

Univerzita Karlova v Praze
Prírodovedecká fakulta



Génová terapia CML:
Experimentálne vakcíny proti *bcr-abl*-transformovaným bunkám

Vincent Lučanský

Dizertačná práca

Praha 2010

Prehlásenie

Táto práca vznikla na Ústave hematológie a krvnej transfúzie v Prahe, pod vedením pána profesora Vladimíra Vonku, DrSc.

Čestne prehlasujem, že som túto dizertačnú prácu napísal samostatne, iba s použitím uvedenej literatúry. Osoby, ktoré participovali na praktickej časti práce, boli menované v časti "Poďakovanie".

Táto práca, ani jej časť nebola doteraz nikdy predložená za účelom získania iného, ani rovnakého akademického titulu.

Pod'akovanie

Moje vd'ačnosť patrí nasledujúcim ľuďom: Dr. Šmahelovi za prípravu plazmidu pBSC/bcr-abl, Dr. Sobotkovej a Dr. Duškovej za prípravu a inokuláciu buniek 12B1 a B210 pri *in vivo* experimentoch, Dr. Němečkovej a Dr. Kutinovej sa spoluprácu pri experimentoch s dendritickými bunkami, rekombinantným vírusom vakcínie a CyaA toxínom, Dr. Gabrielovi za prípravu dendritických buniek, Mgr. Mocovej za prípravu rekombinantných vírusov vakcínie, Dr. Mackovej za prípravu rekombinantného CyaA toxínu, Ing. Suttarovi za prípravu konjugátu rCTB a CpG, Dr. Tachezy za zabezpečenie RT-PCR diagnostiky a všetkým ostatným kolegom a kolegyniam za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

Špeciálne by som chcel poďakovať môjmu vedúcemu dizertačnej práce, pánu profesorovi Vonkovi, za vedenie, ktoré nebolo založené na umelej autorite, ale na inšpirácii, rešpektovaní názoru a ponechaní priestoru pre realizáciu vlastných nápadov.

V neposlednom rade by som rád poďakoval svojim rodičom a rodine za starostlivosť a priateľke Jarmile za jej pomoc a za to, že mi po celý čas bola oporou.

Zoznam použitých skratiek

AAV - Adeno asociated virus
ABL - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AKT - v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ALL - Acute lymphoblastic leukemia
AMP - Adenosine mono phosphate
APC - Antigen presenting cells
ARG - Abl-related gene
Au-A - Aurora - A (kinase)
Bcl-2 - B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-xL - BCL2-like 1
BCR - Breakpoint cluster region
BFM - bróm-fenolová modrá
Cat-G - Cathepsin - G
cdc24 - Guanine nucleotide exchange factor
CML - Chronic myeloid leukemia
CML28 - Chronic myeloid leukemia 28 (antigen)
CML66 - Chronic myeloid leukemia 66 (antigen)
CMV - Cytomegalovirus
CNL - Chronic neutrophilic leukemia
CP - Coat protein
crk - Chicken tumor virus no. 10 regulator of kinase
CRKL - Crk-like
c-Myc - v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
Dbl - Dbl homology
DC - Dendritic cell
DLT - Donor lymphocyte transfusion
Fak - Focal adhesion kinase
FCS - Fetal calf serum
G250 - Carbonic anhydrase IX
GAP - GTPase-activating protein
GFP - Green fluorescent protein
GRB2 - Growth factor receptor bound 2

HAGE - Helicase antigen
HEK 293 - Human embyronic kidney cells 293
HNE - Human neutrophil elastase
HSP70 - Heat shock protein 70
hTERT - Human telomerase reverse transcriptase
IFA - Incomplete Freund's adjuvant
IRIS - International randomized study of interferon vs STI571
Jak - Janus family kinases
JUN - v- JUN avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
Kit - v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
L2CP - L2 epitope + Coat protein
LB - Luria-Bertani (medium)
MAPP11 - Mitosis-associated phosphoprotein 11
NM23-H2 - Nonmetastasis protein 23
Pag - Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains
PBS - Phosphate buffered saline
PCR - Polymerase chain reaction
PDGF-R - Platelet-derived growth factor receptor
PI-3K - Phosphatidylinositol 3-kinase
PRAME - Preferentially expressed antigen in melanoma
PVDF - Polyvinylidene fluoride
PVP - Polyvinylpyrrolidone
RAC - Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
rac-GAP - rac-GTP-ase activating protein
Raf - v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
rAMP - rezistencia na ampicilín
Ras - Rat sarcoma
rCTB - Recombinant cholera toxin B
RHAMM - Receptor of hyaluronic acid-mediated cell motility
Rho - Rhodopsin
RPM - Rounds per minute
RPMI - Roswell Park Memorial Institute (medium)
RT-PCR - Rreverse transcription-polymerase chain reaction
SDS - Sodium dodecyl sulphate

SHC - SHC adaptor protein

SOC - Super optimal broth with catabolite repression (medium)

STAT - signal transducer and transcription activator

TAA - Tumor associated antigens

TAM - Tumor associated macrophages

TGM - Trypsin-base glycine methanol

T_{reg} - T regulačné lymfocyty

VLP - Virus-like particles

WT-1 - Wilms' tumor

Obsah

1. Úvod	11
1.1 Chronická myeloidná leukémia (CML)	11
1.1.1. Stručná definícia CML	11
1.1.2. Pohľad na históriu leukémie	11
1.1.3. Epidemiológia, diagnostika a klinický priebeh CML	12
1.1.4. Cytológia a molekulárna biológia CML	13
1.2. Súčasná možnosti liečby CML	20
1.2.1. Klasická chemoterapia	20
1.2.2. Interferón- α	21
1.2.3. Alogénna transplantácia	21
1.2.4. Inhibítory tyrozín kinázy	22
1.3. Experimentálne prístupy k liečbe CML	25
1.3.1. Génová terapia a imunoterapia všeobecne	25
1.3.2. Imunoterapia a chronická myeloidná leukémia	26
1.3.3. Stručný prehľad doterajších experimentálnych prístupov k liečbe CML	28
1.3.4. DNA imunizácia proti <i>bcr-abl</i> -pozitívnym bunkám	28
2. Metódy a materiál	30
2.1. Model	30
2.2. Bunky	31
2.2.1. B210, 12B1 a 12B1/5	31
2.2.2. HL60	32
2.2.3. 293T	32
2.2.4. Bakteriálne bunky <i>E. coli</i> - XL1-blue	32
2.3. Plazmidy	34
2.3.1. Popis použitých plazmidov	34

2.3.1.1. Použitý vektor	34
2.3.1.2. Plazmid kódujúci celý proteín BCR-ABL	34
2.3.1.3. Plazmidy kódujúce 25 aminokyselinovú sekvenciu spoja BCR-ABL	34
2.3.1.4. Plazmidy kódujúce jednotlivé fragmenty BCR-ABL	35
2.3.1.5. Zmesi plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty BCR-ABL.....	36
2.3.1.6. "GFP" plazmid	37
2.3.2. Produkcia plazmidov	37
2.3.2.1. PCR – optimalizácia, produkcia, primery	38
2.3.2.2. Štiepenie, elektroforéza a izolácia z gélu	41
2.3.2.3. Klonovanie – ligácia	41
2.3.2.4. Transformácia XL1-blue	41
2.3.2.5. Izolácia miniprepov	42
2.3.2.6. Restrikčná analýza	42
2.3.2.7. Sekvenácia	42
2.3.2.8. Izolácia DNA maxiprepom	42
2.3.2.9. Transfekcia 293T Ca-P precipitáciou	43
2.3.2.10. Western blot	43
2.4. Stručný popis vakcín a adjuvans použitých pri kombinovaných pokusoch	47
2.4.1. Adjuvans použité pri intramuskulárnej imunizácii	47
2.4.1.1. CpG	47
2.4.1.2. Konjugát rCTB a CpG	47
2.4.1.3. IFA	48
2.4.2. Pulzované dendritické bunky	48
2.4.3. Rekombinantný vírus vakcínie	48
2.4.4. CyaA toxín	49
2.5. Imunizácia	50
2.5.1. Imunizácia pomocou prístroja "gene-gun"	50
2.5.1.1. Príprava nábojov	50
2.5.1.2. Aplikácia DNA s použitím prístroja "gene-gun"	51
2.5.2. Podanie vakcín injekčne	51

2.6. Meranie nádorov a vyhodnocovanie výsledkov	52
2.7. RT-PCR	53
2.7.1. Izolácia a spracovanie vzoriek	53
2.7.2. Izolácia RNA	53
2.7.3. Reverzná transkripcia	53
2.7.4. Amplifikácia cDNA	53
2.8. Použitý software	55
2.8.1. Predikcia epitopov	55
2.8.2. Analýza sekvencií	55
2.8.3. Konštrukcia plazmidových máp	55
2.8.4. Tvorba grafov a štatistické analýzy	55
3. Výsledky	56
3.1. Výsledky imunizácie plazmidom kódujúcim celý proteín BCR-ABL	56
3.2. Výsledky imunizácie plazmidmi kódujúcimi 25 aminokyselinovú sekvenciu fúznej oblasti BCR-ABL	58
3.3. Výsledky imunizácie kombináciami rozličných vakcín kódujúcich 25 aminokyselinovú sekvenciu fúznej oblasti BCR-ABL	61
3.4. Výsledky imunizácie nonapeptidom odvodeným od spoja BCR-ABL	64
3.5. Výsledky imunizácie plazmidmi kódujúcimi jednotlivé fragmenty BCR-ABL	65
3.6. Výsledky imunizácie zmesami fragmentov pokrývajúcich celú sekvenciu bcr-abl	66
3.7. Výsledky RT-PCR	68
4. Diskusia	69
4.1. Hodnotenie získaných výsledkov	70
4.1.1 Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidom kódujúcim celý proteín BCR-ABL	70
4.1.2 Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidmi kódujúcimi spojovú oblasť BCR-ABL ..	70
4.1.3 Hodnotenie výsledkov imunizácie rozličnými kombináciami vakcín kódujúcich spojovú oblasť BCR-ABL	70
4.1.4 Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidmi kódujúcimi jednotlivé fragmenty	

BCR-ABL	71
4.1.5 Hodnotenie výsledkov imunizácie zmesami plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty BCR-ABL	71
4.2. Analýza najzásadnejších problémov	73
4.2.1 Problém heterogenity sekvencií myších a ľudských proteínov BCR a ABL	73
4.2.2 Problém variabilných výsledkov po jednotlivých imunizáciach	74
4.2.3 Problém s hmotnostnými pomermi proteínov produkovaných jedným μg plazmidu	75
4.2.4 Problém s overením množstva DNA v náboji	76
5. Záver	77
6. Zoznam použitej literatúry	78
7. Prílohy	92

1. Úvod

1.1 *Chronická myeloidná leukémia (CML)*

1.1.1. Stručná definícia CML

Chronická myeloidná leukémia (CML) je maligná choroba, vyvolaná myeloproliferačnou klonálnou expanziou hematopoietickej kmeňovej bunky (1, 2). Má priamu kauzálnu súvislosť so vznikom takzvaného Philadelského chromozómu a následnou produkciou jeho špecifického chimérneho produktu, proteínu BCR-ABL(2).

BCR-ABL zasahuje niekoľko signálnych dráh a jeho transformačný potenciál je dostatočný na malignú transformáciu kmeňovej bunky bez nutnosti kooperácie s ďalším onkogénom. Napriek tomu, nastávajú v akcelerovanej fáze choroby aj ďalšie genetické zmeny (3).

Bunka transformovaná fúznym génom *bcr-abl* sa vyznačuje zvýšenou proliferáciou a viabilitou, zníženou diferenciáciou a adhezivitou, nezávislosťou na niektorých rastových faktoroch, rezistenciou voči apoptóze a poruchami DNA-reparačných mechanizmov (3, 4).

1.1.2. Pohľad na históriu leukémie

Keďže je leukémia chorobou krvných buniek, netvoriacich žiadny solídny orgán, bolo jej objavenie a definovanie viazané na vynájdenie a vývoj mikroskopickej techniky. S objavom leukémie sú najčastejšie spájané tri mená: Donné, Bennett a Virchow.

Donné ako prvý pozoroval a popísal príznaky leukémie v roku 1844, nepublikoval ich však až do roku 1855.

Prvá publikácia, ktorá definovala leukémiu ako samostatnú klinickú entitu, bola z roku 1845. Jej autorom bol Bennett.

O šesť týždňov neskôr vyšla Virchowova práca s názvom *Weisses Blut*. V nej popisovaná choroba nápadne pripomínala pozorovania Bennetta. Práve Virchow zaviedol pojem leukémia, čo znamená biela krv.

Ďalším medzníkom bol objav spojitosti medzi ochorením a zmenami v kostnej dreni. Tento jav popísal a interpretoval Neuman v roku 1868, v roku 1872 definoval leukémiu ako chorobu kostnej drene.

V roku 1880 Ehrlich rozdelil leukémiu na základe farbenia anilínovými farbivami na dva druhy: myeloidnú a lymfoidnú. V roku 1887 redefinoval leukémiu ako primárnu chorobu hematopoetického systému. (5)

1.1.3. Epidemiológia, diagnostika a klinický priebeh CML

Incidencia CML je 1-2 prípady na 100 000 obyvateľov za rok. CML reflektuje okolo 15% všetkých leukémií dospelých. Priemerný vek pacientov je 45-55 rokov (1), približne štvrtina pacientov je staršia ako 60 rokov (2). U detí sa CML vyskytuje podstatne vzácnejšie - cca 1 prípad na 1 000 000 obyvateľov, čo tvorí 2 - 3 % všetkých leukémií diagnostikovaných u detí (6).

CML sa vyskytuje o niečo častejšie u mužov ako u žien (50,6% vs. 49,4%) (7, 8).

Nič nenasvedčuje tomu, že by genetické predispozície mali vplyv na rozvoj CML, aj keď niektoré HLA sú spojené s nižším, či vyšším rizikom vzniku ochorenia (9). Jediným známym rizikovým faktorom je ionizačné žiarenie. Toto tvrdenie je podložené analýzou dát pacientov liečených rádioterapiou a ľudí preživších atómovú katastrofu v Hirošime (3). Zvýšená incidencia CML je aj medzi obeťami nešťastia v Černobyli.

Prvý zachovaný záznam diagnostikovania leukémie u žijúceho pacienta s použitím mikroskopickej techniky je z roku 1846. Fuller vtedy opakovane vyšetril krv svojho pacienta (5). Aj v súčasnosti je väčšina pacientov diagnostikovaných pomocou rutinných krvných testov. 40% novo diagnostikovaných pacientov vyhľadá lekára z úplne inej príčiny, a až pri rutinnom vyšetrení krvného obrazu dochádza k stanoveniu abnormálne vysokého počtu bielych krviniek a následnej diagnóze (10).

Klinické symptómy sú väčšinou nešpecifické – jedná sa o únavu, asténiu, úbytok hmotnosti, pocit „plného brucha“, presýtenosti, bolesti v ľavom hornom kvadrante, nočné potenie, subfebria, krvácavosť, bolesť kostí. Vzácnejšie aj bolesti hlavy, poškodenie sluchu, či zraku, nauzea, anorexia, priapizmus. Pre krvný obraz je typická leukocytóza (viac ako $25 \times 10^9/l$), erytrocytóza, anémia, trombocytóza, bazofília. Ďalej boli pozorované splenomegália, infiltrácia krvných buniek do pečene a hypercelularita kostnej drene (1, 2, 6, 10).

Je pochopiteľné, že presná diagnóza, len na základe krvného obrazu a nešpecifických klinických prejavov, nie je možná. V súčasnej dobe sa preto využíva niekoľko rozličných metodík, ktoré sú principiálne založené buď na dôkaze Philadelského chromozómu, alebo na detekcii fúzneho génu, respektíve jeho transkriptu, alebo produktu. Konkrétne ide o rozličné

cytogenetické metódy, rôzne blotovacie techniky, fluorescenčnú *in situ* hybridizáciu (FISH) a metódy založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR). Medzi najčastejšie používané patrí RT-PCR a FISH. Pri sledovaní vývoja ochorenia býva často využitá kvantitatívna real-time PCR, prípadne detekcia dĺžky telomér (10, 11, 12, 13, 14).

Priebeh CML sa dá rozdeliť do troch relatívne dobre charakterizovateľných fáz: chronická fáza, fáza akcelerácie a blastická kríza (10). 20 - 25% pacientov prechádza z chronickej fázy priamo do blastической krízy. Väčšina chorých (90%) je zachytená chronickej fáze (15).

Počas chronickej fázy je v krvnom obraze pozorovateľné celé spektrum myeloidných buniek v rozličnom stupni maturácie, od blastov (menej ako 5%), až po plne diferencované neutrofile. Výrazná bazofília je pre CML typická, eosinofília je tiež bežná. Kostná dreň vykazuje známky hypercelularity s myeloidnou hyperpláziou (2).

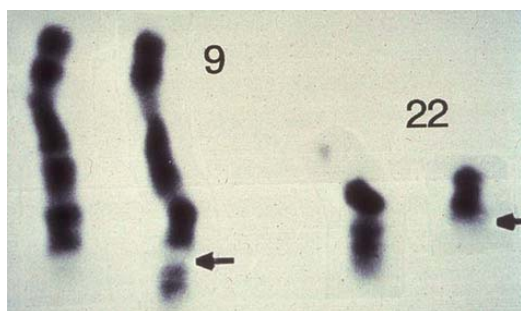
Neliečená CML v chronickej fáze prechádza spravidla po 3-5 rokoch do akcelerovanej fázy (16), ktorá je charakteristická postupne sa zvyšujúcou prevalenciou nematurovaných myelocytov. Patologické zmeny v kostnej dreni sa morfológicky prejavujú vo forme fibrózy a dysplázie (2). Fáza akcelerácie zvyčajne trvá 4 až 6 mesiacov (17).

Tretím, terminálnym štádiom je blastická kríza, zväčša trvajúca iba niekoľko málo mesiacov. Charakteristickým je extrémne rýchly nárast populácie blastov (17). Približne 50% pacientov má prevahu myeloidných blastov, 25% lymfoidných, ďalších 25% má blasty nediferencované. V drvivej väčšine prípadov je prítomných niekoľko rozličných línií (3).

Fáza akcelerácia a blastická kríza sú spojené s postupnou kumuláciou sekundárnych zmien, či už na úrovni génovej, alebo chromozomálnej. Medzi najčastejšie patria rozličné zmeny zahŕňajúce preskupenia, delécie, alebo bodové mutácie v génoch pre p53, Ras, Rb. Na chromozomálnej úrovni najčastejšie dochádza k duplikácii Ph chromozómu, trizómii chromozómu 8, vzniku izochromozómu 17, menej časté, ale možné sú trizómie 17, 19 a 21 chromozómu, delécie chromozómov 7 a 17 (18, 19, 20, 21).

1.1.4. Cytológia a molekulárna biológia CML

CML bola prvá malignita, ktorej špecifický marker, Philadelfský chromozóm (Ph⁺) bol priamo spojený s patogenézou (22, 23). Ide o skrátenej chromozóm 22, ktorý vzniká recipročnou translokáciou medzi dlhými ramienkami chromozómov 9 a 22: t(9;22)-(q34;q11) (24) a je detegovateľný u 95% pacientov (1). (Obrázok 1.1)



Obr. 1.1. Karyotyp pacienta s CML - metafázické chromozómy 9 a 22 farbené podľa Giemsa. Šípky ukazujú miesta translokácie. Úplne na pravo je takzvaný Philadelfský chromozóm. Prebrané z (25).

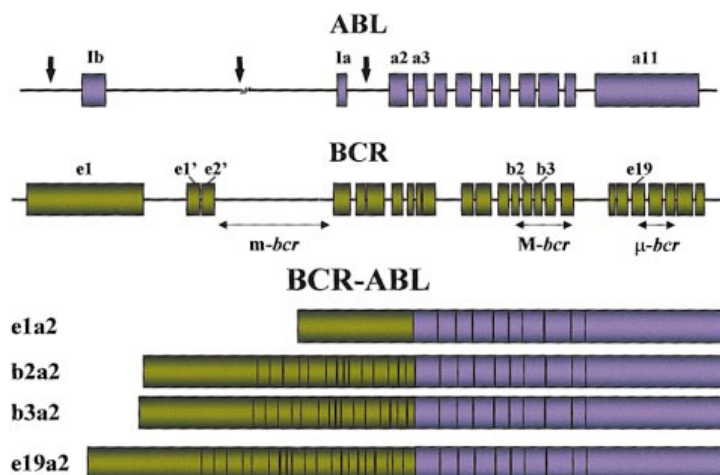
Pri vzniku Philadelfského chromozómu dochádza k pripojeniu časti génu *abl* z chromozómu 9 ku génu *bcr* na chromozóme 22, zároveň dochádza k recipročnej udalosti na chromozóme 9 a vzniku fúzie *abl-bcr* (4).

Zlom na géne *Abl* sa môže objaviť v relatívne veľkej oblasti (viac ako 300 kb) na 5' konci. Môže byť lokalizovaný ešte pred alternatívnym exónom Ib, aj za alternatívnym exónom Ia, najčastejšie je však medzi nimi. Bez ohľadu na to však dochádza k zostrihu primárneho transkriptu tak, že sekvencia pre *bcr* sa pripája k exónu a2.

Existuje niekoľko alternatívnych zón na géne *bcr*, v ktorých môže dôjsť k zlomu: M (major) zóna, m (minor) zóna, a μ (mikro) zóna. Najčastejšie sa *bcr* láme v M- zóne. Ide o úsek dlhý 5,8 kbp, kódujúci 5 exónov (e12-e16 = b1-b5). Podľa lokalizácie zlomu sa k a2 exónu *abl* pridá úsek génu *bcr* končiaci exónom b2, alebo b3. V prvom prípade sa spojenie označuje b2a2 (e13a2) a mRNA je prepisovaná iba v jednej forme (b2a2). Iná situácia nastáva v prípade spojenia exónov b3a2 (e14a2), ktoré je najčastejšie, kde vďaka alternatívnemu zostrihu vznikajú ako transkript b3a2, tak aj transkript b2a2 (26). U niektorých pacientov sa môžu obidva typy transkriptov vyskytovať paralelne, boli popísané aj prípady konverzie z jedného typu na druhý (27). Výsledný produkt má v oboch prípadoch molekulovú hmotnosť 210 kDa.

V prípade, že nastane zlom v m-zóne *bcr*, posunutej viac k 5' koncu génu, dochádza k spojeniu e1a2. Molekulová hmotnosť vznikajúceho proteínu je v tomto prípade 190 kDa. Táto chiméra je často asociovaná s akútnou lymfoblastickou leukémiou (ALL), u pacientov s CML je vzácna.

Ešte vzácnejší je zlom v μ -zóne. Tu dochádza k pripojeniu exónu c3 (e19) *bcr* na a2 *abl*, vzniká tak spojenie c3a2 (e19a2). Produkt má molekulovú hmotnosť 230 kDa. Táto fúzia je spájaná s chronickou neutrofilnou leukémiou (26).



Obr. 1.2. Lokalizácia jednotlivých zlomov na génoch *abl* a *bcr* a štruktúra chimérnych mRNA.
Prebrané z (26).

U pacientov boli vzácne popísané aj ďalšie alternatívy fúzie, s rozličnou prevalenciou viazané buď na CML, alebo ALL: c2 a2'', b2'-a2, b3a3, b2a3, b1a2, e8a2, e6a2, e8-abl intrón 1b-a2, e2- abl intrón 1b-a2, e2a2,e2'-1A, e1a3. (28)

Produkt fúzneho génu - fúzny proteín BCR-ABL zasahuje do množstva signálnych dráh - zvyšuje životaschopnosť, blokuje apoptózu, ovplyvňuje zloženie cytoskeletu, navodzuje nestabilitu genómu (3). Táto polyfunkčnosť je umožnená prítomnosťou viacerých funkčných domén. Pre úplne pochopenie molekulárneho mechanizmu transformácie je nutné poznať jednotlivé funkčné domény, ich vzájomnú interakciu, ako aj ich pôvodnú funkciu a reguláciu v normálnych celulárnych proteínoch c-BCR a c-ABL.

Ľudský c-ABL má molekulovú hmotnosť 145 kDa. Je lokalizovaný predovšetkým v jadre, ale aj v cytoplazme, kde je viazaný na F-aktín (29). Bola pozorovaná zmena lokalizácie v závislosti od okolností (4). Je exprimovaný v celom organizme, najviac však v slezine, týmuse a semenníkoch (30). Vyskytuje sa v dvoch formách, ktoré vznikajú alternatívnym zostrihom prvého exónu. Forma kódovaná mRNA obsahujúcou exón 1b je o 18 aminokyselín dlhšia ako forma kódovaná mRNA obsahujúcou exón 1a, navyše je myristilovaná (4, 26). Tieto odlišnosti rozhodujú o lokalizácii proteínu (31), na funkčnosť jednotlivých foriem však pravdepodobne nemajú zásadný vplyv (4). Funkčne patrí c-ABL medzi nereceptorové tyrozín kinázy s nízkou enzymatickou aktivitou (1). Jeho tyrozín kinázovú aktivitu sprostredkúva SH1 doména (Src holomogy 1). Domény SH3 a SH2 sa podieľajú na regulácii SH1. Všetky

tri sú lokalizované na N-konci proteínu (3, 32). Približne v strede sa nachádza na prolín bohatá oblasť, viažuca CRK a CRKL (8). Na C-konci je jadrový lokalizačný signál (nuclear localization signal, NLS) a niekoľko DNA-viažúcich domén (DNA binding domain, DNA-BD) a aktín-viažúcich domén (Actin binding domain, A-BD) (29).

In vitro štúdie naznačujú, že za fyziologických podmienok c-ABL participuje na regulácii najmenej dvoch mechanizmov. Ide o obranný mechanizmus proti poškodeniu DNA a o participáciu na signálnych dráhach súvisiacich s adhéznymi molekulami. Myši s vyradeným génom („knock-out“) pre ABL vykazujú vysokú postnatálnu mortalitu, poškodenie imunitného systému, následnú zvýšenú vnímavosť k infekcii (4), ale aj porušenú spermatogézu (29) a narušenie funkcie osteoblastov (32).

Bunkový proteín c-BCR má molekulovú hmotnosť 160 kDa a je lokalizovaný v cytoplazme (4). O jeho funkcii je relatívne málo informácií (29). N-koniec proteínu BCR tvorí oligomerizačná doména (OD), umožňujúca homotetramerizáciu. Po nej nasleduje oblasť, na ktorej je kolokalizovaná serín/threonín kinázová aktivita a SH2-viažúca doména. Centrálna oblasť nesie sekvencie s homológiou pre Dbp, Rho, cdc24. Na C-konci je umiestnená rac-GAP doména, ktorá však vo fúznych proteínoch veľkých 190 a 210 kDa chýba a je prítomná iba v prípade 230 kDa veľkého proteínu, spôsobujúceho chronickú neutrofilnú leukémiu (CNL) (3, 8, 29, 32).

Myši s vyradeným *bcr* génom majú poškodené neutrofile a vykazujú zvýšenú náchylnosť k septickému šoku (31).

Z predchádzajúcich odsekov je zjavné, že fúzny proteín BCR-ABL (p210) nesie niekoľko domén z rozličnými funkciami, ktorých vzájomná interakcia zodpovedá za jeho onkogénne vlastnosti (3, 33, 34). Pre onkogénny potenciál BCR-ABL je najdôležitejšia a nevyhnutná tyrozín-kinázová aktivita SH1 domény (35), ktorá je podstatne vyššia ako aktivita c-ABL (36). Toto zvýšenie TK-aktivity umožňuje oligomerizačná doména z N-konca BCR tým, že tvorbou homotetraméru priblíži jednotlivé SH1 domény k sebe, čo umožní ich vzájomnú konštitutívnu aktiváciu (3). Delečná analýza ukázala, že táto funkcia OD je pre navodenie myeloproliferačného ochorenia nevyhnutná (24). Proteín BCR-ABL s nefunkčnou OD doménou je schopný navodiť iba proliferáciu T-buniek, navyše po dlhej latencii (37). OD doména moduluje aj interakciu BCR-ABL a aktínu (38).

Ďalším dôležitým štruktúrnym motívom je oblasť viažúca SH2 doménu proteínu GRB2, ktorý aktivuje Ras dráhu (3, 35). Pre funkciu SH2-viažúcej domény sa zdá byť zásadný tyrozín na pozícii 177. Hoci jeho mutačná zámena neznamená úplné zrušenie onkogénnych

vlastností, dochádza však k výraznému zmierneniu prejavov experimentálne indukovaného ochorenia u myši (39).

Dbí homológna oblasť zdieľa sekvencie s GAP doménou onkoproteínu DBL a prostredníctvom interakcie s proteínmi rodiny Rho by sa mohla podieľať na regulácii prestavby cytoskeletu (40). Na druhej strane, tento región chýba v sekvencii proteínu p190, ktorý má vyšší transformačný potenciál, čo by mohlo naznačovať jeho úlohu v negatívnej regulácii (4).

Sekvencie odvodené od Abl začínajú vo fúznom proteíne SH3 doménou (37), ktorá pravdepodobne zohráva úlohu negatívneho regulátora tyrozín-kinázovej aktivity SH1 domény (41). Jedným z potenciálnych mechanizmov môže byť interakcia s proteínom Pag. Tento proteín, patriaci do rodiny proteínov regulujúcich oxidatívny stres, inhibuje fosforyláciu nadprodukovaného c-ABL (42). O úlohe pri negatívnej regulácii aktivity SH1 domény svedčí aj výsledok delečného experimentu, pri ktorom bol obnovený transformačný potenciál BCR-ABL inhibovaného deléciou OD domény tým, že bola dodatočne deletovaná aj SH3 doména (35).

Doména SH2 nie je nevyhnutná pre samotnú transformáciu, a však je potrebná pri navodení nezávislosti na rastových faktoroch (3). V rámci fúzneho proteínu BCR-ABL interaguje s SH2-viažúcou doménou z N-konca BCR (4).

Po SH3 a SH2 doméne nasleduje už spomínaná SH1 doména.

Za SH1 doménou sa nachádza oblasť schopná viazať adaptorové proteíny z rodiny Crk - Crk a CRKL (Crk-like). Ide o proteíny zapojené v relokizácii a aktivácii viacerých efektorových proteínov, ktorých biologická funkcia spočíva predovšetkým v modulácii adhézie a migrácie buniek (43).

Na C- konci fúzneho proteínu sa nachádzajú 3 jadrové lokalizačné signály (nuclear localization signal - NLS) a jeden jadrový exportný signál (nuclear export signal), ktoré u c-Abl determinujú jeho lokalizáciu vzhľadom na podmienky prostredia. Ďalej tam je DNA-viažúca doména (DNA binding domain) a aktín-viažúca doména (Actin binding domain) (8). Poškodenie aktín-viažúcej domény vedie k zníženiu transformačného potenciálu (4).

Proteín BCR-ABL viaže, alebo fosforyluje viac ako 20 rozličných proteínov (Tabuľka 1.1). Veľa z nich je súčasťou dráh prenášajúcich rozličné signály (44). Na rozličných úrovniach sú do nich zapojené proteíny ako Ras, Raf, RAC, PI-3K, AKT, JUN, STAT, c-Myc, Bcl-2 a pravdepodobne mnoho ďalších (35). Ide o dráhy a proteíny ovplyvňujúce adhéziu, proliferáciu, nezávislosť na rastových faktoroch, prežívanie a bunkový cyklus (18,

45). Je relatívne zložitú odhadnúť významnosť vplyvu aktivácie konkrétnej dráhy na konkrétny biologický efekt. Jedným z dôvodov môže byť relatívne vysoká redundancia jednotlivých zainteresovaných proteínov. Je teda nepravdepodobné, že by jedna konkrétna dráha zodpovedala sama o sebe za transformačný potenciál BCR-ABL (3, 26).

Tabuľka 1.1 (Zdroj: 44)	
Zoznam proteínov interagujúcich s BCR-ABL	
Názov proteínu	Jeho funkcia
Grb-2	adaptórový proteín
CRKL	adaptórový proteín
Shc	adaptórový proteín
Ras-GAP	proteín aktivujúci Ras GTP-ázu
mSOS	proteín uvoľňujúci guanín
p62-Dok	proteín asociovaný s Ras-GAP
p190	proteín asociovaný s Ras-GAP
Syp	proteín tyrozín fosfatáza
PLC- γ	fosfolipáza C- γ
PI -3K p85	regulačná podjednotka PI-3K
Vav	proteín obsahujúci SH2 a SH3, viazaný na hematopietické bunky
Fes	tyrozín kináza viazaná na hematopietické bunky
FAK	kináza fokálnej adhézie
STAT1/STAT5	prenášač signálu a aktivátor transkripcie
F-aktín	štruktúrny proteín
Paxillín	adhéznny proteín
Vinculín	adhéznny proteín
Talín	adhéznny proteín
Tensín	adhéznny proteín
Bcr	serín/threonín kináza a Rac-GTP-áza
Bap-1	proteín asociovaný s Bcr
Cbl	cytoplazmatický proteín
Abi-1/Abi-2	proteíny interagujúce s Abl

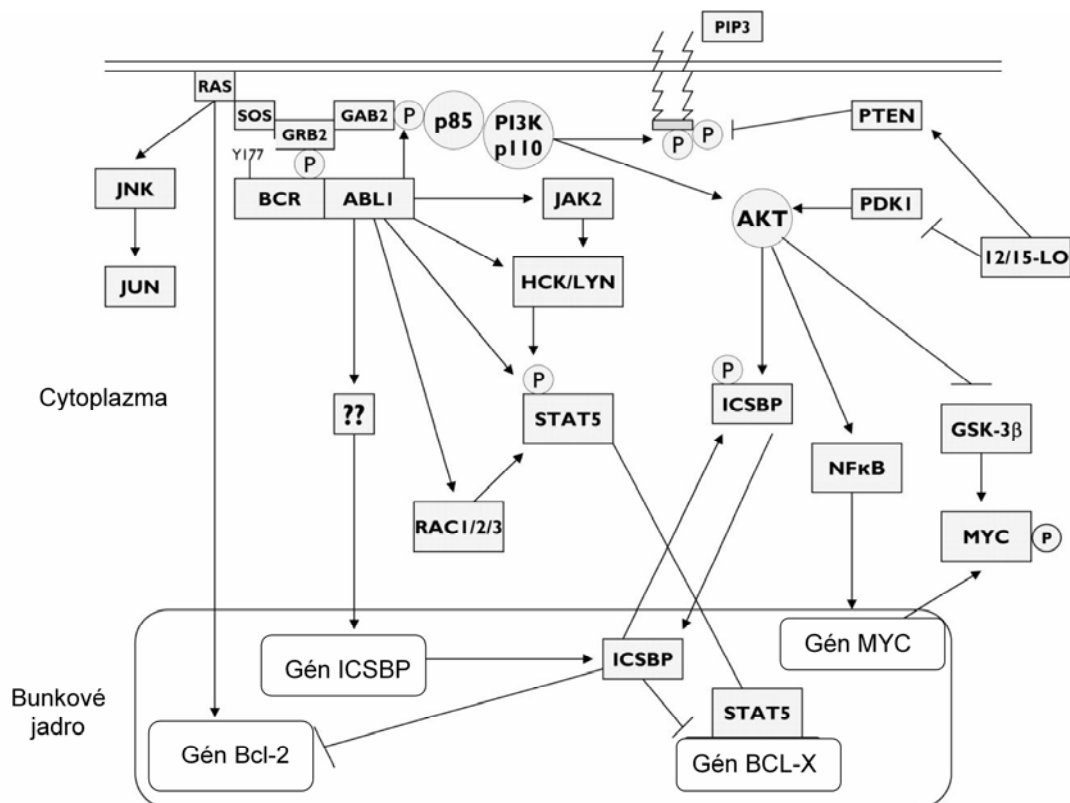
Aktivácia dráhy Ras je jednou z najdôležitejších funkcií BCR-ABL. Experimenty s mutačnou inhibíciou funkcie Ras ukázali, že je pre transformačnú a anti-apoptickú aktivitu BCR-ABL nevyhnutný. Do sprostredkovania aktivácie sú zapojené prinajmenšom 3 adaptorové proteíny - Grb-2, SHC, CRKL (44, 46, 47).

Dráha PI-3K sprostredkúva transformáciu myelocytov. Proteín BCR-ABL aktivuje PI-3K interakciou cez jej regulačnú podjednotku, proteín p85. Pri *in vitro* experimentoch s bunkami nesúcimi defektnú PI-3K bola inhibovaná transformačná aktivita BCR-ABL (48, 49).

STAT1 a STAT5 sú v primárnych bunkách CML, ako aj v mnohých BCR-ABL pozitívnych líniiach konštitutívne fosforylované. STAT5 navodzuje anti-apoptický stav transkripciou aktiváciou génu *Bcl-xL*. Okrem toho je indukovaná produkcia rozličných rastových faktorov a cytokínov, ale aj ich receptorov. BCR-ABL aktivuje STAT1 aj STAT5 priamo, teda nie je nutná predchádzajúca aktivácia Jak proteínov (26).

Zmenu adhezivity spôsobuje rozsiahla prestavba cytoskeletu. Aktínové vlákna totiž plnia nie len štruktúrnu funkciu, ale sú zainteresované aj pri prenose rozličných signálov. V *bcr-abl*-transformovaných bunkách je výrazne vyšší podiel F-aktínu ako v normálnych. V takto zmenených bunkách je pozorovaná kolokalizácia a následná fosforylácia rozličných adhézných proteínov a BCR-ABL. Ide napríklad o tensín, talín, paxilín, vinculin, FAK (3, 26, 38).

Nezávislosť na rastových faktoroch je sprostredkovaná schopnosťou BCR-ABL indukovať produkciu cytokínov ako sú IL-3, GM-CSF a G-CSF (35).



Obr. 1.3. Schéma molekulárnych dráh ovplyvnených chimérom proteínom BCR-ABL. Prebraté z (21).

1.2. *Súčasn*é možnosti liečby CML

Konvenčné možnosti liečby CML až do nedávnej minulosti zahŕňali niekoľko možností. Išlo o klasickú chemoterapiu, liečbu interferónom- α a transplantáciu kostnej drene (44, 50). V prvej dekáde 21. storočia však s objavom a zavedením špecifických inhibítorov tyrozín kinázy, predovšetkým imatinib mesylátu (STI 571, Gleevec) predchádzajúce liečebné prístupy ustúpili do úzadia (8). Každý zo spomenutých terapeutických prístupov má, alebo mal vzhľadom na dané okolnosti v určitej dobe, svoje výhody aj nevýhody. Pre pochopenie potreby vývoja novej liečby je dôležité poznať práve tieto vlastnosti a obmedzenia.

1.2.1. Klasická chemoterapia

Ako prvé liečivo použité pri pokuse liečiť chronickú myeloidnú leukémiu je uvádzaný oxid arzenu. Prvý krát bol použitý už v roku 1865 (5).

Až do začiatku 50-tych rokov 20. storočia bola CML liečená s využitím rozličných prostriedkov, ako napríklad rádioaktívny fosfor, urethan, trietyl melanín, kolcemid, ale aj ožarovanie, prípadne krvné transfúzie (51). Nič z toho však nezabezpečilo výraznejší terapeutický výsledok.

Prvý výrazný zlom v liečbe CML nastal po zavedení busulfanu. Oproti ostatným, v tej dobe používaným cytostatikám, predlžoval život pacientov (44, 51). Už prvá liečebná kúra zvyčajne viedla k zmierneniu symptómov. Závažne nežiaduce efekty neboli príliš časté, ale vyskytovali sa. Dôležitou vlastnosťou busulfanu bola možnosť opakovane podstupovať liečbu, avšak s pribúdajúcim počtom liečebných kúr sa skracovala doba remisie a zvyšovala pravdepodobnosť výskytu nežiadúcich efektov (51).

Približne po desiatich rokoch používania busulfanu sa začala v liečbe CML presadzovať hydroxyurea. V niekoľkých klinických štúdiách sa ukázal nie len jej rýchly účinok, ale predovšetkým u pacientov liečených pomocou hydroxyurey bola predĺžená priemerná doba prežívania z 45 mesiacov, na 58 mesiacov, čo bolo signifikantné zlepšenie. Navyše vedľajšie efekty hydroxyurey boli ešte o niečo menšie. Ďalším dôležitým zistením bol fakt, že hydroxyurea prináša terapeutické zlepšenie ako u nízko rizikových, tak aj u vysoko rizikových pacientov. Hydroxyurea sa tak stala liekom prvej voľby, busulfan sa začal používať iba u pacientov nereagujúcich na liečbu hydroxyureou (52, 53).

1.2.2. Interferón- α

V 80-tych rokoch sa začal pri liečbe CML využívať interferon- α (IFN- α) (50). Niekoľko klinických štúdií v rozličných krajinách Európy ukázalo výhody jeho využitia (44). Kompletná remisia je síce vzácna (54), na druhej strane však priemerná doba prežívania pacientov liečených IFN- α je v porovnaní s pacientmi liečenými konvenčnou chemoterapiou (busulfan, hydroxyurea) predĺžená z 52 na 72 mesiacov. Viac ako 6 rokov prežilo 50% pacientov liečených IFN- α a 29% pacientov liečených klasickou chemoterapiou. U 16% pacientov liečených IFN- α musela byť prerušená liečba kvôli vedľajším nežiadúcim účinkom. (55, 56, 57).

U 40-60% pacientov, ktorí dosiahli kompletnú cytogenetickú remisiu boli detegované špecifické T-lymfocyty proti proteináze 3, čo je proteín, ktorý je často nadprodukovaný v leukemických bunkách. U pacientov, ktorí nedosiahli kompletnú remisiu po liečbe IFN- α , ani u pacientov liečených chemoterapiou takéto T-lymfocyty neboli dokázané nikdy (58). Tieto výsledky naznačujú, že by pri navodení úplnej remisie mohla zohrávať úlohu aj stimulovaná imunitná odpoveď organizmu.

Veľkou nevýhodou sú relatívne vysoké náklady - sú približne 200 krát vyššie ako pri konvenčnej chemoterapii (56).

1.2.3. Alogénna transplantácia

Alogénna transplantácia kostnej drene stále zostáva jediným prístupom k liečbe CML, spojeným s možnosťou úplného vyliečenia (59, 60, 61). Bohužiaľ je táto liečba spojená s relatívne vysokou morbiditou a mortalitou (16), navyše je prístupná iba približne 40% pacientov (60). Limitujúcim faktorom je predovšetkým existencia vhodného darcu, ale aj jeho vek, zhoda pohlavia darcu a príjemcu, aj to, či ide o príbuzného, alebo nie. Ďalej pravdepodobnosť úspechu transplantácie ovplyvňuje vek pacienta, fáza a dĺžka jeho ochorenia a predchádzajúca liečba (50, 60, 62). Pravdepodobnosť úmrtia po transplantácii je medzi 20 - 40% (63). Príčinou smrti bývajú okrem rejekcie a reakcie štetu proti príjemcovi (GVHD - graft versus host disease) aj rozličné bakteriálne, hubové, alebo vírusové infekcie (60).

Za optimálneho darcu je považovaný HLA identický súrodenec (44). Hypotetickou výhodou nepríbuzného darcu môže byť silnejší efekt "štep vs. leukémia" (GvLE - graft versus

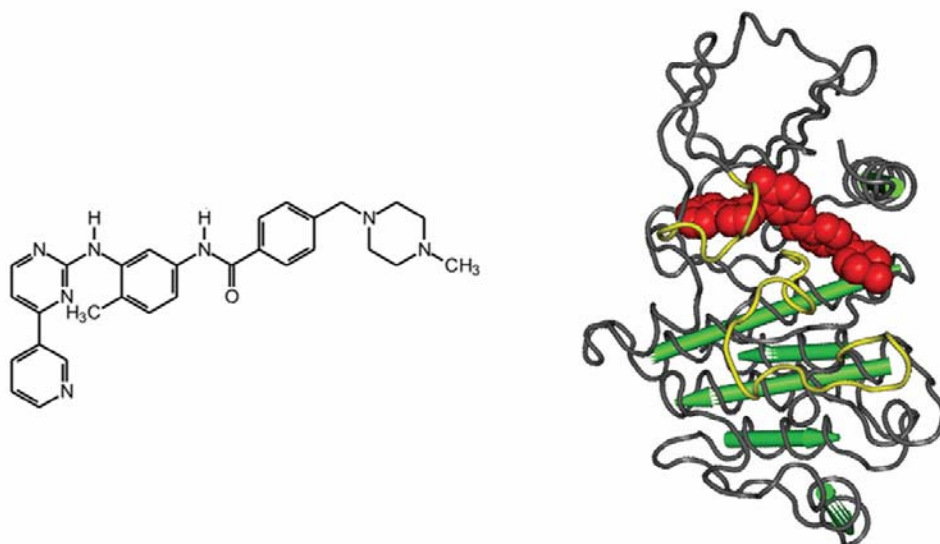
leukemia effect), na druhej strane hrozí zvýšená pravdepodobnosť rejekcie, prípadne reakcia štepu proti príjemcovi (GvHD) (64). Lepšiu prognózu majú mladší pacienti, šancu zvyšuje aj nižší vek darcu (44). Šanca na prežitie po transplantácii počas fázy akcelerácie je iba polovičná, počas blastической krízy dokonca menšia ako 20%, oproti pacientom transplantovaným v chronickej fáze (65). Pacienti, ktorí podstúpia transplantáciu do dvanástich mesiacov od diagnózy, majú lepšiu prognózu (62).

Ak pacient prežije procedúru, a tá bola urobená v skorej chronickej fáze, tak je šanca na úplne vyliečenie až 70%-ná (60).

Vzhľadom na vysokú rizikovosť a nárast rizika s vekom, je pre starších pacientov vhodnejšia liečba, ktorá síce nemá predpoklady na úplné vyliečenie, na druhej strane však výrazne predĺži a skvalitní život. U mladších pacientov, s vyššou pravdepodobnosťou prežitia procedúry a s dostupným vhodným darcom, je transplantácia alternatívou, ktorá s určitou pravdepodobnosťou môže navodiť úplne vyliečenie, samozrejme s podstúpením rizika blízkej smrti (62, 66).

1.2.4. Inhibítory tyrozín kinázy

Zavedenie imatinib mesylátu (Gleevec, Glivec, STI 571) dramaticky zmenilo súčasnú liečbu chronickej myeloidnej leukémie (60, 67). Chemicky ide o derivát 2-fenylaminopyrimidínu (67). Imatinib mesylát je špecifickým inhibítorom tyrozín kinázovej aktivity proteínu ABL a jeho derivátov: BCR-ABL, v-ABL, TEL-ABL. Ďalej inhibuje kinázy kódované génmi Kit, ARG a PDGF-R. Inhibičná aktivita proti ostatným tyrozín kinázam a serín/threonín kinázam bola minimálna, čo naznačuje jeho relatívne vysokú špecifickosť (68, 69). Mechanizmus účinku je založený na väzbe imatinibu v ATP-viažúcej oblasti a stabilizuje tak inaktívnu konformáciu tyrozín kinázovej oblasti (70). Funguje teda ako kompetitívny inhibítor (67).



Obr. 1.4. Štruktúra imatinib mesylátu a jeho väzba na c-ABL. Prebraté z (67).

Imatinib sa stal komerčne dostupný v máji 2001 (71) a vďaka svojej vysokej účinnosti a nízkej toxicite sa veľmi skoro stal liekom prvej voľby (8).

Posledné výsledky získané v medzinárodnej štúdií IRIS, v ktorej bolo zaradených viac než 1100 pacientov, ukázali výrazne predĺženie prežívania. Celkove prežilo viac ako 6 rokov 88% pacientov, ak by sa mala brať do úvahy iba úmrtnosť priamo spojená s CML, tak by to bolo dokonca 95% (72). Úspešnosť liečby už z ďaleka nie je taká vysoká, ak ide o pacientov vo fáze akcelerácie, prípadne v blastickej kríze, a to napriek tomu, že je štandardne používaná vyššia dávka (67, 73).

Imatinib je vo všeobecnosti veľmi dobre tolerovaný. Vedľajšie efekty, ak sa vyskytnú, nie sú vo väčšine prípadov závažné. Ide hlavne o zadržiavanie tekutín, nevoľnosť, slabosť, svalové kŕče a vyrážka (69).

Napriek zjavnej účinnosti imatinibu, dochádza u niektorých pacientov k vzniku rezistencie. Tá môže vzniknúť rozličnými mechanizmami, ale najbežnejšie sú nasledujúce dva: a) vznik bodových mutácií v oblasti miesta väzby imatinibu, ktoré zabránia jeho naviazaniu; alebo b) amplifikácia génu bcr-abl a následne množstva jeho produktu (60). Riešením tohto problému môže byť použitie vyššej dávky imatinibu, alebo použitie inhibítorov TK druhej generácie ako je napríklad dasatinib a nilotinib (74, 75, 76). Klinicky testované boli pred časom ďalšie inhibítory - SKI-606 (bosutinib), INNO-406, alebo MK-0457 (74).

Dasatinib bol prvým prípravkom povoleným na liečbu imatinib rezistentných, alebo imatinib netolerujúcich pacientov. Od imatinibu sa líši chemickou štruktúrou. Viaže sa na rozličné konformácie ABL kinázovej domény. *In vitro* má až 325 x vyššiu aktivitu ako imatinib. Je účinný proti väčšine mutácií navodzujúcich rezistenciu proti imatinibu.

Nilotinib je analógom imatinibu, a podobne ako dasatinib, je účinný proti väčšine mutácií navodzujúcich rezistenciu proti imatinibu.

Len menej ako 10% pacientov dosiahne úplnú molekulárnu remisiu, keď nie sú transkripty bcr-abl detegovateľné pomocou RT-PCR (66). Navyše, u väčšiny pacientov, ktorí prerušili terapiu po dosiahnutí dlhodobej úplnej molekulárnej remisie, došlo v krátkom čase k relapsu (8). Táto neschopnosť imatinibu vyliečiť CML úplne je pravdepodobne spôsobená existenciou neproliferujúcich kmeňových buniek CML. Takéto kmeňové bunky dávajú vznik leukemickým bunkám, ktoré sú rezistentné proti imatinibu, hneď po prerušení liečby, alebo môžu byť zodpovedné za progresiu choroby a navodenie rezistencie (77, 78).

1.3. *Experimentálne prístupy k liečbe CML*

1.3.1. Génová terapia a imunoterapia všeobecne

Pod pojmom génová terapia rozumieme také terapeutické zásahy, ktoré využívajú genetický materiál - prevažne DNA, ale je možné aj použitie RNA. Tento genetický materiál je vnášaný do buniek z rozličných dôvodov: a) môže ísť o snahu opraviť fungovanie nefunkčného, alebo poškodeného génu; b) môže ísť aj o vnesenie novej funkcie; c) alebo naopak o potlačenie nejakej funkcie; d) dokonca o usmrtenie geneticky modifikovanej bunky. Pre prenos genetického materiálu je vyvinuté široké spektrum rozličných metód, ktoré možno podľa ich podstaty rozdeliť na a) fyzikálne; b) chemické; c) biologické.

K fyzikálnym metódam patria mikroinjekcie, elektroporácia, hydrodynamická transdukcia, balistická metóda a mnoho ďalších variácií a kombinácií na danú tému.

Podobne sú na tom čo do početnosti aj chemické metódy transdukcie. Okrem klasickej kalcium-fosfátovej precipitácie je k dispozícii množstvo transfekčných činidiel na báze lipidov. Existujú metodiky na prípravu zložitých komplexov DNA a rozličných molekúl schopných špecificky nasmerovať DNA do cieľových buniek. Pri tomto spôsobe sú využívané rozličné protilátky, či ligandy receptorových molekúl. Ide teda o prechod medzi chemickými a biologickými metódami.

Medzi najčastejšie používané biologické vektory patria rozličné mutantné, alebo génovými manipuláciami upravené vírusy. Ide predovšetkým o retrovírusy, adenovírusy, AAV, herpetické vírusy a vírus vakcínie. Ako vektory môžu byť využité aj niektoré intracelulárne žijúce baktérie, nie sú však príliš rozšírené. Zvláštnou kapitolou sú onkolytické vírusy.

Imunoterapia je definovaná ako terapeutický postup, pomocou ktorého je modulovaná imunitná odpoveď organizmu takým spôsobom, že sprostredkuje liečebný efekt. Zväčša ide o navodenie imunitnej reakcie proti konkrétnemu antigénu, alebo sérii antigénov.

Ako imunoterapeutiká môžu byť použité rozličné DNA vakcíny, bunkové vakcíny, peptidové a proteínové vakcíny, hybridné VLP častice, rekombinantné vírusy exprimujúce, alebo na svojom povrchu nesúce antigénny epitop, bunkové lyzáty, atď.

Deliaca čiara medzi génovou terapiou a imunoterapiou je nejednoznačná. Preparáty používané ako imunoterapeutické agens sú totiž často produktmi génového inžinierstva. Veľmi dobrým príkladom terapeutického agens, patriaceho do oboch kategórií, sú DNA vakcíny. Používajú sa na imunizáciu, ide teda o imunoterapiu, a zároveň je ako terapeutický

materiál použitá DNA, teda ide o formu génovej terapie. V podobnej pozícii sú geneticky modifikované bunky, používané na imunizáciu. Navyše gény, vnesené do týchto buniek, často kódujú rozličné zložky imunitného systému. Rekombinantné vírusy a VLP nesú sekvenciu pre epitop/antigén, ktorá do nich bola vnesená génovou manipuláciou, pritom slúžia na imunizáciu. Dokonca aj proteínové vakcíny sú často pripravené s pomocou génových manipulácií. Na záver môžeme povedať, že nie je dôležité formálne zaradenie vakcíny, ale jej terapeutická úspešnosť.

1.3.2. Imunoterapia a chronická myeloidná leukémia

Pri vývoji nového terapeutického prístupu je okrem iného veľmi dôležitá odpoveď na dve základné otázky: a) Je potrebné/Má zmysel vyvíjať nový terapeutický prístup?; b) Existujú teoretické predpoklady pre úspešnosť/fungovanie zvoleného prístupu?

Odpoveď na prvú otázku je daná súčasnými možnosťami liečby CML. Tak, ako bolo popísané v predchádzajúcej kapitole (kapitola 1.2.), CML môže byť trvalo vyliečená iba transplantáciou kostnej drene, čo je život ohrozujúca procedúra s relatívne vysokým rizikom smrti. Navyše je dostupná iba časti pacientov.

Druhou možnosťou je všeobecne dostupná, život výrazne predlžujúca a v drvivej väčšine prípadov veľmi dobre tolerovaná terapia inhibítormi tyrozín kinázy, ktorá však nie je schopná ochorenie vyliečiť, a teda nemôže byť prerušená, čo je samozrejme nevýhodne, či už z pohľadu pacienta, alebo z pohľadu ekonomického. Okrem toho tu existuje riziko vzniku rezistencie. Takýto prípad sa rieši podaním iného typu inhibítora, tých však nie je neobmedzené množstvo.

Za týchto podmienok je pochopiteľná a potrebná snaha o vytvorenie terapeutického prístupu, ktorý je schopný úplne vyliečiť CML, a zároveň by bol prístupný všetkým pacientom.

Kladná odpoveď na druhú otázku je bez experimentálneho overenia iba odhadom. Na druhej strane je to však odhad podložený viacerými pozorovaniami.

a) Vo všetkých bunkách CML je produkovaný chimérny proteín BCR-ABL. Fúzne miesto má unikátnu sekvenciu, ktorá môže slúžiť ako terč pre imunitnú odpoveď. Navyše je exprimovaný aj proteín ABL-BCR (79, 80, 81).

b) BCR-ABL aktiváciou rozličných dráh spôsobuje nadprodukciu ďalších proteínov, ktoré sa v normálnych bunkách vyskytujú buď v menšom množstve, alebo sa vyskytujú iba v určitej fáze embryonálneho vývoja. Ide teda o antigény, ktoré môžeme označiť ako tumor asociované

antigény (TAA). Ako príklad môžeme uviesť WT-1, proteinázu-3, Cat-G, HNE, Bcl-2, G250, hTERT, HSP70, MAPP11, HAGE, PRAME, Au-A, CML28, CML66, adipofilin, RHAMM, Survivin, NM23-H2, Bcr (82, 83). U pacientov s CML vznikajú proti týmto proteínom imunitné reakcie (84, 85, 86, 87).

c) U zdravých jedincov bola dokázaná prítomnosť génu *bcr-abl* (88, 89). Aj keď existujú pre tento jav aj iné vysvetlenia, je reálna možnosť, že za neprepuknutie choroby zodpovedá imunitný dohľad organizmu. Pre toto vysvetlenie hovorí aj prítomnosť BCR-ABL špecifických, CD8⁺ T-lymfocytov (90).

d) U pacientov s CML bola detegovaná imunitná odpoveď proti proteínu BCR-ABL, aj iným proteínom asociovaným s CML (84, 90, 91). O pravdepodobnej úlohe imunitnej odpovede pri vyliečení CML svedčí aj pozorovanie efektu "štep vs. leukémia" (graft vs. leukemia), o ktorom sa predpokladá, že je jedným z hlavných mechanizmov terapeutického účinku transplantácie kostnej drene. Tento názor je podporený aj účinkom transfúzie darcovských lymfocytov (donor lymphocyte transfusion - DLT), ktorá sa používa ako terapia relapsov po transplantácii (44). Ďalším dôkazom o participácii imunitnej odpovede na vyliečení CML, je už spomínaná prítomnosť špecifických T-lymfocytov proti proteináze 3 u pacientov, liečených IFN- α , ktorí dosiahli remisiu a neprítomnosť u pacientov, ktorí remisiu nedosiahli (58).

e) CML je choroba, ktorá sa rozvíja pomaly, a teda čas potrebný na navodenie dostatočnej imunitnej odpovede je k dispozícii.

f) Leukemické bunky cirkulujú v krvnom a lymfatickom systéme, čo z nich robí bunky ľahko dostupné pre jednotlivé komponenty imunitného systému. Navyše je tu predpoklad, že za týchto podmienok bude negatívna rola rozličných buniek infiltrujúcich solidné nádory (T_{reg}, TAM, atď.) minimálna.

g) Existencia imatinib mesylátu a iných inhibítorov tyrozín kinázy umožňuje redukcii väčšiny leukemických buniek. Imunitný systém stimulovaný pomocou imunoterapie by sa tak musel vysporiadať iba s minimálnou reziduálnou chorobou, čo je, vzhľadom na doterajšie skúsenosti s imunoterapiou, optimálny prípad.

Na základe týchto faktov sa môžeme domnievať, že pokus o imunoterapiu CML je opodstatnený a má teoretické predpoklady uspieť.

1.3.3. Stručný prehľad doterajších experimentálnych prístupov k liečbe CML

Publikované práce relevantné k téme tejto práce možno rozdeliť na niekoľko skupiny podľa modelového objektu. Ide jednak o práce robené na zvieracom modeli, práce robené na ľudských bunkách a klinické štúdie na pacientoch.

Veľké množstvo publikovaných výsledkov získaných na myšom modeli pochádza od skupiny profesora Katsanisa. Ako vakcíny používali peptidy odvodené od spoja BCR-ABL, peptidom pulzované dendritické bunky, na chaperóny bohaté lyzáty bcr-abl pozitívnych leukemických buniek. Výsledky naznačovali imunogenicitu spoja BCR-ABL (92, 93, 94).

Pri *in vitro* experimentoch s ľudskými bunkami sú používané buď bunkové línie odvodené od buniek pacientov v blastickéj kríze, alebo priamo leukemické bunky získané od pacientov. Ako vakcíny boli najčastejšie používané peptidy z oblasti spoja BCR-ABL (95, 96, 97) a rozlične pulzované dendritické bunky (98, 99, 100).

Doteraz bolo publikovaných 13 klinických štúdií. Väčšina vakcín bola založená na peptidoch odvodených od spoja BCR-ABL, respektíve ich zmesí. Okrem toho boli použité vakcíny na báze dendritických buniek, peptidy odvodené od WT-1, proteínázy 3 a HSP70 s naviazanými leukemickými proteínmi a v jednej štúdií geneticky modifikovaná nádorová línia (K562 produkujúca GM-CSF). Výsledky boli relatívne priaznivé. Všetky vakcíny boli dobre tolerované, bola pozorovaná imunologická aj klinická odpoveď. Na druhú stranu išlo o malé štúdie (3-20 pacientov) a žiadna z nich nebola robená ako dvojito slepá, čo v kombinácii s faktom, že boli použité rozličné vakcíny a vakcinačné protokoly, výrazne sťažuje objektívne porovnanie jednotlivých výsledkov (82, 101, 102, 103).

1.3.4. DNA imunizácia proti bcr-abl-pozitívnym bunkám

Pri imunizácii pomocou gene-gun-u je do kože doslova vstrelená DNA vakcína prilepená na zlatých mikroparticulách. Časť DNA prenikne do buniek, a následne do bunkového jadra, kde je genetická informácia prepísaná do mRNA, ktorá je na ribozómoch preložená do formy proteínu. Proteín je v bunke štiepený a príslušné epitopy sú vystavované na povrchu buniek pomocou molekúl MHC. Medzi transdukovanými bunkami je určité percento antigén prezentujúcich buniek (APC), prípadne APC mohli získať antigén z okolia (mŕtve transdukované bunky, produkt transgénu vyprodukovaný inými bunkami do okolia). Tieto bunky sú schopné migrovať pomocou krvného a lymfatického systému do lymfatických

orgánov, kde pomocou prezentácie antigénu v kontexte MHC a kostimulačných molekúl aktivujú antigén špecifické bunky imunitného systému (T a B lymfocyty).

Okrem práce uvedenej v prílohe, nebola zatiaľ publikovaná žiadna iná práca popisujúca DNA imunizáciu pomocou gene-gun-u proti bcr-abl-pozitívnym bunkám. A to napriek nesporným výhodám: plazmidová DNA je presne definovaná, ľahko namnožitelná, ľahko skladovateľná, imunizácia pomocou gene-gun-u je v podstate neinvazívna, spotrebuje sa pri nej cca 100x menej DNA ako pri intramuskulárnej imunizácii, je opakovateľná (Na rozdiel od použitia niektorých vírusových vektorov, ktoré vyvolávajú imunitné reakcie aj proti sebe.) a je aj relatívne lacná.

2. Materiál a metódy

2.1. Model

Ako experimentálny model bol použitý inbredný kmeň myší BALB/c a syngénne bunkové línie transformované fúznym génom *bcr-abl* a exprimujúce p210^{bcr-abl}. Medzi nesporné výhody takého modelu patrí ľahká manipulovateľnosť, relatívne nízke náklady a krátky čas nevyhnutný na získanie experimentálnych výsledkov. K nevýhodám patrí rýchly priebeh experimentálneho ochorenia, ktorý pripomína skôr akútnu leukémiu, alebo blastickú krízu chronickej myeloidnej leukémie ako chronickú fázu CML. A práve chronická fáza je tým obdobím, o ktorom je opodstatnené sa domnievať, že je najvhodnejšie na aplikáciu imunoterapie. Tento fakt nebol problematický len z pohľadu formálneho dodržania podobnosti experimentálneho modelu a skutočného ochorenia, ale vniesol do systému aj praktické obmedzenia. Za daných podmienok bolo v podstate nemožné vytvorenie účinnej terapeutickú schémy. Na druhej strane je prvým krokom vo vývoji terapeutických vakcín potvrdenie účinnosti testovaných preparátov v pokusoch o vyvolanie ochrany proti podaným nádorovým bunkám, a tak boli vakcíny testované v schéme preventívnej imunizácie.

2.2. *Bunky*

Bunky B210, 12B1, 12B1/5 a HL60 boli pestované a pasážované v živnom médiu RPMI, 293T bunky v médiu DMEM. Média boli doplnené 10% FCS (PAA Labs., Linz, Rakúsko), 2mM glutamínu a antibiotikami.

2.2.1. B210, 12B1 a 12B1/5

Bunky B210 nám daroval G.Q. Daley (Whitehead Institute of Biochemical Research, Cambridge, MA), bunky 12B1, pôvodne izolované J. McLaughlin-om, nám poskytol E. Katsanis (University of Arizona, Tuscon, AZ). B210 majú pôvod v línii odvodenej od buniek kostnej drene myši BALB/c - BaF3. Boli vytvorené pomocou infekcie retrovírusom nesúcim ľudský fúzny gén *bcr-abl* (104). Línia 12B1 bola odvodená priamo od primárnych buniek kostnej drene za pomoci podobne skonštruovaného retrovírusu (105). Napriek tomu, že obe boli vytvorené retrovírusovou transformáciou ľudským génom *bcr-abl* (v b3a2 konfigurácii), dokonca produkujú porovnateľné množstvo BCR-ABL proteínu, líšia sa v množstve zásadných vlastností. Podrobnosti sú v tabuľke 2.1.

Tabuľka 2.1		
Porovnanie vybraných vlastností buniek B210 a 12B1		
	B210	12B1
Vznik leukémie po i.v. podaní	áno	áno
1 TID ₅₀ po i.v. podaní	5x10 ⁴ buniek	1x10 ² buniek
Vznik nádoru po s.c. podaní	nie	áno
TID ₅₀ po s.c. podaní	XXX	10 ^{2,5} buniek
Expresia MHC I na povrchu	veľmi nízka ⁺⁾	vysoká

+) kultivácia v prítomnosti IFN- γ indukuje tvorbu molekúl MHC I

Okrem spomínaných vlastností boli u týchto dvoch bunkových línií zaznamenané rozdiely v morfológii a vo frekvencii expresie proliferačných markrov (106, 107).

Choroba, ktorú bunky B210 ako aj 12B1 indukujú po intravenóznom podaní, pripomína skôr akútnu leukémiu, alebo chronickú leukémiu v jej akcelerovanej, blastической fáze. Po podaní buniek B210 v dávke 5x10⁵ sa prvé príznaky ochorenia môžu objaviť približne po dvoch týždňoch. Pri aplikácii 3x10² buniek 12B1 vyizolovaných z nádoru dochádza k

prejaveniu choroby ešte skôr - v extrémnych prípadoch už po týždni. Väčšina zvierat zomrie približne po týždni od začiatkov manifestácie ochorenia.

Po subkutánnom podaní buniek 12B1 dochádza k tvorbe nádorov. Nami používaná dávka bola 5×10^3 buniek. Prvé nádory sa zvyknú objavovať v 11. deň po inokulácii. Rýchlosť rastu je variabilná, ale väčšina myší vytvorí nádor, aspoň v jednom rozmere väčší ako 2 cm, už po jednom týždni od jeho objavenia. U menej ako 1% subkutálne inokulovaných myší dochádza k vytvoreniu príznakov leukémie, bez vzniku hmatateľného nádoru. V približne u 3% dochádza k prejavom leukémie u relatívne malých nádorov (pod 1,5 cm v aspoň jednom rozmere) a ďalších 14% zomrie na leukémiu pred dosiahnutím 2 cm veľkosti nádoru.

Bunky 12B1/5 boli odvodené od buniek 12B1. Od pôvodnej, "materskej" línie sa odlišujú pomalším rastom, čo môže byť pri *in vivo* pokusoch výhodné. Táto bunková línia bola použitá pri niektorých experimentoch prebiehajúcich v spolupráci s pracoviskom Dr. Němečkovej.

V snahe znížiť variabilitu bola myšiam inokulovaná vždy 3. pasáž buniek z toho istého štoku zmrazených buniek.

2.2.2. HL60

Línia *bcr-abl*-negatívnych ľudských leukemických buniek HL60 bola použitá ako negatívna kontrola pri detekcii prítomnosti transkriptov *bcr-abl* pomocou RT-PCR.

2.2.3. 293T

Bunky 293T boli využívané na prípravu lyzátov pri overovaní expresie pripravených plazmidov. Ide o bunky odvodené od línie HEK 293. Tá bola pripravená transformáciou buniek izolovaných z obličky ľudského embrya pomocou DNA adenovírusu 5 (108). Bunky 293T ešte navyše exprimujú veľký T-antigén vírusu SV40. Hlavnou výhodou týchto buniek je pomerne jednoduchá transfekovateľnosť kalcium-fosfátovou precipitáciou.

2.2.4. Bakteriálne bunky *E. coli* - XL1-blue

Plazmidová DNA bola množená v bakteriálnych bunkách *Escherichia coli* (*E. coli*), kmeň XL1-blue. Pre prípravu kompetentných baktérií bol používaný kit Z - CompetentTM *E. Coli* Transformation Buffer Set od firmy Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg, Nemecko.

Kompetencia baktérii bola stanovovaná pomocou plazmidu pALTER, známej koncentrácie (0,2 ng/μl).

2.3. Plazmidy

2.3.1. Popis použitých plazmidov

Všetky plazmidy použité v imunizačných experimentov sa dajú rozdeliť na základe svojho zloženia do nasledujúcich skupín: a) plazmid kódujúci celý proteín BCR-ABL; b) plazmidy kódujúce 25 aminokyselinovú sekvenciu spoja BCR-ABL pripojenú ku génom kódujúcim rozličné adjuvantné proteíny, respektíve ich časti; c) plazmidy kódujúce jednotlivé fragmenty BCR-ABL. Všetky konštrukty boli zaligované do toho istého vektora.

2.3.1.1. Použitý vektor

Plazmid pBSC slúžil ako expresný vektor pri všetkých konštruktoch použitých na imunizáciu. Bol vytvorený s použitím sekvencií z plazmidov pBCMGNeo.mIL-2, pBluescript-SK a pBK-CMV (109). Inzertovaný gén je exprimovaný pomocou cytomegalovírusového promotora (CMV). Ide o silný promótor, umožňujúci expresiu v širokom spektre eukaryotických buniek. Za promotórom bola začlenená sekvencia intrónov králičieho β -globínu. Jej úlohou bolo zvýšenie expresie inzertovaného génu. Rezistencia na ampicilín (rAMP) uľahčovala selektívne pomnoženie v baktériách.

2.3.1.2. Plazmid kódujúci celý proteín BCR-ABL

Plazmid pBSC/bcr-abl, kódujúci kompletný proteín p210^{bcr-abl} v b3a2 konfigurácii, bol zásadný pre celú prácu z dvoch dôvodov. Jednak slúžil ako zdroj sekvencie pre všetky ostatné konštrukty, jednak bol v drvivej väčšine prípadov použitý ako pozitívna kontrola pri *in vivo* experimentoch. Sekvencie bcr-abl bola získaná vyštiepením z plazmidu pGD210 (110). Plazmid pGD210 láskavo poskytol G. Q. Daley. Gén *bcr-abl* bol preklonovaný s použitím EcoRI miest do plazmidu pBSC.

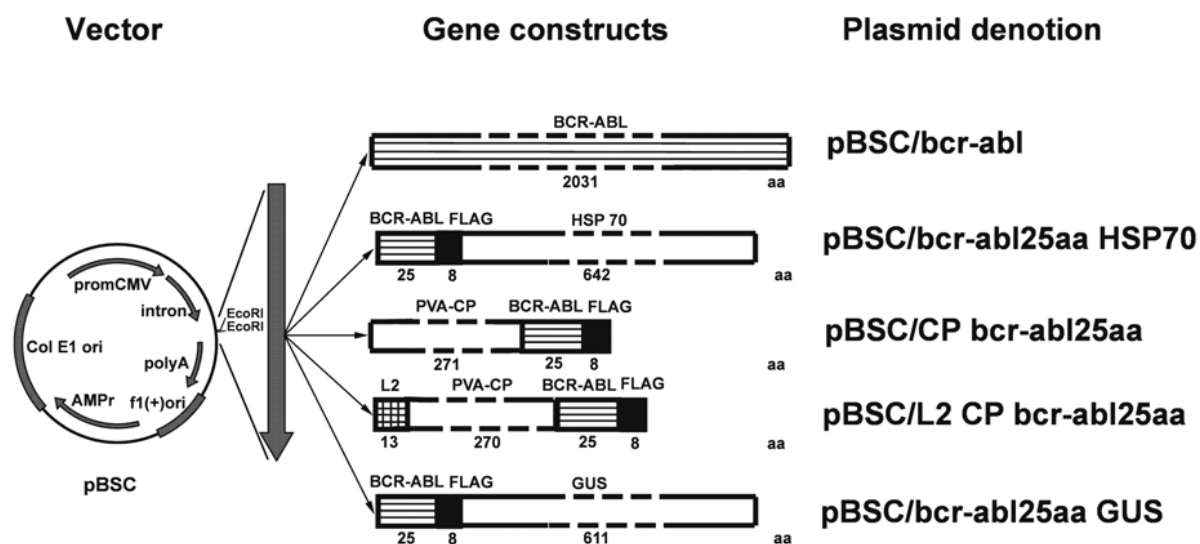
2.3.1.3. Plazmidy kódujúce 25 aminokyselinovú sekvenciu spoja BCR-ABL

Sekvencia 25 aminokyselín spoja BCR-ABL (IVHSATGFKQSSKALQRPVASDFEP) bola vybraná tak, aby bol novovzniknutý lyzín lokalizovaný v strede, a teda na N-konci bolo 12 aminokyselín z BCR a na C-konci 12 aminokyselín z ABL. Táto sekvencia ľudského

BCR-ABL je úplne homologická s príslušnými sekvenciami myšieho BCR a ABL. Navyše, väčšia dĺžka aminokyselinového reťazca umožňuje vyštípiť viacero potenciálnych epitopov, čo zvyšuje pravdepodobnosť funkčnosti vakcíny u väčšieho počtu MHC molekúl.

Pri PCR produkcii boli pomocou prečnievajúcich oblastí primerov k nukleotidovej sekvencii kódujúcej fúziu oblast' pridané na 5' koniec: vhodné restričné miesto, Kozakova sekvencia a "štartovací" triplet pre methionin (M). Na 3' koniec bola pripojená sekvencia kódujúca FLAG epitop (DYKDDDDK) a vhodné restričné miesto. Cez pridané restričné miesta bol PCR-konstrukt vligovaný do plazmidu pBSC nesúceho gén pre adjuvantný proteín, ktorého úlohou bolo posilnenie imunitnej odpovede.

Takto skonštruovaný plazmid exprimoval 25 aminokyselín spoja BCR-ABL označených FLAG sekvenciou, pripojených buď na N-koniec (HSP70 a GUS), alebo C-koniec (CP a L2CP) adjuvantného génu. (Obr. 2.1)



Obr. 2.1. Schématické znázornenie plazmidov nesúcich buď gén pre celý proteín BCR-ABL, alebo iba jeho fúziu oblast' označenú sekvenciou pre FLAG a pripojenú k adjuvantným génom. Čísllice udávajú počet aminokyselín.

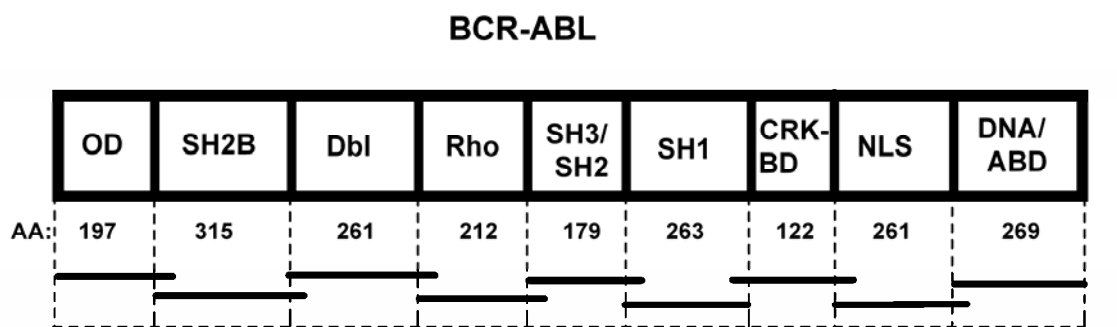
2.3.1.4. Plazmidy kódujúce jednotlivé fragmenty BCR-ABL

Plazmidy kódujúce jednotlivé fragmenty BCR-ABL proteínu, označené ako pBSC/OD, pBSC/SH2B, pBSC/Dbl, pBSC/Rho, pBSC/SH3/SH2, pBSC/SH1, pBSC/CRKBD, pBSC/NLS a pBSC/DNA/ABL, boli designované tak, aby sa ich okrajové sekvencie

prekrývali. Toto opatrenie malo predísť prípadnej strate epitopu tým, že by mohol byť lokalizovaný práve v oblasti rozdelenia aminokyselinovej sekvencie.

Kvôli možnosti detegovať vzniknuté fragmenty Western blotom bola na C-koniec každého konštruktu pripojená sekvencia pre skrátenú verziu epitopu FLAG (DYKDDDD).

Pri konštrukcii jednotlivých plazmidov bolo rešpektované doménové zloženie proteínu. To malo za následok určitú disproporciu v dĺžke exprimovaných produktov. Všetkých 9 plazmidov bolo pomenovaných podľa domény, ktorou fragment začína. Treba mať však na pamäti, že vzniknutý produkt nie vždy predstavuje iba spomenutú doménu. Napríklad produkt plazmidu pBSC/OD kóduje 197 aminokyselín z N-konca BCR, ale iba 61 aminokyselín tvorí oligomerizačnú doménu (OD).



Obr. 2.2. Schématické znázornenie rozdelenie génu *bcr-abl* na časti vložené do expresného plazmidu pBSC. Obrázok ukazuje prekrývanie jednotlivých sekvencií a počet kódovaných aminokyselín. Vysvetlenie skratiek: OD, oligomerization domain; SH2B, SH2 binding; Dbl, Dbl homology domain; Rho, Rho GTP-ase; SH3/SH2, Src homology 3/Src homology 2; SH1, Src homology 1; CRKBD, CRK binding domain; NLS, nuclear localization signal; DNA/ABD, DNA/actin binding domains.

2.3.1.5. Zmesi plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty BCR-ABL

V niektorých experimentoch boli použité zmesi plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty proteínu BCR-ABL. Pri ich príprave bola zanedbaná ich mierne rozdielna veľkosť (5255-5849 bázových párov) - pre prípravu DNA nábojov boli vždy namiešané rovnaké hmotnostné pomery. Obsah niektorých pripravených zmesí bol volený tak, aby pokrýval vždy konkrétnu časť sekvencie. Napríklad: Mix-bcr, Mix-abl, alebo Mix-compl. V iných prípadoch

vychádzal z konkrétnych okolností, alebo cieľov experimentu. Zloženie použitých zmesí zobrazuje tabuľka 2.2.

Tabuľka 2.2									
Zoznam a zloženie zmesí plazmidov použitých v experimentoch									
Označenie zmesi	Prítomnosť jednotlivých plazmidov v zmesi								
	pBSC/ OD+	pBSC/ SH2B	pBSC/ DBL+	pBSC/ Rho+	pBSC/ SH3/SH2	pBSC/ SH1	pBSC/ CRKBD	pBSC/ NLS	pBSC/ DNA/ABD
Mix - compl	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Mix - orig			•	•	•		•	•	•
Mix - bcr	•	•	•	•					
Mix - abl					•	•	•	•	•
Mix – orig +OD	•		•	•	•		•	•	•
Mix - orig + SH2B		•	•	•	•		•	•	•
Mix - orig + SH1			•	•	•	•	•	•	•
Mix - orig + OD + SH2B	•	•	•	•	•		•	•	•
Mix - orig + OD + SH1	•		•	•	•	•	•	•	•
Mix - orig + SH2B + SH1		•	•	•	•	•	•	•	•

2.3.1.6. "GFP" plazmid

Pri transfekciách plazmidov do buniek 293T bol ako kontrola úspešnosti transfekcie využívaný plazmid pTR-UF2, produkujúci zelený fluoreskujúci proteín (green fluorescent protein - GFP).

2.3.2. Produkcia plazmidov

Plazmidy testované v *in vivo* experimentoch boli, až na drobné odlišnosti, pripravené obdobným postupom, zahŕňajúcim tieto kroky: a) Príprava klonovaného génového fragmentu, ktorá vo väčšine prípadov znamenala PCR amplifikáciu. Iba fragmenty OD a SH2B boli vyrobené syntézou (GenScript, USA). b) Opracovanie fragmentu aj vektora príslušným restriktčným enzýmom. c) Prečistenie cez gél a následná izolácia DNA z gélu. d) Ligácia. e) Transformácia ligačnej zmesi do kompetentných baktérií a následne pomnoženie jednotlivých bakteriálnych klonov v tekutom médiu. f) Izolácia plazmidovej DNA z jednotlivých bakteriálnych klonov. g) Identifikácia plazmidu pomocou restriktčnej analýzy. h) U plazmidov, obsahujúcich sekvenciu amplifikovanú pomocou PCR, bola nutná sekvenácia. V prípade konštruktov s OD a SH2B bola sekvenácia súčasťou servisu poskytnutého firmou. i) Namnoženie DNA v baktériách a izolácia väčšieho množstva maxiprepom. j) Transfekcia plazmidovej DNA do buniek 293T a príprava lyzátu z transfekovaných buniek. k) Overenie expresie proteínu pomocou metódy Western blot.

2.3.2.1. PCR – optimalizácia, produkcia, primery

Metóda PCR bola použitá pri amplifikácii jednotlivých úsekov génu *bcr-abl*.

Použité primery boli navrhnuté tak, aby ich prečnievajúce oblasti obsahovali rozličné sekvencie, ktoré nie sú súčasťou génu *bcr-abl*: miesta pre vhodné restriktčné enzýmy, Kozakova sekvencia, iniciačný kodón, terminačný kodón, prípadne sekvencia pre FLAG (nebola priamou súčasťou primeru pri konštruktoch s *bcr-abl25aa*). Dĺžka takýchto primerov sa pohybovala od 26 do 65 nukleotidov, pričom hybridizačnú oblasť však predstavoval úsek dlhý iba 18 nukleotidov. Zoznam a sekvencie jednotlivých primerov sú zobrazené v tabuľke 2.3.

Tabuľka 2.3	
Zoznam použitých primerov	
Označenie primerov	Sekvencia primerov
CML-3	5'CCCAAGCTTGCCGCCATGATCGTCCACTCAGCCACT 3'
CML-4a	5'CATGCCATGGCCTTGTCTCATCGTCTTT 3'
CML-CP-F	5'GGGATGCATCACCTTGTATCGTCCACTCAGCCACT 3'
CML-CP-R	5'GGGAAGCTTACTTGTCTCATCGTCT 3'
CML-GUS-F	5'CTAGCCCGGGGCCGCCATGATCGTCTCCACTCAGCCACT3'
CML-GUS-R	5'CTAGCCCGGGCCCTTGTCTCATCGTCTTTG 3'
CML-DbI-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGTGGGTCCTGTCTGGGAATC 3'
CML-DbI-R	5'GCGAATTCTTAGTCGACGAATGCGTCGTCGTCGTCTTTGTA GTCATCCGTGAGCGGAATGTA 3'
CML-Rho-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGTACATTCCGCTCACGGAT 3'
CML-Rho-R	5'GCGAATTCTTATTGATCAAGATATCGGTCGTCGTCGTCTTTG TAGTCGAAAAGGTTGGGGTCATT 3'
CML-SH3/SH2-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGAATGACCCCAACCTTTTC 3'
CML-SH3/SH2-R	5'GCGAATTCTTAGTCGACGAATGCGTCGTCGTCGTCTTTGTAG TCGCGTTCCATCTCCCACTT 3'
CML-SH1-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGGACTACAAAGACGACGACGACAAG TGGGAGATGGAACGC 3'
CML-SH1-R	5'GCGAATTCTTAGTCGACGAATGCCATTGTTTCAAAGGGTTG 3'
CML-CRKBD-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGCAAGCCTTTGAAACAATG 3'
CML-NLS-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGAAGAAGAAGACAGCCCCA 3'
CML-NLS-R	5'GCGAATTCTTAGTCGACGAATGCGTCGTCGTCGTCTTTGTAG TCCTTGCTGGTGCCCCCTGG 3'
CML-DNA/ABD-F	5'CGGAATTCGCCGCCATGCCAGGGGGCACCAGCAAG 3'
CML-DNA/ABD-R	5'GCGAATTCTTAGTCGACGAATGCGTCGTCGTCGTCTTTGTAG TCCCTCTGCACTATGTCACT 3'.

Na krátke fragmenty (bcr-abl25aa) bola použitá Taq polymeráza, na ostatné fragmenty DeepVent polymeráza s proof reading aktivitou, obidve od firmy New England BioLabs (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA).

Jednotlivé reagenty boli v nasledujúcich koncentráciách: polymeráza - 2 U/ μ l, pufer (k danej polymeráze) - 10x koncentrovaný, primery – 25 μ M, MgCl₂ (pre Taq polymerázu) a MgSO₄ (pre DeepVent polymerázu) - 100 mM, nukleotidy - 10 mM. Ako matrica bol

požívaný plazmid pBSC/bcr-abl (nariadený na koncentráciu 0,02 µg/µl), prípadne PCR produkt z už urobených PCR-reakcií (v prípade bcr-abl25aa). Na riedenie jednotlivých reagensí bola použitá ultra čistá voda pre PCR.

Pri optimalizácii reakcia prebiehala v objeme 25 µl, pri produkčnej PCR v 100 µl. V optimalizačnej schéme boli ako prvé menené množstvá pridaných primerov a Mg²⁺. Manipulácia s týmito hodnotami vo väčšine prípadov stačila na výber najvhodnejšieho pomeru reagensí. Ďalšími možnosťami boli zmeny množstva matricovej DNA a polymerázy. Klasická optimalizačná schéma mala 9 kombinácií primerov a Mg²⁺. Z týchto možností bola vybraná tá, ktorá mala čo najväčší podiel amplifikovaného produktu a zároveň čo najmenej nešpecifických prúžkov, hlavne vo veľkosti blížiacej sa k veľkosti amplifikovaného produktu. Jednotlivé pomery reagensí pri optimalizácii zobrazuje tabuľka 2.4.

Tabuľka 2.4							
Optimalizácia PCR							
	primery (µl)	Mg ²⁺ (µl)	puffer (µl)	nukl. (µl)	pol. (µl)	H ₂ O (µl)	DNA (µl)
1	0,5+0,5	1,5	2,5	0,5	0,25	18,25	1
2	0,5+0,5	3	2,5	0,5	0,25	16,75	1
3	0,5+0,5	5	2,5	0,5	0,25	14,75	1
4	1+1	1,5	2,5	0,5	0,25	17,25	1
5	1+1	3	2,5	0,5	0,25	15,75	1
6	1+1	5	2,5	0,5	0,25	13,75	1
7	2+2	1,5	2,5	0,5	0,25	15,25	1
8	2+2	3	2,5	0,5	0,25	13,75	1
9	2+2	5	2,5	0,5	0,25	11,75	1
neg. k.	1+1	3	2,5	0,5	0,25	16,75	0

Pri amplifikácii väčšiny sekvencií bol použitý nasledujúci program: a) denaturácia - 95 °C - 5 minút; b) 40 x opakovanie krokov: denaturácia - 94 °C - 1 minútu, nasadenie primerov - 50 °C - 1 minútu, predlžovanie sekvencie syntetizovaných reťazcov - 72 °C - 1 minútu; c) dokončenie syntézy - 72 °C - 4 minúty; d) chladenie - 10 °C - „donekonečna“. Iba v prípade fragmentov SH3/SH2 a CRKBD bola použitá teplota pre nasadenie primerov 55 °C.

2.3.2.2. Štiepenie, elektroforéza a izolácia z gélu

Po amplifikácii bol výsledný produkt PCR reakcie naštiepený príslušnými restriktívnymi enzýmami (New England BioLabs). Prítomnosť PCR reagensí v roztoku sa nikdy neprejavila ako prekážka úspešného štiepenia. Podobne bol naštiepený aj expresný vektor (pBSC). Následne boli ako fragment, tak aj vektor separovaný na agarózovom gély. Pre klonovaný fragment bol používaný 1-3% gél - podľa veľkosti cieľového amplifikovaného fragmentu, pripravený z „low melting agarózy pre fragmenty menšie ako 1000 bps“ (BioWhittaker molecular Applications, rockland, ME, USA). Pre izoláciu naštiepeného vektora, alebo väčších fragmentov sa používal 1% gél pripravený z „low melting agarózy pre fragmenty väčšie ako 1000 bps“ (BioWhittaker molecular Applications). Elektroforéza prebiehala pri 100 V približne 35 – 45 minút – v závislosti od koncentrácie agarózového gélu a veľkosti separovaného fragmentu.

DNA z vyrezaného prúžku bola izolovaná DNA Lego Kitom (Top Bio, Praha, Česká republika) podľa protokolu odporúčaného výrobcom.

2.3.2.3. Klonovanie – ligácia

Vektor a vkladajúci fragment boli v ligačnej zmesi spravidla v pomere 1 : 3. V prípade, že ligácia bola neúspešná, boli použité pomery zväčšované v prospech klonovaného fragmentu. Pri príprave ligačnej zmesi bolo vhodné vizuálne overiť prítomnosť ATP kryštálov v ligačnom pufrí, a následne ich rozpustenie po vortexovaní. Bola používaná T4 DNA ligáza (New England BioLabs). Ligačná zmes bola inkubovaná pri teplote 16 °C 16 – 18 hodín (cez noc).

2.3.2.4. Transformácia XL1-blue

Na transformáciu boli používané baktérie *E. coli* – kmeň XL1-blue. Do 50 µl Z-kompetentných XL1-blue baktérií bolo pridané 2,5 - 5 µl ligačnej zmesi. Po hodinovej inkubácii na ľade bolo pridaných 450 µl LB, alebo SOC – média. Následne bola táto zmes inkubovaná 1 hodinu pri 37°C. Na Petriho misky s živnou agarózovou pôdou s

pridaným ampicilínom (AMP, 0,1%), slúžiacim ako selekčné médium, bolo rozotrených 50 μ l bakteriálnej zmesi. Misky boli inkubované v termostate, pri 37 °C, cez noc.

2.3.2.5. *Izolácia miniprepov*

Vybrané natransformované kolónie, ktoré vyrástli na Petriho miske, boli označené a pomocou špáradla prenesené najprv na záložnú Petriho misku a potom aj so špáradlom prenesené do skúmavky s približne 3 ml LB média s 0,1% AMP. Po približne 16 hodinovej inkubácii (cez noc) v trepačke pri 37 °C a RPM 200 by mali byť baktérie pomnožené do takej úrovne, že je možné pozorovať zakalenie média.

Na izoláciu DNA boli použité vždy 2 ml bakteriálnej suspenzie. Plazmidová DNA bola izolovaná s použitím DNA Lego Kitu, podľa protokolu stanoveného výrobcom.

2.3.2.6. *Restrikčná analýza*

Klony baktérií nesúce požadovaný plazmid boli identifikované pomocou restrikčnej analýzy izolovanej plazmidovej DNA. Restrikčné enzýmy boli volené tak, aby a) vyštípili klonovaný fragment; b) vyštípili úsek plazmidovej DNA, ktorý obsahuje časť klonovaného fragmentu a časť vektora; c) určili orientáciu fragmentu (ak to bolo potrebné).

Štiepenie prebiehalo v objeme 20 μ l, štiepených bolo 2 - 5 μ l DNA-miniprepu (podľa veľkosti očakávaného fragmentu), použité restrikčné enzýmy boli od firmy New England BioLabs. Inkubácia (najmenej 1 hodinu) prebiehala v teplote odporúčanej výrobcom – od 25 – 65 °C, väčšinou to však bolo 37 °C.

Po naštiepení boli vzorky separované elektroforézou na 1-3% agarózovom gély a vizualizované a vyfotené pod UV svetlom.

2.3.2.7. *Sekvenácia*

Vzhľadom na to, že pri konštrukcii plazmidov boli použité sekvencie namnožené pomocou PCR, bolo potrebné jednotlivé konštrukty osekvenovať. Na sekvenáciu bol použitý Big Dye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Pri práci bol dodržaný protokol odporúčaný výrobcom.

2.3.2.8. *Izolácia DNA maxiprepom*

Skonstruované a osekvenované plazmidy boli pre ďalšie použitie pomnožené v baktériách a izolované s pomocou Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko). Pri pracovnom postupe boli dodržané odporúčania výrobcu. Stručne: 200 ml bakteriálnej suspenzie bolo centrifugovaných pri 10 000g 15 minút. Po odstránení supernatantu bol sediment resuspendovaný v 10 ml resuspendačného pufru a následne lýzovaný pridaním 10 ml lýzačného pufru. Po 5 minútovej inkubácii na ľade bol proces lýzy ukončený pridaním 10 ml neutralizačného pufru. Po 20 minútach inkubácie na ľade, boli oddelené vyzrážané proteíny pomocou 30 minútovej centrifugácie a následnej filtrácii supernatantu cez filtračný papier. Supernatant obsahujúci plazmidovú DNA bol prevedený cez kolónu ekvilibrovanú 10 ml ekvilibračného pufru. Na kolóne zachytená DNA bola 2x premytá 30 ml premývacieho pufru, hneď potom pomocou elučného pufru vyplavená z kolóny a zachytená. Po precipitácii v 10,5 ml izopropanolu a následnej 30 minútovej centrifugácii pri 10 000g, bol DNA pelet premytý v 5 ml etanolu a znovu sцентрифugovaný - tento krát 10 minút pri 10 000g. Po maximálne možnom odstránení etanolu bola plazmidová DNA rozpustená v TE. Koncentrácia plazmidu bola určená spektrofotometricky.

2.3.2.9. *Transfekcia 293T Ca-P precipitáciou*

Na Petriho misky s priemerom 6cm bolo nasadených 5×10^5 buniek. Ako pozitívnu kontrolu úspešnosti transfekcie bol používaný plazmid exprimujúci GFP (pTR-UF2).

Samotný protokol je veľmi jednoduchý. Jednotlivé reagenty boli pipetované v tomto poradí: 180 μ l H₂O, 6 μ g DNA, 20 μ l 3M CaCl₂ a 200 μ l 2x koncentrovaného HBSS (Stratagene). Následne bola precipitačná zmes premiešaná, inkubovaná 3 minúty a pomaly prekvapkaná do média na bunkách.

Bunky boli inkubované 48 hodín v termostate. Už po 24 hodinách bolo možné vizuálne skontrolovať úspešnosť transfekcie – GFP pod UV svetlom zeleno fluoreskuje. Podľa množstva transfekovaných buniek produkujúcich GFP bolo možné približne odhadnúť úspešnosť transfekcie.

2.3.2.10. *Western blot*

Funkčnosť skonstruovaných plazmidov bola overovaná pomocou metódy Western blot. Samotná metodika pozostáva z niekoľkých krokov: a) príprava lyzátu z transfekovaných buniek; b) SDS page elektroforéza; c) polosuchý blot; d) imunoprecipitácia; e) vizualizácia.

Pri príprave lyzátu boli transfekované bunky (1×10^6) ešte na miske 2x opláchnuté 1 ml PBS a následne spláchnuté pipetovaním do 1 ml PBS. Po 5 minútovej centrifugácii pri 3000 g a 4 °C bolo PBS zliate a sedimentované bunky boli na ľade lýzované 200 μ l Kaufmanovho roztoku. Prípadné zvyšky sedimentu boli rozbité krátkym vortexovaním. Opakovaným presávaním (10x) cez injekčnú ihlu došlo k deštrukcii dlhých úsekov jadrovej DNA a tým k zníženiu viskozity lyzátu. Po krátkej centrifugácii, slúžiacej na odstránenie vzniknutej peny, bolo presávanie cez ihlu zopakované. K lyzátu bola pridaná farbička (BFM). Proteíny obsiahnuté v pripravenom lyzáte boli denaturované 5 minút teplotou 98°C.

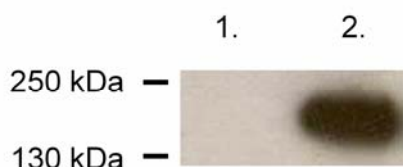
Proteíny zo spracovaného lyzátu boli nanesené na 10% SDS gél a 1 hodinu elektroforeticky separované. Konštantný prúd použitý na 1 gél mal hodnotu 20 mA.

Po elektroforéze bol gél 20 minút inkubovaný v TGM s obsahom 15% metanolu. Medzitým bola PVDF membrána pripravovaná na polosuchý blot. Aktivácia membrány začala 10 sekundovou inkubáciou v metanole, pokračovala 5 minútovým ponorením do "ultra pure" H₂O a končila 10 minútovou inkubáciou v TGM s obsahom 15% metanolu. PVDF membrána aj SDS gél boli umiestnené medzi dva hrubé filtračné papiere, navlhčené v roztoku TGM a 15% metanolu. Blotovanie prebiehalo 1 hodinu, pri konštantnom prúde 40 mA na 1 gél.

Fáza imunoprecipitácie bola zahájená opláchnutím membrány v "ultra pure" vode a hodinovým blokovaním v 10% odstredenom mlieku. Nasledovala inkubácia do druhého dňa (cca 16 hodín) v primárnej protilátke, 1000 krát riedenej v odstredenom 10% mlieku. Po troch 10-minútových premývaniach v PBS s 0,1% Tween-om bola pridaná sekundárna protilátka, značená peroxidázou, 2000 krát riedená v 10% odstredenom mlieku. Inkubácia so sekundárnou protilátkou trvala 1 hodinu. Následne bola membrána 3 krát po 10 minút premytá v primeranom objeme roztoku PBS s 0,1% Tween-om. Posledné premývanie bolo v čistom PBS (bez Tween-u). Trvalo takisto 10 minút.

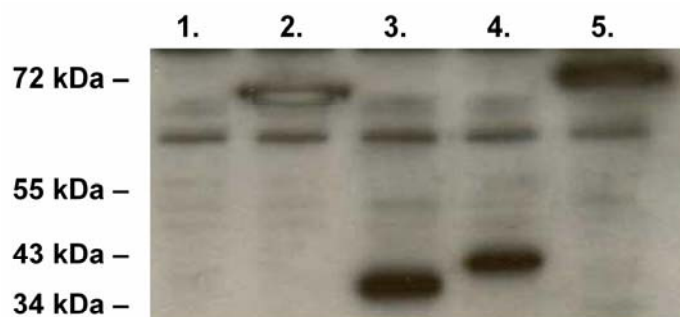
Na vizualizáciu bol použitý kit "ECL plus western blotting detection system" (Amersham, Buckinghamshire, Veľká Británia). Fotografický film bol exponovaný podľa intenzity luminiscenčnej reakcie prebiehajúcej na PVDF membráne. Išlo o čas v intervale desiatok sekúnd až desiatok minút.

Pri detekcii produktov tvorených po transfekcii rozličnými plazmidmi boli použité rozličné primárne aj sekundárne protilátky. Celý proteín BCR-ABL bol detegovaný pomocou myšieho monoklonálu proti C-koncovkej časti ABL (Oncogene research Products, Boston, USA). Na obrázku 2.3. je zobrazená expresia plazmidu pBSC/bcr-abl.



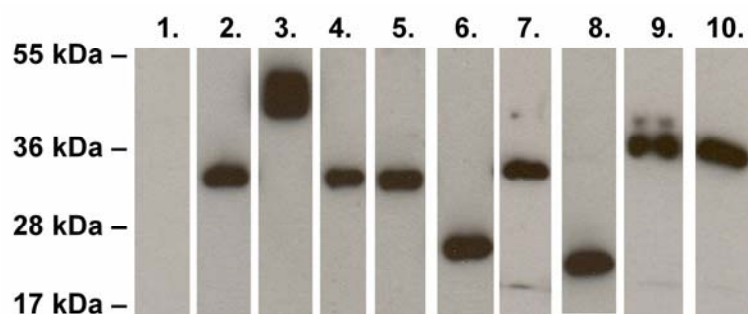
Obr. 2.3. Western blot s lyzátmi buniek 293T, ktoré boli transfekované plazmidmi: 1. pBSC, 2. pBSC/bcr-abl.

Najširšie spektrum protilátok použiteľných pre overenie funkčnosti plazmidov bolo dostupné u konštruktov kódujúcich spojovú oblasť BCR-ABL. K dispozícii bol jednak králičí polyklonál proti fúznej oblasti (111), jednak monoklonál proti sekvencii FLAG pridanej pomocou PCR (Amersham). Ďalej bolo možné použiť monoklonálne protilátky proti niektorým produktom imuno-stimulačných génov ku ktorým bola pridaná sekvencia spoja BCR-ABL. Išlo o protilátky anti-HSP70 (StressGen Biotechnologies Corp, Victoria, Kanada) a anti-GUS (Invitrogen, Leiden, Holandsko). Na obrázku 2.4 je znázornený výsledok detekcie produktov jednotlivých plazmidov pomocou králičieho polyklonálu.



Obr. 2.4. Western blot s lyzátmi buniek 293T, ktoré boli transfekované plazmidmi: 1. pBSC, 2. pBSC/bcr-abl25aa HSP70, 3. pBSC/CP bcr-abl25aa, 4. pBSC/L2CP bcr-abl25aa, 5. pBSC/bcr-abl25aa GUS.

Produkty plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty BCR-ABL mohli byť detegované iba pomocou pridanej sekvencie FLAG. Výsledok Western blotu potvrdzujúceho expresiu jednotlivých fragmentov je na obrázku 2.5.



Obr. 2.5. Western blot s lyzátmi buniek 293T, ktoré boli transfekované plazmidmi: 1. pBSC, 2. pBSC/OD, 3. pBSC/SH2B, 4. pBSC/Dbl, 5. pBSC/Rho, 6. pBSC/SH3/SH2, 7. pBSC/SH1, 8. pBSC/CRKBD, 9. pBSC/NLS, 10. pBSC/DNA/ABD.

Na vizualizáciu špecifických prúžkov proteínu boli používané sekundárne protilátky s naviazanou peroxidázou (HRP - horse radish peroxidase). Výber sekundárnej protilátky vždy závisel od zvierat'a, v ktorom boli produkované protilátky primárne. Pre králičí polyklonál proti spoju BCR-ABL a anti-GUS protilátku, tiež produkovanú v králikovi, to bol kozí monoklonál proti králičej protilátke - goat anti-rabbit (Amersham). Ostatné použité protilátky boli myšacie monoklonály, a teda ako sekundárna protilátka bola použitá v ovci produkovaná protilátka proti myším protilátkam - sheep anti-mouse (Amersham).

2.4. *Stručný popis vakcín a adjuvans použitých pri kombinovaných pokusoch*

Pri niektorých experimentoch boli pri imunizácii použité aj iné preparáty ako plazmidová DNA. Jednalo sa buď o látky, ktorých úlohou bolo zvýšenie imunizačného potenciálu DNA vakcín (tzv. adjuvans), alebo o vakcíny skonštruované na inom princípe ako DNA vakcíny. V prvom prípade išlo o a) oligodeoxynukleotidy (CpG); b) konjugát rekombinantného cholera toxínu B a CpG (112); c) nekompletné Freundovo adjuvans. V druhom prípade išlo o a) peptidom pulzované dendritické bunky; b) rekombinantný vírus vakcínie; c) rekombinantný CyaA toxín.

2.4.1. Adjuvans použité pri intramuskulárnej imunizácii

2.4.1.1. *CpG*

Vo všetkých experimentoch boli použité oligodeoxyribonukleotidy ODN 1826, ktoré aktivujú cytotoxické lymfocyty, ako aj NK bunky (113). Ich sekvencia bola: 5' TCCATGACGTTCCCTGACGTT 3'.

2.4.1.2. *Konjugát rCTB a CpG*

Príprava konjugátu rCTB a CpG prebehla následne: Po zmeraní koncentrácie boli oligonukleotidy aj cholera toxín zahustené a prevedené do PBS s 5 mM EDTA (v prípade rCTB), alebo 10 mM EDTA (v prípade CpG). Keďže syntetické oligonukleotidy obsahujú phosphorothioátové skupiny (hlavne na 5' konci), mohli byť použité bez akejkoľvek modifikácie s tým, že sa dá očakávať reaktivita prítomných SH skupín. Cholera toxín bolo nutné pred samotnou konjugáciou modifikovať. Maleimidovaný rCTB bol pripravený pridaním sulfo-SMCC (sulfo-succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) k rCTB v PBS s 5 mM EDTA. Inkubácia pri laboratórnej teplote trvala 45 minút. Aktivovaný rCTB bol zmiešaný s roztokom CpG v pomere 1:1 a za občasného premiešania inkubovaný pri laboratórnej teplote 3 hodiny. Po pridaní cysteínu bol roztok inkubovaný ďalších 30 minút pri laboratórnej teplote a následne 48 hodín pri 4°C (v chladničke). Výsledný roztok bol prefiltrovaný centrifugáciou cez 0,22 µm filter a následne odsolený (ZEBA kolonka) a zahustený (filter 10 kDa cut off).

2.4.1.3. IFA

Pri subkutálnej aplikácii peptidu bola na posilnenie imunitnej odpovede použitá zmes nekompletného Freundovho adjuvans (IFA - incomplete Freund's adjuvant) a CpG, popísaného v kapitole 2.4.1.1. Množstvo použitého CpG bolo 30 μg v 200 μl IFA (s pridanými 100 μg peptidu) na jednu dávku.

2.4.2. Pulzované dendritické bunky

Bunky vyizolované z kostnej drene získanej zo stehenných kostí myší BALB/c boli nasadené na Petriho misky s priemerom 10 cm, v počte 4×10^6 , do 10 ml R10 média s pridaným FBS (10%) (Gibco) a 10% supernatant z AG3 hybridómovej kultúry (R10-GM). Po troch dňoch bolo pridaných ďalších 10 ml média R10. Na šiesty deň bola polovica objemu bunkovej kultúry scentrifugovaná, následne vrátená do pôvodnej Petriho misky a resuspendovaná v 10 ml čerstvého média. Na deviaty deň boli bunky pomocou jemného pipetovania opláchnuté, scentrifugované a resuspendované v novej miske, v médiu R10-GM s pridaným $\text{TNF}\alpha$ 10 ng/ml (Sigma), do výslednej koncentrácie 4×10^6 /ml. Na desiaty deň boli bunky stočené a resuspendované v RPMI médiu, obsahujúcom 10% myšie sérum. Nasledovalo pulzovanie s peptidom "GFKQSSKAL", vo výslednej koncentrácii 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptidu, za prítomnosti β 2 mikroglobulínu s koncentráciou 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Koncentrácia dendritických buniek bola 10^6 /ml. Inkubácia pri 37°C trvala 3 hodiny.

Štádium maturácie buniek bolo určené na základe analýzy expresie povrchových proteínov (MHC II, CD80, CD86 a CD11c) pomocou prietokovej cytometrie.

2.4.3. Rekombinantný vírus vakcínie

Príprava rekombinantných vírusov vakcínie začala konštrukciou plazmidu vhodného na rekombináciu. Do plazmidu pSC59-H5 (114), naštípeného restriktčnými enzýmami EcoRI a Hind III (BioLabs) bol vligovaný fragment bcr-abl25aa HSP70, ktorý bol získaný vyštípením z plazmidu pUC131/bcr-abl25aa HSP70, čo bol medziprodukt pri príprave pBSC/bcr-abl25aa HSP70. V plazmide pSC59-H5-bcr-ablHsp70 bola expresia fúzneho génu pod kontrolou VACV-H5 promótoru.

Rekombinantné vírusy boli pripravené z klonov MVA klon2 a Praha (P13), ktoré boli namnožené buď na kuracích fibroblastoch (MVA), alebo na opičích obličkových bunkách CV-1 (P13). Na selekciu TK- rekombinantov boli použité TK deficientné RAT2 potkanie bunky. Pripravené rekombinantné vírusy boli pomenované MVA bcr-abl25aa HSP70 a P13 bcr-abl25aa HSP70 a prečistené centrifugáciou v sacharózovom gradiente. Expresia produktu bola overená pomocou Western blotu.

2.4.4. CyaA toxín

Adenylát cykláza baktérie *Bordetella pertussis* (CyaA) penetruje do cytoplazmy buniek exprimujúcich na svojom povrchu CD11b/CD18. Keďže medzi tieto bunky patria aj dendritické bunky, je možné využiť túto vlastnosť na nasmerovanie proteínu priamo do nich (115).

Produkcia rekombinantného CyaA toxínu prebehla nasledovne: a) fragmenty zo spoja bcr-abl (bcr-abl25aa a bcr-abl9aa) boli amplifikované pomocou PCR. Fragment kódujúci 25 aminokyselín bol zhodný s fragmentom použitým v DNA vakcínach, fragment bcr-abl9aa kódoval sekvenciu epitopu " GFKQSSKAL"; b) nasledovala inzercia do BsrGI restrikčných miest génu CyaA, ktorý bol naklonovaný v plazmide pT7CACT1 BsrGI; c) orientácia a lokalizácie inzertov bola stanovená sekvenáciou (Použité boli konštrukty, ktoré boli vligované do miesta 336.); d) rekombinantný proteín bol produkovaný v baktériách *Escherichia coli*, následne purifikovaný; e) bola stanovená jeho enzymatická (adenylát kinázová) aktivita a invazivita. Takto pripravený a overený rekombinantný CyaA toxín bol použitý v *in vivo* experimentoch.

2.5. *Imunizácia*

Imunizácia a následná aplikácia nádorových buniek bola základnou metódou testovania účinnosti pripravených vakcín. V drvinej väčšine experimentov bola použitá imunizácia pomocou prístroja gene-gun (Bio Rad - Helios, Philadelphia, USA) (Obr. 2.6.), prípadne jej kombinácia s iným typom vakcíny podanej injekčne.



Obr. 2.6. Prístroj gene-gun používaný na intradermálnu imunizáciu s DNA vakcínami.

2.5.1. Imunizácia pomocou prístroja "gene-gun"

2.5.1.1. *Príprava nábojov*

"Náboj" predstavuje 1 cm úsek plastovej hadičky, z vnútra pokrytej zmesou plazmidovej DNA a zlatých častíc s priemerom 1 μm . Jeden náboj by mal obsahovať približne 1 μg DNA a 0,5 μg zlata.

Pri príprave nábojov bolo postupované podľa protokolu dodaného výrobcom (Bio Rad - Helios). Stručne: Pridaním 100 μl 1 M CaCl_2 do suspenzie 25 mg zlata, 50 μl DNA s koncentráciou 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 100 μl 0,05 M spermidínu počas vortexovania bol docielený vznik zrazeniny obsahujúcej agregáty zlatých častíc a plazmidovej DNA. Po krátkej inkubácii a troch premytiach v 1 ml 100% etanolu, bolo do zmesi pridaných 180 μl etanolového roztoku PVP s koncentráciou 0,05 mg/ml. Suspenzia bola prenesená do hadičky, kde sa zrazenina usadila na jej stenách. Následne bola opatrne odsatá tekutá časť zmesi a zrazenina zlata a DNA bola otáčaním rozprestretá a prúdom dusíku usušená. Nasekaním hadičky na 1 cm úseky vznikli DNA "náboje" pripravené na imunizáciu.

2.5.1.2. Aplikácia DNA s použitím prístroja "gene-gun"

Imunizácia pomocou prístroja gene-gun je svojou podstatou balistická metóda. DNA, prichytená na zlatých časticiach, je pomocou prúdu hélia (400 Psi) doslova vstrelená do buniek pokožky v oblasti brucha. Na takúto procedúru musí byť myš pripravená oholením príslušných partií tela. V jedna dávka (= 1 náboj) obsahuje 1 µg DNA. Ak nie je uvedené ináč, imunizačná schéma pozostávala z podania 3 dávok, s tým, že medzi jednotlivými dávkami bol časový interval 2 týždňov. Po ďalších dvoch týždňoch boli podané nádorové bunky. V prípade vakcín založených na zmesiach plazmidov, jedna dávka pozostávala z 2 µg DNA, teda pri jednej imunizácii boli aplikované 2 náboje, namiesto jedného.

2.5.2. Podanie vakcín injekčne

Okrem intradermálnej aplikácie DNA vakcín pomocou gene-gunu boli niektoré vakcíny podávané injekčne. Intramuskulárne boli podávané plazmidy, prípadne ich zmesi s CpG a konjugátom CpG a rekombinantnej podjednotky B cholera toxínu (rCTB-CpG). Pri tomto spôsobe imunizácie bolo do stehenného svalu vpravovaných vždy 100 µg DNA v 100 µl roztoku.

Subkutálne bol podaný nonapeptid GFKQSSKAL zo spoja BCR-ABL. Peptid (100 µg) v zmesi s IFA a CpG bol injikovaný do oblasti nad chvostom. Celkový objem jednej dávky bol 200 µl. Celkovo boli podané 2 dávky. Bol medzi nimi dvojtýždňový časový interval.

Intraperitoneálnym podaním boli aplikované vakcíny založené na dendritických bunkách (DC), vakcíny založené na rekombinantnom víruse vakcínie a vakcíny obsahujúce CyaA toxín. Pri imunizácii bol vo všetkých spomenutých prípadoch vždy injikovaný objem 500 µl. Dendritických buniek bolo v 1 dávke podaných 5×10^5 , CyaA 50 µg na dávku a ako 1 dávka vírusu slúžilo 10^7 PFU.

2.6. Meranie nádorov a vyhodnocovanie výsledkov

Pri získavaní výsledkov boli aplikované následné kritériá: a) objavovanie sa nádoru/leukémie; b) prežívanie myší; c) veľkosť nádoru (iba u 12B1).

Ako "objavenie sa nádoru" bolo označené prvé palpačné zistenie hmatateľného útvaru v mieste subkutálneho vpichu nádorových buniek 12B1. Za prejav objavujúcej sa leukémie bolo považované pozorovanie malátnosti, naježenej srsti, zníženej aktivity a pohyblivosti, prípadne znížený svalový tonus (ochabnutie) tela zvierat'a. Po podaní buniek 12B1 bola často pozorovaná paralýza zadných končatín, pravdepodobne spôsobená masívnou infiltráciou nádorových buniek do miechy (103).

"Prežívanie myší" bolo kvôli relatívne vysokej variabilite možných prejavov a s ohľadom na nutnosť humánneho zachádzania so zvieratami definované relatívne široko. Ako "mŕtva" bola označená tá myš, ktorá spĺňala aspoň jedno z nasledujúcich kritérií: a) dosiahnutie veľkosti nádoru viac ako 20 mm aspoň v jednom rozmere; b) závažné prejavy ochorenia leukémiou u zvierat s nádorom nedosahujúcim kritický rozmer, prípadne bez hmatateľného nádoru; c) smrť chorého zvierat'a. Myši, ktoré splnili kritérium a), alebo b) boli vyradené z pokusu a humánne usmrtené. Leukémia bola potvrdená nálezom splenomegálie pri pitve, prípadne histologickým vyšetrením.

Posledným vyhodnocovaným údajom pri *in vivo* experimentoch bola "veľkosť nádoru". To bolo samozrejme možné iba v prípadoch subkutálneho podania buniek 12B1. U malých nádorov bola veľkosť odhadovaná palpačne, nádory väčšie ako cca 3 mm boli merané posuvným meradlom. Vždy boli merané 2 navzájom kolmé rozmery nádoru - meraná bola teda plocha nádoru.

Pri odčítaní výsledkov bola vždy snaha, aby jednotlivé merania robila vždy jedná a tá istá osoba.

Pre zjednodušenú orientáciu je v popisoch všetkých grafov v zátvorke vždy na prvom mieste udávaný počet myší ktoré vytvorili nádor, nasledovaný celkovým počtom myší v skupine.

2.7. *Detekcia bcr-abl pozitívnych buniek pomocou RT-PCR*

2.7.1. Izolácia a spracovanie vzoriek

Pečene a sleziny boli skladované pri -70°C až do vyšetrenia. Naproti tomu izolácia RNA z kostnej drene bola robená okamžite po odbere.

2.7.2. Izolácia RNA

Pred samotnou extrakciou boli vzorky tkanív (250 mg pečene, alebo sleziny; $4-10 \times 10^6$ buniek kostnej drene) homogenizované. Celková RNA bola izolovaná s pomocou Qiagen Rnasy Midi Kit-u a RNase-Free DNase Set-u podľa inštrukcií výrobcu. Koncentrácia vyizolovanej RNA bola zmeraná na spektrometre (BioMate 3, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) a kvalita bola overená na agarózovom gély.

RNA určená na použitie pri reverznej transkripcii bola ešte dodatočne opracovaná DNAsou I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemecko) pri 37°C , 30 minút, ktorá bola následne inaktivovaná pri 65°C , 10 minút.

2.7.3. Reverzná transkripcia

Pri reverznej transkripcii boli použité 2 μg RNA, primer oligo(dT)₁₈, MMLV reverzná transkriptáza (Promega, Madison, WI, USA) a Rnasin (Promega). Po počiatkovej 10 minútovej denaturácii pri 70°C , nasledovala 60 minútová inkubácia pri 37°C .

2.7.4. Amplifikácia cDNA

Prítomnosť transkriptov bcr-abl bola stanovovaná pomocou nested PCR. Externé primery amplifikovali fragment dlhý 327 bázových párov, interné primery amplifikovali fragment dlhý 245 bázových párov. Amplifikovaný fragment bol lokalizovaný v oblasti spoja fúzneho génu bcr-abl v konfigurácii b3a2. Ako interná kontrola kvality cDNA boli použité primery špecifické pre β -aktín, ktoré amplifikovali úsek veľký 166 bázových párov.

Tabuľka 2.5	
Primery použité pri RT-PCR	
Primer	Sekvencia primeru
primer oligo(dT) ₁₈	5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
externý primer - forward	5' TTCAGAAGCTTCTCCCTG 3'
externý primer - reverse	5' CTCCACTGGCCACAAAAT 3'
interný primer - forward	5' GTGAAACTCCAGACTGTC 3'
interný primer - reverse	5' CAACGAAAAGGTTGGGGT 3'
primer pre β -aktín - forward	5' CCACTGGGACGACATGGAGAAGAT3'
primer pre β -aktín - reverse	5' CATGGCTGGGGTGTGAAGGTC 3'

Obe PCR reakcie prebehli v objeme 50 μ l. Pre amplifikáciu bola použitá Taq polymeráza (0,5U/reakcia) (Fermentas, Vilnius, Litva). Reakčná zmes ďalej obsahovala 1x koncentrovaný pufer (NH₄)₂ SO₄ (Fermentas), 250 pM príslušných primerov, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM deoxinukleotidtrifostátov. Ako matrica pri druhej PCR reakcii bol použitý 1 μ l z 10x riedeného PCR produktu z prvej reakcie. RNA z buniek B210 slúžila ako pozitívna kontrola, RNA z buniek HL60 ako negatívna kontrola.

Pri oboch PCR bol použitý nasledujúci program: a) začiatková denaturácia - 94°C - 5 minút; b) 35 cyklov - 94°C - 1 minútu, 57°C - 90 sekúnd, 72°C - 90 sekúnd; c) 72°C - 7 minút.

Pri teste citlivosti bola táto metodika schopná detegovať <10 - <100 bcr-abl pozitívnych buniek (12B1) v 10⁶ buniek negatívnych (HL60).

2.8. *Použitý software*

2.8.1. Predikcia epitopov

Predikcia epitopov bola urobená s použitím online softvéru "RANKPREP". (<http://www.bio.drgci.harvard.edu/RANKPEP>).

2.8.2. Analýza sekvencií

Sekvence ľudských aj myších cDNA pre Bcr a Abl boli získané z NCBI Entrez databázy. Na ich porovnanie bol použitý softvér "Clone Manager 9".

2.8.3. Konštrukcia plazmidových máp

Pre tvorbu restričných máp plazmidov, návrhy nových konštruktov a prípravu restričnej analýzy bol opäť využitý softvér "Clone Manager 9".

2.8.4. Tvorba grafov a štatistické analýzy

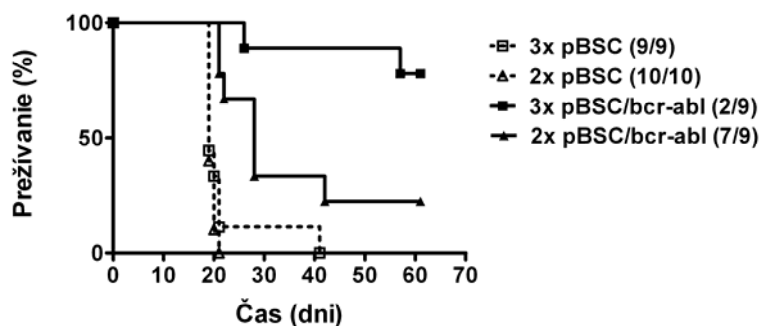
Získané výsledky boli graficky spracované ako aj štatisticky analyzované pomocou softvéru "GraphPad Prism 4". Pri hodnotení kriviek prežívania bol použitý log-rank test, pri krivkách rastu nádorov two-way ANOVA.

3. Výsledky

3.1. Imunizácia plazmidom kódujúcim celý proteín BCR-ABL

Ako prvý bol v *in vivo* experimente testovaný konštrukt kódujúci celý proteín BCR-ABL, označený ako pBSC/bcr-abl. Cieľom experimentu bolo zistiť, či je tento plazmid schopný navodiť ochranu proti bcr-abl-pozitívnym bunkám a porovnať imunizačný efekt dvoch a troch dávok plazmidu podaných intradermálne. Jednotlivým skupinám myší boli gene-gunom aplikované buď dve alebo tri dávky plazmidu pBSC/bcr-abl, paralelne s tým, ako kontrola, dve alebo tri dávky prázdneho vektoru (pBSC). Medzi podaním vakcín bol vždy interval dvoch týždňov, po ďalších dvoch týždňoch boli intravenózne podané nádorové bunky B210 (5×10^5). Z obrázku č. 3.1 je zrejmé, že rozdiel medzi skupinami, ktoré boli imunizované plazmidom pBSC/bcr-abl a prázdny vektorom (pBSC) bol vysoko signifikantný ($p < 0,001$). Zároveň dosiahnutá ochrana pred bunkami B210 bola signifikantne ($p < 0,02$) vyššia pri skupine, ktorá bola imunizovaná trikrát.

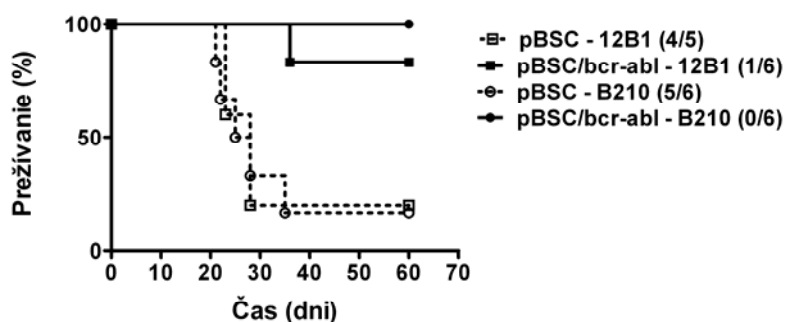
Na základe dosiahnutého výsledku, boli takmer pri všetkých ďalších imunizačných experimentoch aplikované 3 dávky DNA vakcíny, s dvojtýždňovými intervalmi medzi jednotlivými dávkami.



Obr. 3.1. Prežívanie myší imunizovaných 2, alebo 3 dávkami pBSC/bcr-abl a myší ošetrovaných 2, alebo 3 dávkami prázdneho plazmidu po podaní buniek B210.

Vzhľadom na možnosť využiť schopnosť buniek 12B1 tvoriť po subkutálnom podaní solídne nádory, bol urobený experiment zameraný na porovnanie ochranného účinku imunizácie plazmidom pBSC/bcr-abl jednak proti intravenózne podaným bunkám B210, ako aj proti subkutálne podaným bunkám 12B1. Jednotlivé skupiny myší boli buď imunizované

tromi dávkami plazmidu pBSC/bcr-abl, alebo boli ošetrené prázdnyim vektorom (pBSC). Výsledný ochranný efekt imunizácie voči podaným nádorovým bunkám bol porovnateľný. V oboch prípadoch bol rozdiel v prežívaní imunizovaných myší a myší z negatívnej kontroly signifikantný $p < 0,005$ pre B210 a $p < 0,02$ pre 12B1. (Obrázok č. 3.2). Na základe tohto výsledku boli v nasledujúcich experimentoch používané takmer výhradne tumor tvoriace bunky 12B1, čím bol získaný ďalší parameter umožňujúci presnejší popis dynamiky vývoja experimentálne vyvolaného ochorenia.

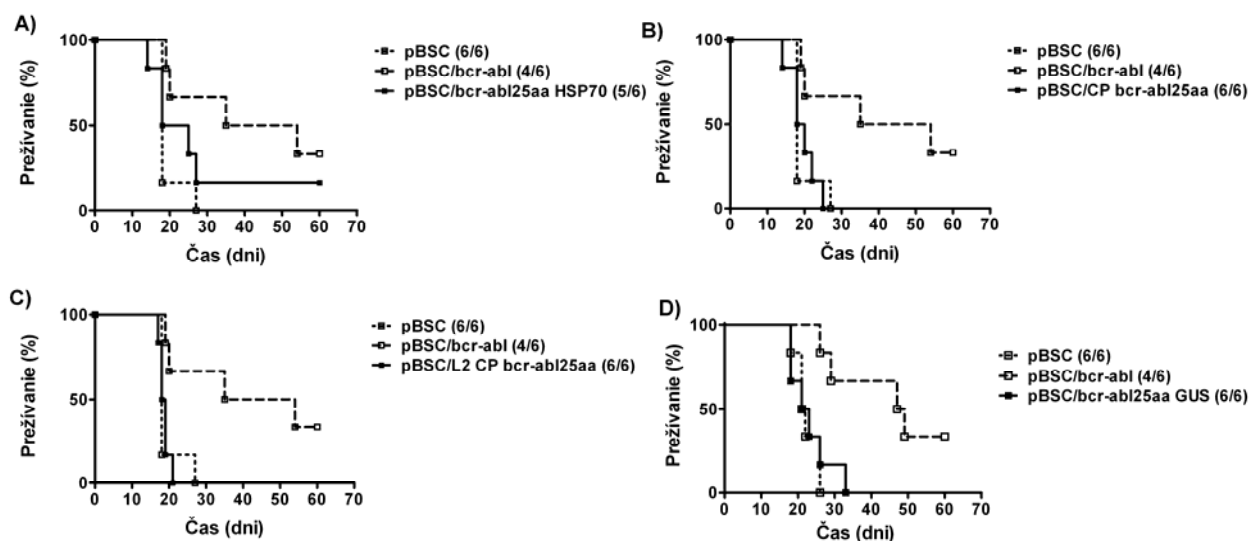


Obr. 3.2. Prežívanie myší imunizovaných plazmidom pBSC/bcr-abl a myší ošetrených prázdnyim plazmidom po intravenóznom podaní buniek B210, alebo subkutálnom podaní buniek 12B1.

Záverom je možné výsledky úvodných pokusov zhrnúť tak, že plazmid pBSC/bcr-abl je schopný navodiť po intradermálnom podaní ochranu proti bunkám B210 ako aj 12B1. Navodená ochrana bola výrazne vyššia po troch dávkach než po dvoch.

3.2. Výsledky imunizácie plazmidmi kódujúcimi 25 aminokyselinovú sekvenciu fúznej oblasti BCR-ABL

Ako ďalšie v poradí boli testované plazmidy kódujúce 25 aminokyselinovú sekvenciu fúznej oblasti proteínu BCR-ABL. Išlo o konštrukty pBSC/bcr-abl25aa HSP70, pBSC/CP bcr-abl25aa, pBSC/L2CP bcr-abl25aa a pBSC/bcr-abl25aa GUS. Napriek tomu, že práve spoj BCR-ABL je unikátna, novovzniknutá sekvencia, navyše, v prípade vymenovaných konštruktov je táto sekvencia pripojená ku génom, ktorých produkty v iných systémoch výrazne posilnili imunitnú odpoveď proti antigénu (109, 116), boli výsledky imunizácie negatívne. Ako je vidieť z obrázku 3.3 A-D, štatisticky významnú ochranu proti bunkám 12B1 navodil iba plazmid pBSC/bcr-abl, použitý ako pozitívna kontrola ($p < 0,005$). Prežívanie myší ošetrovaných plazmidmi nesúcimi sekvenciu pre fúzu oblasť bcr-abl v podstate kopírovalo krivku prežívania myší ošetrovaných prázdny plazmidom. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj po intravenóznom podaní buniek B210 (data neuvedené).

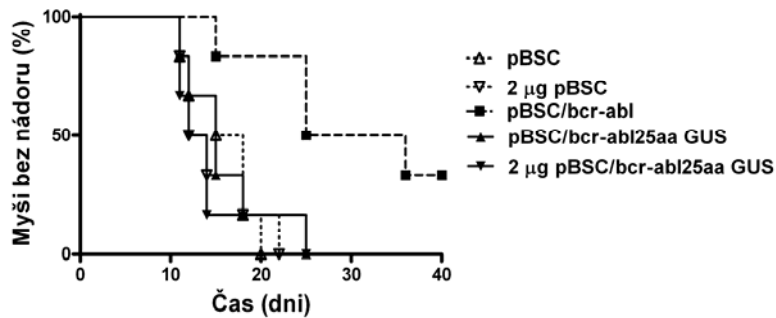


Obr. 3.3. Prežívanie myší imunizovaných plazmidmi: A) pBSC/bcr-abl25aa HSP70; B) pBSC/CP bcr-abl25aa; C) pBSC/L2CP bcr-abl25aa a D) pBSC/bcr-abl25aa GUS po subkutálnom podaní buniek 12B1. Plazmidy pBSC/bcr-abl a pBSC boli použité ako pozitívna a negatívna kontrola.

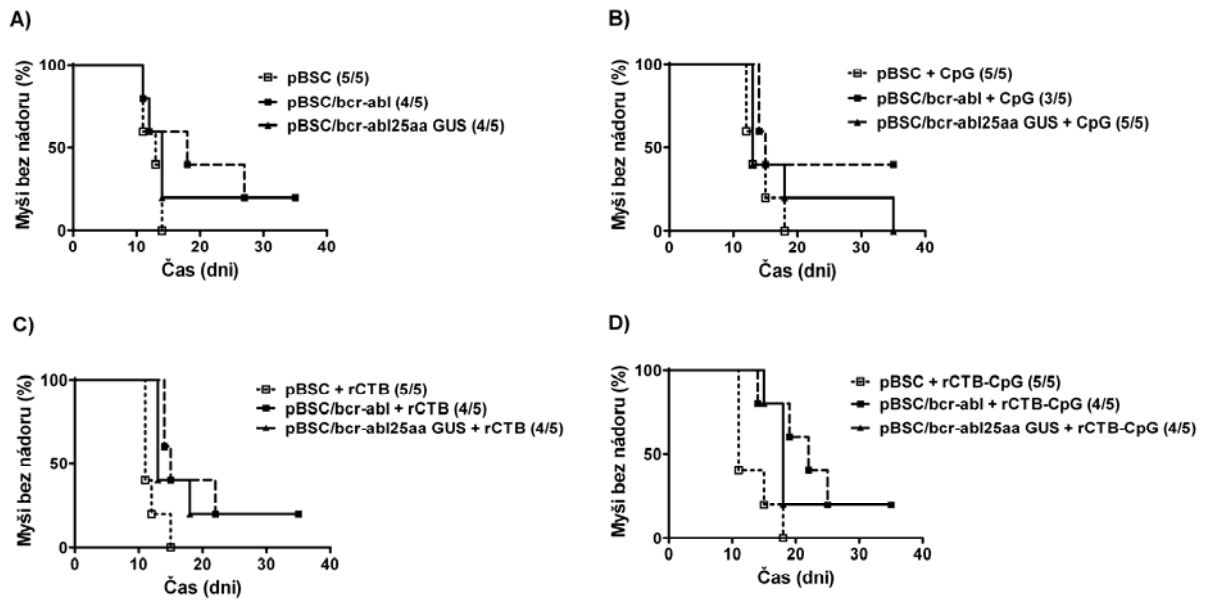
Vzhľadom na neúspech pokusu navodiť imunitnú odpoveď pomocou intradermálneho podania zmiených DNA vakcín, bol postup imunizácie modifikovaný. Išlo buď o zväčšenie množstva DNA aplikovanej v jednej dávke z 1 μg na 2 μg , alebo o zmenu spôsobu podania zo subkutálnej aplikácie gene-gunom na intramuskulárnu aplikáciu. Pri druhom spomínanom

spôsobе sa jednalo o množstvo 100 µg DNA na dávku, navyše obohatenú o CpG, prípadne konjugát rekombinantného cholératoxínu s CpG. K dávkovaniu oligonukleotidov je potrebné poznamenať, že aj keď sme v iných experimentoch používali dávku 30 µg CpG, v tomto prípade bola dávka znížená tak, aby odpovedala množstvu CpG v konjugáte s rCTB, a teda mohla slúžiť ako kontrola. Výsledne koncentrácie adjuvans použitých v pokuse teda boli: a) CpG: 4,2 µg / dávku; b) rCTB: 17,84 µg / dávku; c) rCTB-CpG: 17,84 µg / 4,2 µg / dávku.

Ako je zrejmé z obrázkov 3.4 a 3.5, žiadna spomínaná modifikácia imunizačného postupu neprinesla zlepšenie. Iba pBSC/bcr-abl navodil signifikantnú ochranu ($p < 0,01$) Navyše, plazmid pBSC/bcr-abl po intramuskulárnom podaní nenavodil takú ochranu, ako bola pozorovaná po intradermálnom podaní. Iba v prípade pridania konjugátu rCTB-CpG bol účinok pBSC/bcr-abl signifikantný ($p < 0,02$) (Obr. 3.5)



Obr. 3.4. Objavovanie sa nádorov po imunizácii 1 µg, alebo 2 µg pBSC/bcr-abl25aa GUS, a následnom podaní buniek 12B1. Plazmid pBSC/bcr-abl bol použitý ako pozitívna kontrola. Plazmid pBSC v množstve 1 alebo 2 µg ako negatívna kontrola.

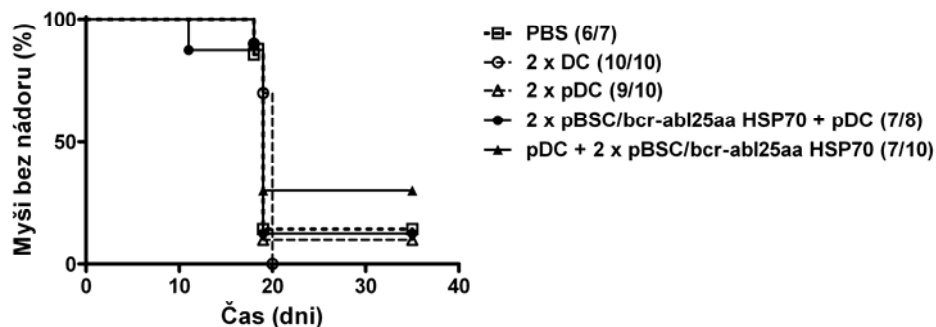


Obr. 3.5. Objavovanie sa nádorov po intramuskulárnej imunizácii plazmidom pBSC/bcr-abl25aa GUS a pBSC/bcr-abl a následnom podaní buniek 12B1. K jednotlivým skupinám bolo pridané nasledujúce adjuvans: A) bez adjuvans; B) CpG; C) rCTB; D) rCTB-CpG. Plazmid pBSC/bcr-abl bol použitý ako pozitívna a pBSC ako negatívna kontrola.

3.3. *Výsledky imunizácie kombináciami rozličných vakcín kódujúcich 25 aminokyselinovú sekvenciu fúznej oblasti BCR-ABL*

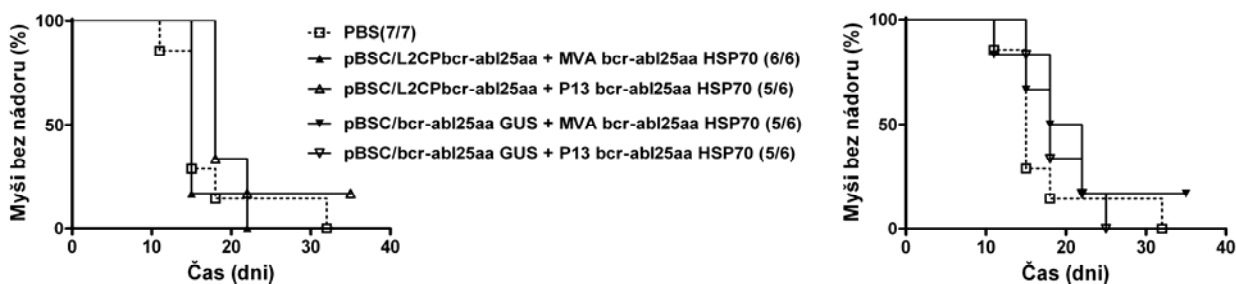
V snahe navodiť imunitnú odpoveď proti fúznej oblasti BCR-ABL bolo pristúpené k prime-boost experimentom. V spolupráci so skupinou Dr. Nemečkovej (Dr. Kutinová, Mgr. Mocová, Dr. Gabriel, Dr. Macková, Mgr. Heintz, Mgr. Babiarová) boli testované kombinácie DNA vakcín a dendritických buniek pulzovaných nonapeptidom z fúznej oblasti BCR-ABL, DNA vakcín a rekombinantného vírusu vakcínie exprimujúceho 25 aminokyselinovú sekvenciu zo spoja BCR-ABL pripojenú na N koniec HSP70, dokonca trojkombináciu DNA vakcíny, CyaA toxínu s pripojenou spojovou oblasťou BCR-ABL a rekombinantnej vakcínie. (Poznámka: V týchto experimentoch neboli použité všetky pripravené plazmidy nesúce fúznu oblasť bcr-abl. Pri výbere konkrétneho plazmidu zohrávalo úlohu viacero faktorov, ktoré boli ovplyvnené zameraním a cieľom experimentu. Ako ilustráciu neschopnosti daných plazmidov navodiť ochranu proti nádorovým bunkám však môžu byť predložené výsledky považované za dostatočné.)

Ako prvá bola testovaná kombinácia plazmidu pBSC/bcr-abl25aa HSP70 a dendritických buniek pulzovaných peptidom GFKQSSKAL. Imunizačné schéma zahŕňala skupinu myší, ktorým boli intradermálne podané 2 dávky DNA vakcíny, nasledované podaním pulzovaných dendritických buniek (5×10^5 v 500 μ l PBS), ako aj skupinu myší, ktoré najprv dostali pulzované dendritické bunky a až potom 2 krát po sebe DNA vakcínu. Ďalším skupinám slúžiacim ako kontroly boli podané pulzované, alebo nepulzované DC, a nakoniec, ako negatívna kontrola slúžila skupina, ktorej bolo intraperitoneálne aplikované PBS. Časový interval medzi jednotlivými dávkami, ako aj podaním nádorových buniek bol jeden týždeň. Ako challenge bolo intravenózne podaných 3×10^2 buniek 12B1. Z obrázku 3.6 je zjavné, že kombinácia dendritických buniek a DNA vakcíny nepriniesla žiadne významné navodenie ochrany proti podaným nádorovým bunkám.



Obr. 3.6. Objavovanie nádorov po imunizácii pulzovanými dendritickými bunkami, prípadne po imunizácii v prime-boost schéme kombináciou pulzovaných dendritických buniek a plazmidu pBSC/bcr-abl25aa HSP70. Ako kontrola bol použitý roztok PBS a nepulzované dendritické bunky.

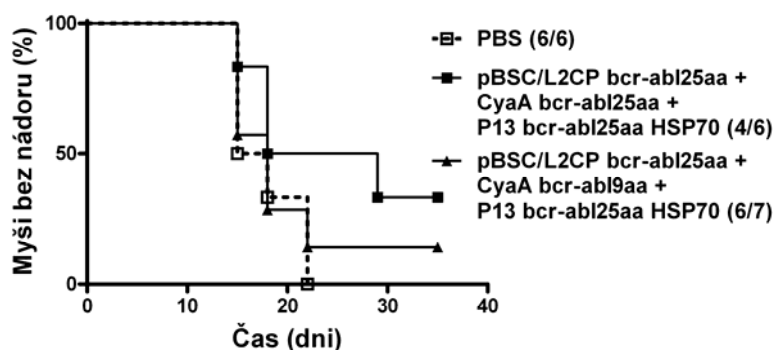
Následne boli testované kombinácie plazmidov pBSC/L2CP bcr-abl25aa a pBSC/bcr-abl25aa GUS a rekombinantných vírusov vakcín MVA bcr-abl25aa HSP70 a P13 bcr-abl25aa HSP70. Zatiaľ čo plazmid bol podaný intradermálne (1 μ g), vírus bol podaný intraperitoneálne (10⁷ PFU/dávku). Ako je zjavné z obrázku 3.7, všetky výsledky boli negatívne. Nebol pozorovaný žiadny rozdiel, ktorý by eventuálne mohol súvisieť s použitým typom DNA vakcíny, prípadne s použitým kmeňom rekombinantného vírusu vakcín.



Obr. 3.7. Objavovanie nádorov po imunizácii jednotlivými kombináciami plazmidov pBSC/bcr-abl25aa HSP70 a pBSC/bcr-abl25aa GUS a rekombinantných vírusov vakcín MVA bcr-abl25aa HSP70 a P13 bcr-abl25aa HSP70 v prime-boost schéme. Ako negatívna kontrola bol použitý roztok PBS.

Posledným pokusom o vyvolanie imunitnej odpovede bolo skombinovanie DNA vakcíny (pBSC/L2CP bcr-abl25aa), rekombinantného CyaA toxínu a rekombinantného vírusu vakcín (P13 bcr-abl25aa HSP70) do jednej imunizačnej schémy. Jednotlivé vakcíny boli

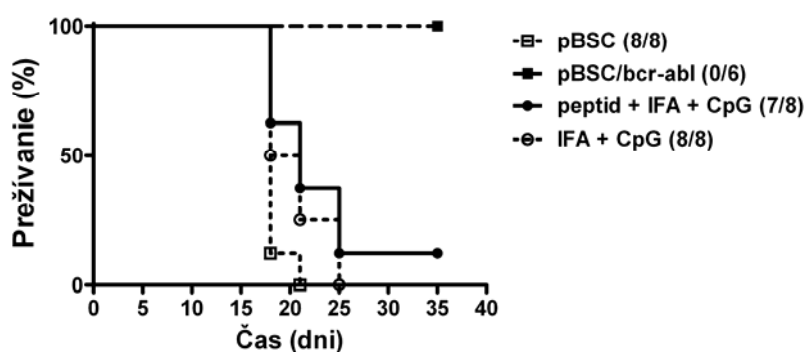
podané v spomenutom poradí, vždy s odstupom jedného týždňa. Dávkovanie DNA vakcín a vírusov bolo totožné s predchádzajúcim experimentom, rekombinantný CyaA toxín bol podaný v množstve 50 µg/500 µl intraperitoneálne. Nádorové bunky im boli podané 7 dní po poslednej imunizácii. Napriek tomu, že boli testované tri konštrukty CyaA, na obrázku (Obr. 3.8) sú znázornené iba dva: konštrukt kódujúci 25 aminokyselinový úsek spoja, prítomný v ostatných konštruktoch a konštrukt kódujúci nonapeptid, ktorý je zhodný s peptidom použitým pri imunizácii a pulzovaní dendritických buniek. Medzi skupinou imunizovanou konštruktom CyaA nesúcim 25 aminokyselinovú sekvenciu spoja BCR-ABL a negatívnou kontrolou bol pozorovaný určitý malý rozdiel, ktorý však nebol štatisticky významný.



Obr. 3.8. Objavovanie nádorov po imunizácii 3 typmi vakcín. DNA vakcína a rekombinantný vírus vakcínie boli v oboch prípadoch rovnaké - skupiny sa odlišovali dĺžkou sekvencie zo spoja BCR-ABL pridanej k CyaA. Ako negatívna kontrola bol použitý roztok PBS.

3.4. Výsledky imunizácie nonapeptidom odvodeným od spoja BCR-ABL

Po neúspechu rozličných vakcín založených na fúznej oblasti BCR-ABL bol urobený posledný experiment zameraný na overenie schopnosti peptidu GFKQSSKAL navodiť protekčnú imunitnú odpoveď v nami používanom modelovom systéme. Plazmidy pBSC a pBSC/bcr-abl, podané v 3 dávkach slúžili ako negatívna a pozitívna kontrola. Samotný peptid bol podaný 2 krát v rozmedzí 2 týždňov. Jednu dávku predstavovalo množstvo 100 µg peptidu, spolu s 30µg CpG (ODN 1826) v 200µl IFA. Ako ďalšia negatívna kontrola bolo použité nekompletné Freundové adjuvans s CpG v objeme 200 µl. Pozitívna kontrola navodila vysoko signifikantnú ochranu ($p < 0,001$). Nebola však pozorovaná žiadna štatisticky významná ochrana proti podaným nádorovým bunkám (12B1), ktorá by bola navodená peptidom. (Obr. 3.9)

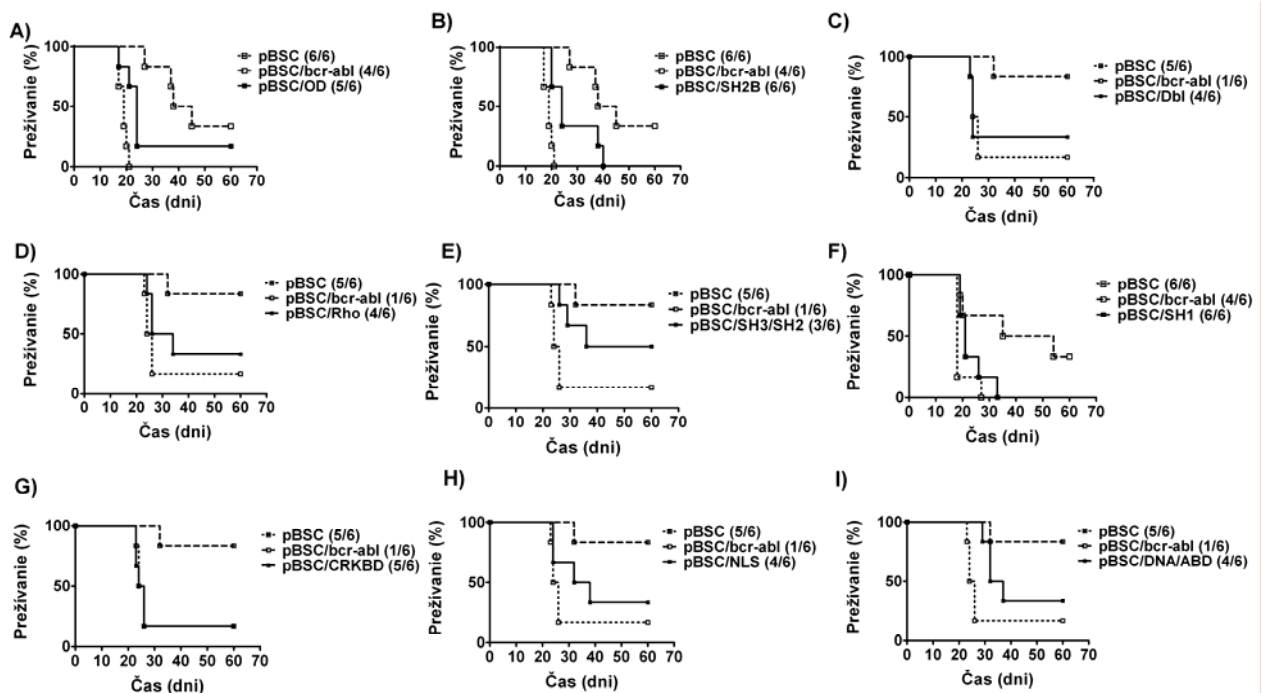


Obr. 3.9. Prežívanie myši imunizovaných peptidom GFKQSSKAL po subkutálnom podaní buniek 12B1. Ako pozitívna kontrola bol použitý plazmid pBSC/bcr-abl, ako negatívne kontroly plazmid pBSC a roztok IFA a CpG.

3.5. Výsledky imunizácie plazmidmi kódujúcimi jednotlivé fragmenty BCR-ABL

V snahe lokalizovať umiestnenie epitopu/epitopov sprostredkujúcich imunizačný efekt DNA vakcíny nesúcej celý fúzny gén, bola sekvencia bcr-abl rozdelená na 9 fragmentov. Výsledky imunizácie plazmidmi kódujúcimi jednotlivé úseky bcr-abl (pBSC/OD, pBSC/SH2B, pBSC/Dbl, pBSC/Rho, pBSC/SH3/SH2, pBSC/SH1, pBSC/CRKBD, pBSC/NLS, pBSC/DNA/ABD) sú zobrazené na obrázku 3.10.

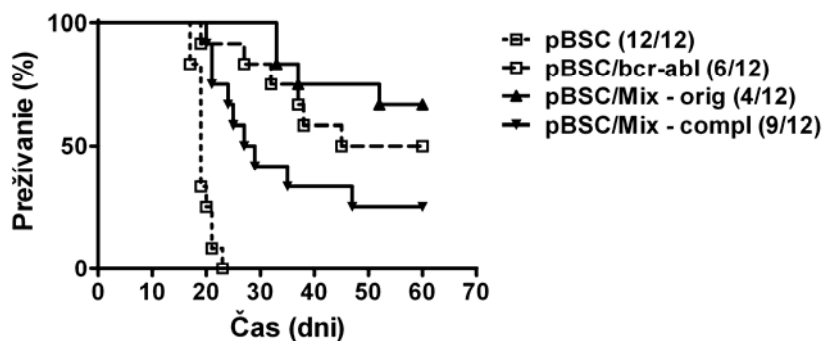
Z grafov znázorňujúcich krivky prežívania je zjavné, že žiadny z deviatich fragmentov nenavodil ochranu porovnateľnú s účinkom celého BCR-ABL. Aj keď u niektorých konštruktov bol náznak imunitnej odpovede, žiadny výsledok nebol signifikantne odlišný od negatívnej kontroly. Plazmid pBSC/bcr-abl, použitý ako pozitívna kontrola navodil štatisticky významnú ochranu vo všetkých prípadoch. (Pre A) a B) $p < 0,001$; pre C), D), E), G), H), I) $p < 0,02$; pre F) $p < 0,01$).



Obr. 3.10. Prežívania myši imunizovaných plazmidmi kódujúcimi fragmenty fúzneho proteínu BCR-ABL po subkutálnom podaní buniek 12B1. Ako pozitívna kontrola bol použitý plazmid pBSC/bcr-abl, ako negatívna kontrola plazmid pBSC.

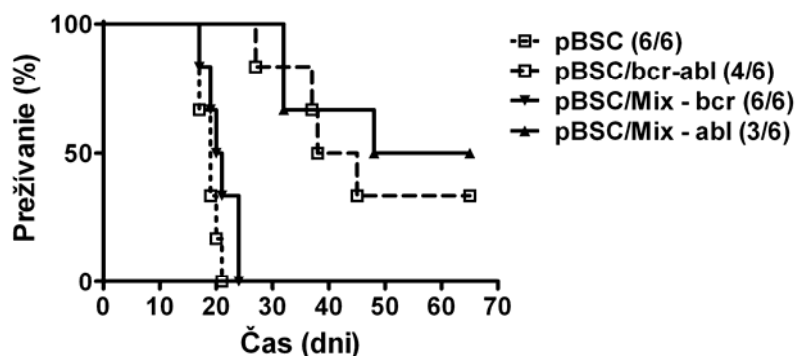
3.6. Výsledky imunizácie zmesami fragmentov pokrývajúcich celú sekvenciu bcr-abl

Vzhľadom na to, že žiadny z fragmentov bcr-abl neaktivoval imunitný systém do miery porovnateľnej s účinkom celého bcr-abl bolo pristúpené k imunizácii zmesami plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty. Ako prvá bola vytvorená a testovaná zmes pomenovaná "Mix-orig". Zloženie tejto zmesi bolo dané aktuálnou dostupnosťou konštruktov kódujúcich jednotlivé fragmenty. Na základe predpokusov s týmto nekompletným setom plazmidov, ktorý imunizuje porovnateľne ako pBSC/bcr-abl, bol výsledok získaný imunizáciou kompletným setom, nazvaným "Mix-compl", prekvapujúci. Rozdiel medzi účinkom Mix-orig a Mix-compl je štatisticky významný ($p < 0,02$). (Obr. 3.11)



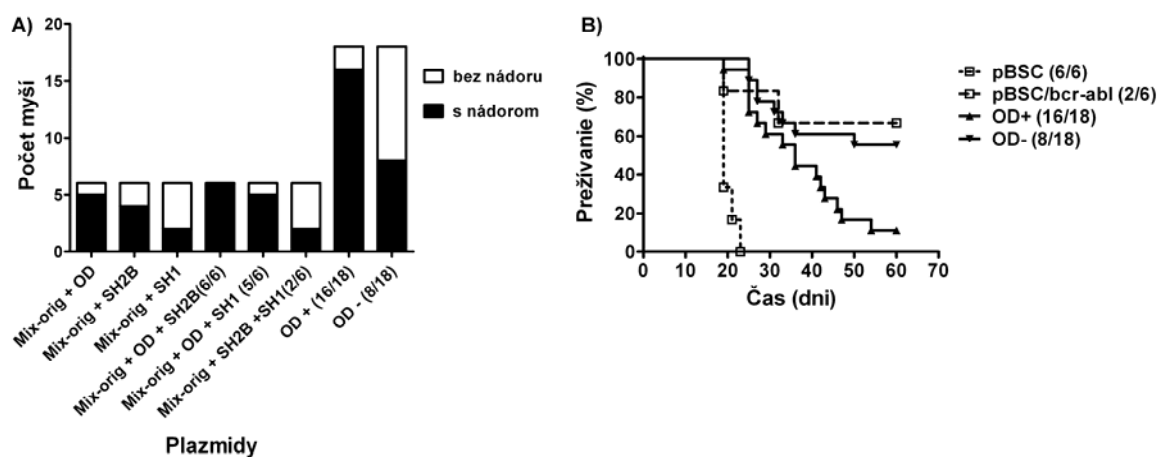
Obr. 3.11. Prežítie myši imunizovaných zmesami plazmidov kódujúcich fragmenty fúzneho proteínu BCR-ABL (Mix-orig a Mix-compl) po subkutálnom podaní buniek 12B1. Ako pozitívna kontrola bol použitý plazmid pBSC/bcr-abl, ako negatívna kontrola plazmid pBSC.

Ďalšími testovanými zmesami boli "Mix-bcr" a "Mix-abl". Ako už samotné názvy napovedajú, tieto zmesi obsahujú buď plazmidy kódujúce sekvencie pre BCR, alebo ABL. Výsledok ukazuje, že epitopy zodpovedné za navodenie ochrany proti nádorovým bunkám sú sústredené v oblasti proteínu ABL. (Obr. 3.12) Rozdiel medzi Mix-bcr a Mix-abl bol vysoko signifikantný ($p < 0,001$).



Obr. 3.12 . Prežívania myši imunizovaných zmesami plazmidov kódujúcich fragmenty fúzneho proteínu BCR-ABL (Mix-bcr a Mix-abl) po subkutánnom podaní buniek 12B1. Ako pozitívna kontrola bol použitý plazmid pBSC/bcr-abl, ako negatívna kontrola plazmid pBSC.

V snahe o objasnenie zníženej schopnosti zmesi "Mix-compl" navodiť ochranu, bol pripravený experiment založený na doplnení pôvodného zloženia zmesi "Mix-orig" o jednotlivé kombinácie plazmidov, ktoré v tejto zmesi chýbali. Výsledok zobrazený na obrázku 3.13 naznačuje, že za zníženie imunizačného potenciálu pravdepodobne zodpovedá plazmid pBSC/OD. Rozdiel medzi skupinami, ktoré boli imunizované zmesami vakcín bez pBSC/OD a tými, ktoré boli imunizované zmesami vakcín obsahujúcimi pBSC/OD bol štatisticky významný ($p < 0,02$).



Obr. 3.13. Prežívania myši imunizovaných zmesami plazmidov obsahujúcimi plazmid pBSC/OD (OD+), alebo neobsahujúcimi spomínaný plazmid (OD-). Ako pozitívna kontrola bol použitý plazmid pBSC/bcr-abl, ako negatívna kontrola plazmid pBSC.

3.7. Výsledky RT-PCR

Za účelom potvrdenia, že imunizované myši, ktoré nevytvorili nádor, sú naozaj zdravé, bola urobená diagnostika prítomnosti transkriptov *bcr-abl* pomocou RT-PCR. Vyšetrené boli tieto orgány: pečeň, slezina a kostná dreň. Všetky zvieratá, ktoré vyvinuli nádor boli *bcr-abl* pozitívne vo všetkých testovaných orgánoch. A naopak, všetky testované zvieratá, ktoré nevyvinuli nádor, boli *bcr-abl* negatívne. Takéto zvieratá boli považované za vyliečené.

Tabuľka 3.1						
Prítomnosť <i>bcr-abl</i>-pozitívnych buniek detegovaná pomocou RT-PCR v úspešne imunizovaných a neimunizovaných zvieratách inokulovaných buď bunkami B210 alebo 12B1						
Bunky	Imunizácia	Počet myši	S nádorom	Detegované <i>bcr-abl</i> transkripty v:		
				Pečeni	Slezine	Kostnej dreni
B210	áno	8	0	0	0	netestované
	nie	1	1	1	1	netestované
12B1	áno	5	0	0	0	0
	nie	5	5	5	5	5

4. Diskusia

Hodnotenie výsledkov bolo možné rozdeliť podľa typu použitých plazmidov na:

- a) Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidom kódujúcim celý proteín BCR-ABL;
- b) Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidmi kódujúcimi spojovú oblasť BCR-ABL;
- c) Hodnotenie výsledkov imunizácie rozličnými kombináciami vakcín kódujúcich spojovú oblasť BCR-ABL;
- d) Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidmi kódujúcimi jednotlivé fragmenty BCR-ABL
- a e) Hodnotenie výsledkov imunizácie zmesami plazmidov kódujúcich jednotlivé fragmenty BCR-ABL.

Výsledky každej experimentálnej práce sú limitované použitým modelom a ich interpretácia by mala byť vždy robená s ohľadom na tento fakt. Aj v rámci predloženej práce bolo potrebné čeliť rozličným problémom. Medzi najzávažnejšie patrili: a) Problém heterogenity sekvencií myších a ľudských proteínov BCR a ABL; b) Problém variabilných výsledkov jednotlivých imunizačných pokusov; c) Problém s hmotnostnými pomermi proteínov produkovaných jedným μg plazmidu; d) Problém s overením množstva DNA v náboji.

4.1. *Hodnotenie získaných výsledkov*

4.1.1 Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidom kódujúcim celý proteín BCR-ABL

Vzhľadom na spomenutú heterogenitu sekvencie nie je prekvapujúce, že plazmid pBSC/bcr-abl navodil imunitnú odpoveď. Napriek variabilite diskutovanej vyššie, bola indukovaná ochrana vždy štatisticky významná, bez ohľadu na to či sa jednalo o zabránenie vzniku nádorov, alebo iba o odloženie rastu nádorov a predĺženie prežívania.

Avšak počítať s využitím tohto konštruktu ako DNA vakcíny v humánnej medicíne nie je možné, nakoľko ide o funkčný onkogén. Predpokladom prípadného využitia by bola zavedenie mutácií do fúzneho génu tak, aby inaktivovali funkčné domény.

4.1.2 Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidmi kódujúcimi spojovú oblasť BCR-ABL

Plazmidy, kódujúce spojovú oblasť BCR-ABL zlyhali pri navodení ochranného efektu. A to napriek teoretickému predpokladu, že práve novo vytvorená, unikátna sekvencia s novo zaradenou aminokyselinou bude optimálna pre navodenie imunitnej odpovede. Aj podľa počítačovej predikcie sa v danej sekvencii nachádza T - epitop (GFKQSSKAL) pre BALB/c myši. Navyše sekvencia kódujúca fúznú zónu proteínu BCR-ABL bola pripojená k sekvencii pre gény, ktoré pri predchádzajúcich experimentoch s inými antigénmi boli schopné zvýšiť imunitnú odpoveď. Na výsledok nemal vplyv ani spôsob aplikácie plazmidov, ani zvýšenie dávky.

Ani samotný epitop podaný vo forme peptidu „GFKQSSKAL“ nebol schopný navodiť ochranu pred nádorovými bunkami.

4.1.3 Hodnotenie výsledkov imunizácie rozličnými kombináciami vakcín kódujúcich spojovú oblasť BCR-ABL

Ani prime-boost stratégia nepriniesla navodenie ochrany pomocou sekvencie spoja BCR-ABL. Boli vyskúšané kombinácie: a) DNA vakcína + pulzované dendritické bunky; b) DNA vakcína + rekombinantný vírus vakcínie; c) DNA vakcína + rekombinantný CyaA toxín + rekombinantný vírus vakcínie.

4.1.4 Hodnotenie výsledkov imunizácie plazmidmi kódujúcimi jednotlivé fragmenty

BCR-ABL

Situácia, ktorá nastala po neúspechu vakcín kódujúcich spoj BCR-ABL, obrátila našu pozornosť k snahe zistiť, ktorá oblasť BCR-ABL zodpovedá za navodenie ochrany proti nádorovým bunkám. K tomuto účelu bolo skonštruovaných deväť plazmidov, kódujúcich deväť fragmentov BCR-ABL, pokrývajúcich celú sekvenciu fúzneho proteínu. Pracovná hypotéza bola založená na predpoklade, že niektorý z plazmidov navodí imunitnú odpoveď porovnateľnú s účinkom plazmidu kódujúceho celý proteín BCR-ABL. Ďalším logickým krokom by bol pokus o identifikáciu konkrétneho epitopu, následne určenie, či ide o homogénnu, alebo heterogénnu oblasť a urobenie záverov z toho vyplývajúcich. O to prekvapujúcejší bol výsledok - žiadny z konštruktov nedosiahol úroveň ochrany porovnateľnú s pBSC/bcr-abl. V niektorých prípadoch boli síce pozorované náznaky indukcie ochrany, žiadny výsledok však nebol štatisticky významný. Z toho sme usúdili, že epitopy zodpovedajúce za navodenie ochrany budú pravdepodobne široko roz distribuované po sekvencii proteínu BCR-ABL.

4.1.5 Hodnotenie výsledkov imunizácie zmesami plazmidov kódujúcimi jednotlivé fragmenty

BCR-ABL

K použitiu zmesi plazmidov bolo pristúpené po zistení, že žiadny z deviatich plazmidov kódujúcich fragmenty BCR-ABL nenavodzuje imunitnú odpoveď porovnateľnú s efektom plazmidu kódujúceho celý proteín. Tvorba zmesi so sebou priniesla technické problémy diskutované vyššie, na druhej strane však poskytla možnosť experimentálne overiť, či je pre navodenie imunity nevyhnutná celá, neprerušená sekvencia BCR-ABL, prípadne či sú niektoré úseky dôležitejšie ako iné. Týmto spôsobom bolo ukázané, že epitopy zodpovedné za imunizačný efekt sú lokalizované v oblasti ABL. Imunizačný efekt mala aj hexavakcína nazvaná Mix-orig. Prekvapujúcim však bolo zistenie, že zmes všetkých deviatich plazmidov, ktorých produkty spolu reprezentujú všetky potenciálne epitopy BCR-ABL, nie len že nedosiahla úroveň ochrany navodenej plazmidom pBSC/bcr-abl, ale prakticky kopirovala negatívnu kontrolu. Pri pokuse vysvetliť tento jav vzniklo niekoľko pracovných hypotéz - ako správnu sa nakoniec ukázala hypotéza o negatívnom vplyve minimálne jedného plazmidu v zmesi na imunizačný proces. Identifikáciu daného plazmidu uľahčila existencia hexavakcíny Mix-orig, s imunizačným efektom podobným pBSC/bcr-abl. Takto zostali ako kandidáti na

overenie negatívneho efektu iba tri plazmidy, chýbajúce v pôvodnej hexavakcíne. Po in vivo otestovaní účinku zmesí založených na Mix-orig, doplnených o všetky možné kombinácie zvyšných troch plazmidov, sme došli k záveru, že za negatívny efekt na imunizáciu pravdepodobne zodpovedá plazmid pBSC/OD, kódujúci N-oblasť proteínu BCR. Na vysvetlenie tohto javu sú potrebné ešte ďalšie experimenty.

4.2 Analýza najzásadnejších problémov

4.2.1 Problém heterogenity sekvencií myších a ľudských proteínov BCR a ABL

Vzhľadom na to, že v prípade myší nie je známa paralela k ľudskému bcr-abl, boli modelové bunkové línie vytvorené retrovírusovou transformáciou buniek kostnej drene ľudským génom bcr-abl. Sekvencia ľudského BCR a ABL sa však odlišuje od svojich myších ekvivalentov. Obrázok 4.1. V prípade BCR je odlišných 8% aminokyselín, u ABL dokonca 13%.

mvdpvfgfaeawkaqfpd**sepprmel**rsvglieqelerkasirrlaqevnqer**rfmlylqtl**lakekksydrqrwgfrraa
qapdgaseprapasirppapadgadpppaeepearpdgegsppgkarpgtarpgaaasgerddr**gppasvaal**rsnfe
rirkgghgppgadae**kpfyvnevfh**hherglvkvndkevsdrisslgsqamqmerkkshgagssvvdasrppyrgrsse
sscgvdgdyedaelnprflkdnlidangg**srppwppleyqpyqsiyvggm**megegkqpllrsqstseqekrltwprsys
prsfedgggytpdcssnenltssee**dfssgqssrv**spsttyrmfrdkrspsqnsqqsfdssspptqchkrhrhcvvv
seativgvrtgqiwpndg**egafhg**dadgsfgtppgycaadr**aeqr**rhqdglyiddspssphlsskgrgsrdalvsg
al**estkasel**dleklemrkwvlsgilasee**tylshleall**lpmkplkaaatt**sqpvltsqqi**etiffkvpelyeihke**fydglfp**
rvqqwshqqrvgdl**fqlasql**gvyravfdnygvamem**aeccc**qana**qfaeisen**lrarsnkda**kdp**tt**knsletl**lykp
vdrvtrstlvldllkhtpashpdhplldalrisq**nflssineei**prqsmtvkkgehrqllkdsfmvelvegarkl**rhvflf**
telllctklkkqsggktyydek**wyipltdlsfqm**vdeavpniplypdeeldalkikisqiksdiqrekrank**gskaterl**
kkklseqeslllmspsmafrvhsrngk**sytfli**ssdyeraewrenireqqkk**cf**rsf**ltsvelqml**tnscvklqtvhsipti
nkeddespglygflnvivhsat**gfkqssKal**qrvasdfepqglseaar**wnskenl**lqpsendpnlfvaly**dfvasgdnt**
lsitkgeklrvlgynhngewceaqtknqgqvwps**nyitpvn**slkhswyhgpsvsnaa**eyll**ssgingsflvreses**spgq**
rsislryegrvyhyrintasdgkly**vssesr**ntlael**vhhstvadg**littlhypakrnkptvygvs**pn**ydkwemertdi
tmkhklggg**qygeve**gyv**wk**kyslt**vavkt**lkedtmeeveeflkeavmkei**khpnlvqll**gvctrepp**fyiite**fmytgn
lldylrecnrqevnavvlymat**qissameylekknfi**hrdlaarnclvgenhlv**kvadfglsr**lmtgd**tytahagak**fpik
wtapeslaynkfsiksdvwaqgvllweiatygmsspygidlsq**vyellekdy**rmerpegepekyvelmracwqwnpsd
rpsfaeihqafetmfqessisdevekelgkqgvrgavst**llqapel**ptktrtsrraaehrdtdvpepmskqgesdpld**h**
epavspllprkerpppegglnderllpkdk**ktnlfsal**ikkkkktap**tp**pkrs**ssf**remdgqpergagaeegrdisngal
aftpldtadpaksppkpsngagvpngalresggsgfrsphlwk**ksstltsr**latgeeeeggssskfrlrsasascvphgakdt
ewrsvtlprdlqstgrqfdsstfgghksekpalprkragenrsdqvt**rgtvtpppr**lvkkneeaadevfkdimess**spgssp**
pnltpkplrrqv**tvapasgl**phkeeaekgsalgtpaaaeptvtskagsgapggtsgkpaeesrvrrhkhssesprgdkg
klsrlkpappppppaasagkagkpsqps**sqeaageavlg**aktkatslvdavnsdaak**psqp**gegllkpvlpatpkpqs
akpsgtpis**pavp**st**lpsassal**agdqpss**tafi**listrvslrkrqpperiasgaitkgvldstealclairsnseqmash
savleagknlytfcv**syvdsiqm**rnk**afreainkl**ennlrelqicpatagspa**atqdfskll**ssvkeisdivqr

Obr. 4.1. Sekvencia proteínu BCR-ABL s vyznačenými oblasťami, ktoré sa líšia u ľudského a myšacieho BCR a ABL (hnedá), s vyznačenými predikovanými epitopmi (červená), vyznačenou 25 aminokyselinovou oblasťou spoja (podčiarknutá oblasť) a s označeným novozaradeným lyzínom (veľké "K").

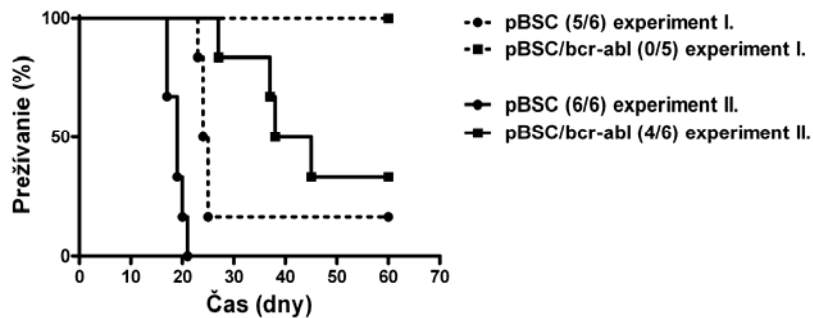
Keďže pôvodným zámerom práce bola imunizácia sekvenciou zo spoja fúzneho proteínu, ktorá je 100% homológna, heterogenita v ďalších oblastiach daných proteínov sa nezdaľa byť na prekážku. Až neschopnosť plazmidov, kódujúcich fúzu zónu BCR-ABL, navodiť ochranu

proti nádorovým bunkám, a na druhej strane úspešne navodenie ochrany plazmidom produkujúcim celý proteín BCR-ABL, naznačilo, že je potrebné brať do úvahy aj prípadný vplyv heterogenity sekvencií. Za týchto okolností vyvstala otázka, či za navodenie ochrany zodpovedá imunitná odpoveď namierená práve proti heterogénnym oblastiam, respektíve či pri navodení imunitnej odpovede zohráva primárnu úlohu samotný proces imunizácie ako takej, bez ohľadu na sekvenciu. Vylúčiť sa nedá ani jedna možnosť, dokonca je pravdepodobné, že výsledný efekt je daný súčinnosťou oboch mechanizmov. Po urobení predikčnej analýzy *in silico*, bola porovnaná kolokalizácia všetkých predikovaných epitopov a heterogénnych oblastí. Výsledok neukázal žiadnu výlučnú súvislosť medzi heterogénnou oblasťou a predikovanými epitopmi (Obr. 4.1). Navyše, zmes plazmidov kódujúcich sekvencie BCR nevykázala žiadnu ochranu pri testovaní *in vivo*, napriek tomu, že obsahuje heterogénne oblasti. To naznačuje, že heterogenita sekvencie nemusela nevyhnutne vyústiť v navodenie imunitnej odpovede.

Pred časom sa objavili práce (117, 118), ktoré tvrdia, že proteín BCR-ABL nie je imunodominantným antigénom CML, ale iba svojou biologickou aktivitou navodzuje nadprodukciiu rozličných bunkových proteínov, ktoré následne pôsobia ako antigény asociované s nádorom (tumor associated antigens - TAA). Ak by táto teória bola pravdivá, otázka heterogenity v nami použitom modeli by čiastočne stratila relevanciu. Výsledky imunizačných pokusov s plazmidom pBSC/bcr-abl, kódujúcim celý proteín BCR-ABL a pokusov so zmesou plazmidov Mix-compl, obsahujúcou plazmidy nesúce celú sekvenciu bcr-abl, ale rozdelenú na 9 častí, by mohli posilňovať oprávnenosť tejto teórie. Na druhej strane, úspešná imunizácia pomocou zmesi Mix-orig, síce autormi predloženú tézu priamo nevyvracia, ale prinajmenšom naznačuje, že je možné úspešne imunizovať aj rozdelenou sekvenciou BCR-ABL, a teda takou, ktorá nemá (kompletnú) biologickú aktivitu.

4.2.2 Problém variabilných výsledkov po jednotlivých imunizáciach

Pri jednotlivých experimentoch bola pozorovaná nezanedbateľná variabilita u skupín ošetrovaných plazmidmi používanými ako negatívna (pBSC) a pozitívna kontrola (pBSC/bcr-abl). Na obrázku 4.2 sú znázornené výsledky z dvoch rozličných experimentov, zobrazujúce dva extrémne prípady.



Obr. 4.2. Porovnanie výsledku dvoch experimentov testujúcich prežítvanie myši imunizovaných plazmidom pBSC/bcr-abl, alebo ošetrených prázdny m plazmidom pBSC.

V jednom prípade bola pomocou plazmidu pBSC/bcr-abl navodená ochrana u 100% imunizovaných myši, avšak nie všetky myši zo skupiny inokulovanej prázdny m plazmidom (pBSC) vytvorili nádor. V druhom prípade síce všetky myši v negatívnej kontrole vytvorili nádor a vytvorili ho skôr, na druhú stranu ochranný účinok plazmidu pBSC/bcr-abl bol podstatne slabší. V oboch prípadoch bol však rozdiel signifikantný ($p < 0,001$ a $p < 0,01$). Štatisticky významný rozdiel bol pozorovaný aj medzi 2 skupinami imunizovanými pBSC/bcr-abl ($p < 0,05$).

Tento jav bol pozorovaný takmer pri všetkých experimentoch. V snahe štandardizovať celý proces boli nádorové bunky pripravované vždy z toho istého štoky, inokulovaná bola vždy tá istá pasáž a vždy tou istou osobou. Napriek týmto opatreniam dochádzalo k pozorovanej variabilite. Domnievame sa, že za variabilitu výsledkov zodpovedá pravdepodobne aktuálny stav podávaných nádorových buniek.

Preto bolo potrebné jednotlivé experimenty vyhodnocovať vždy s ohľadom na aktuálnu pozitívnu a negatívnu kontrolu a prípadne porovnávanie výsledkov medzi jednotlivými experimentmi bolo potrebné robiť vždy s ohľadom na spomenutý fakt.

4.2.3 Problém s hmotnostnými pomermi proteínov produkovaných jedným μg plazmidu

Vytváranie rozličných zmesí plazmidov kódujúcich fragmenty BCR-ABL prinieslo so sebou určité praktické problémy. Ak predpokladáme, že expresia každého testovaného konštruktu bola približne rovnaká (teda, že gén, či jeho časť nesená plazmidom vyprodukuje rovnaký počet molekúl proteínu, respektíve jeho časti), potom množstvo celého proteínu vyprodukovaného jedným plazmidom pBSC/bcr-abl bolo ekvivalentné k produkcii 9

rozdielnych plazmidov, z ktorých každý exprimuje časť sekvencie celého proteínu. Keďže jeden "náboj" pre gene-gun obsahuje vždy iba 1 μg DNA, je zjavné, že 1 dávka zmesi plazmidov (v extrémnom prípade až deviatich) produkovala vždy menej celkového množstva aminokyselinových sekvencií, ako plazmid kódujúci BCR-ABL v celku. A to napriek tomu, že plazmid, nesúci celú sekvenciu bcr-abl, je približne 2x väčší, ako plazmidy kódujúce jednotlivé fragmenty, a teda 1 μg pBSC/bcr-abl obsahuje približne 2 krát menej kópií génu v porovnaní s ostatnými plazmidmi. Túto disproporciu sme sa snažili zmierniť použitím 2 μg DNA (2 nábojov) ako štandardnej dávky pri imunizácii zmesami plazmidov. Výsledky potvrdili, že tieto kvantitatívne rozdiely nemali výraznejší účinok na imunizačný efekt.

4.2.4 Problém s overením množstva DNA v náboji

Ďalším problémom, tento krát skôr teoretického charakteru, bola neexistencia metodiky overujúcej množstvo DNA v 1 náboji. Pri príprave sa použije 50 μg DNA na cca 50 nábojov. Avšak už vizuálne pozorovateľný rozdiel v kvantite aj kvalite prilnutia zlatých partikulí medzi jednotlivými nábojmi, ako aj medzi sériami vyrobených nábojov naznačuje, že nie každý náboj musí obsahovať presne 1 μg DNA. Na druhej strane však nebola pozorovaná priama závislosť medzi vizuálnou kvalitou náboja a výsledkom imunizácie.

5. Záver

Výsledky experimentov je možné zhrnúť v nasledujúcich bodoch:

- a) Imunizácia s vakcínou založenou na celom *bcr-abl* géne navodila signifikantnú ochranu proti bunkám B210 ako aj bunkám 12B1.
- b) Imunizácia vakcínami založenými na fúznej oblasti *bcr-abl* génu nenavodila ochranu.
- c) Žiadny z 9 fragmentov *bcr-abl* génu nebol schopný navodiť signifikantnú ochranu porovnateľnú s imunizačným efektom celého BCR-ABL.
- d) Niektoré „zmesné“ vakcíny boli schopné navodiť ochranu porovnateľnú s efektom celého BCR-ABL.
- e) Epitopy zodpovedné za navodenie efektívnej ochrany sú lokalizované v ABL časti fúzneho proteínu; je však možné, že pri navodení protekcie zohrala úlohu aj heterogenita sekvencie myšacieho a ľudského ABL proteínu.
- f) Bola pozorovaná možná negatívna rola N-terminálneho konca BCR.

Cieľom tejto práce bolo priniesť nové informácie týkajúce sa využitia DNA vakcín pri imunoterapii CML. Bolo ukázané, že navodenie ochrany pomocou plazmidov kódujúcich sekvencie BCR-ABL je za určitých podmienok možné. Ďalej bolo ukázané, že za navodenie imunitnej odpovede pravdepodobne zodpovedá viacero epitopov, a teda, že v tomto prípade nejde o „klasický“ prípad imunizácie proti imunodominantnému epitopu. Je dôležité si uvedomiť, že tieto výsledky boli získané na modelovom organizme, a ako také nemusia mať univerzálnu platnosť. Na tento fakt je potrebné pamätať pri akýchkoľvek prípadných pokusoch o aplikáciu v inom systéme, prípadne v klinickej praxi.

6. Zoznam použitej literatúry

- 1) Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM: The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999 Jul 15;341(3):164-72.
- 2) Mauro MJ, Druker BJ: Chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2001 Jan;13(1):3-7.
- 3) Sattler M, Griffin JD: Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int J Hematol.* 2001 Apr;73(3):278-91.
- 4) Maru Y: Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2001 Apr;73(3):308-22
- 5) Piller GJ: Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol.* 2001 Feb;112(2):282-92.
- 6) Millot F, Traore P, Guilhot J, Nelken B, Leblanc T, Leverger G, Plantaz D, Bertrand Y, Bordigoni P, Guilhot F: Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics.* 2005 Jul;116(1):140-3.
- 7) Lee JP, Birnstein E, Masiello D, Yang D, Yang AS: Gender and ethnic differences in chronic myelogenous leukemia prognosis and treatment response: a single-institution retrospective study. *J Hematol Oncol.* 2009 Jul 24;2:30.
- 8) Quintás-Cardama A, Cortes JE: Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006 Jul;81(7):973-88.
- 9) Posthuma EF, Falkenburg JH, Apperley JF, Gratwohl A, Roosnek E, Hertenstein B, Schipper RF, Schreuder GM, D'Amaro J, Oudshoorn M, van Biezen JH, Hermans J, Willemze R, Niederwieser D: HLA-B8 and HLA-A3 coexpressed with HLA-B8 are associated with a reduced risk of the development of chronic myeloid leukemia. The Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Blood.* 1999 Jun 1;93(11):3863-5.

- 10) Sessions J: Chronic myeloid leukemia in 2007. *J Manag Care Pharm.* 2007 Oct;13(8 Suppl A):4-7
- 11) Lee WI, Kantarjian H, Glassman A, Talpaz M, Lee MS: Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. *Ann Oncol.* 2002 May;13(5):781-8.
- 12) Morgan GJ, Pratt G: Modern molecular diagnostics and the management of haematological malignancies. *Clin Lab Haematol.* 1998 Jun;20(3):135-41.
- 13) Min CK, Yang IH, Kim DW, Lee JW, Han CW, Min WS, Kim CC: Detection of the BCR-ABL fusion gene in natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematol.* 2000;104(2-3):135-8.
- 14) Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, Eaves AC, Lansdorp PM: Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood.* 2000 Mar 15;95(6):1883-90.
- 15) Jabbour E, Cortes JE, Giles FJ, O'Brien S, Kantarjian HM: Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer.* 2007 Jun 1;109(11):2171-81.
- 16) von Bubnoff N, Duyster J: Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Feb;107(7):114-21.
- 17) Calabretta B, Perrotti D: The biology of CML blast crisis. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4010-22. Epub 2004 Feb 24.
- 18) Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG: Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist.* 2000;5(5):405-15.
- 19) Ahuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, Advani S, Allen SL, Goldman J, Snyder D, Foti A, Cline M: The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J Clin Invest.* 1991 Jun;87(6):2042-7.

- 20) Foti A, Ahuja HG, Allen SL, Koduru P, Schuster MW, Schulman P, Bar-Eli M, Cline MJ: Correlation between molecular and clinical events in the evolution of chronic myelocytic leukemia to blast crisis. *Blood*. 1991 Jun 1;77(11):2441-4.
- 21) Quintás-Cardama A, Cortes J: Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. Epub 2008 Sep 30.
- 22) Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt S, Talpaz M: Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000:90-109.
- 23) Wong S, Witte ON: Modeling Philadelphia chromosome positive leukemias. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5644-59.
- 24) Ren R: Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):172-83.
- 25) Nowell PC: Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2033-5.
- 26) Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3343-56.
- 27) Arana-Trejo RM, Ruíz Sánchez E, Ignacio-Ibarra G, Báez de la Fuente E, Garces O, Gómez Morales E, Castro Granados M, Ovilla Martínez R, Rubio-Borja ME, Solís Anaya L, Herrera P, Delgado Llamas J, Kofman S: BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clin Lab Haematol*. 2002 Jun;24(3):145-50.
- 28) Leeksma OC, Kessler JH, Huijbers IJ, Ten Bosch GJ, Melief CJ: BCR-ABL directed immunotherapy: a virtual reality? *Leuk Lymphoma*. 2000 Jun;38(1-2):175-81.

- 29) Wertheim JA, Miller JP, Xu L, He Y, Pear WS: The biology of chronic myelogenous leukemia: mouse models and cell adhesion. *Oncogene*. 2002 Dec 9;21(56):8612-28.
- 30) Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D: The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*. 1989 Aug 25;58(4):669-78.
- 31) Chopra R, Pu QQ, Elefanty AG: Biology of BCR-ABL. *Blood Rev*. 1999 Dec;13(4):211-29.
- 32) Sattler M, Griffin JD: Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol*. 2003 Apr;40(2 Suppl 2):4-10.
- 33) Inokuchi K: Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J Nippon Med Sch*. 2006 Aug;73(4):178-92.
- 34) Zhang X, Wong R, Hao SX, Pear WS, Ren R: The SH2 domain of bcr-Abl is not required to induce a murine myeloproliferative disease; however, SH2 signaling influences disease latency and phenotype. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):277-87.
- 35) Ren R: The molecular mechanism of chronic myelogenous leukemia and its therapeutic implications: studies in a murine model. *Oncogene*. 2002 Dec 9;21(56):8629-42.
- 36) Konopka JB, Witte ON: Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol*. 1985 Nov;5(11):3116-23.
- 37) Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R: The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(3):840-53.
- 38) McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY: A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol*. 1993 Dec;13(12):7587-95.

- 39) Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM: Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5531-41.
- 40) Chuang TH, Xu X, Kaartinen V, Heisterkamp N, Groffen J, Bokoch GM: Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 24;92(22):10282-6.
- 41) Verfaillie CM: Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998 Feb;12(1):1-29.
- 42) Wen ST, Van Etten RA: The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev.* 1997 Oct 1;11(19):2456-67.
- 43) Feller SM: Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene.* 2001 Oct 1;20(44):6348-71.
- 44) Carella AM, Frassoni F, Melo J, Sawyers C, Eaves C, Eaves A, Apperley J, Tura S, Hehlmann R, Reiffers J, Lerma E, Goldman J: New insights in biology and current therapeutic options for patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica.* 1997 Jul-Aug;82(4):478-95.
- 45) Meyn MA 3rd, Wilson MB, Abdi FA, Fahey N, Schiavone AP, Wu J, Hochrein JM, Engen JR, Smithgall TE: Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J Biol Chem.* 2006 Oct 13;281(41):30907-16.
- 46) Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON: Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med.* 1995 Jan 1;181(1):307-13.
- 47) Cortez D, Stoica G, Pierce JH, Pendergast AM: The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene.* 1996 Dec 19;13(12):2589-94.

- 48) Kharas MG, Deane JA, Wong S, O'Bosky KR, Rosenberg N, Witte ON, Fruman DA: Phosphoinositide 3-kinase signaling is essential for ABL oncogene-mediated transformation of B-lineage cells. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4268-75.
- 49) Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B: Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J*. 1997 Oct 15;16(20):6151-61.
- 50) Goldman JM, Druker BJ: Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*. 2001 Oct 1;98(7):2039-42.
- 51) Haut A, Abbott WS, Wintrobe MM, Cartwright GE: Busulfan in the treatment of chronic myelocytic leukemia. The effect of long term intermittent therapy. *Blood*. 1961 Jan;17:1-19.
- 52) Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Löffler H, Heinze B, Georgii A, et al.: Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood*. 1993 Jul 15;82(2):398-407.
- 53) Kennedy BJ: Hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1972 Apr;29(4):1052-6.
- 54) Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, Hehlmann R, Hochhaus A, Shepherd PC, Steegmann JL, Kluin-Nelemans HC, Thaler J, Simonsson B, Louwagie A, Reiffers J, Mahon FX, Montefusco E, Alimena G, Hasford J, Richards S, Saglio G, Testoni N, Martinelli G, Tura S, Baccarani M; Europea Study Group on Interferon in Chronic Myeloid Leukemia; Italian Cooperative Study Group on CML; France Intergroup of CML; German CML Study Group; UK Medical Research Council Working Party on CML; Spanish CML Study Group; Australian CML Study Group; Swedish CML Study Group: Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):3074-81.

- 55) The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. [No authors listed]: Long-term follow-Up of the italian trial of interferon-alpha versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1541-8.
- 56) The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. [No authors listed]: Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1994 Mar 24;330(12):820-5.
- 57) Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M: Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. *The Leukemia Service. Ann Intern Med*. 1995 Feb 15;122(4):254-61.
- 58) Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM: Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2000 Sep;6(9):1018-23.
- 59) Huang Q, Wu Y, Snyder DS, Chang KL, Slovak ML, Gaal KK, Palmer JM, Weiss LM: Clinical and pathologic analysis of 16 cases of relapsed chronic myeloid leukemia after stem cell transplantation. *Am J Clin Pathol*. 2007 Oct;128(4):565-70.
- 60) Stone RM: Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. *Oncologist*. 2004;9(3):259-70.
- 61) Fernandez HF, Kharfan-Dabaja MA: Tyrosine kinase inhibitors and allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: targeting both therapeutic modalities. *Cancer Control*. 2009 Apr;16(2):153-7
- 62) Goldman JM, Szydlo R, Horowitz MM, Gale RP, Ash RC, Atkinson K, Dicke KA, Gluckman E, Herzig RH, Marmont A, et al: Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood*. 1993 Oct 1;82(7):2235-8.
- 63) Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R, Appelbaum FR, Anderson J, Bennett C, Goldman JM, Guilhot F, Kantarjian HM, Lichtin AE, Talpaz M, Tura S: An evidence-based analysis of

the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1517-36.

64) Marks DI, Cullis JO, Ward KN, Lacey S, Syzdlo R, Hughes TP, Schwarzer AP, Lutz E, Barrett AJ, Hows JM, Batchelor JR, Goldman JM: Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia using sibling and volunteer unrelated donors. A comparison of complications in the first 2 years. *Ann Intern Med*. 1993 Aug 1;119(3):207-14.

65) Horowitz MM, Rowlings PA, Passweg JR: Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant*. 1996 May;17 Suppl 3:S5-6.

66) O'Brien S, Tefferi A, Valent P: Chronic myelogenous leukemia and myeloproliferative disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:146-62.

67) Henkes M, van der Kuip H, Aulitzky WE: Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevec trade mark). *Ther Clin Risk Manag*. 2008 Feb;4(1):163-87.

68) Druker BJ: Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4808-17.

69) Druker BJ, O'Brien SG, Cortes J, Radich J: Chronic myelogenous leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:111-35.

70) Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J: Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.

71) Fausel C: Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. *J Manag Care Pharm*. 2007 Oct;13(8 Suppl A):8-12.

72) Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, Goldman JM, Müller MC, Radich JP, Rudoltz M, Mone M, Gathmann I, Hughes TP, Larson RA; IRIS Investigators: Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1054-61. Epub 2009 Mar 12.

73) Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ: Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3530-9.

74) Ramirez P, DiPersio JF: Therapy options in imatinib failures. *Oncologist*. 2008 Apr;13(4):424-34.

75) Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, Nicaise C, O'Brien S, Giles F, Talpaz M, Cortes J: Dasatinib (BMS-354825) is active in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib (AMN107) therapy failure. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):497-9.

76) Guilhot F, Apperley J, Kim DW, Bullorsky EO, Baccarani M, Roboz GJ, Amadori S, de Souza CA, Lipton JH, Hochhaus A, Heim D, Larson RA, Branford S, Muller MC, Agarwal P, Gollerkeri A, Talpaz M: Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4143-50.

77) Jamieson CH: Chronic myeloid leukemia stem cells. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:436-42.

78) Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE: Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009 Apr;16(2):122-31.
Cortes J, O'Brien S, Kantarjian H: Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2204-5.

79) Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore MA, Ruthardt M: Reciprocal t(9;22) ABL/BCR fusion proteins: leukemogenic potential and effects on B cell commitment. *Plos Dne*. 2009 Oct 30;4(10):e7661.

80) de la Fuente J, Merx K, Steer EJ, Müller M, Szydlo RM, Maywald O, Berger U, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC, Melo JV, Hochhaus A; German CML Study Group: ABL-BCR expression does not correlate with deletions on the derivative chromosome 9 or survival in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2879-80.

81) Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM: The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1993 Jan 1;81(1):158-65.

82) Vonka V: Immunotherapy of chronic myeloid leukemia: present state and future prospects. *Future medicine*. 2010; v tlači

83) Pinilla-Ibarz J, Shah B, Dubovsky JA: The biological basis for immunotherapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Control*. 2009 Apr;16(2):141-52.

84) Gannagé M, Abel M, Michallet AS, Delluc S, Lambert M, Giraudier S, Kratzer R, Niedermann G, Saveanu L, Guilhot F, Camoin L, Varet B, Buzyn A, Caillat-Zucman S: Ex vivo characterization of multiepitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):8210-8.

85) Wagner WM, Ouyang Q, Pawelec G: The abl/bcr gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of abl/bcr can be recognized by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 Feb;52(2):89-96.

86) Fujiwara H, Melenhorst JJ, El Ouriaghli F, Kajigaya S, Grube M, Sconocchia G, Rezvani K, Price DA, Hensel NF, Douek DC, Barrett AJ: In vitro induction of myeloid leukemia-specific CD4 and CD8 T cells by CD40 ligand-activated B cells gene modified to express primary granule proteins. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 15;11(12):4495-503.

- 87) Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Chen J, Brunner C, Barth T, Schmitt A, Wiesneth M, Döhner K, Döhner H, Greiner J: Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8⁺ T-cell responses and are lacking costimulatory molecules. *Exp Hematol*. 2006 Dec;34(12):1709-19.
- 88) Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P: Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*. 1995 Oct 15;86(8):3118-22.
- 89) Bayraktar S, Goodman M: Detection of BCR-ABL Positive Cells in an Asymptomatic Patient: A Case Report and Literature Review. *Case Report Med*. 2010;2010:939706.
- 90) Butt NM, Rojas JM, Wang L, Christmas SE, Abu-Eisha HM, Clark RE: Circulating bcr-abl-specific CD8⁺ T cells in chronic myeloid leukemia patients and healthy subjects. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1315-23.
- 91) Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V, Langlade-Demoyen P: Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*. 1998 May 15;101(10):2290-6.
- 92) Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E: Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4485-91.
- 93) Zeng Y, Graner MW, Thompson S, Marron M, Katsanis E: Induction of BCR-ABL-specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL⁺ tumor cells. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2016-22.
- 94) He L, Feng H, Raymond A, Kreeger M, Zeng Y, Graner M, Whitesell L, Katsanis E: Dendritic-cell-peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Mar;50(1):31-40.

- 95) Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, Zakhaleva V, Roberts W, Scheinberg DA: Synthetic peptide analogs derived from bcr/abl fusion proteins and the induction of heteroclitic human T-cell responses. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1324-32.
- 96) Berke Z, Andersen MH, Pedersen M, Fugger L, Zeuthen J, Haurum JS: Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*. 2000 Mar;14(3):419-26.
- 97) Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, Mackinnon S, Yang SY, Sette A, Scheinberg DA: Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood*. 1996 May 1;87(9):3587-92.
- 98) Mannering SI, McKenzie JL, Fearnley DB, Hart DN: HLA-DR1-restricted bcr-abl (b3a2)-specific CD4+ T lymphocytes respond to dendritic cells pulsed with b3a2 peptide and antigen-presenting cells exposed to b3a2 containing cell lysates. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):290-7.
- 99) Wang WW, Huang RW, Hu Y, Li XD, Wang DN, He Y, Liu JJ: Construction of genetically modified dendritic cell vaccine expressing bcr/abl fusion gene and inducing specific cytotoxic T lymphocytes to kill K562 cells in vitro. *Ai Zheng*. 2009 Jun;28(6):602-6.
- 100) Sun JY, Krouse RS, Forman SJ, Senitzer D, Sniecinski I, Chatterjee S, Wong KK Jr: Immunogenicity of a p210(BCR-ABL) fusion domain candidate DNA vaccine targeted to dendritic cells by a recombinant adeno-associated virus vector in vitro. *Cancer Res*. 2002 Jun 1;62(11):3175-83.
- 101) Smith BD, Kasamon YL, Kowalski J, Gocke C, Murphy K, Miller CB, Garrett-Mayer E, Tsai HL, Qin L, Chia C, Biedrzycki B, Harding TC, Tu GH, Jones R, Hege K, Levitsky HI: K562/GM-CSF immunotherapy reduces tumor burden in chronic myeloid leukemia patients with residual disease on imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 1;16(1):338-47.
- 102) Li Z, Qiao Y, Liu B, Laska EJ, Chakravarthi P, Kulko JM, Bona RD, Fang M, Hegde U, Moyo V, Tannenbaum SH, Ménoret A, Gaffney J, Glynn L, Runowicz CD, Srivastava PK:

Combination of imatinib mesylate with autologous leukocyte-derived heat shock protein and chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4460-8.

103) Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J, Scheinberg DA: Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood.* 2000 Mar 1;95(5):1781-7.

104) Daley GQ, Baltimore D: Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(23):9312-6.

105) McLaughlin J, Chianese E, Witte ON: In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Sep;84(18):6558-62.

106) Jelinek F, Sobotkova E, Vonka V: Characteristics of two mouse bcr-abl-transformed cell lines. II. Pathological lesions induced in mice. *Folia Biol (Praha).* 2005;51(4):93-102.

107) Sobotkova E, Ludvikova V, Petrackova M, Duskova M, Smetana K, Jelinek F, Marinov I, Vonka V: Characteristic of two mouse bcr-abl-transformed cell lines: I. General properties of the cells. *Folia Biol (Praha).* 2005;51(1):12-8.

108) Graham FL, Smiley J: Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36 (1977), 59-72; DOI 10.1099/0022-1317-36-1-59

109) Smahel M, Síma P, Ludvikova V, Vonka V: Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology.* 2001 Mar 15;281(2):231-8.

110) Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D: Introduction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210^{bcr-abl} Gene of the Philadelphia chromosome. *Science.* 1990 Feb 16;247(4944):824-30.

- 111) Ludvikova V, Hamsikova E, Sobotkova E, Lucansky V, Smahel M, Vonka V: Use of polyclonal rabbit antibodies for detection of the bcr-abl fusion zone in cells transfected with experimental bcr-abl DNA vaccines. *Int J Oncol.* 2005 Jul;27(1):265-74.
- 112) Adamsson J, Lindblad M, Lundqvist A, Kelly D, Holmgren J, Harandi AM: Novel immunostimulatory agent based on CpG oligodeoxynucleotide linked to the nontoxic B subunit of cholera toxin. *J Immunol.* 2006 Apr 15;176(8):4902-13.
- 113) Gramzinski RA, Doolan DL, Sedegah M, Davis HL, Krieg AM, Hoffman SL: Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun* 69: 1643-1649, 2001.
- 114) Nemeckova S, Stranska R, Subrtova J, Kutinova L, Otahal P, Hainz P, Maresova L, Sroller V, Hamsikova E, Vonka V: Immune response to E7 protein of human papillomavirus type 16 anchored on the cell surface. *Cancer Immunol Immunother.* 2002; 51:111-119
- 115) Mackova J, Stasikova J, Kutinova L, Masin J, Hainz P, Simsova M, Gabriel P, Sebo P, Nemeckova S: Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol Immunother* (2006) 55: 39–46
- 116) Pokorna D, Cerovska N, Smahel M, Moravec T, Ludvikova V, Mackova J, Synkova H, Duskova M, Hozak P, Veleminsky J: DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44-60). *Oncol Rep.* 2005 Oct;14(4):1045-53.
- 117) Grünebach F, Mirakaj V, Mirakaj V, Müller MR, Brümmendorf T, Brossart P: BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5892-900.
- 118) Brauer KM, Werth D, von Schwarzenberg K, Bringmann A, Kanz L, Grünebach F, Brossart P: BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5489-97.

7. Přílohy:

Příloha číslo 1:

Ludvíková V, Hamsíková E, Sobotková E, **Lucansky V**, Smahel M, Vonka V: Use of polyclonal rabbit antibodies for detection of the bcr-abl fusion zone in cells transfected with experimental bcr-abl DNA vaccines. *Int J Oncol.* 2005 Jul;27(1):265-74.

Příloha číslo 2:

Lucansky V, Sobotkova E, Tachezy R, Duskova M, Vonka V: DNA vaccination against bcr-abl-positive cells in mice. *Int J Oncol.* 2009 Oct;35(4):941-51.