time that CD66c expression stays qualitatively stable from diagnosis to relapse in all relapsed cases studied. This finding, together with high frequency of CD66c^{pos} cases, supports inclusion of CD66c into a moAbs panels for MRD detection in patients positive for this CD marker at diagnosis. However, anecdotal downregulation of CD66c expression during chemotherapy has been observed [15], but has not been methodically studied yet. Any temporary downregulation might lead to falsely lower values of MRD measurement – thus, it would be worthwhile to disclose whether this phenomenon occurs regularly at certain points of chemotherapy.

Mutual exclusiveness of MyAg expression as well as different stability of CD66c compared to other MyAgs [28] challenges the general practice of prognostic evaluation of MyAg^{pos} ALL cases as a group [26] and favors individual

evaluation of contribution/regulation of each MyAg for blast cell.

Conclusion

CD66c presents some of the tightest associations with ALL genotype. Although our findings indicate that CD66c is unlikely to gain a practical importance as a prognosis predictor, there are several reasons to focus on it in diagnostic and MRD studies. CD66c, apparently the most frequently expressed aberrant antigen in childhood ALL, is very useful in discriminating leukemic blasts from non-malignant cells. Aberrant expression remains a puzzling phenomenon that warrants further investigation. If it is confirmed by techniques sensitive enough that the so called "aberrant markers" are truly not expressed on any subtle population of lymphoid precursors, there will be an opportunity to find new targets for specific ALL therapy (e.g. monoclonal antibodies against differently glycosylated form of CD66c) that will spare the non-leukemic precursors, thus reducing the treatment toxicity.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TK performed flow cytometry, cell sorting, RQ-RT-PCR study and drafted the manuscript, MV carried out the Western blot study, EM acquired and analyzed patients flow cytometry data and performed the statistical analysis, JM designed and assisted to the RQ-RT-PCR study, JT designed RT-PCR, did the genotype detection and critically discussed the manuscript, JS contributed to the study design and organization and OH conceived of the study, analyzed data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of Charles University #44/2001 and #65/2004, IGA #7430-3 and MSM0021620813. Superb technical assistance of J. Ridoskova, K. Pospisilova, L. Gondorcina, P. Hanusova, K. Muzikova and M. Kalinova as well as the collaboration of all Czech Pediatric Hematology (CPH) centers (data manager A. Vrzalova, leaders: B. Blazek (Ostrava), Z. Cerna (Plzen), Y. Jabali (Ceske Budejovice), V. Mihal (Olomouc), D. Prochazkova (Usti nad Labem), J. Stary (Praha), J. Sterba (Brno), J. Hak and K. Tousovska (Hradec Kralove)) is highly appreciated. V. Horejssi is acknowledged for consulting in molecular immunology. We thank to F. Grunert for providing us with a sample of 9A6 clone of CD66c.

References

1. Markert CL: **Neoplasia: a disease of cell differentiation.** *Cancer Res* 1968, **28**:1908-1914.
2. Greaves MF: **Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes.** *Science* 1986, **234**:697-704.
3. Mori T, Sugita K, Suzuki T, Okazaki T, Manabe A, Hosoya R, Mizutani S, Kinoshita A, Nakazawa S: **A novel monoclonal antibody, KOR-SA3544 which reacts to Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells with high sensitivity.** *Leukemia* 1995, **9**:1233-1239.
4. Hrusak O, Trka J, Zuna J, Houskova J, Bartunkova J, Stary J: **Aberrant expression of KOR-SA3544 antigen in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts TEL-AMLI negativity. The Pediatric Hematology Working Group in the Czech Republic.** *Leukemia* 1998, **12**:1064-1070.
5. Hrusak O, Porwit-MacDonald A: **Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias.** *Leukemia* 2002, **16**:1233-1258.
6. Bocconi P, Di Noto R, Lo Pardo C, Villa MR, Ferrara F, Rotoli B, Del Vecchio L: **CD66c antigen expression is myeloid restricted in normal bone marrow but is a common feature of CD10+ early-B-cell malignancies.** *Tissue Antigens* 1998, **52**:1-8.
7. Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H: **Leukocyte Typing VI.** New York, London, Garland Publishing Inc; 1997:1342.
8. Klein ML, McGhee SA, Baranian J, Stevens L, Hefta SA: **Role of non-specific cross-reacting antigen, a CD66 cluster antigen, in activation of human granulocytes.** *Infect Immun* 1996, **64**:4574-4579.
9. Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP: **CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils.** *J Leukoc Biol* 1996, **60**:106-117.
10. Jantschke P, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, Micheel B, Brummer J, Laffer U, Metzger U, Herrmann R, Rochlitz C: **Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance.** *J Clin Oncol* 2003, **21**:3638-3646.
11. Ordonez C, Screation RA, Ilantzis C, Stanners CP: **Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis.** *Cancer Res* 2000, **60**:3419-3424.
12. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE: **CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells.** *Oncogene* 2004, **23**:465-473.
13. Sugita K, Mori T, Yokota S, Kuroki M, Koyama TO, Inukai T, Iijima K, Goi K, Tezuka T, Kojika S, Shiraiishi K, Nakamura M, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, Nakazawa S: **The KOR-SA3544 antigen predominantly expressed on the surface of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells is nonspecific cross-reacting antigen-50/90 (CD66c) and invariably expressed in cytoplasm of human leukemia cells.** *Leukemia* 1999, **13**:779-785.
14. Campana D, Coustan-Smith E: **Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry.** *Cytometry* 1999, **38**:139-152.
15. Campana D, Coustan-Smith E: **Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2002, **15**:1-19.
16. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB: **Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).** *Leukemia* 1995, **9**:1783-1786.
17. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**:156-159.
18. Baranov V, Yeung MM, Hammarstrom S: **Expression of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting 50-kDa antigen in human normal and cancerous colon mucosa: comparative ultrastructural study with monoclonal antibodies.** *Cancer Res* 1994, **54**:3305-3314.
19. Madzo J, Zuna J, Muzikova K, Kalinova M, Krejci O, Hrusak O, Otova B, Stary J, Trka J: **Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AMLI positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study.** *Cancer* 2003, **97**:105-113.
20. Muller HJ, Beier R, Loning L, Blutters-Sawatzki R, Dorffel W, Maass E, Muller-Weihrich S, Scheel-Walter HG, Scherer F, Stahnke K, Schrappe M, Horn A, Lumkemann K, Boos J: **Pharmacokinetics of native Escherichia coli asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment.** *Br J Haematol* 2001, **114**:794-799.
21. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, Fritsch G, Gadner H: **Prognostic significance and modalities**

- of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002, **99**:1952-1958.
22. Hanenberg H, Baumann M, Quentin I, Nagel G, Grosse-Wilde H, von Kleist S, Gobel U, Burdach S, Grunert F: **Expression of the CEA gene family members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B-cell origin.** *Leukemia* 1994, **8**:2127-2133.
 23. Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J: **Carcinoembryonic Antigen Family Members CEACAM6 and CEACAM7 Are Differentially Expressed in Normal Tissues and Oppositely Deregulated in Hyperplastic Colorectal Polyps and Early Adenomas.** *Am J Pathol* 2000, **156**:595-605.
 24. Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE: **Overexpression of CEACAM6 promotes insulin-like growth factor I-induced pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness.** *Oncogene* 2004, **23**:5834-5842.
 25. Duxbury MS, Ito H, Ashley SW, Whang EE: **CEACAM6 as a novel target for indirect type I immunotoxin-based therapy in pancreatic adenocarcinoma.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **317**:837-843.
 26. Putti MC, Rondelli R, Cocito MG, Arico M, Sainati L, Conter V, Guglielmi C, Cantu-Rajoldi A, Consolini R, Pession A, Zanasco L, Masera G, Biondi A, Basso G: **Expression of Myeloid Markers Lacks Prognostic Impact in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia: Italian Experience in AIEOP-ALL 88-91 Studies.** *Blood* 1998, **92**:795-801.
 27. San Miguel JF, Ciudad J, Vidriales MB, Orfao A, Lucio P, Porwit-MacDonald A, Gaipa G, van Wering E, van Dongen JJ: **Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia.** *Crit Rev Oncol Hematol* 1999, **32**:175-185.
 28. Mejstrikova E, Kalina T, Trka J, Stary J, Hrusak O: **Correlation of CD33 with poorer prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy.** *Leukemia* 2005, in press.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/38/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



PŘÍLOHA Č.5

TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements—*which comes first?*

Jan Zuna^{a,b,*}, Ondrej Krejci^{a,b}, Jozef Madzo^{a,b}, Eva Fronkova^{a,b},
Lucie Sramkova^{a,b}, Ondrej Hrusak^{a,c}, Tomas Kalina^{a,c}, Martina Vaskova^{a,c},
Jan Stary^b, Jan Trka^{a,b}

The Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH)

^a CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

^b Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

^c Department of Immunology, 2nd Medical School, Charles University Prague, V Uvalu 84, Prague, Czech Republic

Received 10 August 2004; accepted 23 November 2004

Available online 18 January 2005

Abstract

TEL/AML1 fusion gene is present in 20–25% of childhood acute lymphoblastic leukaemias. In order to unravel at which stage of B-cell precursor development the fusion is originated, we analysed frequency and pattern of immunoreceptor (immunoglobulin and T-cell receptor) gene rearrangements in 47 TEL/AML1-positive and 43 TEL/AML1-negative cases of the same CD10+ immunophenotype. Moreover, we compared corresponding immunoreceptor gene rearrangements in 11 cases of TEL/AML1-positive leukaemia at diagnosis and relapse. More mature immunogenotype of TEL/AML1-positive cases and changes in 37% of rearrangements between diagnosis and relapse suggest that in most cases the TEL/AML1 fusion is formed during immunoreceptor gene rearrangement process.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Acute lymphoblastic leukaemia; TEL/AML1; Immunoglobulin; T-cell receptor; Rearrangement; Relapse

1. Introduction

Leukaemias with TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion gene (resulting from *t*(12; 21) translocation) form the most common genetically defined subgroup of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) with 20–25% of all cases [1]. This subgroup is relatively homogeneous and a significant part of its characteristics regarding biological and clinical features, behaviour, prognosis and also aetiology has been revealed. However, a number of questions still remain unanswered. One of these questions concerns the timing of initiating event of the leukaemic process. It is believed that the fusion of TEL and AML1 genes is the first or initiating hit in these leukaemias. It has been shown that this hit

occurs already during prenatal development in most cases [2–4] and recent data suggest that it does not necessarily lead to overt leukaemia [5]. However, it is still not clear at which stage of B-cell precursor (BCP) development this fusion takes place.

In our study we compare the number and pattern of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements at initial diagnosis in the groups of TEL/AML1-positive and -negative patients diagnosed with ALL of the same CD10+ immunophenotype and, moreover, we compare Ig/TCR rearrangements at diagnosis and relapse of the TEL/AML1-positive leukaemia. In discussion, we offer scenarios that are compatible with our own data as well as the other data published so far—particularly, we analyse hypotheses concerning the question in the background of Ig/TCR rearrangements and TEL/AML1 fusion relationship: *which comes first?*

* Corresponding author. Tel.: +420 22443 6580; fax: +420 22443 6521.
E-mail address: jan.zuna@lfmotol.cuni.cz (J. Zuna).

2. Materials and methods

2.1. Immunoreceptor gene rearrangements analysis

We examined pattern of Ig/TCR gene rearrangements in bone marrow samples of ALL patients using the set of 18 reactions covering the vast majority (>90%) of Ig-heavy chain (IgH), Ig-kappa (Igκ), TCR-delta (TCRδ) and TCR-gamma (TCRγ) rearrangements in B-cell precursor ALL (IgH: VH1–JHcons, VH2–JHcons, VH3–JHcons, VH4–JHcons, VH5–JHcons; Igκ: VκI–Kde, VκII–Kde, VκIII–Kde, VκIV–Kde, intron RSS–Kde; TCRδ: Vδ2–Dδ3, Dδ2–Dδ3; TCRγ: VγI–Jγ1.1/2.1, VγI–Jγ1.3/2.3, VγII–Jγ1.1/2.1, VγII–Jγ1.3/2.3, VγIV–Jγ1.1/2.1, VγIV–Jγ1.3/2.3). Sequences of primers and PCR conditions were specified elsewhere [6,7]. To reliably distinguish clonal PCR products from polyclonal we performed heteroduplex analysis of fragments using polyacrylamide gel. Clonal PCR products were excised and purified using QIAquick gel extraction kits (QIAGEN, Valencia, CA). Purified PCR fragments were sequenced directly on ABI PRISM® 310 capillary sequencer using Big Dye Terminator Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA). Variable (V), diversity (D) and joining (J) regions of immunoreceptor genes were identified by comparison with sequences in GeneBank using the ImMunoGeneTics (IMGT) Database (<http://imgt.cines.fr>, IMGT, European Bioinformatics Institute, Montpellier, France) and the IGBlast search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

2.2. Patients

All patients included in this study were treated in one of the Czech Paediatric Haematology Working Group (CPH) centres according to Berlin–Frankfurt–Munster (BFM) ALL protocols. Informed consent was obtained from patients or their guardians. We compared the number and pattern of Ig/TCR rearrangements at initial diagnosis in the groups of 47 TEL/AML1-positive and 43 TEL/AML1-negative patients diagnosed with ALL of the same CD10+ immunophenotype (TEL/AML1-positive: common ALL $n=30$, prae-B ALL $n=17$; TEL/AML1-negative: common ALL $n=27$, prae-B ALL $n=16$) and of the same age at presentation. Moreover, we examined Ig/TCR rearrangements in corresponding diagnostic and relapse samples of 11 patients diagnosed with relapsed TEL/AML1-positive ALL. The TEL/AML1 status was determined using reverse transcriptase (RT)-PCR method as described elsewhere [1].

2.3. Cell cycle analysis

CycleTESTt PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA) was used for analysis of nuclear DNA from cell suspension according to the manufacturer's instructions. The distribution of cell cycle phases was analysed with CELLQuest (Becton Dickinson)

and ModFit (Verity House, Topsham, ME, USA) software applications.

2.4. Statistical analysis

Fisher's exact test and Mann–Whitney test were used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Ig/TCR rearrangements in TEL/AML1+ and TEL/AML1– ALL

The results of this analysis are summarised in Table 1. The number of patients with at least one detectable clonal (i.e. only mono- or bi-clonal/allelic) rearrangement is comparable within both selected cohorts (94% versus 95% for TEL/AML1-positive and TEL/AML1-negative groups, respectively; $p=1.0$). However, we found a significantly higher total number of clonal rearrangements in the TEL/AML1-positive patients ($p=0.0006$). The most significant difference between the two groups was identified in Igκ segment (72% versus 26%; $p<0.0001$) and also the TCRγ rearrangements were significantly more frequent in the TEL/AML1-positive group (81% versus 56%; $p=0.0128$). The frequency of clonal TCRδ and IgH rearrangements did not differ significantly in the TEL/AML1-positive compared to -negative patients (53% versus 56%; $p=0.8349$ and 79% versus 65%; $p=0.1658$, respectively).

3.2. Ig/TCR rearrangements at diagnosis and relapse

Summary of Ig/TCR rearrangements found in diagnostic and corresponding relapse samples of 11 patients with relapsed TEL/AML1-positive ALL is shown in Table 2. In four patients the pattern of rearrangements was the same at diagnosis and relapse (2, 3, 4 and 5 rearrangements, respectively). In five patients we found loss of some markers at relapse,

Table 1

	Number of patients with clonal (mono- or bi-clonal/allelic) rearrangements					
	IgH ^a	Igκ ^a	TCRδ ^a	TCRγ ^a	≥1 ^b	Overall ^c
TEL/AML1+ ($n=47$)	79% (37/47)	72% (34/47)	53% (25/47)	81% (38/47)	94% (44/47)	186 (4.0/pt.)
TEL/AML1– ($n=43$)	65% (28/43)	26% (11/43)	56% (24/43)	56% (24/43)	95% (41/43)	116 (2.7/pt.)
<i>p</i>	0.17 ^d	<0.0001 ^d	0.83 ^d	0.0128 ^d	1.0 ^d	0.0006 ^e

^a Number of patients with at least one clonal (mono- or bi-clonal/allelic) rearrangement of particular gene.

^b Number of patients with at least one clonal rearrangement.

^c Total number of clonal rearrangements within the group (number of rearrangements per patient).

^d Statistical significance (*p*) calculated using Fisher's exact test.

^e Statistical significance (*p*) calculated using Mann–Whitney test.

Table 2
Immunoreceptor gene rearrangements of 11 TEL/AML1-positive patients at diagnosis and relapse

Patient	Immunoreceptor gene rearrangements	
	Diagnosis	Relapse
1	VH4/JH	–
	VH5/JH	VH5/JH
	VkI/Kde	VkI/Kde
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	VgII/Jg1.3–2.3
2	VkI/Kde	VkI/Kde
	–	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
	VgI/Jg1.3–2.3 (1)	–
	–	VgI/Jg1.3–2.3 (2)
3	VH3/JH	–
	VkIV/Kde	–
	RSS/Kde	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	–
	VgI/Jg1.3–2.3 (1)	VgI/Jg1.3–2.3 (1)
	VgI/Jg1.3–2.3 (2)	VgI/Jg1.3–2.3 (2)
4	VH3–33/DH3–10/JH6	–
	–	VH3–38/DH3–10/JH6
	VH4/JH	–
	VH5–51/DH3–10/JH6 (1)	–
	–	VH5–51/DH3–10/JH6 (2)
	VkII/Kde	VkII/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
VgI/Jg1.3–2.3	–	
5	VkI/Kde	VkI/Kde
	RSS/Kde	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	–
6	VH3/JH	–
	VkIII/Kde	–
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
7	VkI/Kde	–
	VkII/Kde	VkII/Kde
	Vd2/Dd3	–
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	–
8	VH2/JH	VH2/JH
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
	VgII/Jg1.3–2.3	VgII/Jg1.3–2.3
9	VH2/JH	VH2/JH
	VgIV/Jg1.1–2.1	VgIV/Jg1.1–2.1
10	VH3/JH	VH3/JH
	RSS/Kde	RSS/Kde
	Vd2/Dd3	Vd2/Dd3
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3
11	VH2/JH	VH2/JH
	VH3/JH	VH3/JH
	VkI/Kde	VkI/Kde
	VkII/Kde	VkII/Kde
	VgI/Jg1.3–2.3	VgI/Jg1.3–2.3

but at least one dominant rearrangement was maintained between the diagnosis and relapse in all of these children. In the remaining two patients the changes were more complex. Patient number two had clonal rearrangements in V δ 2–D δ 3, V κ I–Kde and V γ I–J γ 1.3/2.3 systems at diagnosis. At relapse, in addition to identical V δ 2–D δ 3 and V κ I–Kde, she gained RSS–Kde rearrangement and the V γ I–J γ 1.3/2.3 rearrangement showed a different sequence. Unfortunately, the limited amount of diagnostic DNA material did not allow us to backtrack the latter clones back to diagnosis. The diagnostic sample of the patient number 4 was positive in systems VH3–JH6, VH4–JH4, VH5–JH6, V δ 2–D δ 3, V κ II–Kde and V γ I–J γ 1.3/2.3. At relapse the VH4–JH4 and V γ I–J γ 1.3/2.3 rearrangements were lost and the VH3–JH6 and VH5–JH6 rearrangements showed change of the VH segment with DH–JH sequence maintained. This change is likely to be caused by a clonal evolution of the rearrangement between diagnosis and relapse. Altogether, in our cohort of 11 patients with relapsed TEL/AML1-positive ALL we detected 47 Ig/TCR rearrangements at diagnosis and 36 rearrangements at relapse. We found 37% of Ig/TCR rearrangements to be changed between the two time points.

3.3. Cell cycle analysis of TEL/AML1-positive and -negative patients

In 59 cases (34 TEL/AML1-positive and 25 TEL/AML1-negative) we were able to evaluate a cell cycle of the leukaemic population analysing the DNA content using propidium iodide. The proportion of the cells in G0–G1 phase was identical in both groups (median 92% (71–97%) and median 91% (76–96%) for the TEL/AML1-positive and -negative patients, respectively; non-significant).

4. Discussion

In normal B- and T-lymphoid precursors the rearrangement process begins with IgH and TCR δ genes, respectively, followed by TCR γ (T-lymphocytes) and finally Ig κ (B-lymphocytes) in more advanced stages of differentiation [8]. It has been shown recently that TCR rearrangements typical for BCP-leukaemic cells are present also in normal B-cell precursors [9]. Therefore, the presence of TCR rearrangements in BCP-ALLs probably reflects physiological situation and also the physiological order of recombination is preserved in childhood BCP leukaemias [10]. The higher overall number of clonal Ig/TCR rearrangements and particularly the predominance in the Ig κ and TCR γ loci thus indicates more mature immunogenotype of the TEL/AML1-positive ALL compared to other childhood leukaemias of the same immunophenotype. In the traditional view, age at diagnosis of ALL could possibly be a factor influencing the relative immunogenotypic maturity of the leukaemic blasts. However, age at presentation did not differ significantly between our groups (TEL/AML1-positive: median 53 months

(15–167 months); TEL/AML1-negative: median 65 months (4–218 months); $p = 0.47$). To further eliminate any possible bias caused by the different presentation age we performed also an age-matched analysis of the two groups. We were able to select 33 patients from each group and made TEL/AML1-positive versus TEL/AML1-negative pairs with age at diagnosis differing by fewer than six months within each pair. The analysis revealed similar result with significant difference between the positive and negative groups in the overall frequency of rearrangements ($p = 0.0089$) and frequency of Igk ($p = 0.0002$) and TCR γ ($p = 0.0332$) rearrangements. Again, the number of patients with at least one rearrangement as well as frequency of TCR δ and IgH rearrangements showed no statistically significant difference ($p = 0.24$, $p = 0.45$ and $p = 0.57$, respectively). Comparable results were recently obtained in a similar study performed by Hubner et al. [11].

If we want to disclose the reason *why* the TEL/AML1-positive leukaemias have significantly more mature immunogenotype compared to others the key question—in our opinion—is whether Ig/TCR rearrangement precedes TEL/AML1 fusion or vice versa. There are three conceivable scenarios: (1) TEL fuses to AML1 before the initiation of Ig/TCR rearrangements; (2) TEL fuses to AML1 after the Ig/TCR rearrangements are completed; (3) TEL fuses to AML1 during the Ig/TCR rearrangement process. Let us analyse the three possible situations in the light of the presented data and also with respect to other recently published studies briefly summarised below.

TEL/AML1 fusion often arises pre-natally—the patient-specific intronic fusion of the two genes can be “backtracked” to the patient’s newborn DNA material [4]. However, the fusion itself does not necessarily lead to leukaemia (approximately 1% of cord blood samples taken from healthy newborns harbour the TEL/AML1-positive cells [5] and our unpublished data). A subsequent, postnatal hit (silencing of the non-translocated TEL seems to be the most probable candidate [5,12,13]) is needed to trigger an overt leukaemia—it is usually diagnosed in the pre-school age but the pre-leukaemic phase can span more than 10 years [3]. The Ig/TCR gene rearrangements specific for the leukaemic clone can also be detected in the patient’s newborn DNA material in both TEL/AML1-positive and -negative cases [14]. Twins with concordant TEL/AML1-positive leukaemia shared an identical genomic TEL/AML1 fusion sequence as well as an identical Ig rearrangement, but another rearrangement of Ig gene was detected only in one twin [2]. Among TEL/AML1-positive relapses (recalculated from Refs. [12,15] and our presented data), 25/26 patients with relapsed TEL/AML1-positive leukaemia retained at least one dominant clonal immunoreceptor gene rearrangement between the diagnosis and relapse; in the last case the rearrangements dominant at relapse were present at original diagnosis at the level of 10^{-4} (~1 positive cell among 10.000 negative cells). In total, about 55% of rearrangements were maintained without change; all rearrangements were identical between diagnosis and relapse

in 11/26 patients. Even in cases with different TEL deletion at relapse compared to original diagnosis (such relapses are believed to originate from pre-leukaemic clone by an independent second hit (TEL deletion)) the Ig/TCR rearrangements are maintained [12,13]. Peham et al. [15] used minimal residual disease monitoring techniques and they found “exclusive” relapse rearrangements back at original diagnosis in all relapsed TEL/AML1-positive patients (albeit at different levels). The results suggest that some clonal proliferation occurs already during the pre-leukaemic phase and implies that the pre-leukaemic population is clonal with respect to the TEL/AML1 fusion but in terms of Ig/TCR rearrangements it is, in fact, a mixture of differently related subclones.

Possible scenarios of the TEL/AML1 and Ig/TCR rearrangements timing (schematically illustrated in Fig. 1):

4.1. TEL/AML1 precedes Ig/TCR rearrangement

In case TEL/AML1 fusion is the first event, the chimaeric product itself would then stimulate the formation of mature Ig/TCR rearrangements from the fully germline configuration. Several mechanisms could be envisaged including a cell cycle retardation in the TEL/AML1-positive cells [11]. However, there are facts questioning this scenario. As TEL/AML1 is a leukaemia-specific fusion gene we can assume proliferation of the positive cell before the Ig/TCR genes start to rearrange. If the Ig/TCR rearrangement process begins after the first cell division of the TEL/AML1-positive cell with Ig/TCR genes in germline configuration, we would find different TEL/AML1-positive subclones completely unrelated in terms of Ig/TCR. This would lead to a polyclonal pattern of rearrangements within the (prae-)leukaemic population. The unfortunate questions are:

- Why the second hit strikes the cells with the same rearrangement in case of concordant leukaemia in twins diagnosed at the age of 3 and 4 [2]?
- Why are the cells with a specific Ig/TCR rearrangement, which will be a clonal marker of fully leukaemic cells several years later, present in the newborn material already as a relatively large clone [14]?
- Why the subsequent hit turning the pre-leukaemic cell to the leukaemic one occurs in the precursor with the same Ig/TCR rearrangement even in the cases of “relapse” triggered by an independent TEL deletion [12,13]?

Taken together we presume this first scenario applies seldom—if ever—for TEL/AML1-positive leukaemias.

We also tried to confirm the theory of the cell cycle retardation in TEL/AML1-positive ALL suggested previously [11]. In case TEL/AML1 fusion leads to a retardation of a cell cycle one would expect a higher number of cells in the G0–G1 phase. However, the proportion of these cells was identical in both (TEL/AML1+ and –) groups. Thus, if the TEL/AML1 fusion causes a cell cycle retardation this effect might be noticeable only in pre-leukaemic cells, but it is definitely abolished in the leukaemic blasts. Moreover, to our knowl-

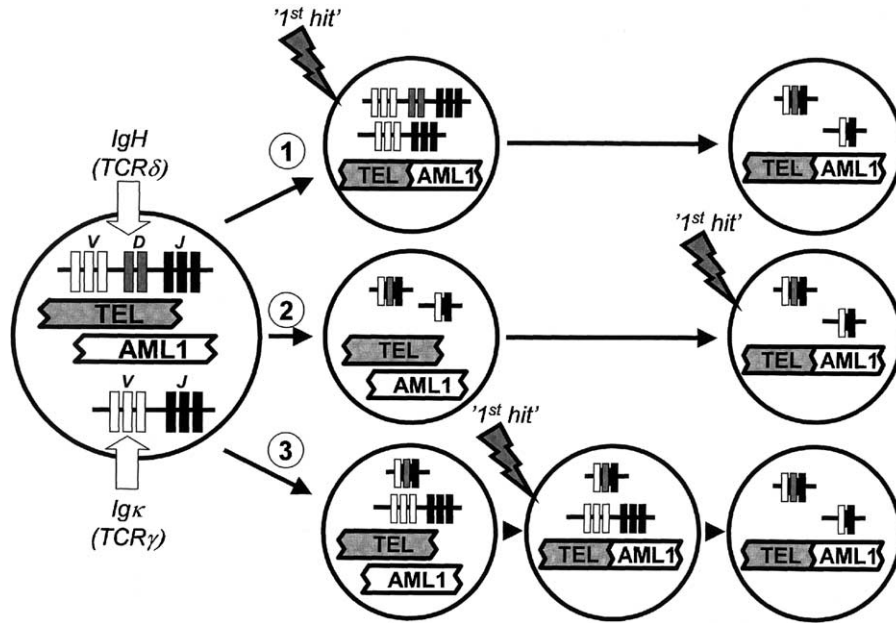


Fig. 1. The three possible scenarios of TEL/AML1 and Ig/TCR rearrangements relationship as described in the text. (1) TEL fuses to AML1 before the Ig/TCR rearrangements are initiated. TEL/AML1 stimulates/allows the Ig/TCR rearrangement machinery to finish all rearrangements. (2) TEL fuses to AML1 after the Ig/TCR rearrangements are finished (=TEL/AML1 fusion is originated in a relatively mature precursor). (3) TEL fuses to AML1 during the Ig/TCR rearrangement process; some Ig/TCR genes are already rearranged. TEL/AML1 then stimulates/allows the cell to finish the rest. More comments in the text. V, variable; D, diversity; J, joining regions of immunoreceptor genes.

edge, the assumption of the TEL/AML1 blocking the G1 to S progression is not supported by direct experimental data.

4.2. Ig/TCR rearrangement precedes TEL/AML1

This scenario presumes TEL/AML1 fusion occurs when the Ig/TCR genes are already rearranged. If the Ig/TCR rearrangement process were already definitively finished at the time of TEL/AML1 fusion, then all TEL/AML1-positive cells would keep the same Ig/TCR pattern. It is not the case for the majority of patients as demonstrated by the differences between the diagnostic and relapse samples and by the oligoclonality in about 20% of diagnostic samples [11]. Also the spectrum of the rearrangements in the TEL/AML1-positive patients showing some non-physiological features [11] suggests that at least some Ig/TCR rearrangements may be completed or changed after the malignant turn of the cell. However, in cases of TEL/AML1-positive ALL with fully identical Ig/TCR pattern at all examined time points this scenario cannot be ruled out. The “mature” origin of the progenitor originally affected by the TEL/AML1 fusion might also contribute to the superior treatment results of this subgroup of childhood ALL.

4.3. TEL/AML1 arises during the Ig/TCR rearrangement

When TEL/AML1 fusion is formed some Ig/TCR rearrangements are already made and others are yet to be finished. Generally, we have three time points where analysis

of TEL/AML1 and Ig/TCR can be done—birth (indirectly in twin studies or directly using backtracking on Guthrie cards), diagnosis and relapse—and at least two of them can be compared in more than 30 cases described to date. All but one of these cases have at least one dominant Ig/TCR rearrangement maintained but many rearrangements are changed during the evolution process. This makes this scenario the most plausible from our point of view. It is probably impossible to prove whether the more mature pattern of Ig/TCR rearrangements in TEL/AML1-positive ALL is rather due to more mature progenitor originally affected by the fusion (with most of the rearrangements already finished) or whether it is a function of the TEL/AML1 protein that, somehow, stimulates the activity of the rearrangement machinery. We believe that combination of both might be responsible for the resultant picture. Only fragments of data are available at the moment to support any of the hypotheses. From the raw data obtained by expression profiling of childhood ALL [16] (<http://www.stjuderresearch.org/data/ALL1>), we recalculated that the expression of the RAG1 gene is significantly higher in the TEL/AML1-positive ALL compared to other subtypes; in the analysis based on 79 TEL/AML1-positive and 205 TEL/AML1-negative B-cell precursor childhood ALL cases the difference reached statistically extremely significant value ($p < 0.0001$). Also the expression of RAG2 is increased in TEL/AML1-positive cases but not to such extent ($p = 0.0024$ and $p = 0.24$, according to probe set used). This supports the theory that the fusion gene has some secondary impact on the Ig/TCR rearrangements. Despite the fact that

the process is certainly more complex, we might speculate that as there is no difference in the frequency of IgH and TCR δ rearrangements between the TEL/AML1-positive and -negative cases, the fusion of TEL and AML1 genes takes place in the B-cell precursor that already finished the rearrangement process of these genes. Increased RAG activity in the TEL/AML1-positive cases could then stimulate rearrangements of Ig κ and TCR γ . This would fit with the data we present here and with the third scenario proposed in the discussion.

In our study, we provide results of two different analyses concerning immunoreceptor gene rearrangements in the large group of TEL/AML1-positive childhood ALLs. We show that TEL/AML1-positive leukaemias have more mature pattern of immunoreceptor gene rearrangements compared to the negative cases. Our results as well as other recent data allow us to analyse detailed scenarios on the timing of the origin of TEL/AML1 fusion with respect to the Ig/TCR rearrangements. The third scenario proposed in this study fits best with the data from the analysis of the Ig/TCR rearrangements in twins, in the Guthrie cards and in the TEL/AML1-positive ALL at diagnosis and relapse. We believe this scenario is applicable to the majority of TEL/AML1-positive cases. However, we feel that much additional work must be done before this “which comes first” problem is definitively solved.

Acknowledgements

Collaboration of all Czech Paediatric Haematology (CPH) centres (leaders: B. Blazek (Ostrava), Z. Cerna (Plzen), Y. Jabali (Ceske Budejovice), V. Mihal (Olomouc), D. Prochazkova (Usti nad Labem), J. Stary (Praha), J. Sterba (Brno), K. Tousovska (Hradec Kralove)) is highly appreciated. The work was supported by grants 62/2004 (GAUK), 301/P041 (GACR), 7430 (IGA MZ) and Programs #111300003 and #0021620813 from the Czech Ministry of Education.

Contributions. Jan Zuna contributed to conception and design (1), analysis and interpretation of data (2), drafting the article (3), final approval of article (5). Ondrej Krejci contributed to conception and design (1), analysis and interpretation of data (2), final approval of article (5). Jozef Madzo contributed to technical support (9), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5). Eva Fronkova contributed to technical support (9), final approval of article (5). Lucie Sramkova contributed to provision of study materials (6), technical support (9), final approval of article (5). Ondrej Hrusak contributed to technical support (9), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5). Tomas Kalina contributed to technical support (9), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5). Martina Vaskova contributed to technical support (9), final approval of article (5). Jan Stary contributed

to provision of study materials (6), logistic support (9), final approval of article (5). Jan Trka contributed to conception and design (1), critical revision of the article for important intellectual content (4), final approval of article (5).

References

- [1] Zuna J, Hrušák O, Kalinova M, Muzikova K, Stary J, Trka J, Czech Paediatric Haematology Working Group. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? *Leukemia* 1999;13:22–4.
- [2] Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4584–8.
- [3] Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999;94:1057–62.
- [4] Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999;354:1499–503.
- [5] Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8242–7.
- [6] Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, D’aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements and TALI deletions as PCR targets: report of the biomed-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:110–8.
- [7] Szczepanski T, Willems MJ, van Wering ER, van Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJ. Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001;15:1415–23.
- [8] Van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T-cell receptor genes. Part I: basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991;198:1–91.
- [9] Krejci O, Prouzova Z, Horvath O, Trka J, Hrusak O. Cutting edge: TCR delta gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *J Immunol* 2003;171:524–7.
- [10] van der Burg M, Barendregt BH, Szczepanski T, van Wering ER, Langerak AW, van Dongen JJ. Immunoglobulin light chain gene rearrangements display hierarchy in absence of selection for functionality in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16:1448–53.
- [11] Hubner S, Cazzaniga G, Flohr T, van der Velden VH, Konrad M, Potschger U, et al. High incidence and unique features of anti-gene receptor gene rearrangements in TEL-AML1-positive leukemias. *Leukemia* 2004;18:84–91.
- [12] Ford AM, Fasching K, Panzer-Grumayer ER, Koenig M, Haas OA, Greaves MF. Origins of “late” relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood* 2001;98:558–64.
- [13] Zuna J, Ford A, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:5355–60.
- [14] Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Scott JS, Matherly LH, et al. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2992–6.

- [15] Peham M, Konrad M, Harbott J, Konig M, Haas OA, Panzer-Grumayer ER. Clonal variation of the immunogenotype in relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia indicates subclone formation during early stages of leukemia development. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:156–60.
- [16] Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133–43.