

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Buněčná signalizace leukemických buněk  
a nemaligních B-lymfocytů**

Mgr. Veronika Kanderová

Praha 2011

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně, v laboratořích CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, pod vedením svého školitele MUDr. Tomáše Kaliny, Ph.D. a uvedla všechny použité zdroje informací.

**Veronika Kanderová**

## **Poděkování**

Největší poděkování patří mému školiteli, MUDr. Tomáši Kalinovi, Ph.D., za profesionální vedení, cenné zkušenosti, které mi předal, a za možnost podílet se na vědecky zajímavých projektech v Česku i zahraničí. Dále děkuji doc. MUDr. Ondřeji Hrušákovi, Ph.D. za možnost pracovat v laboratořích s velmi dobrým zázemím a celému kolektivu CLIP za více než přátelskou atmosféru. Velký dík patří i Mgr. Marcele Vlkové, Ph.D. za přijetí do vědecké skupiny zabývající se defekty imunitního systému a Fridtjofu Lund-Johansenovi, M.D., Ph.D. za otevření dveří do světa afinitní proteomiky. Poděkování patří i mé rodině za podporu během celého mého studia.

## **Předmluva**

Předkládaná dizertační práce se skládá ze dvou částí. Jejich společným bodem je *in vitro* funkční testování buněčné signalizace, proliferace a apoptózy a sledování intracelulárních a povrchových znaků pomocí polychromatické průtokové cytometrie. První část, BUNĚČNÁ SIGNALIZACE LEUKEMICKÝCH BUNĚK, obsahuje výsledky výzkumu dětských akutních leukemií - i) sledování funkčního významu aberantně exprimovaných molekul CEACAM6 a NTAL a ii) cytometrická detekce povrchových a intracelulárních molekul pomocí nových „microarray“ technologií. Na projektech vývoje a testování nových „microarray“ technologií spolupracujeme s laboratořemi konsorcia EuroFlow ([www.euroflow.org](http://www.euroflow.org)) a s laboratoří Fridtjofa Lund-Johansena (Rikshospitalet, Department of Immunology, University of Oslo, Norsko). Druhá část, BUNĚČNÁ SIGNALIZACE NEMALIGNÍCH B-LYMFOCYTŮ, obsahuje výsledky výzkumu B-lymfocytů v periferní krvi zdravých dárců a pacientů s běžným variabilním imunodeficitem. Tento projekt zaštiťuje Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně.

## **Obsah**

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Předmluva.....	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7

### **Část I. Buněčná signalizace leukemických buněk**

1. Leukemie.....	8
1.1. Akutní lymfoblastická leukemie.....	9
1.1.1. Morfologie.....	9
1.1.2. Imunofenotyp.....	9
1.1.3. Cytogenetika.....	10
1.1.4. Prognostické faktory a léčba.....	11
1.1.5. Leukemogeneze a nově objevené prognostické faktory.....	12
1.1.6. Aberantně exprimované antigeny.....	13
1.1.6.1. Aberantně exprimovaná molekula CEACAM6 je zapojena v signalizaci vedoucí k apoptóze buněk akutní lymfoblastické leukemie .....	15
1.1.6.2. Adaptorový protein NTAL zvyšuje proximální signalizaci přes povrchový imunoreceptor a potenciuje glukokortikoidy navozenou apoptózu buněk T-ALL.....	19
1.2. Nové cytometrické techniky detekce molekul intracelulárních signálních drah, potenciálně prognostických znaků a fúzních proteinů asociovaných s akutní leukemií.....	21
1.2.1. Průtoková cytometrie v diagnostice akutních leukemií.....	21
1.2.2. Průtoková cytometrie ve výzkumu akutních leukemií.....	22
1.2.2.1. „Single-Cell Phospho-Flow Cytometry“.....	22
1.2.2.2. „Microsphere-based Flow Cytometry Technology“.....	23
1.2.2.2.1. Multiplexní imunoprecipitace buněčných proteinů 1725 komerčně dostupnými protilátkami.....	26
1.2.2.2.2. Automatické zpracování dat z cytometrické proteinové microarray.....	28
1.3. Akutní myeloidní leukemie.....	33
1.3.1. Morfologie.....	33
1.3.2. Imunofenotypizace.....	33
1.3.3. Cytogenetika.....	34
1.3.4. Cytometrický test pro rychlou a snadnou detekci fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$ při diagnóze akutní promyelocytární leukemie.....	35

### **Část II. Buněčná signalizace nemaligních B-lymfocytů**

2.1. Vývoj lidských B-lymfocytů.....	39
2.1.1. Subpopulace naivních CD24 pozitivních B-lymfocytů objevené při charakterizaci lymfocytárních subpopulací pacientů s běžným variabilním imunodeficitem.....	41
3. Seznam zkratk.....	46
4. Seznam autorských publikací a prezentací.....	48
4.1. Seznam publikací vztahujících se k tématu dizertační práce.....	48
4.1.1. Seznam přijatých publikací.....	48
4.1.2. Seznam publikací zaslaných k revizi.....	48
4.2. Seznam prezentací vztahujících se k tématu dizertační práce.....	49
5. Reference.....	53

## **Abstrakt**

### **Buněčná signalizace leukemických buněk**

Akutní leukemie (AL) je nejčastější malignitou dětského věku. V Česku AL onemocní 90 až 100 dětí za rok. AL je komplexní onemocnění, které se patologicky projevuje na úrovni DNA, mRNA, proteinů i buněk. Leukemické buňky často aberantně exprimují molekuly, které se za fyziologických podmínek vyskytují u jiných buněčných typů a jejichž funkční zapojení není probádáno. Zjistili jsme, že molekula CEACAM6 se aberantně vyskytuje na lymfoblastech B-prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie, kde zvyšuje expresi a afinitu integrinů, mediuje signalizaci přes intracelulární proteinkinázy Akt, p38MAPK a p44/42 MAPK a spouští apoptózu leukemických buněk. Adaptorová molekula NTAL, aberantně exprimovaná v buňkách T-buněčné akutní lymfoblastické leukemie, mediuje signalizaci přes intracelulární proteinkinázu p44/42 MAPK a zvyšuje senzitivitu leukemických buněk ke glukokortikoidům. Současný výzkum biologie leukemií je zaměřen převážně na sledování mutací na úrovni DNA, funkční důsledky těchto změn na buněčné úrovni však objasněny nejsou. Spojníkem mezi genovou expresí a buněčnou fyziologií jsou proteiny, analýza proteomu tedy pomůže prohloubit znalosti o mechanismu nemoci, prognóze a odpovědi na léčbu. Technologie proteinových microarrays se stávají centrem zájmu základního výzkumu i diagnostických aplikací. Mohou být využity pro rychlou a snadnou kvantitativní detekci fúzních proteinů (např. PML-RAR $\alpha$  akutní promyelocytární leukemie) nebo pro detekci změn proteomu po inhibici leukemických buněk cílenými terapeutiky.

### **Buněčná signalizace nemaligních B-lymfocytů**

Běžný variabilní imunodeficit (CVID) je heterogenní skupina onemocnění, charakterizovaná sníženou produkcí protilátek. Možnou příčinou tohoto selhání imunitního systému jsou změny proteomu a následně změněná signalizace a vyžívání B-lymfocytů. Pacienti s CVID mají obvykle méně zralých paměťových B-lymfocytů, více naivních B-lymfocytů a zvláštních (CD27neg CD21neg CD38neg) B-lymfocytů, jež jsou u zdravých lidí zcela ojedinělé. Tyto CD21neg B-lymfocyty jsme rozdělili podle exprese IgM a CD24 na dvě populace. Na základě funkčních testů (*in vitro* diferenciací) a exprese IgM a CD24, odpovídají tyto dvě populace folikulárním (FO) I a FO II buňkám popsaným dříve u myši. CD27neg CD21neg CD38neg B-lymfocyty zřejmě diferencují z FO I nebo FOII buněk ztrátou exprese molekuly CD21.

## **Abstract**

### **Leukemia cell signaling**

Acute leukemia (AL) is the most common pediatric cancer. Approximately 90 - 100 children is diagnosed every year in the Czech Republic. Acute leukemia is a complex disease that is pathologically manifested at the DNA, mRNA, protein and cellular level. Leukemic cells aberrantly express molecules that are found in other cell types under physiological conditions and their functional involvement in leukemic cells is unknown. We found that aberrantly expressed CEACAM6 increases the expression and affinity of integrins, increases the phosphorylation of intracellular kinases Akt, p38MAPK and p44/42 MAPK and triggers apoptosis in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. Adaptor molecule NTAL, aberrantly expressed in T-cell acute lymphoblastic leukemia, signals through intracellular kinase p44/42 MAPK and potentiates corticosteroid induced apoptosis. Current leukemia research is focused mainly on monitoring of mutations at the DNA level, however, the functional consequences of these changes on cellular machineries are not straightforward. Since proteome analysis can provide link between gene sequence and cellular physiology, proteomics will contribute to elucidate mechanism of disease, prognosis and response to treatment. Protein microarrays technology is of major interest for basic proteomic research as well as for diagnostic applications. It can be used for fast and easy quantitative detection of fusion proteins (e.g. PML-RAR $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia) or for detection of proteomic changes after targeted therapeutics.

### **Signaling of non-malignant B-cells**

Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous group of diseases characterized by decreased production of antibodies. Changes in the proteome, altered signaling, impaired maturation of B-lymphocytes or defective B-cell / T-cell interactions are possible causes of this immune system failure. Patients with CVID typically present with less memory B-cells and more naive B-cells. Subgroup of patients also presents with CD27<sup>neg</sup> CD21<sup>neg</sup> CD38<sup>neg</sup> B-lymphocytes that are rare in healthy humans. We divided these CD21<sup>neg</sup> B-lymphocytes into two populations according to CD24 and IgM expression. Focusing on the expression of IgM and CD24 and on *in vitro* functional tests, these two populations correspond to follicular (FO) I and FOII cells previously described in mice. CD27<sup>neg</sup> CD21<sup>neg</sup> CD38<sup>neg</sup> B-lymphocytes probably originate from the two FO subsets after loss of CD21 expression.

## Část I.

### Buněčná signalizace leukemických buněk

#### 1. Leukemie

Termínem leukemie označujeme nádorové onemocnění hematopoetické tkáně. Hematopoetický systém kostní dřeně je složen z nediferencovaných pluripotentních kmenových buněk, které proliferují a diferencují do dvou buněčných linií - myeloidní a lymfoidní. Myeloidní buňky diferencují a vyžívají v erythrocyty, thrombocyty, monocyty a granulocyty, lymfoidní buňky v B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK-buňky<sup>1</sup>. Leukemie vzniká klonální expanzí nezralé lymfoidní nebo myeloidní buňky, která je zablokována v určité fázi svého vývoje<sup>2</sup>. Leukemie představují spolu s nádory centrálního nervového systému nejčastější onkologická onemocnění v dětském věku.

V posledních 30ti letech došlo k obrovskému pokroku v poznání této choroby, její diagnostice a léčbě, takže již dávno neplatí, že jde o onemocnění nevléčitelné. Leukemií onemocní v ČR zhruba 100 dětí za jeden rok. V 80% jde o akutní lymfoblastickou leukemii (ALL), v 15% o akutní myeloidní leukemii (AML). Zbytek představují tzv. akutní bifenotypické leukemie (jedna populace buněk splňující současně kritéria ALL i AML), akutní bilineární leukemie (s jednou lymfoidní a druhou myeloidní populací buněk) a chronická myeloidní leukemie (CML, 1-3%)<sup>3</sup>.

Základní dělení leukemií na akutní a chronické je stále platné, i když se jedná o historickou záležitost. Původně se toto dělení vztahovalo k průběhu nemoci před zavedením účinné léčby, akutní leukemie vedla poměrně rychle k smrti pacienta za bouřlivějších klinických příznaků, naopak průběh chronické leukemie byl pomalejší<sup>4</sup>. Dnes je akutní leukemie charakterizována jako rychle se vyvíjející onemocnění, které postihuje zejména nezralé, nediferencované buňky. Tyto buňky nejsou schopny vykonávat svou normální funkci. Chronická leukemie je pomaleji se vyvíjející onemocnění postihující zralejší, diferencované buňky, které si zachovávají některé ze svých normálních funkcí<sup>1</sup>.



## **1.1. Akutní lymfoblastická leukemie**

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku v hospodářsky rozvinutém světě. V České republice ALL onemocní 70 až 80 dětí za rok<sup>3</sup>.

### **1.1.1. Morfologie**

Morfologicky se ALL klasifikuje podle FAB (francouzsko-americko-britské) klasifikace na skupiny L1 (malé homogenní lymfoblasty, nejčastěji ALL z prekurzorů B-lymfocytů (tzv. B-cell precursor ALL, BCP-ALL), L2 (lymfoblasty rozdílné velikosti, nejčastěji ALL z prekurzorů T-lymfocytů (T-ALL) a L3 (velké lymfoblasty se silně bazofilní cytoplazmou a častou vakuolizací, nejčastěji ALL ze zralých B-lymfocytů)<sup>5,6</sup>.

### **1.1.2. Imunofenotyp**

Imunofenotypizace neboli stanovení povrchových a intracelulárních znaků pomocí průtokové cytometrie zažívá v posledních letech ohromný rozmach. Rychlá odpověď na základní diagnostické otázky, zda se jedná o nemaligní proliferaci prekurzorů nebo o leukemii, zda leukemie vychází z myeloidní nebo z lymfoidní řady, zda se jedná o ALL z prekurzorů B-lymfocytů nebo z prekurzorů T-lymfocytů má velký význam pro potvrzení či vyloučení malignity a zařazení pacienta do léčebného protokolu. Leukemické buňky exprimují antigeny, které odpovídají určitým vývojovým stádiům nemaligních lymfoblastů, ale také antigeny, kterými se od svých nemaligních protějšků odlišují (asynchronní antigeny odpovídající jinému stupni zralosti či aberantní antigeny charakteristické pro jinou vývojovou linii)<sup>7</sup>.

Imunofenotypová klasifikace ALL podle návrhu skupiny EGIL (European Group for Immunological characterization of Leukemia)<sup>8,9</sup>, kterou používá v rámci léčebných protokolů i Česká republika, rozlišuje několik kategorií podle positivity uvedených znaků (tabulka 1, tabulka 2):

<b>BCP-ALL</b>		cyCD79	a/nebo CD19	a/nebo cy/mCD22	CD10	cy IgM	cy/m	nebo
B I	pro-B			pos	neg	neg		neg
B II	common B			pos	pos	neg		neg
B III	pre-B			pos	pos	pos		neg
<b>zralé B-ALL</b>								
B IV	mature B			pos	pos	pos		pos

Tab. 1 Imunofenotypová klasifikace BCP-ALL a zralých B-ALL<sup>8,9</sup>.

cy...cytoplazmatický, m...membránový, pos...pozitivní, neg...negativní,

κ, λ. ... lehké imunoglobulinové (Ig) řetězce

<b>T-ALL</b>		cyCD3	CD7	CD2 a/nebo CD5	a/nebo CD8	CD1a	mCD3+/CD1a-	m / TCR	m / TCR
T I	pro-T	pos	pos			neg	neg		
T II	pre-T	pos	pos			pos	neg		
T III	cortical T	pos	pos			pos	neg		
T IV	mature T	pos	pos			pos	pos		
group a	/ T-ALL	pos						pos	neg
group b	/ T-ALL	pos						neg	pos

Tab. 2 Imunofenotypová klasifikace T-ALL<sup>8,9</sup>.

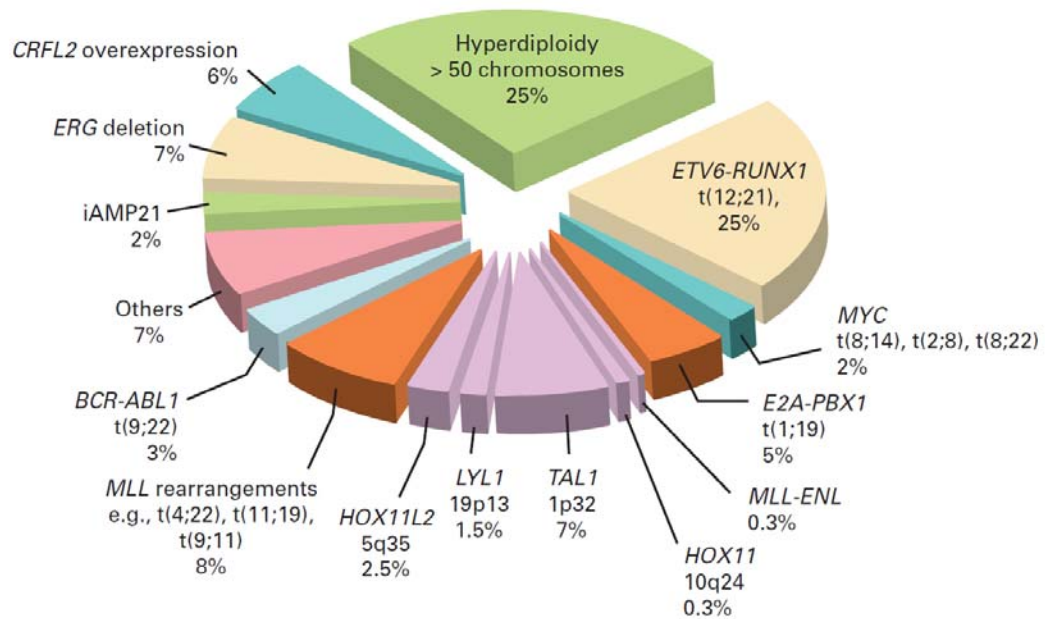
cy...cytoplazmatický, m...membránový, pos...pozitivní, neg...negativní, TCR (T-cell receptor, T-buněčný receptor)

Imunofenotypová klasifikace prodělává neustálý vývoj, v roce 2009 byla popsána nová skupina T-ALL, tzv. early T-cell precursor ALL (ETP-ALL), charakterizovaná nezralým imunofenotypem bez exprese CD1a a CD8, s nízkou expresí CD5, s expresí jednoho nebo více myeloidních znaků nebo znaků kmenových buněk (CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b, CD65) a genovým expresním profilem podobným normálním thymickým prekurzorům s multilineárním diferenciačním potenciálem a větší genetickou nestabilitou. Tito pacienti měli extrémně špatnou prognózu<sup>10</sup>.

### 1.1.3. Cytogenetika

V 80 až 90% případů dětské akutní lymfoblastické leukemie byly popsány chromozomální změny<sup>5</sup>. Chromozomální změny mohou být strukturální nebo numerické, v mnoha případech ALL se vyskytují pohromadě. Strukturální abnormality zahrnují translokace (např. *ETV6/RUNX1*, *BCR-ABL1*), delece, inverze a další genové změny s onkogenetickým potenciálem, které vedou k přerušení specifické buněčné diferenciace a proliferace a k nástupu leukemogeneze. Numerické abnormality jsou klasifikovány podle počtu chromozómů na buňku, vysoce hyperdiploidní karyotyp je charakterizován 50-

65 chromozómy, hypodiploidní karyotyp méně než 46 chromozómy a tzv. téměř haploidie 23-29 chromozómy na buňku<sup>11,12</sup> (obr. 1).



Obr. 1 Zastoupení specifických genových abnormalit dětských ALL (abnormality asociované s T-ALL jsou vyznačeny fialově)<sup>13</sup>.

#### 1.1.4. Prognostické faktory a léčba

Díky pokrokům ve výzkumu a v medicínských technologiích vzrostla během posledních 50ti let šance na vyléčení dětí s ALL z 0 na 80%<sup>14</sup>. Hlavním předpokladem tohoto úspěchu je správné zařazení pacienta do vhodné léčebné skupiny, zohledňující riziko selhání léčby. Stratifikace pacientů se provádí na základě ukazovatelů prognózy (klinické nálezy, molekulárně-genetické, imunologické a morfologické charakteristiky leukemických buněk v době diagnózy a odpověď na prednisonovou léčbu 8. den od zahájení terapie). V sedmdesátých letech se do praxe zavedla intenzivní chemoterapie a spolu s ní riziku přizpůsobená léčba („risk-adapted therapy“). Od devadesátých let se díky lepším možnostem detekce chromozomálních translokací ukazuje prognostický význam jednotlivých fúzních genů<sup>14,15,12</sup>.

V České republice jsou děti s ALL léčeny podle moderních protokolů německé pracovní skupiny BFM (Berlín - Frankfurt - Münster). Podle nich rozlišujeme tři kategorie rizika: standardní, střední a vysoké<sup>16</sup>. Cílem této stratifikace pacientů je maximalizovat účinnost léčby a minimalizovat její toxicitu. Intenzita

terapie odráží závažnost onemocnění a je přímo úměrná pravděpodobnosti relapsu (návratu) onemocnění. Do skupiny s nejvyšším rizikem relapsu patří všichni pacienti s translokací *BCR-ABL1* a *MLL-AFF1* a hypodiploidii. Naopak lepší prognózu nese fúzní gen *ETV6-RUNX1* a vysoká hyperdiploidie<sup>17</sup>. Dalším, koncem 90. let zavedeným, významným prognostickým faktorem, je stanovení tzv. minimální reziduální (zbytkové) nemoci (MRN, nejmenšího množství nádorových buněk, které lze vyšetřit, a které může způsobit relaps onemocnění). Informace o tom, kolik nádorových buněk v organismu přežívá a jak postupuje jejich eliminace, je nejlepší kontrolou účinnosti terapie. MRN se sleduje zejména metodami kvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR) (detekce fúzních genů a detekce přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR)) a pomocí průtokové cytometrie<sup>18,19</sup>.

#### **1.1.5. Leukemogeneze a nově objevované prognostické faktory**

K malignímu zvratu zdravých prekurzorů B- nebo T-lymfocytů dochází pravděpodobně následkem vytvoření fúzního genu<sup>20</sup>. Fúzní gen je důležitý při iniciaci leukemie, samotný však nedokáže generovat plně leukemický fenotyp, což vedlo k domněnce přítomnosti dalších kooperativních onkogenetických změn. S rozvojem nových molekulárně genetických technik (high-resolution genome wide analysis of gene expression, DNA copy number alterations, single-nucleotide polymorphisms) bylo v posledních letech objeveno mnoho těchto tzv. kooperativních mutací<sup>21</sup>. Tyto druhotné události (delece, amplifikace, bodové mutace či strukturální změny) ve většině postihují geny důležité v lymfoidní diferenciaci (*PAX5*, *TCF3*, *EBF1*, *IKZF1*, *IKZF3*, *BTG1*), inhibici buněčného cyklu (*CDKN2A/B*, *RB1*), apoptóze, signalizačních kaskádách (*CRLF2*, *JAK*) a rezistenci na léčbu (*NR3C1*, *NR3C2*)<sup>22,23,24</sup>. *PAX5* gen kóduje transkripční faktor esenciální pro vývoj B-lymfocytů, který aktivuje expresi genů specifických pro B-lymfocyty (*CD19*, *CD79A*, *BLNK*, *CD72*) a inhibuje geny jiných vývojových linií. *PAX5* delece, bodové mutace, intragenní amplifikace a kryptické translokace byly objeveny u 32% dětských ALL<sup>21,25</sup>. Přestože jsou tyto genetické změny důležité při leukemogenezi, jejich prognostický význam zatím nebyl nalezen<sup>23</sup>. *IKZF1* gen kóduje časný lymfoidní transkripční faktor IKAROS. Monoalelické delece genu *IKZF1* byly objeveny u 80% *BCR-ABL1* pozitivních ALL, kde korelují s horší prognózou a

vznikem relapsu<sup>26,27</sup>. Delece *IKZF1* byly objeveny i u *BCR-ABL1* negativních ALL, jejichž genetický profil je podobný *BCR-ABL1* pozitivním ALL. Tyto případy byly označeny jako BCR-ABL1-like ALL. Jejich prognóza je srovnatelná s prognózou *BCR-ABL1* pozitivních ALL<sup>28</sup>. Kryptické translokace *P2RY8-CRLF2*, *IGH-CRLF2* nebo mutace v samotném genu *CRLF2*, vedoucí ke zvýšené expresi proteinu CRLF2 (Cytokine Receptor Like Factor 2, vytvářející heterodimer s receptorem  $\alpha$  interleukinu (IL) 7) na povrchu leukemických buněk, byly objeveny u 6-7% BCP-ALL a 50-60% AL asociovaných s Downovým syndromem<sup>29,30</sup>. *CRLF2* alterace jsou v 60% asociovány s aktivačními mutacemi Janus kináz (JAK) a vyvolávají konstitutivní aktivaci JAK-STAT signalizační dráhy<sup>31</sup>. V myším modelu vyvolávají proliferaci progenitorů B-lymfocytů bez přítomnosti exogenních cytokinů, mutace *CRLF2* a *JAK* jsou tak kooperující mutace vedoucí k leukemogenezi<sup>29</sup>. U vysoce rizikových ALL jsou nalézány alterace *IKZF1* pospolu s mutacemi *JAK* a *CRLF2* a jsou spojovány s velmi špatnou prognózou<sup>32</sup>.

#### 1.1.6. Aberantně exprimované antigeny

Leukemogenetické změny vedou primárně k ovlivnění genové regulace (především u ALL s fúzními geny *ETV6-RUNX1* a *MLL-AFF1*) nebo k aktivaci kinázových kaskád (např. trvalá aktivace ABL kinázy fúzním proteinem BCR-ABL1). Tyto děje pak vedou k zástavě diferenciaci a k poruše regulace apoptózy a proliferace<sup>20</sup>. Ke vzniku maligního klonu dochází na různých stupních diferenciaci lymfoidních blastů, což lze zjistit vyšetřením membránových a cytoplazmatických antigenů, které jsou typické pro jednotlivé podskupiny fyziologických lymfoblastů. Maligní transformace buňky je také provázena expresí antigenů, které se za fyziologických okolností vyskytují u jiných buněčných typů, např. myeloidních buněk. Regulační mechanismus tohoto jevu, známého jako aberantní exprese, je však stále neznámý. Předpokládá se, že leukemie s aberantními antigeny vzniká jedním z následujících 3 mechanismů : i) leukemogeneze začíná již na úrovni nediferencované buňky, ii) leukemie vzniká na úrovni diferencované lymfoidní či myeloidní buňky, ale během leukemogeneze dojde k porušení vývojové příslušnosti („lineage commitment“) k lymfoidní, resp. myeloidní řadě, iii)

leukemie vzniká z fyziologicky přítomných, nepočtených a dosud neobjevených populací<sup>3,33</sup>. Biologické vlastnosti leukemické buňky (a regulace proliferace odlišná od nemaligního protějšku) jsou ovlivněny expresí těchto aberantních molekul. Některé aberantní molekuly se vyskytují napříč genotypy se srovnatelnou četností (např. CD13, CD33), jiné mají ke genotypu těsný vztah (např. CEACAM6 (Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6))<sup>33</sup>. Z pohledu diagnostiky jsou tyto molekuly vhodné jako prediktivní faktory (např. CD33 asociovaný s horší prognózou ALL<sup>34</sup>), mohly by ale také ovlivňovat (jako důležité adhezivní molekuly) biologické chování leukemických buněk v mikroprostředí kostní dřeně a být potenciálně využitelné při imunoterapii<sup>35,36</sup>. ALL je onemocnění, které vzniká a vyvíjí se v kostní dřeni. Mikroprostředí kostní dřeně zřejmě hraje zásadní úlohu ve vývoji tohoto onemocnění a je místem, kde reziduální leukemické buňky přežívají standardní chemoterapii. Buňky, které takto přežily, způsobují následně relaps onemocnění<sup>37</sup>. Stromální buňky kostní dřeně regulují lymfopoézu 3 základními mechanismy: produkcí rozpustných a membránových cytokinů, sekrecí proteinů extracelulární matrix (ECM) a přímým mezibuněčným kontaktem zprostředkovaným adhezivními receptory<sup>38</sup>. Právě adhezivní molekuly (VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1), fibronectin, integriny, kadheriny) se jeví jako kritické v protekci leukemických buněk před chemoterapií navozenou apoptózou, např. interakce VCAM-1 a integrinu skupiny beta1 je doprovázena rezistencí BCP-ALL na cytarabin a etoposid<sup>39,40</sup>.

Význam aberantně a asynchronně exprimovaných antigenů pro prognózu dětských leukemií je v laboratořích CLIP dlouhodobě sledovanou problematikou<sup>41,33,34</sup>. Kladli jsme si otázku, zda a jak ovlivňuje aberantně exprimovaný antigen CEACAM6 biologické chování buněk BCP-ALL v kontextu mikroprostředí kostní dřeně.

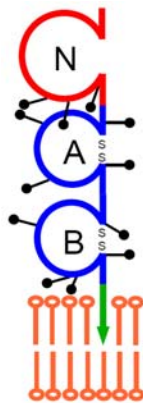
### 1.1.6.1. Aberantně exprimovaná molekula CEACAM6 je zapojena v signalizaci vedoucí k apoptóze buněk akutní lymfoblastické leukemie

#### Příloha 1:

*Aberrantly expressed CEACAM6 is involved in the signaling leading to apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells, Veronika Kanderová, Ondřej Hrušák, and Tomáš Kalina, *Experimental Hematology* 2010;38:653–66, IF: 3,106*

#### Úvod

Molekula CEACAM6 (CD66c, dříve zvaná Nonspecific Crossreacting Antigen, NCA 50/90 nebo KOR-SA3544) je členem rodiny karcinoembryonálního antigenu (CEA family). Skládá se z jedné IgV-like domény (homologní s variabilní (V) imunoglobulinovou (Ig) doménou) a ze dvou IgC2-like domén (homologních s konstantní (C) Ig doménou sady C2). Jedna IgC2-like doména je typu A (93 aminokyselin), druhá typu B (85 aminokyselin). Molekula CEACAM6 je silně glykosylovaná na asparaginových zbytcích a zakotvená v membráně pomocí GPI (glykofosfatidylinositolové) kotvy (<http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>, obr. 2)<sup>42</sup>.



Obr. 2 Schéma molekuly CEACAM6 (<http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>)

N - N-terminální Ig V-like doména, A, B - Ig C2-like domény, S-S - disulfidové můstky,

● glykosylační místa,  glykofosfatidylinositolová (GPI) kotva

CEACAM6 je exprimovaná na buňkách střevního epitelu a některých orgánů gastrointestinálního traktu, zvýšená exprese je časným molekulárním znakem nádorové transformace<sup>43,44,45</sup>. CEACAM6 je intenzivně studována

v souvislosti s kolorektálním karcinomem a karcinomem pankreatu, je však spojována i s jinými typy lidských nádorů (např. plic nebo prsní žlázy)<sup>46,44,47,48,49</sup>. Na kolorektálním karcinomu byla experimentálně prokázána schopnost CEACAM6 aktivovat Kupfferovy buňky, které působením cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) zvyšovaly expresi adhezivních molekul ICAM-1, VCAM-1 a E-selektinu na buňkách endotelu a tím zvýšily metastatický potenciál maligních kolonocytů<sup>50</sup>. Na kolorektálním karcinomu a karcinomu pankreatu byl prokázán její význam pro rezistenci k anoikis (apoptóze mediované ztrátou kontaktu s extracelulární matrix) a tím pro metastatický potenciál nádorových buněk<sup>51,52</sup>. Utišením genu CEACAM6 pomocí si-RNA („short interfering“ RNA) došlo ke zvýšení kaspázové aktivity a k urychlení anoikis v modelu *in vitro* a k inhibici metastatické aktivity a angiogeneze karcinomu pankreatu v modelu *in vivo*<sup>53</sup>. CEACAM6 je tak možným terapeutickým cílem pro kontrolu malignity. Protilátky proti CEACAM6 inhibovaly adhezi a metastázování v *in vitro* i v *in vivo* modelech všech výše uvedených nádorů<sup>54,55</sup>. Duxbury a kol. použili cílenou imunoterapii (anti-CEACAM6 specifickou protilátku konjugovanou s imunotoxinem Saporin) v myším modelu karcinomu pankreatu. Tento přístup protinádorové terapie prokázal silně apoptotické účinky zprostředkované kaspázami *in vitro* a dokázal výrazně potlačit růst nádoru *in vivo*<sup>56</sup>.

CEACAM6 není pouze znakem nádorové transformace, ale také důležitou adhezivní molekulou. Váže např. E-selektin, CEACAM8 i samotnou CEACAM6<sup>57</sup>. V rámci hematopoetického systému je exprimována pouze na granulocytech a jejich prekurzorech, kde plní funkci homotypické a heterotypické adheze a Ca<sup>2+</sup> mediované signalizace. Díky povrchovému „sialyl Lewis“ epitopu umožňuje adhezi granulocytů k povrchu cévních endotelií (k E-selektinu). Prokřížení molekul CEACAM6 aktivuje integriny skupiny  $\beta 1$  a  $\beta 2$  a zvyšuje tak adhezivitu granulocytů ke komponentám ECM (fibronektinu, kolagenu IV, lamininu)<sup>58,59</sup>.

CEACAM6 je také jedním z nejčastěji aberantně exprimovaných myeloidních znaků na buňkách dětské BCP-ALL<sup>60,61,62,41,33</sup>. Je prokazována na *BCR-ABL1* pozitivních CML, na některých subtypech ALL (pozitivní korelace s chromozomální translokací *BCR-ABL1* a s hyperdiploidii, negativní



korelace s chromozomální translokací *ETV6-RUNX1*<sup>41</sup>) a využívána k detekci MRN průtokovou cytometrií<sup>33</sup>. Mejstříková a kol., autoři studie zaměřené na standardizaci a optimalizaci monitorování MRN pomocí průtokové cytometrie uniformní strategií, sledovali zastoupení nemaligních buněk specificky pro konkrétní časový bod léčby pomocí tzv. cross lineage kontrol (tzn. vzorky T-ALL měřeny kombinacemi protilátek pro BCP-ALL a naopak). Z výsledků vyplývá, že molekula CEACAM6 může být v podmínkách stresové hematopoézy exprimována i fyziologicky, spíše na zralejších B-lymfocytárních buňkách, ale nevyhýbá se zcela ani CD10 pozitivním B-lymfocytárním prekurzorům (nepublikovaná data). Ačkoli je tedy CEACAM6 důležitým znakem používaným pro detekci MRN BCP-ALL, její samotná exprese na B-lymfoidní buňce nesvědčí pro maligní původ buňky a hodnocení MRN je třeba provádět v kontextu ostatních vyšetřovaných antigenů optimálně pomocí polychromatické průtokové cytometrie<sup>19</sup>.

### **Výsledky a diskuze**

V projektu jsme jako první studovali funkční roli aberantně exprimované molekuly CEACAM6 na buňkách BCP-ALL. Experimenty jsme prováděli na BCP-ALL buněčných liniích (NALM-24 a TOM-1) a primárních maligních vzorcích BCP-ALL odebraných z kostní dřeně při diagnóze onemocnění. K prokřížení molekul CEACAM6 a ke spuštění signalizace jsme použili specifickou anti-CEACAM6 protilátku (klon 9A6). Jako kontrolu jsme využili anti-CD24 protilátku (klon SN3) k prokřížení a stimulaci CD24, tedy neaberantně exprimované GPI-kotvené molekuly<sup>63</sup>.

Zjistili jsme, že CEACAM6 i CD24 aktivují na BCP-ALL fosforylaci proliferačních a apoptotických signalizačních molekul p44/42 MAPK (mitogen-activated protein kinase), Akt a p38 MAPK s podobnou dynamikou a ovlivňují, rovněž podobně, povrchovou expresi a afinitu adhezivních molekul (integrinů skupiny  $\beta 1$  a integrinů skupiny  $\beta 2$ ). V konečném důsledku však CEACAM6 spouští apoptózu *in vitro*. Prokřížení molekul CEACAM6 spustilo pro-apoptotický signál, zatímco prokřížení kontrolní molekuly CD24 nevyvolalo žádný apoptotický efekt. CD24 je B-buněčný diferenciační antigen exprimovaný na velmi časných B-lymfocytárních prekurzorech i na zralých B-

lymfocytech, její exprese klesá při aktivaci B-buněk. CD24 mediuje buněčnou signalizaci (fosforylaci p38 MAPK a p44/42 MAPK) a ovlivňuje aktivitu integrinů, byla ale popsána i její role v apoptóze pro-B ALL i pre-B ALL buněčných linií<sup>64,65</sup>.

Zajímavé bylo zjištění, že ligace molekuly CEACAM6 neměla žádný apoptotický ani anti-apoptotický efekt na primární buňky bez fúzního proteinu BCR/ABL1. (Tento efekt však mohl být způsobem spontánní masivní apoptózou primárních buněk *in vitro*<sup>38</sup>.) Protože je leukemický potenciál BCP-ALL buněk s chromozomální translokací *BCR-ABL1* přisuzován konstitutivní aktivaci fúzního proteinu BCR/ABL1, otestovali jsme, zda inhibice BCR/ABL1 fúzního proteinu specifickým (klinicky používaným) inhibitorem imatinib mesylátem, ovlivní efekt vyvolaný molekulou CEACAM6. Inhibice fúzního proteinu BCR/ABL1 imatinib mesylátem vyvolala očekávanou apoptózu<sup>66</sup>. Prokřížení molekul CEACAM6 však tuto apoptózu ještě urychlilo. Dále jsme sledovali, zda fibronectin (ligand integrinů skupiny  $\beta 2$ ) nebo stromální buňky odvozené z buněk kostní dřeně (linie HS-27a) mohou poskytnout anti-apoptotický (záchranný) signál BCP-ALL buňkám po stimulaci přes CEACAM6<sup>67</sup>. Stromální podkladová vrstva měla částečný podpůrný efekt na *in vitro* přežívání BCP-ALL buněk, apoptózu indukovanou CEACAM6 ale nezvrátila.

Naše výsledky jsou opačné než výsledky studií o CEACAM6 na jiných typech nádorů, které ukazují anti-apoptotický efekt signalizace přes CEACAM6<sup>52,68</sup>. Jedním možným vysvětlením je jiné složení lipidových raftů na buňkách BCP-ALL. Lipidové rafty jsou submikroskopické regiony plazmatické membrány obohacené o glykosfingolipidy a cholesterol, které sdružují esenciální proteiny důležité v signalizačních (např. kinázy rodiny Src) a adhezivních procesech (např. GPI-kotvené molekuly CEACAM6 a CD24)<sup>69,70</sup>. Jednotlivé GPI-kotvené molekuly se mohou nacházet v různých lipidových raftech s různými asociovanými signalizačními molekulami. Následná agregace GPI-kotvených molekul tedy může mediovat signály, které vyúsťují odlišnými biologickými funkcemi<sup>71</sup>. Určitou roli mohou hrát i podmínky *in vitro*, které se, i přes použití stromální podkladové vrstvy

napodobující mikroprostředí kostní dřeně, od *in vivo* podmínek značně odlišují.

### 1.1.6.2. Adaptorový protein NTAL zvyšuje proximální signalizaci přes povrchový imunoreceptor a potenciuje glukokortikoidy navozenou apoptózu buněk T-ALL

#### *Příloha 2:*

*Adaptor protein NTAL enhances proximal signaling and potentiates corticosteroid induced apoptosis in T-ALL, Karel Svojgr, Tomas Kalina, Veronika Kanderova, Tereza Skopcova, Tomas Brdicka, Jan Zuna, manuskript zaslaný do časopisu *Experimental Hematology**

#### Úvod

Transmembránové adaptorové molekuly jsou další důležitou složkou lipidových raftů. Jsou to molekuly s krátkou N-terminální extracelulární doménou a dlouhou doménou intracelulární, která obsahuje až 10 tyrosinových zbytků. Po signalizaci přes povrchový imunoreceptor jsou tyto tyrosinové zbytky fosforylovány kinázami rodiny Src nebo Syk a tvoří tak kotvící místa pro další molekuly s SH2 (fosfotyrosin-vazebnou) doménou. Do dnešního dne bylo charakterizováno 8 transmembránových adaptorových molekul (LAT, LAX, LIME, NTAL, PAG, SIT, TRIM, PRR7), z nichž čtyři (LAT, LIME, NTAL, PAG) jsou díky palmitoylaci krátkého intracelulárního motivu obsaženy v lipidových raftech<sup>72,73</sup>.

NTAL (Non-T cell Activation Linker) je přítomen na B-lymfocytech, NK buňkách a myeloidních buňkách. Po prokřížení povrchového B-buněčného receptoru (BCR, B Cell Receptor) nebo vysokoafinitních Fc gamma a Fc epsilon receptorů je NTAL fosforylován kinázou Syk a asociován s molekulami Grb2, Sos1, Gap1 a c-Cbl<sup>74</sup>. NTAL může působit aktivačně nebo inhibičně, podle typu buněk, na kterých je exprimován. U B-lymfocytů je po aktivaci BCR NTAL fosforylován, asociován s molekulou Grb2, následně dochází k Ca<sup>2+</sup> influxu a Ca<sup>2+</sup> mediované signalizaci<sup>75</sup>. V T-lymfocytech působí NTAL spíše inhibičně. Není exprimován v naivních T-lymfocytech, jeho exprese se zvyšuje po aktivaci přes T-buněčný povrchový imunoreceptor

(TCR, T Cell Receptor), NTAL následně vyvolává snížení aktivace T-lymfocyty<sup>76</sup>.

Přestože NTAL není exprimován ve zdravých naivních T-lymfocytech ani thymocytech (jeho exprese byla zaznamenána pouze na malém procentu buněk ve dřeni thymu), je vysoce exprimován na buňkách T-ALL<sup>72,77</sup>. T-ALL tvoří 15% všech dětských ALL. Podle BFM léčebného protokolu se v prvním týdnu T-ALL chemoterapie podávají glukokortikoidy (prednisolon či methylprednisolon) a intrathekální methotrexát, v den 7 po začátku terapie se sleduje redukce T-ALL blastů. Podle míry redukce blastů se pacienti rozdělují do 2 skupin, tzv. prednisone good-responders (s poklesem počtu blastů pod 1000 buněk na  $\mu\text{L}$ ) a tzv. prednisone poor-responders (s nižším poklesem počtu blastů)<sup>78</sup>. Prednisone good-responders přitom mají vyšší hladinu NTAL na mRNA úrovni než prednisone poor-responders, hladina exprese NTAL by mohla sloužit jako prognostickým faktor<sup>77</sup>.

### **Výsledky a diskuze**

V projektu jsme sledovali zda a jakým způsobem exprese molekuly NTAL přispívá ke glukokortikoidy (methylprednisolonem - methylovaný derivát prednisolonu) navozené apoptóze buněk T-ALL. Jako model jsme zvolili buněčnou T-ALL linii Jurkat se stabilně transfekovanou molekulou NTAL.

NTAL pozitivní buňky vykazovaly po podání methylprednisolonu vyšší míru apoptózy než NTAL negativní buňky. NTAL pozitivní buňky tedy mohou odpovídat skupině „prednisone good-responders“. Následně jsme sledovali, zda a jak ovlivňuje exprese molekuly NTAL TCR-mediovanou intracelulární signalizaci. Po prokřížení molekul TCR protilátkou anti-CD3 (klon C305) se zvýšila fosforylace signalizační molekuly p44/42 MAPK (ERK) v buněčné linii JURKAT, dosáhla maxima po 5 minutách a následně klesala. Expese molekuly NTAL v linii JURKAT/NTAL+ tuto TCR-mediovanou fosforylaci p44/42 MAPK ještě zvýšila. Míra a délka fosforylace p44/42 MAPK rozhoduje o selekci thymocytů po aktivaci TCR. Rychlá a mohutná p44/42 MAPK fosforylace vede k apoptóze, pozdější p44/42 MAPK fosforylace naopak k pozitivní selekci thymocytů<sup>79</sup>. Rychlá a vysoká fosforylace p44/42 MAPK tak zřejmě přispívá k vyšší míře apoptózy NTAL pozitivních buněk po TCR

aktivaci. Pro kontrolu jsme fosforylaci p44/42 MAPK zainhibovali specifickým inhibítorem UO126. Po této inhibici se rozdíl v methylprednisolonem i TCR navozené apoptóze mezi NTAL pozitivními a NTAL negativními buňkami zcela eliminoval.

Funkční testy provedené na buněčných liniích JURKAT a JURKAT/NTAL+ tedy částečně objasnily lepší odpověď NTAL pozitivních primárních T-ALL na léčbu (methyl)prednisolonem. NTAL může působit na buňkách T-ALL jako aktivační molekula, která zvyšuje proximální signalizaci přes povrchový imunoreceptor (zvýšením fosforylace p44/42 MAPK) a senzitivizuje T-ALL buňky k působení glukokortikoidů.

## **1.2. Nové cytometrické techniky detekce molekul intracelulárních signálních drah, potenciálně prognostických znaků a fúzních proteinů asociovaných s akutní leukemií**

### **1.2.1. Průtoková cytometrie v diagnostice akutních leukemií**

Průtoková cytometrie je moderní laboratorní metoda vhodná k detekci jednotlivých buněk či subpopulací buněk i ve velmi heterogenních buněčných populacích, např. v periferní krvi nebo kostní dřeni. Je rutinně využívána k imunofenotypizaci a dále k detekci funkčních stavů zkoumaných buněk (viability, apoptózy, apod)<sup>80</sup>. V hemato-onkologii je cytometrie centrální metodou, která řeší otázky diferenciatně diagnostické, typizuje leukemické buňky a má vliv na zařazení pacientů do léčebných protokolů<sup>7</sup>. Díky vysokému prahu detekce (1 leukemická buňka na 10 000 zdravých buněk) je průtoková cytometrie vhodná ke sledování minimální reziduální nemoci - a tudíž i k průběžnému sledování skutečné úspěšnosti léčby. Díky nestabilitě exprese některých antigenů však správnost interpretace dat závisí na zkušenostech cytometristy<sup>19</sup>. V rámci pracovních skupin EuroFlow a BFM se Laboratoř CLIP - Cytometrie podílí na optimalizaci a standardizaci imunofenotypické klasifikace a prognostické subklasifikace hematologických malignit a testuje nové cytometrické metody detekce fúzních proteinů leukemických buněk (BCR-ABL1 a PML-RAR $\alpha$ )<sup>81</sup>.

### **1.2.2. Průtoková cytometrie ve výzkumu akutních leukemií**

Hlavním cílem biomedicínského výzkumu posledních let je získávání informací o genech, proteinech a dalších biomolekulách a jejich integrace do celkového funkčního modelu buňky a organismu<sup>82</sup>. Přestože genové expresní profilování může poskytnout důležité informace pro subklasifikaci ALL a AML a hledat nové potenciálně prognostické faktory<sup>83,84,85</sup>, úroveň exprese mRNA transkriptu často nekoreluje s expresí proteinu a rozdílně exprimované geny nemusí být nutně zapojeny v patogenezi leukemie<sup>86</sup>. Úroveň proteinové exprese a post-translační modifikace proteinů mohou poskytnout nezávislou nebo doplňující informaci, která není zachycena transkripčním profilováním. Funkční proteomika je tedy důležitým informačním zdrojem, který může přispět k pochopení patogeneze leukemií a rozšířit možnosti budoucí terapie<sup>87</sup>.

K detekci proteinů exprimovaných leukemickými buňkami se dnes využívá zejména průtoková cytometrie, analýza je zaměřena především na povrchové molekuly. Expese povrchových molekul koreluje s vývojovým stádiem buňky, může dokonce odrážet genotyp leukemie, přesto se v diagnostice hematologických malignit využívá méně než 50 znaků<sup>88,89</sup>. K přesnější subklasifikaci a predikci odpovědi na léčbu je nutné získat kvalitativní a kvantitativní přehled o celkovém buněčném proteomu. Současné proteomice dominuje hmotnostní spektrometrie, která má kapacitu objevovat velké množství (až stovky) nových molekul. Hofmann a kol. takto identifikovali až 500 povrchových molekul AML<sup>89</sup>. Hmotnostní spektrometrie je však časově i technicky náročná metoda a není tedy rozšířena v klinických laboratořích tak jako průtoková cytometrie. Cílem našeho výzkumu je vytěžit co nejvíce z „high-throughput“ možností průtokové cytometrie a zvýšit množství vyšetřovaných antigenů 10x až 100x.

#### **1.2.2.1. „Single-Cell Phospho-Flow Cytometry“**

Posttranslační modifikace intracelulárních signálních proteinů poskytuje jedinečný pohled na funkční stav jednotlivých buněk. Jednou z nejpřínosnějších metodik nově vyvinutých ke studiu biologického chování primárních nádorových buněk je tzv. Single-Cell Phospho-Flow Cytometry, tedy cytometrická detekce fosforylovaných forem intracelulárních

signalizačních proteinů. Intracelulární signalizační dráhy představují složitou komunikační síť, která přenáší signály z mnoha povrchových receptorů do jádra, kde dochází k aktivaci určitých genových cílů. Tyto dráhy hrají důležitou úlohu v buněčné proliferaci, diferenciaci, přežívání, apoptóze a buněčné smrti. Fosforylace tyrosinových, serinových a threoninových zbytků je kritická pro kontrolu aktivity proteinů (kináz a fosfatáz) zúčastněných v těchto signálních drahách. Vývoj vysoce specifických protilátek, které rozeznávají fosforylovanou a nefosforylovanou formu určitého proteinu, umožňuje spolu s průtokovou cytometrií detekci aktivačních stavů proteinů na úrovni jednotlivých buněk a v různých (i velmi malých) buněčných subpopulacích. Výhodou této metodiky je současné multiparametrové značení povrchových a intracelulárních antigenů, které umožňuje rychle identifikovat přesný signalizační profil v definované buněčné subpopulaci a detekovat stimul-specifický nebo buněčně-specifický fenotypový profil<sup>90,91</sup>.

„Single-Cell Phospho-Flow Cytometry“ je využívána např. pro rychlou detekci fosforylace molekuly STAT5 v odpovědi na podání GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů) u GM-CSF hypersenzitivních juvenilních myelomonocytárních leukemií (JMML)<sup>92,93</sup>. Ve studii „Aberrantly expressed CEACAM6 is involved in the signaling leading to apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells a „Adaptor protein NTAL enhances proximal signaling and potentiates corticosteroid induced apoptosis in T-ALL“ jsme metodu „Single-Cell Phospho-Flow Cytometry“ využili k detekci časně signalizace přes povrchové molekuly CEACAM6 a CD24, resp. TCR.

#### **1.2.2.2. „Microsphere-based Flow Cytometry Technology“**

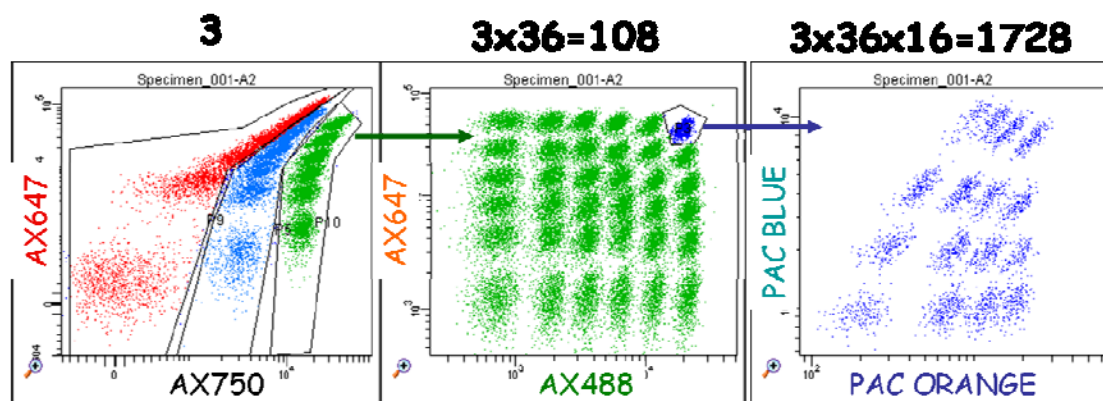
Technologie proteinových „microarrays“ se hojně využívají v základním výzkumu i v diagnostických aplikacích. V závislosti na požadavcích se používají dva základní typy „microarrays“ : planární „microarrays“ a „microsphere-based microarrays“. Planární „microarray“ systémy jsou ideální pro detekci velkého počtu cílových proteinů, jejich použití je ale omezeno nízkou rychlostí analýzy a malým počtem měřených vzorků<sup>94</sup>. V roce 2008 Tibes a kol. a Kornblau a kol. představili novou, tzv. Reverse Phase Protein Array, pomocí které identifikovali 51 proteinů a jejich fosforylovaných forem

zúčastněných v signalizaci, kontrole buněčného cyklu a apoptózy v diagnostických vzorcích AML<sup>87,95</sup>. Velmi zajímavou alternativou jsou tzv. microsphere-based flow cytometry microarrays, kterými se detekují povrchové i intracelulární proteiny pomocí protilátek ukotvených na plastových mikrokuličkách. Kuličky jsou opticky kódované - fluorescenční, infra-červené, nebo pouze světlo rozptylující. Nejčastěji se setkáváme se „sandwichovým“ uspořádáním, kdy je na kuličce navázána monoklonální protilátka proti detekovanému antigenu a po přidání analyzovaného vzorku se do směsi přimísí fluorescenčně značená detekční protilátka proti jinému epitopu stejného antigenu<sup>94</sup>. V současnosti jsou tyto technologie využívány zejména pro detekci cytokinů (např. sady od firem BenderMed Systems, Illumina), firmy Luminex a BD Biosciences rozšířili aplikace na hormony, růstové faktory, diagnostické znaky nebo intracelulární signální molekuly. EuroFlow konsorcium (včetně laboratoře CLIP) ve spolupráci s BD Biosciences nedávno představili „microsphere-based assays“ pro detekci BCR-ABL1 fúzního proteinu u ALL a CML a pro detekci PML-RAR $\alpha$  fúzního proteinu u AML<sup>81</sup>. Hlavním limitujícím faktorem „sandwichových“ uspořádání je nedostatek párů vazebná protilátka-detekční protilátka, což tyto testy omezuje na max. 100 analyzovaných proteinů<sup>94</sup>.

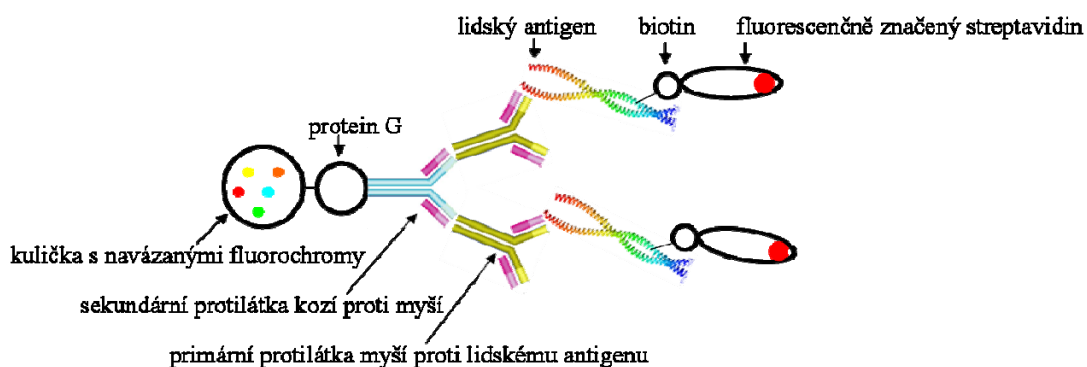
V laboratoři Dr. Lund-Johansena (Department of Immunology, Rikshospitalet University Hospital and University of Oslo, Norway) vyvinuli novou inovativní „microsphere-based microarray“, pomocí které lze specificky a kvantitativně detekovat až 1728 proteinů z jednoho omezeného vzorku (stačí 10 miliónů) buněk<sup>96</sup>. „Array“ je souborem polymetakrylátových mikrokuliček označených 5ti fluorescenčními próbami v několika koncentracích (obr. 3), na nich jsou přes protein G ukotveny protilátky proti zkoumaným proteinům. Pomocí detergentů se z buněk vyzolují membránové, cytoplazmatické a jaderné proteiny. Nativní proteiny (a proteinové komplexy) se následně označí nízkomolekulární značkou biotin-(polyethylen glykol)<sub>4</sub>-N-hydroxysukcinimid esterem (biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS, obr. 5) a na chromatografické koloně (Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), kolona Superdex 200\_300/10) rozdělí na 24 frakcí podle hydrodynamického poloměru proteinů (který přibližně odpovídá jejich velikosti). Následuje imunoprecipitace, kdy jsou proteiny ze



všech FPLC frakcí vycíhánými protilátkami na mikrokuličkách, označení nabiotinylovaných proteinů streptavidinem konjugovaným s phycoerythrinem (PE) (obr. 4) a detekce signálů z kuliček a ze streptavidinu-PE pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie.



Obr. 3 Grafické zobrazení 1728 populací fluorescenčně značených kuliček cytometrické „microsphere-based microarray“. FACS LSR II, nahrávací software Diva (BD Biosciences). Kuličky jsou barveny 5ti fluorescenčními próbami (Alexa 750, Alexa 647, Alexa 488, Pacific Orange a Pacific Blue) v různých koncentracích.



Obr. 4 Schéma detekce nabiotinylovaných lidských antigenů, vyvázaných na 1 populaci kuliček, fluorescenčně značeným streptavidinem.

Tato „microsphere-based microarray“ má oproti výše zmiňovaným technologiím několik výhod:

- i) Vysoká úroveň multiplexe díky barevnému kódování kuliček (až 1728 cílů)
- ii) Informace o velikosti proteinu a protein-protein interakcích díky chromatografickému rozdělení buněčného lyzátu na 24 frakcí
- iii) Flexibilita při tvorbě „array“ a výběru protilátek (př. fosfo-specifických protilátek)
- iv) Aplikovatelnost na všechny 3-laserové průtokové cytometry

#### **1.2.2.2.1. Multiplexní imunoprecipitace buněčných proteinů 1725 komerčně dostupnými protilátkami**

**Příloha 3:**

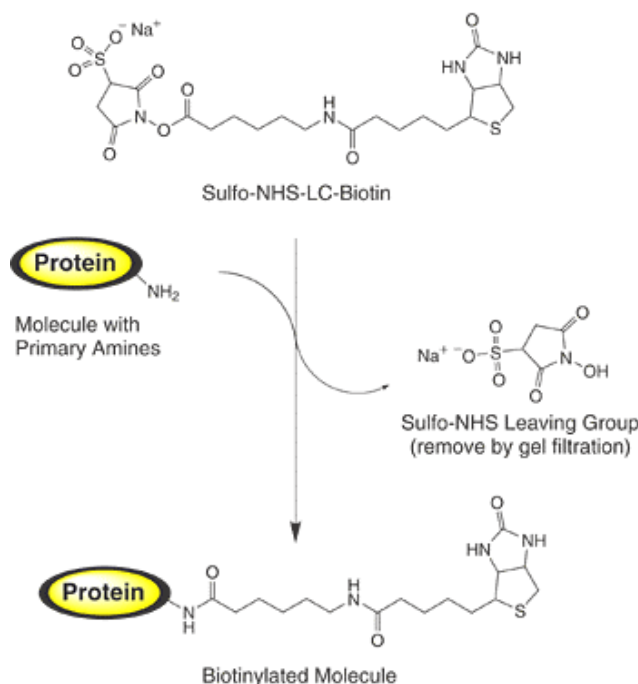
***Multiplexed immuno-precipitation with 1725 commercially available antibodies to cellular proteins, Heidi Slaastad, Weiwei Wu, Luiz Goullart, Veronika Kanderova, Geir Tjønnfjord, Jan Stuchly, Tomas Kalina, Anders Holm and Fridtjof Lund-Johansen, Proteomics, in press, technical brief, IF : 4,43***

#### **Úvod**

Multiplexní imunoprecipitace stovek až tisíců proteinů najednou z jednoho vzorku buněčného lyzátu má jeden důležitý předpoklad, mono-specifitu použitých protilátek. Specifitu protilátky můžeme otestovat metodou western blot (kde po detekci vidíme specifické či nespecifické proužky), nebo rozdělením proteinů pomocí chromatografie před samotným imunoprecipitačním krokem<sup>97</sup>.

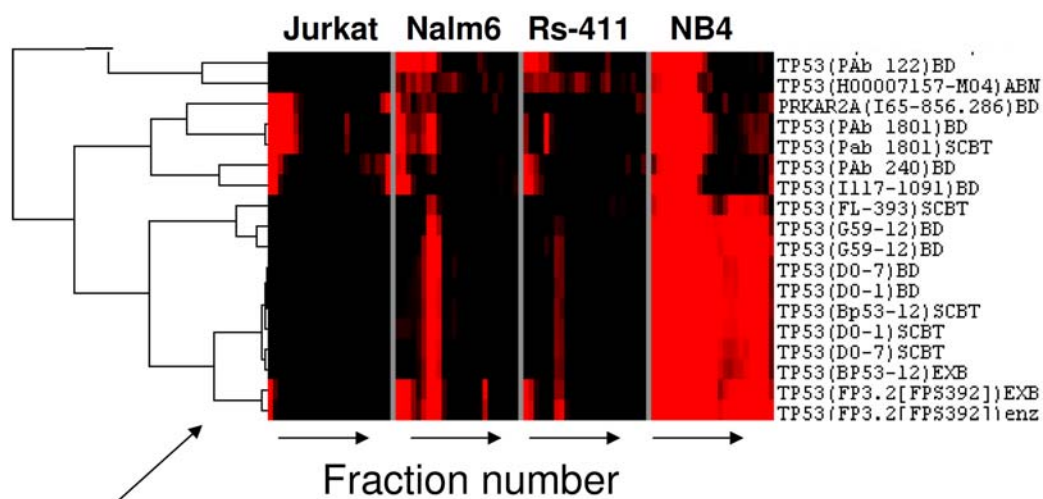
#### **Výsledky a diskuze**

Cílem předkládané studie bylo zjistit, zda můžeme multiplexně imunoprecipitovat buněčné proteiny s použitím komerčně dostupných protilátek. Nejprve jsme ověřili, zda a jak ovlivňuje biotinylace proteinu pomocí biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS (obr. 5) následnou schopnost protilátky specificky protein detekovat.



Obr. 5 Schéma reakce primárních aminů proteinů s biotin-(polyethylen glykol)<sub>4</sub>-N-hydroxysukcinimid esterem (biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS) ([www.piercenet.com](http://www.piercenet.com)).

Zjistili jsme, že biotin-PEG<sub>4</sub>-NHS neinhibuje vazbu proteinů na většinu použitých protilátek, pokud je poměr biotinu a lysinů (v proteinech) 1:1 nebo nižší. Většina námi použitých protilátek je výrobcem deklarovaná k použití metodou western blot, při které se proteiny denaturují pomocí dodecylsulfátu sodného (SDS) a povařením při 90°C. Porovnali jsme tudíž i vazbu denaturovaný protein-protilátka a nativní protein-protilátka. Denaturace proteinů odhalila epitopy pro vazbu proteinu některými protilátkami, výrazně však zvýšila i vazbu nespecifickou. Protože je „microsphere-based microarray“ metodou detekční, ne analytickou (jako např. hmotnostní spektrometrie), musíme proteinovou expresi ověřovat více klonů protilátek proti jednomu antigenu. Na příkladu dat získaných pomocí „microsphere-based microarray“ čtyř buněčných leukemických linií jsme ukázali, jak je primární rozdělení proteinů pomocí chromatografie užitečným nástrojem k ověření specifity použitých protilátek. Po seskupení dat („cluster analysis“) pomocí softwaru MeV (MultiExperiment Viewer) vidíme, jak různé klonů protilátek proti jednomu proteinu vytváří stejné či podobné shluky („cluster“) pozitivních signálů v rámci 24 FPLC frakcí, přičemž jiné klonů vykazují vyšší nespecifitu (pozitivní signál v jiných FPLC frakcích) (obr. 6).



Obr. 6 Příklad proteinu TP53 detekovaného v buněčných liniích JURKAT (T-ALL), NALM-6, RS4,11 (BCP-ALL) a NB-4 (AML) pomocí 11 různých klonů (v závorce) protilátek proti proteinu TP53. Červeně pozitivní signál TP53 ve FPLC frakcích 1-24 (osa x). Kobercový graf (tzv. heatmap) vytvořen pomocí softwaru MeV (MultiExperiment Viewer).

Z našich výsledků vyplývá, že přibližně jedna čtvrtina komerčně dostupných protilátek je vhodná k použití v „microsphere-based microarray“ technologiích a k následnému proteomickému profilování klinických vzorků.

#### 1.2.2.2. Automatické zpracování dat z multiplexní cytometrické proteinové microarray

##### **Příloha 4:**

*An automated analysis of highly complex flow cytometry-based proteomic data, Jan Stuchly, Veronika Kanderova, Karel Fiser, Daniela Cerna, Anders Holm, Weiwei Wu, Ondrej Hrusak, Fridtjof Lund-Johansen, Tomas Kalina, manuskript zaslaný po 2.revizi zpět do časopisu Cytometry A*

### Úvod

V laboratořích CLIP se dlouhodobě zabýváme vyhledáváním a testováním nových potenciálně prognostických znaků dětských akutních leukemií pomocí nejmodernějších metod molekulární genetiky a polychromatické průtokové cytometrie<sup>17,88,34</sup>. V rámci spolupráce s Dr. Lund-Johansenem zavádíme do klinických aplikací a výzkumu dětských leukemií i metodu „microsphere-based

microarray“. Vytvořili jsme „array“ vhodnou ke sledování změn exprese a fosforylace proteinů v buňkách dětských akutních leukemií. Cíle (diagnostické znaky - CD antigeny, potenciálně prognostické znaky, znaky naznačující odpověď na léčbu, intracelulární signalizační molekuly a jejich fosforylované formy) jsme vybrali z publikovaných prací a z DNA-expressních profilů akutních leukemií<sup>85,84</sup>. Data získaná touto technikou nám poskytnou komplexní informaci o expresi proteinů, jejich subcelulární lokalizaci, postranlačních modifikacích a protein-protein interakcích ve vzorcích akutních leukemií odebraných při diagnóze onemocnění nebo v průběhu léčby.

Ke grafické analýze dat z průtokové cytometrie se používají speciální softwary (např. Diva, FlowJo), ve kterých se provádí manuální výběr („gating“) poskupin buněk na základě přítomnosti jednotlivých znaků. Protože komplexita změřených dat narůstá se zvyšováním počtu parametrů, je vhodně zvolená strategie analýzy velmi důležitá pro interpretaci dat<sup>7</sup>.

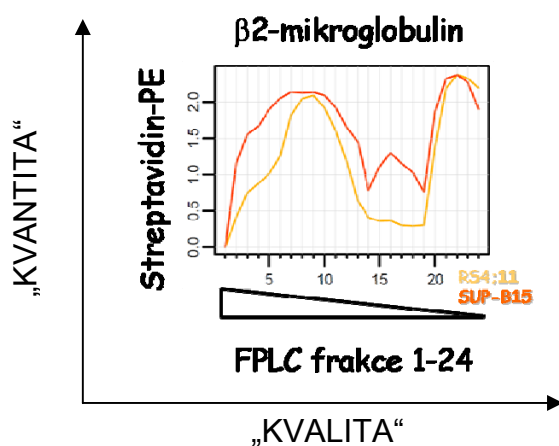
### **Výsledky a diskuze**

V publikaci představujeme rychlý, semi-automatický algoritmus umožňující analýzu multiparametrických dat z cytometrické „microsphere-based microarray“. Algoritmus funkcí vytvořených ve volně dostupném softwaru R-project detekuje jednotlivé populace kuliček na základě přítomnosti kombinací fluorescenčních značek (Alexa 750, Alexa 647, Alexa 488, Pacific Blue, Pacific Orange) ve dvou-dimenzionálním prostoru a fluorescenční signál ze streptavidinu-PE kvantitativně vyjadřující množství vyvázaného proteinu.

Pomocí PAM (Partitioning Around Medoids) algoritmu nejprve vytvoříme na jednom nahraném (FCS 3.0) souboru analyzační templát obsahující zmiňovaných 1728 populací (pro účely předkládané publikace jsme použili „microsphere-based array“ obsahující 1152 populací mikrokuliček) a následně můžeme tímto templátem zanalyzovat 96 FCS 3.0 souborů během 5-10 minut<sup>98</sup>. Následuje kontrola kvality provedeného experimentu: i) odhalení bimodálních signálů ze streptavidinu-PE a eliminace těchto populací kuliček (fenomén bimodálních signálů ze streptavidinu-PE ještě není objasněn) a ii) eliminace populací obsahujících méně než 10 kuliček (10 kuliček v populaci dává hodnotu mediánu intenzity fluorescence (MFI) ze streptavidinu-PE porovnatelnou s MFI streptavidinu-PE populací s max. počtem 170 nahraných

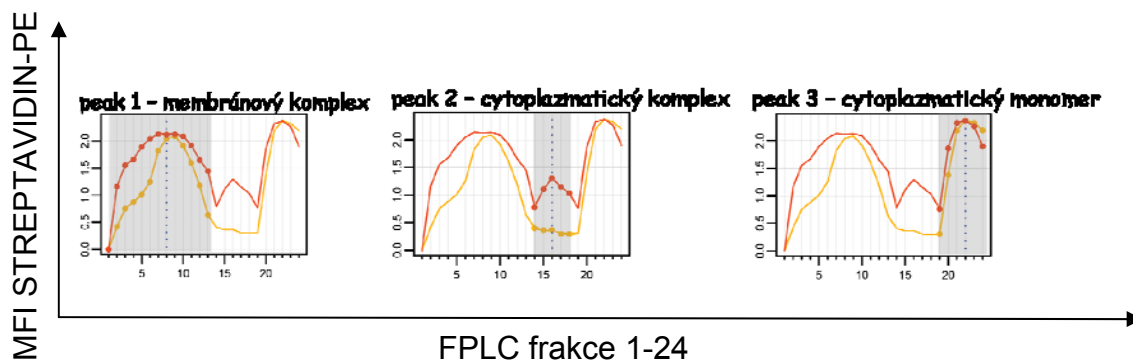
kuliček). Pro porovnání proteinové exprese mezi jednotlivými vzorky leukemických buněk odečítáme ode všech signálů ze streptavidinu-PE tzv. background signál (signál z populací kuliček bez navázané primární detekční protilátky) a dále používáme i korekci na nanášku („protein load“) na základě exprese kontrolních proteinů, jejichž exprese je stabilní za různých experimentálních podmínek. Na základě provedených experimentů jsme zjistili, že jako kontrolní proteiny můžeme použít beta-2-mikroglobulin, transkripční faktor HES-1 a serin/threonin protein kinázu VRK1.

Pro vizuální zobrazení získaných dat používáme lineární interpolaci mediánů intenzity fluorescence streptavidinu-PE ve všech 24 FPLC frakcích (čárový graf, obr. 7).

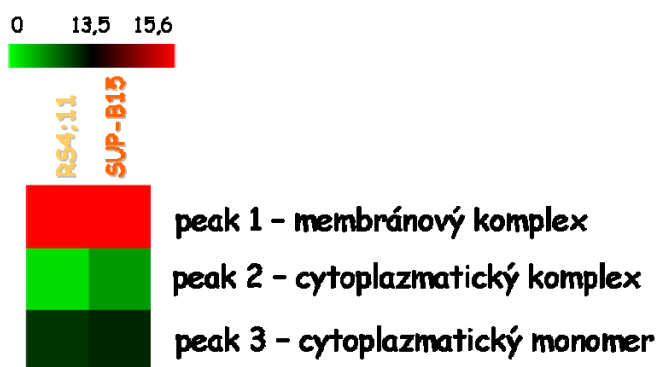


Obr. 7 Příklad čárového grafu beta-2 mikroglobulinu vyprecipitovaného z BCP-ALL buněčných linií SUP-B15 (oranžově) a RS4,11 (žlutě). Na ose x 24 velikostních frakcí z FPLC, na ose y medián intenzity fluorescence (MFI) ze streptavidinu-PE navázaného na protein v jednotlivých FPLC frakcích.

Vrcholy na křivce čárového grafu odpovídají proteinovým formám (např. izoformy, monomery, komplexy). Dále manuálně definujeme jednotlivé proteinové formy (tzv. peak), kde plocha pod křivkou kvantitativně definuje množství vyvázaného proteinu (obr. 8). Tento formát dat nám dále umožňuje hierarchické seskupování podobně jako výsledky z „DNA-microarrays“ a kvantitativní porovnávání exprese proteinů mezi jednotlivými vzorky (obr. 9).



Obr. 8 Tři různé proteinové formy beta-2 mikroglobulinu vyprecipitovaného z BCP-ALL buněčných linií SUP-B15 (oranžově) a RS4,11 (žlutě). Na ose x 24 velikostních frakcí z FPLC, na ose y medián intenzity fluorescence (MFI) ze streptavidinu-PE navázaného na protein v jednotlivých FPLC frakcích. Vrchol („peak“) 1 určuje membránový komplex beta-2-mikroglobulinu, tedy membránově vázanou molekulu HLA I. třídy, „peak“ 2 určuje cytoplazmatický komplex HLA molekuly I. třídy a „peak“ 3 cytoplazmatický monomer beta-2 mikroglobulinu.



Obr. 9 Expres 3 různých proteinových forem beta-2 mikroglobulinu buněk SUP-B15 (oranžově) a RS4,11 (žlutě). Kobercový graf (tzv. heatmap) vytvořen pomocí softwaru MeV (MultiExperiment Viewer).

Celý proces analýzy dat (včetně kontroly kvality) jsme nakonec aplikovali na klinický problém, změny proteomu 4 BCR-ABL1 pozitivních leukemických linií (SUP-B15, TOM-1 (BCP-ALL), BV-173 (CML v blastické krizi BCP-ALL, K562 (CML v blastické krizi) po inhibici BCR-ABL1 fúzního proteinu specifickým inhibitorem, imatinib mesylátem. BCR-ABL1 fúzní protein hraje zásadní úlohu v leukemogenezi<sup>99</sup>. Jako konstitutivní kináza dereguluje řadu signálních drah, které se účastní buněčné proliferace, diferenciace, apoptózy a mezibuněčné adheze. BCR-ABL1 např. aktivuje Ras/MAPK, JAK/STAT,

PI3K/Akt signalizační dráhy, zvyšuje expresi Bcl-xL a potlačuje mitochondriální dráhu apoptózy, ovlivňuje integriny-mediovanou buněčnou adhezivitu a reguluje mechanismy opravy DNA<sup>100,101,102,103</sup>. Imatinib mesylát, selektivní inhibitor BCR-ABL1 tyrosin kinázy, je široce používán k léčbě pacientů s BCR-ABL1 pozitivní leukemií. Po vazbě imatinib mesylátu na kinázovou doménu BCR-ABL1 kinázy je BCR-ABL1 rychle defosforylována, což vede k její inaktivaci, inhibici buněčného cyklu a apoptóze<sup>104,105</sup>. Stále však existují mechanismy, které vedou k rezistenci na imatinib, např. bodová mutace ABL kinázy, PI3K-závislá hyperexprese Btk (Bruton's Tyrosine Kinase) nebo downregulace PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog)<sup>102,106,66</sup>.

Pomocí vytvořené cytometrické „microsphere-based microarray“ jsme byli schopni definovat dříve popsané změny proteomu - celkovou tyrosinovou defosforylaci proteomu, změny v expresi a fosforylaci hlavních cílů BCR-ABL1 kinázy (LCP2 (Lymphocyte Cytosolic Protein 2, SLP-76)), naštěpení DNA reparačního enzymu PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase) jako znaku apoptózy, zvýšení exprese inhibitoru buněčného cyklu CDKN1a (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A, p21) a snížení exprese proteinů asociovaných s buněčnou adhezí (integrinů skupiny  $\beta 2$ )<sup>107,108,109,110,111,112</sup>. Protože je buněčná linie TOM-1 částečně rezistentní na imatinib mesylát (apoptotické změny jsme nezjistili ani pomocí „microsphere-based microarray“ ani cytometricky fluorescenčně značeným Annexinem V), detekované změny v expresi a fosforylaci proteinů po podání imatinib mesylátu nebyly ovlivněny degradací proteinů při apoptóze<sup>102</sup>.

Integrace průtokové cytometrie, „microsphere-based microarray“ a počítačového zpracování multidimenzionálních dat představuje praktický nástroj vhodný ke sledování změn proteomu klinických vzorků. Důležitým předpokladem však je zajištění reproducibility při přípravě vzorků i při samotném cytometrickém měření.



### 1.3. Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je heterogenní onemocnění charakterizované nekontrolovaným růstem myeloidních buněk, tvoří asi 15% akutních leukemií u dětí. AML většinou vzniká na základě 2 kooperativních mutací genů, které vedou k deregulaci buněčné proliferace a zástavě diferenciaci<sup>113</sup>.

#### 1.3.1. Morfologie

Morfologicky se AML klasifikuje podle FAB klasifikace na několik podtypů (M0-M8, tabulka 3)<sup>6</sup>.

podtyp AML	typ buněk
M0	Nezralé myeloblasty s minimální diferenciací
M1	Nezralé myeloblasty bez vyzrávání
M2	Zralé myeloblasty s granulocytárním vyzráváním
M3	Promyelocyty
M4	Myelomonocyty
M4eo	Myelomonocyty + eosinofilie
M5	Monocyty
M6	Erytroidní buňky
M7	Megakaryoblasty
M8	Bazofily

Tab. 3 Morfologická klasifikace AML<sup>6</sup>.

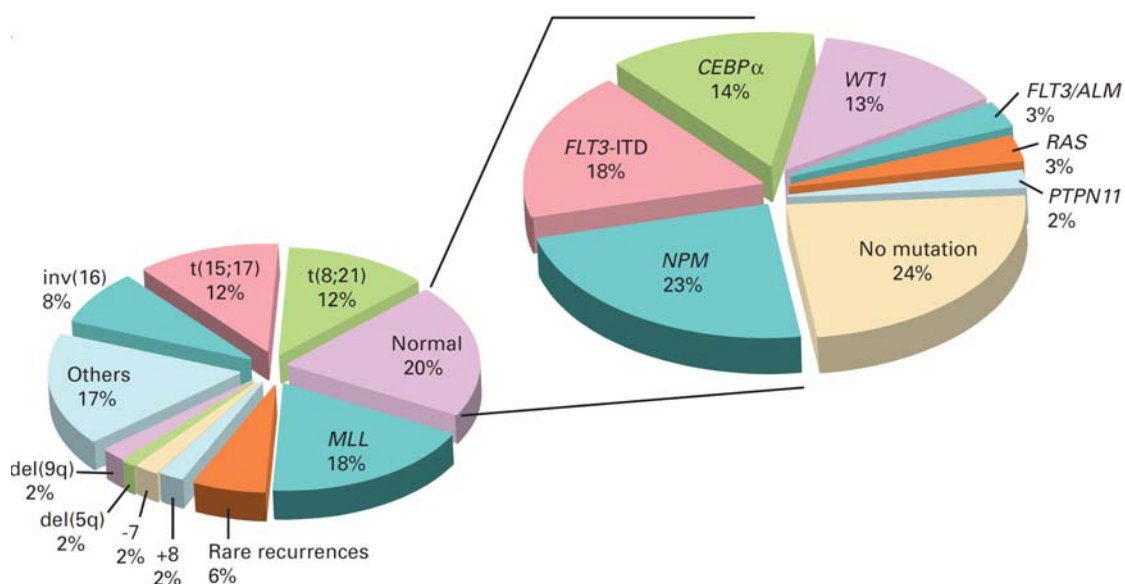
#### 1.3.2. Imunofenotypizace

Protože se klasifikace AML opírá zejména o morfologii, imunofenotypové charakterizaci není věnováno mnoho publikací. Na buňkách AML je exprimována vždy kombinace myeloidních znaků charakteristických pro danou buněčnou linii a vývojové stádium. Na nejčasnějších progenitorech se objevuje CD34, HLA-DR a intracelulární myeloperoxidáza, následují časně znaky (CD13, CD33, CD117) a dále antigeny charakteristické pro vývojovou linii (např. CD15 a CD65 jako znaky neutrofilních granulocytů, CD14 jako znak monocytů, CD36 a glykoforin jako znak erytroidních buněk a CD41, CD42 a CD61 jako znaky megakaryocytů)<sup>8,114</sup>.

### 1.3.3. Cytogenetika

Genotypová klasifikace odráží heterogenitu AML. Mezi nejčastější chromozomální aberace patří translokace *AML1-ETO* (t(8;21)(q22;q22)) korelující s M2 podtypem, translokace *PML-RAR $\alpha$*  (t(15;17)(q22;q12)) korelující s podtypem M3, *inv16*(p13;q22) (*MYH11-CBF $\beta$* ) korelující s podtypem M4eo a translokace *MLL* genu<sup>13,115</sup>. Genové aberace AML lze rozdělit do 3 základních skupin (obr. 10):

- 1) mutace genů kontrolujících buněčnou proliferaci (*FLT3*, *c-Kit*, *Ras*, *PTPN11*, *WT1*, *JAK2*)
- 2) mutace genů zúčastněných v myeloidní diferenciaci (*AML1*, *CEBP $\alpha$* )
- 3) mutace genů regulujících buněčný cyklus a apoptózu (*P53*, *NPM1*)<sup>113</sup>.



Obr. 10 Zastoupení specifických genových abnormalit dětských AML<sup>13</sup>.

### 1.3.4. Cytometrický test pro rychlou a snadnou detekci fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$ při diagnóze akutní promyelocytární leukemie

#### **Příloha 5:**

*Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML-RARA fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia, E. H. A. Dekking, V. H. J. van der Velden, R. Varro, H. Wai, S. Böttcher, M. Kneba, E. Sonneveld, A. Koning, N. Boeckx, N. Van Poecke, P. Lucio, A. Mendonça, L. Sedek, T. Szczepański, T. Kalina, V. Kanderová, P. Hoogeveen, J. Flores-Montero, M. C. Chillón, A. Orfao, P. Evans, M. Cullen, A. L. Noordijk, P. M. Vermeulen, M. T. de Man, E.P. Dixon, W. M. Comans-Bitter and J. J. M. van Dongen, manuskript zaslaný do časopisu Leukemia*

#### **Úvod**

Akutní promyelocytární leukemie (APL, AML M3) je typická chromozomální translokací t(15;17)(q22;q12), která vede k fúzi promyelocytárního leukemického genu (*PML*) s genem pro receptor  $\alpha$  kyseliny retinoové (*RAR $\alpha$* ) s následnou translací do fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$ . PML-RAR $\alpha$  fúzní protein vede k zástavě maturace ve stádiu promyelocytu a k nekontrolované proliferaci buněk<sup>116</sup>.

RAR $\alpha$  je členem rodiny jaderných receptorů pro hormony. Tento ligandem indukovaný transkripční faktor ovlivňuje geny zúčastněné v myeloidní diferenciaci. Váže se, v heterodimeru s RXR (Retinoid X Receptor) na RARE (Retinoid Acid Response Element) oblast na DNA. Funkce RAR $\alpha$ /RXR heterodimeru je ovlivněna jeho fyziologickým ligandem, retinoovou kyselinou (RA). Bez účasti RA heterodimer RAR $\alpha$ /RXR váže jaderný korepresor N-CoR/histone deacetylázový komplex (HDAC) a změnou struktury chromatinu umlčí RA cílové geny. Po vazbě RA je korepresorový komplex N-CoR/HDAC uvolněn a receptor RAR $\alpha$ /RXR asociuje s transkripčními aktivátory<sup>117,118,119</sup>.

PML je protein RBCC (RING-B-Box-Coiled-Coil) rodiny, lokalizovaný v cytoplasmě a v sumoylované formě i v jádře ve formě tělísek („nuclear bodies“), které jsou součástí jaderné matrix a jsou důležité v RNA transkripci a udržování chromatinové struktury. PML je nutný pro správný buněčný vývoj a indukci apoptózy, transfekce PML indukuje apoptózu v různých typech buněk<sup>118</sup>.

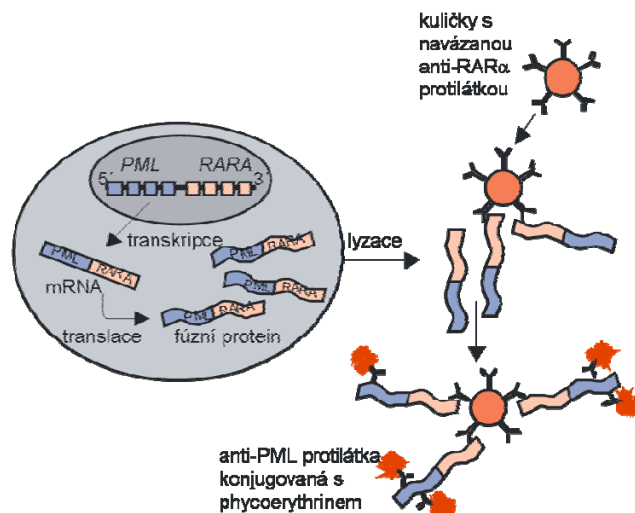
Fúzní protein PML-RAR $\alpha$  nese DNA vazebnou i ligand vazebnou doménu RAR $\alpha$  a inhibuje myeloidní diferenciaci konstitutivním umlčením RA cílových genů účastnících se diferenciaci hematopoetických prekurzorů. PML-RAR $\alpha$  tvoří stabilní komplexy s korepresorem N-CoR/HDAC i při fyziologické koncentraci RA. K léčbě APL se používá ATRA (all-trans-retinoová kyselina), která uvolňuje korepresorový komplex N-CoR/HDAC z PML-RAR $\alpha$  a indukuje diferenciaci do buněk podobných granulocytům<sup>120,121,118</sup>.

*PML-RAR $\alpha$*  fúzní gen se vyskytuje u 95% APL. Zbývajících 5% APL obsahuje tzv. neklasickou formu *PML-RAR $\alpha$*  s dalšími genetickými aberacemi (např. insercí) nebo gen *RAR $\alpha$*  fúzovaný s jiným genovým partnerem (např. *PLZF*, *NPM*, *NUMA*)<sup>122,123</sup>. APL tvoří 5-15% všech leukemií a je, bez včasné diagnózy a zahájení léčby, nejrychleji progredující formou AML. Před zavedením ATRA terapie umíralo více než 50 % pacientů již během chemoterapie, ATRA terapie významně zlepšila prognózu pacientů s APL, kompletní remise (stavu s nedetekovatelnou MRN) dnes dosáhne více než 95% pacientů<sup>118</sup>.

Diagnostika APL je založena na detekci fúzního genu *PML-RAR $\alpha$*  pomocí karyotypizace, fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) a PCR<sup>123,124</sup>. Tyto techniky jsou vysoce senzitivní, ale náročné na experimentální zručnost a vybavení diagnostických laboratoří. Laboratoře pracovní skupiny EuroFlow (jejíž součástí je i Laboratoř CLIP-Cytometrie) ve spolupráci s firmou BD Biosciences vyvinuly novou, rychlou a jednoduchou techniku detekce fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$  s využitím průtokové cytometrie, tzv. **PML-RARA Immunobead Assay**.

### **Výsledky a diskuze**

Na mikrokuličkách s navázanou protilátkou anti-RAR $\alpha$  jsme z lyzátu buněk APL vyvázali PML-RAR $\alpha$  fúzní protein a tento následně detekovali fluorescenčně značenou anti-PML protilátkou (obr. 11).



Obr. 11 Schéma detekce PML-RAR $\alpha$  fúzního proteinu pomocí PML-RARA Immunobead Assay.

V genu *RAR $\alpha$*  je místo zlomu lokalizováno v intronu 2, v genu *PML* se vyskytují 3 místa možného zlomu, v intronu 6 (výsledkem je vznik fúzního genu tzv. bcr (breakpoint cluster region) 1), v exonu 6 (fúzní gen tzv. bcr2) nebo v intronu 3 (fúzní gen tzv. bcr3)<sup>124</sup>. U 2 pacientů byl objeven zlom v exonu 7 genu *PML*<sup>125</sup>. Protilátky na Immunobead Assay byly navrženy tak, aby vázaly všechny 4 formy proteinu PML-RAR $\alpha$  (bcr1, bcr2, bcr3 i bcr se zlomem v exonu 7 genu *PML*).

PML-RARA Immunobead Assay byla nejprve validována na *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních buňkách (NB-4 buněčná linie) a *PML-RAR $\alpha$*  negativních buňkách (buněčné linie ME1, MV4;11, K562, 697, RCH-ACV, Kasumi, REH) a následně byla stanovena senzitivita ředěním NB-4 buněk ve zdravých krevních leukocytech. PML-RAR $\alpha$  specifický signál byl detekován i v koncentraci 10% NB-4 buněk. Tato senzitivita je dostatečná, protože většina pacientů s APL má při iniciální diagnóze 70% - 90% leukemických blastů. Nakonec bylo v laboratořích EuroFlow otestováno celkem 163 vzorků akutních leukemií odebraných při diagnóze onemocnění (z toho 46 APL, v Praze otestováno celkem 30 vzorků) a výsledky byly porovnány s expresí *PML-RAR $\alpha$*  na mRNA úrovni.

Pomocí PML-RARA Immunobead Assay bylo zjištěno 100% všech APL vzorků, non-APL vzorky byly v Assay negativní. Expresie fúzního proteinu

PML-RAR $\alpha$  nekorelovala s počtem blastů při diagnóze, jednotlivé vzorky APL zřejmě mohou exprimovat různé hladiny PML-RAR $\alpha$  proteinu. Na rozdíl od této variability vykazovaly párové vzorky (vzorky APL od jednoho pacienta odebrané v době diagnózy z kostní dřeně a periferní krve) srovnatelnou expresi fúzního proteinu. Testovány byly i různé podmínky přípravy vzorku, centrifugace proteinového lyzátu při 4°C a při 25°C a čas mezi příjmem a zpracováním vzorku. Teplota centrifugace nijak neovlivnila výsledky měření. Hladina naměřeného PML-RAR $\alpha$  fúzního proteinu byla stabilní do 36h po příjmu vzorku, delší transport vzorku či čas mezi zpracováním a měřením tedy výsledky neovlivnily.

Přestože je PML-RARA Immunobead Assay méně citlivější než PCR nebo FISH (její citlivost je 10% leukemických blastů), je plně dostatečná k detekci fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$  v diagnostických vzorcích APL. Její výhodou je rychlost a snadná příprava, která může zajistit včasnou diagnózu APL a umožnit tak zahájení léčby před nástupem život ohrožujících projevů APL, jakým je např. krvácení<sup>126</sup>.

## Část II.

### Buněčná signalizace nemaligních B-lymfocytů

#### 2.1. Vývoj lidských B-lymfocytů

Časný vývoj lidských B-lymfocytů ze společného lymfoidního progenitoru (CLP, common lymphoid progenitor) probíhá v kostní dřeni<sup>127</sup>. Pro-B buňky (imunofenotypově CD19 negativní (-) CD10 středně pozitivní (+/-) CD20-CD22 pozitivní (+) CD24- vpreB- Ig $\alpha$ -/+) jsou charakteristické expresí prvního B-lymfocytárního povrchového znaku, molekuly CD22<sup>128</sup>. Následně dochází k expresi pre-B buněčného receptoru (pre-BCR, pre-B Cell Receptor), který se skládá z těžkých imunoglobulinových řetězců  $\mu$ , náhradních lehkých řetězců složených z molekul  $\lambda 5$  a vpreB a z asociovaných signalizačních komponent (Ig $\alpha$ , Ig $\beta$ ), a buňka se stává pre-B lymfocylem (CD19+ CD10+ CD20- CD24 vysoce pozitivní (++) vpreB+ Ig $\alpha$ + intracelulární  $\mu$ +)<sup>129,128</sup>. Po několika buněčných děleních pre-B lymfocytů dochází k výměně náhradních lehkých řetězců za lehké imunoglobulinové řetězce  $\kappa$  nebo  $\lambda$  a na buněčném povrchu je vystaven B-buněčný receptor (BCR) představovaný imunoglobulinem IgM<sup>130</sup>. V této fázi se buňka stává nezralým B-lymfocylem imunofenotypově charakterizovaným jako CD19+ CD10+ CD20+ CD24++ IgM+<sup>128</sup>. Povrchová exprese IgM dovoluje první antigen-specifickou negativní selekci B-lymfocytů, tedy apoptózu autoreaktivních klonů<sup>131</sup>. Nezralé B-lymfocyty vycestovávají z kostní dřeni jako transientní buňky a cévním řečištěm migrují do sekundárních lymfatických orgánů, zejména do sleziny. Lidské transientní buňky byly poprvé popsány jako CD10+ nebo CD24++ CD38++ B-lymfocyty, které jsou nacházeny v nízkém procentu v periferní krvi a sekundárních lymfatických orgánech. Suryani a kol. popsali v roce 2010 dvě funkčně odlišné skupiny transientních buněk (CD20+, CD27-, CD24++, CD38++, CD10+) podle exprese znaku CD21, tedy CD21+ a CD21- transientní buňky. Zdá se, že CD21- předcházejí vzniku CD21+ transientním buňkám<sup>132</sup>.

Transientní buňky se dále vyvíjejí do dvou funkčně i fenotypicky odlišných typů B-lymfocytů - folikulárních (FO) B-lymfocytů a B-lymfocytů marginálních

zóny (MZ). V myším modelu se FO resp. MZ buňky vyvíjejí z transientních buněk v závislosti na síle stimulace přes BCR a další receptory (Notch 2, BAFF-R (B Cell Activating Factor Receptor), integriny). Silná BCR stimulace a Btk-závislá signalizace vede k vývoji FO buněk, slabá BCR stimulace, silná stimulace DL1 (Delta-like1) ligandem Notch 2 receptoru a stimulace přes BAFF-R preferuje MZ vývoj<sup>133</sup>. Zesílení BCR signalizace inhibicí negativních regulátorů BCR signalizace (Aiolos, CD22) v myším modelu eliminovalo vývoj MZ B-lymfocytů a posílilo vývoj FO B-lymfocytů<sup>134</sup>.

**MZ** B-lymfocyty (CD19+ CD21+ CD24++ **CD27+** IgM++ IgD+ CD38-) jsou lokalizovány v marginální zóně sleziny a reprezentují asi 15-25% cirkulujících B-lymfocytů<sup>128</sup>. U myši nejsou MZ B-lymfocyty detekovány v periferním oběhu, ale pouze v marginální zóně sleziny<sup>133</sup>. MZ B-lymfocyty jsou důležité v obraně proti T-nezávislým antigenům, jakým je např. polysacharid *Streptococcus pneumoniae*. Tyto buňky jsou schopny rychlé aktivace a diferenciaci do krátce žijících plasmatických buněk produkujících imunoglobuliny třídy IgM i bez stimulace přes BCR (např. stimulací přes Toll-like receptory (TLR))<sup>135,136,137,138</sup>. MZ B-lymfocyty jsou vysoce CD21 pozitivní. CD21 je receptor pro C3d složku komplementu<sup>139</sup>. Pomocí CD21 buňky MZ v myším modelu mediovaly transport antigenu (v imunokomplexech s C3d) do centra lymfoidních folikulů a byly tedy zúčastněny i v T-závislé odpovědi na antigen<sup>140,141</sup>. Vysoká exprese CD1d na myších MZ B-lymfocytech a CD1 rodiny molekul na lidských MZ B-lymfocytech jim také umožňuje prezentaci lipidových antigenů NKT buňkám resp. T-lymfocytům, MZ B-lymfocyty jsou zřejmě důležitým zdrojem lipid-specifických protilátek<sup>142</sup>.

**FO** B-lymfocyty (CD19+ CD21+ CD24+ CD23+ **CD27-** IgM+/- IgD+ CD38+) jsou lokalizovány ve folikulech v bílé pulvě sleziny a v lymfatických uzlinách a představují největší procento cirkulujících B-lymfocytů. FO B-lymfocyty jsou důležité v obraně proti T-závislým antigenům<sup>128</sup>. FO B-lymfocyty, podobně jako MZ B-lymfocyty, exprimují molekulu CD21. CD21 je důležitá při formování germinálního centra lymfoidního folikulu a při interakcích B-lymfocyt-folikulární dendritická buňka<sup>139</sup>. FO B-lymfocyty se účastní tzv. germinální reakce (izotypového přesmyku a somatické hypermutace genů pro variabilní oblasti imunoglobulinů) v lymfoidních folikulech a vyžívají do dlouhožijících paměťových a plasmatických buněk (CD19 níže pozitivní



CD21 nízcce pozitivní CD24- CD27++ CD38+++)) produkujících imunoglobuliny jiné třídy než IgM (např. IgG, IgA,...)<sup>128,143</sup>.

Cariappa a kol. v roce 2007 identifikovali na myším modelu 2 populace cirkulujících dlouhožijících folikulárních buněk, tzv. FOI (IgD++, **IgM nízcce pozitivní**, CD21+/- CD23+) a FOII B-lymfocyty (IgD++, **IgM vysoce pozitivní**, CD21+/-, CD23+), lišící se intenzitou exprese IgM. FOI a FOII B-lymfocyty se liší bazální tyrosinovou fosforylací, bazální produkcí cytokinů a proliferací po BCR stimulaci, tvoří tak 2 funkčně odlišné populace folikulárních B-lymfocytů. FOII populace tvoří asi třetinu cirkulujících FO B-lymfocytů, vyvíjí se bez účasti BCR stimulace a následné Btk-závislé signalizace, k přežití nepotřebuje ani Notch 2 signalizaci. FOII B-lymfocyty zřejmě tvoří zásobník pro doplnění buněk marginální zóny v případě deplece MZ B-lymfocytů při akutní infekci patogeny v krevním oběhu. FOI B-lymfocyty se vyvíjejí po silné BCR stimulaci a Btk-závislé signalizaci a účastní se germinální reakce<sup>144</sup>.

### 2.1.1. Subpopulace naivních CD24 pozitivních B-lymfocytů objevené při charakterizaci lymfocytárních subpopulací pacientů s běžným variabilním imunodeficitem

#### **Příloha 6:**

*Characterization of Lymphocyte Subsets in Patients with Common Variable Immunodeficiency Reveals Subsets of Naive Human B Cells Marked by CD24 Expression, Marcela Vlková, Eva Froňková, Veronika Kanderová, Aleš Janda, Šárka Růžičková, Jiří Litzman, Anna Šedivá, Tomáš Kalina, The Journal of Immunology 2010 Dec 1;185(11):6431-8, IF: 5.646*

#### **Úvod**

Běžný variabilní imunodeficit (Common Variable Immunodeficiency, CVID) je heterogenní skupina onemocnění, charakterizovaná sníženou produkcí alespoň 2 izotypů protilátek (zejména IgG a IgA) a následnou špatnou odpovědí na očkování. Ke klinické manifestaci většinou dochází ve druhé polovině života, projevuje se různými autoimunitní procesy a větší vnímavostí k bakteriálním infekcím, zejména v gastrointestinálním a dýchacím systému.

Kvůli značné heterogenitě onemocnění bylo navrženo několik subklasifikací (Freiburgská, Pařížská a EUROClass klasifikace) do klinicky a imunofenotypově dobře definovaných podskupin. Podle Freiburgské klasifikace se pacienti s CVID rozdělují do 3 skupin podle procenta izotypově přesmyknutých paměťových („class-switched memory“) B-lymfocytů (CD19+ CD27+ IgM- IgD-) v rámci CD19+ B-lymfocytů. Skupinu I tvoří pacienti s méně než 0,4% těchto buněk, skupinu II pacienti s vyšším procentem. Skupina I se dále rozděluje na typ Ia a Ib podle procenta CD19+ **CD21**- CD27- CD38- IgM+ buněk. Ve zdravé periferní krvi je referenční rozmezí těchto CD21 negativních buněk 0,9 - 7,6% v rámci CD19+ B-lymfocytů. Skupina Ia má více než 20% CD21 negativních B-lymfocytů v rámci CD19+ B-lymfocytů, skupina Ib méně než 5%<sup>128</sup>.

Ačkoli bylo u CVID pacientů nalezeno mnoho abnormalit ve funkci B-lymfocytů i T-lymfocytů, otázkou zůstává, do jaké míry se tyto změny podílejí na poruše tvorby protilátek<sup>145</sup>. Primární porucha může postihovat i) B-lymfocytární vývoj nebo ii) T-lymfocytární vývoj, který pak může vést k dysregulaci T+B buněčné komunikace a následně k poruše vývoje B-lymfocytů. Na molekulární úrovni již bylo objeveno několik mutací v genech zúčastněných v B- a T-lymfocytárním vývoji, např. v genech pro ICOS, TACI, CD19 nebo BAFF-R. **ICOS** (Inducible T-cell costimulator, CD278) je kostimulační molekula, jejíž exprese je limitována na aktivované T-lymfocyty, zejména v germinálních centrech sleziny a lymfatických uzlin. Ligandem ICOS je B7h exprimovaná na profesionálních antigen prezentujících buňkách (APC), fibroblastech, epitelích i endoteliích. Signalizace přes ICOS vede k proliferaci T-lymfocytů a k produkci řady cytokinů (např. IL-10), které jsou důležité při terminální diferenciaci B-lymfocytů do plazmatických a paměťových buněk. Homozygotní delece *ICOS* genu v T-lymfocytech vede k nástupu příznaků primární imunodeficiency (ke snížení počtu B-lymfocytů, úplné ztrátě paměťových CD27+ B-lymfocytů a ke snížení hladiny imunoglobulinů v krevním séru) v dospělém věku<sup>146</sup>. **TACI** (CD267) patří do rodiny TNF (Tumor Necrosis Factor) a je exprimován především na CD27+ paměťových B-lymfocytech. Mutace v genu *TNFRSF13B*, který kóduje TACI protein, je nejčastějším genetickým defektem u CVID. Funkční charakterizace TACI mutací však stále chybí<sup>128</sup>. **CD19** protein je součástí B-

buněčného kostimulačního komplexu spolu s molekulami CD21, CD81 a CD225. Homozygotní mutace *CD19* genu vede ke snížení počtu paměťových CD27+ B-lymfocytů a špatné odpovědi na očkování *rabies* vakcínou (vakcínou proti vzteklině)<sup>147</sup>. **BAFF-R** je, stejně jako TACI, součástí rodiny TNF. Je exprimován na všech periferních B-lymfocytech jako hlavní receptor pro BAFF (B Cell Activating Factor). Homozygotní delece *BAFF-R* je charakterizována zastavením diferenciací ve stádiu transientních B-lymfocytů (zvýšením procenta transientních B-lymfocytů a snížením procenta FO, MZ a izotypově-přesmyknutých paměťových B-lymfocytů v periferní krvi) a poklesem hladiny imunoglobulinů IgM a IgG v krevním séru<sup>148</sup>.

### **Výsledky a diskuze**

V předkládané studii jsme imunofenotypově charakterizovali 48 vzorků periferní krve pacientů s CVID v porovnání se 49 vzorky periferní krve zdravých věkově odpovídajících kontrol. Při cytometrické analýze jsme všechny CD19+ B-lymfocyty rozdělovali podle exprese CD27 na naivní (CD27-) a paměťové (CD27+) B-lymfocyty.

V souladu s dříve provedenými studiemi jsme zjistili vyšší procento naivních buněk a nižší procento paměťových buněk u pacientů s CVID a identifikovali dvě skupiny CVID pacientů: i) se zvýšenou frekvencí normálních naivních B-lymfocytů (CD19+ **CD21+** CD27- CD38- IgM+), tzv. *CVID-21norm* skupina a ii) se zvýšenými počty CD19+ **CD21-** CD27- CD38- IgM+ B-lymfocytů, tzv. *CVID-21low* skupina<sup>149</sup>. V rámci těchto naivních CD21- B-lymfocytů se u CVID pacientů dobře odlišovaly 2 populace buněk na základě exprese CD24 a IgM, tedy **CD24 nízké pozitivní IgM nízké pozitivní** a **CD24++ IgM++** populace. Stejně populace (pouze s nižší expresí CD24) jsme identifikovali i na CD21+ naivních B-lymfocytech zdravých kontrol.

Naším cílem bylo nalézt mezi těmito typy buněk vývojové vztahy, které by nám pomohly osvětlit normální vývoj B-lymfocytů a jeho poruchy při CVID. Pomocí *in vitro* funkčních testů na zdravých B-lymfocytech periferní krve jsme prokázali, že tyto 2 populace charakterizované expresí CD24 a IgM odpovídají folikulárním FOI resp. FOII buňkám dříve popsaným v myším modelu<sup>144</sup>. FOII B-lymfocyty (CD24++ IgM++) odpovídaly na T-nezávislou stimulaci pomocí CpG DNA oligonukleotidu, agonisty Toll-like receptoru 9

(TLR9), mohutnou aktivací a proliferací<sup>137</sup>. FOI B-lymfocyty (CD24 nízcce pozitivní IgM nízcce pozitivní) naopak odpovídaly pouze aktivací na T-závislou stimulaci pomocí proteinu L z *Peptococcus magnus*, který aktivuje BCR vazbou na lehké řetězce  $\kappa$ <sup>150</sup>. Protože se při stimulaci výrazně měnila exprese molekuly CD24, použili jsme k definici FOI a FOII B-lymfocytů v *in vitro* systému pouze expresi IgM<sup>151</sup>.

Skupina *CVID-21low* vykazovala nižší procento **CD21+** FOI buněk (v rámci CD19+ B-lymfocytů) v porovnání se zdravými kontrolami, což může být zapříčiněno deficientní BCR signalizací<sup>152</sup>. Skupina *CVID-21norm* měla v rámci CD19+ B-lymfocytů relativně zvýšené procento obou, FOI i FOII populací.

Následně jsme sledovali replikační historii vybraných populací naivních B-lymfocytů na základě exprese tzv. KRECs (Kappa-deleting Recombination Excision Circles), které vznikají při přeskupování genů pro lehké imunoglobulinové řetězce kappa a jejichž počet je přímo úměrný počtu buněčných dělení<sup>153</sup>. FOI buňky i FOII buňky zdravých kontrol vykazovaly stejný počet buněčných dělení jako buňky transientní, tyto 2 populace se zřejmě vyvíjejí z transientních buněk bez proliferačního mezikroku. V porovnání se zdravými kontrolami jsme ale zjistili vyšší replikační aktivitu FOI i FOII buněk ve skupině *CVID-21norm* a FOII buněk ve skupině *CVID-21low*, zřejmě díky vyšší homeostatické proliferaci těchto subpopulací. CD21- buňky vykazovaly všeobecně vyšší replikační aktivitu než CD21+ buňky. Tento rozdíl byl nejvyšší ve skupině *CVID-21low* a mohl odrážet prodlouženou homeostatickou proliferaci nebo proliferaci v odpovědi na non-BCR stimulaci.

Porovnáním imunofenotypu, replikační historie a *in vitro* odpovědi na BCR a non-BCR stimulaci předpokládáme, že lidské transientní buňky diferencují do FOI a FOII typů folikulárních buněk. CD21- CD27- CD38- B-lymfocyty, které nalézáme ve zvýšeném počtu u některých pacientů s CVID (*CVID-21low skupina*), zřejmě vznikají z těchto typů FO buněk ztrátou exprese molekuly CD21. Protože je molekula CD21 důležitá při formování germinálního centra lymfoidního folikulu a při interakcích B-lymfocyt-folikulární dendritická buňka,

nemohou CD21- buňky pacientů s CVID projít germinální reakcí (tedy diferencovat do izotypově přesmyknutých paměťových buněk) a na stimulaci antigenem reagují pouze proliferací a produkcí imunoglobulinů třídy IgM<sup>139</sup>.

### 3. Seznam zkratek

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
APC	buňka prezentující antigen
APL	akutní promyelocytární leukemie
ATRA	all-trans-retinoová kyselina
B-ALL	B-buněčná akutní lymfoblastická leukemie
BCP-ALL	B-prekurzorová akutní lymfoblastická leukemie ( <i>B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia</i> )
BCR	B-lymfocytární receptor ( <i>B-cell receptor</i> )
bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BFM	Berlín - Frankfurt - Münster
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEA	karcinoembryonální antigen
CEACAM6	<i>Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CML	chronická myeloidní leukemie
CpG	oblasti DNA bohaté na cytosin a guanin
CVID	běžný variabilní imunodeficit ( <i>Common Variable Immunodeficiency</i> )
EGIL	<i>European Group for Immunological characterization of Leukemia</i>
FAB	francouzsko-americko-britský
Fc	<i>fragment crystallizable region</i>
FCS 3.0	<i>Flow Cytometry Standard format</i>
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
FO	folikulární
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	glykofosfatidylinositol
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
JMML	juvenilní myelomonocytární leukemie
KREC	<i>Kappa-deleting Recombination Excision Circles</i>

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	medián intenzity fluorescence
MRN	minimální reziduální nemoc
MZ	marginální zóna
NTAL	<i>Non-T cell Activation Linker</i>
PAM	<i>Partitioning Around Medoids</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PML	promyelocytární leukemický gen
pre-BCR	pre-B lymfocytární receptor
RA	kyselina retinoová
RAR $\alpha$	receptor $\alpha$ kyseliny retinoové
SDS	dodecylsulfát sodný
si-RNA	<i>short interfering RNA</i>
T-ALL	T-buněčná akutní lymfoblastická leukemie
TCR	T-lymfocytární receptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TLR	Toll-like receptor
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

#### **4. Seznam autorských publikací a prezentací**

##### 4.1. Seznam publikací vztahujících se k tématu dizertační práce

###### 4.1.1. Seznam přijatých publikací

#### **Aberrantly expressed CEACAM6 is involved in the signaling leading to apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells**

Veronika Kanderová, Ondřej Hrušák, and Tomáš Kalina

**Experimental Hematology 2010;38:653–660 IF: 3,106**

#### **Characterization of Lymphocyte Subsets in Patients with Common Variable Immunodeficiency Reveals Subsets of Naive Human B Cells Marked by CD24 Expression**

Marcela Vlková, Eva Froňková, Veronika Kanderová, Aleš Janda, Šárka Růžičková, Jiří Litzman, Anna Šedivá, Tomáš Kalina

**The Journal of Immunology 2010 Dec 1;185(11):6431-8 IF: 5.646**

#### **Multiplexed immuno-precipitation with 1725 commercially available antibodies to cellular proteins**

Heidi Slaastad, Weiwei Wu, Luiz Goullart, Veronika Kanderova, Geir Tjønnfjord, Jan Stuchly, Tomas Kalina, Anders Holm and Fridtjof Lund-Johansen

**Proteomics 2011, in press IF: 4.43**

###### 4.1.2. Seznam publikací zaslaných k revizi

#### **Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML-RARA fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia**

E. H. A. Dekking, V. H. J. van der Velden, R. Varro, H. Wai, S. Böttcher, M. Kneba, E. Sonneveld, A. Koning, N. Boeckx, N. Van Poecke, P. Lucio, A. Mendonça, L. Sedek, T. Szczepański, T. Kalina, V. Kanderová, P. Hoogeveen, J. Flores-Montero, M. C. Chillón, A. Orfao, P. Evans, M. Cullen, A. L. Noordijk, P. M. Vermeulen, M. T. de Man, E.P. Dixon, W. M. Comans-Bitter and J. J. M. van Dongen

**Leukemia**



## **An automated analysis of highly complex flow cytometry-based proteomic data**

Jan Stuchly, Veronika Kanderova, Karel Fiser, Daniela Cerna, Anders Holm, Weiwei Wu, Ondrej Hrusak, Fridtjof Lund-Johansen, Tomas Kalina

### **Cytometry A**

## **Adaptor protein NTAL enhances proximal signaling and potentiates corticosteroid induced apoptosis in T-ALL**

Karel Svojgr, Tomas Kalina, Veronika Kanderova, Tereza Skopcova, Tomas Brdicka, Jan Zuna

### **Experimental Hematology**

#### 4.2. Seznam prezentací vztahujících se k tématu dizertační práce (prezentující tučně)

##### Prezentace na zahraničních konferencích:

- Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., poster: *Aberrant CEACAM6 enhances integrin-ligand interactions on leukemic cells*. ISAC (International Society for Analytical Cytology) XXIV International Congress (Budapest, Hungary, 2008)
- Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., poster a přednáška: *Aberrant CEACAM6 influences integrin-ligand interactions and survival of leukemic cells*. The 19th Annual International CEA Symposium (Essen/Bochum, Germany, 2009).
- Holm A., Wu W., Goullart L., Slåstad H., de la Rosa Carrillo D., Stuchly J., **Kanderova V.**, **Kalina T.**, Lund-Johansen F., přednáška: *High-resolution antibody array analysis: a new look at the cellular proteome*. EHA 15th Annual Congress (Barcelona, Spain, 2010)
- Kalina T., **Kanderová V.**, Stuchlý J., Černá D., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Lund-Johansen F., poster: *Antibody array revealing new prognostic and drug-response pathways in childhood leukemia*. 7th Bi-Annual Childhood Leukaemia Symposium (Antalya, Turkey, 2010)
- Vlková M.**, Froňková E., **Kanderová V.**, Janda A., Růžičková Š., Litzman J., Šedivá A., Kalina T., poster: *Characterization of lymphocyte subsets in CVID patients reveals novel subsets of human naïve B-cells marked by IgM and CD24 expression*. Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI) (Vienna, Austria, 2010)

**6. Kanderova V.**, Stuchly J., Fiser K., Cerna D., Hrusak O., Slåstad H., Wu W., Holm A., Kalina T., Lund-Johansen F., poster: *Antibody array revealing new prognostic markers of childhood acute leukemia*. XXVI Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (CYTO 2011) (Baltimore, Maryland, USA, 2011)

**7. Kalina T.**, **Kanderova V.**, Stuchly J., Fiser K., Cerna D., Wu W., Holm A., Hrusak O., Lund-Johansen F., poster: *Antibody array-based proteomic profiling of childhood acute leukemia*. EHA 16th Annual Congress (London, UK, 2011)

Prezentace na českých a slovenských konferencích:

**1. Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., přednáška: *Aberantní CD66c v mezibuněčné komunikaci leukemických buněk*. XVI. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR (Podbánské, SR, 2006)

**2. Kanderová V.**, Hrušák O., Thürner D., Kalina T., přednáška: *Úloha aberantní CD66c v signalizaci, adhezi, proliferaci a apoptóze leukemických buněk*. Výjezdní zasedání CLIP (Kácov, 2007)

**3. Kalina T.**, **Kanderová V.**, Vášková M., Hrušák O. přednáška: *Aberantní signalizace CD66c u leukemických buněk zahrnuje integriny a Erk-kinázovou dráhu*. XXI. Olomoucké hematologické dny (Olomouc, 2007)

**4. Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., přednáška: *Aberantní CD66c v mezibuněčné komunikaci leukemických buněk*. Analytická cytometrie IV. (Brno, 2007) - ocenění za přednášku

**5. Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., poster: *Aberrant CEACAM6 enhances integrin-ligand interactions on leukemic cells*. Studentská vědecká konference 2. LF UK (Praha, 2008)

**6. Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., poster: *Aberantní CEACAM6 ovlivňuje integrin-ligand vazebné interakce na leukemických buňkách*. XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí (Olomouc, 2008)

**7. Kanderová V.**, Hrušák O., Kalina T., poster: *Aberrant CEACAM6 influences integrin-ligand interactions and survival of leukemic cells*. Analytická cytometrie V. (Olomouc, 2009) - ocenění za poster

**8. Kanderová V.**, Kalina T., Stuchlý J., Černá D., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Lund-Johansen F., přednáška: *Protilátkové „arrays“ odhalující nové prognostické znaky dětských akutních leukemií*. Vědecká konference 2. LF UK (Praha, 2010) - cena za nejlepší přednášku

- 9. Kanderová V.**, Kalina T., Stuchlý J., Černá D., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Lund-Johansen F., přednáška: *Protilátkové „arrays“ odhalující nové prognostické znaky dětských akutních leukemií*. Konference DNA Analýza VII (Beckman Coulter) (Praha, 2010)
- 10. Kanderová V.**, Kalina T., Stuchlý J., Černá D., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Lund-Johansen F., přednáška: *Antibody array revealing new prognostic and drug-response pathways in childhood leukemia*. XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí (Olomouc, 2010)
- 11. Kanderová V.**, Kalina T., Stuchlý J., Fišer K., Černá D., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Holm A., Lund-Johansen F., poster: *Antibody array revealing new prognostic and drug-response pathways in childhood leukemia*. 9th EFIS-EJI Tatra Immunology conference (Štrbské Pleso, SR, 2010)
- 12. Kanderová V.**, Kalina T., Stuchlý J., Fišer K., Černá D., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Holm A., Lund-Johansen F., poster: *Protilátkové „arrays“ odhalující nové prognostické znaky dětských akutních leukemií*. XX. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR (Praha, 2010) - ocenění za poster
- 13. Kanderová V.**, Černá D., Stuchlý J., Fišer K., Vášková M., Mejstříková E., Hrušák O., Kalina T., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Holm A., Lund-Johansen F., přednáška: *Protilátkové arrays odhalující nové prognostické znaky dětských akutních leukemií*. Výjezdní zasedání CLIP (Měříň, 2010)
- 14. Kanderová V.**, Stuchlý J., Černá D., Fišer K., Hrušák O., Slåstad H., Wu W., De Souza Goulart L. F., de la Rosa Carrillo D., Holm A., Lund-Johansen F., **Kalina T.**, přednáška: *Antibody array revealing new prognostic of childhood acute leukemia*. Informal Proteomic meeting 2010 (Liblice, 2010)
- 15. Vlková M.**, Froňková E., Kanderová V., Janda A., Růžičková Š., Litzman J., Šedivá A., Kalina T., přednáška: *Characterization of lymphocyte subsets in CVID patients reveals novel subsets of human naïve B-cells marked by IgM and CD24 expression*. 10th ESID Prague Spring Meeting (Praha, 2011)
- 16. Kanderová V.**, Stuchlý J., Černá D., Fišer K., Hrušák O., Wu W., Holm A., Lund-Johansen F., Kalina T., poster: *Protilátkové arrays a proteinový profil dětských akutních leukemií*. Vědecká konference 2. LF UK (Praha, 2011)
- 17. Švojr K.**, Kalina T., Brdička T., Kanderová V., Kačerová T., Starý J., Zuna J., přednáška: *Adaptorový protein NTAL zvyšuje účinek kortikoidů u T-ALL cestou posílení signalizace přes T-buněčný receptor*. Vědecká konference 2. LF UK (Praha, 2011)

**18. Kanderová V.**, Fišer K., Stuchlý J., Černá D., Wu W., Holm A., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T., přednáška: *Flow Cytometry Microsphere-based Affinity Proteomics - New Tool for Childhood Acute Leukemia Profiling*. Analytická cytometrie VI. (Praha, 2011)

**19. Kanderová V.**, Dekking E.H.A., van der Velden V.H.J., Varro R., Wai H., Böttcher S., Kneba M., Sonneveld E., Koning A., Boeckx N., Van Poecke N., Lucio P., Mendonça A., Sedek L., Szczepański T., Kalina T., Hoogeveen P., Flores-Montero J., Chillón M.C., Orfao A., Evans P., Cullen M., Noordijk A.L., Vermeulen P.M., de Man M.T., Dixon E.P., Comans-Bitter W.M. and van Dongen J.J.M., přednáška: *Flow cytometric immunobead assay for PML-RARA fusion protein detection*. Analytická cytometrie VI. (Praha, 2011)

**20. Černá D.**, Kanderová V., Fišer K., Stuchlý J., Wu W., Holm A., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T., poster: *Leukemia Cell Lines Immunophenotyping - Flow Cytometry Microsphere-based Affinity Proteomics and Classical FACS-based Methods Comparison*. Analytická cytometrie VI. (Praha, 2011)

## 5. Reference

1. Colby-Graham, M.F. & Chordas, C. The childhood leukemias. *Journal of Pediatric Nursing* **18**, 87-95(2003).
2. Pui, C.-H., Crist, W.M. & Look, A.T. Biology and Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **76**, 1449-1463(1990).
3. Mayer, J. & Starý, J. Leukémie. *Leukémie, Avicenum, Grada Publishing, Praha* (2002).
4. Adam, Z. et al. Hematologie II, Přehled maligních hematologických nemocí. *Hematologie II, Avicenum, Grada Publishing, Praha* (2001).
5. Pui, C.-H. Childhood Leukemias. *The New England Journal of Medicine* **332**, 1618-1630(1995).
6. Pui, C.H. Childhood Leukemias. *Childhood Leukemias, Cambridge University Press, Second Edition* (2006).
7. Kalina, T. et al. Imunofenotypizace dětských leukemií. *Transfúze a Hematologie Dnes* **12**, 20-25(2006).
8. Béné, M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunology Letters* **98**, 9-21(2005).
9. Béné, M. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* **9**, 1783-1786(1995).
10. Coustan-Smith, E. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology* **10**, 147-156(2009).
11. Harrison, C.J. The genetics of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Baillière's Clinical Haematology* **13**, 427-39(2000).
12. Harrison, C.J. Acute lymphoblastic leukaemia. *Baillière's Clinical Haematology* **14**, 593-607(2001).
13. Pui, C.-H. et al. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 551-565(2011).
14. Pui, C.-H. Recent Research Advances in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of the Formosan Medical Association* **109**, 777-787(2010).
15. Pui, C.-H., Robison, L.L. & Look, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* **371**, 1030-1043(2008).

16. Stary, J. et al. Long-term results of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia in the Czech Republic. *Leukemia* **24**, 425-428(2010).
17. Harrison, C.J. et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *British Journal of Haematology* 132-142(2010).
18. Fronkova, E. et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* **22**, 989-997(2008).
19. Mejstříková, E. et al. Detection of Residual B Precursor Lymphoblastic Leukemia by Uniform Gating Flow Cytometry. *Pediatric Blood and Cancer* 62-70(2010).
20. Pui, C.-H., Relling, M.V. & Downing, J.R. Acute Lymphoblastic Leukemia Mechanisms of disease. *The New England Journal of Medicine* **350**, 1535-1548(2004).
21. Mullighan, C.G. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758-764(2007).
22. Collins-Underwood, J.R. & Mullighan, C.G. Genomic profiling of high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **24**, 1676-1685(2010).
23. Mullighan, C.G. New Strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia: Translating Advances in Genomics into Clinical Practice. *Clinical Cancer Research* 396-400(2010).
24. Roberts, K.G. & Mullighan, C.G. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Current Opinion in Pediatrics* **23**, 34-40(2011).
25. Nebral, K. et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **23**, 134-143(2009).
26. Mullighan, C.G.M. et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **360**, 470-480(2009).
27. Kuiper, R.P. et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* **24**, 1258-1264(2010).
28. Den Boer, M.L. et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology* **10**, 125-134(2009).

29. Mullighan, C.G. et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **41**, 1243-1246(2009).
30. Cario, G. et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood* **115**, 5393-5397(2010).
31. Russell, L.J. et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 2688-2698(2009).
32. Harvey, R.C. et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 5312-21(2010).
33. Kalina, T. et al. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer* **5**, 38(2005).
34. Mejstříková, E. et al. Correlation of CD33 with poorer prognosis in childhood ALL implicates a potential of anti-CD33 frontline therapy. *Leukemia* **19**, 1092-1094(2005).
35. Velden, V.H.J.V.D. et al. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg ( CMA-676 ) in acute myeloid leukemia : in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* **97**, 3197-3204(2001).
36. Cotter, M. et al. SUCCESSFUL USE OF GEMTUZUMAB OZOGAMICIN IN A CHILD WITH RELAPSED CD33-POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA. *British Journal of Haematology* **122**, 687-688(2003).
37. Ayala, F. et al. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* **23**, 2233-2241(2009).
38. Hall, B.M. & Gibson, L.F. Regulation of Lymphoid and Myeloid Leukemic Cell Survival: Role of Stromal Cell Adhesion Molecules. *Leukemia & Lymphoma* **45**, 35-48(2004).
39. Hall, B.M. et al. Stromal cells expressing elevated VCAM-1 enhance survival of B lineage tumor cells. *Cancer Letters* **207**, 229-239(2004).
40. Shiozawa, Y. et al. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia* **22**, 941-950(2008).

41. Hrušák, O. & Porwit-MacDonald, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* **16**, 1233-1258(2002).
42. Skubitz, K.M. et al. CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *The Journal of Immunology* **155**, 5382-5390(1995).
43. Kuroki, M. et al. Identification and comparison of residues critical for cell-adhesion activities of two neutrophil CD66 antigens, CEACAM6 and CEACAM8. *The Journal of Leukocyte Biology* **70**, 543-550(2001).
44. Schölzel, S. et al. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *The American Journal of Pathology* **156**, 595-605(2000).
45. Oue, N. et al. Gene Expression Profile of Gastric Carcinoma: Identification of Genes and Tags Potentially Involved in Invasion, Metastasis, and Carcinogenesis by Serial Analysis of Gene Expression. *Cancer Research* **64**, 2397-2405(2004).
46. Hammarström, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology* **9**, 67-81(1999).
47. Duxbury, M.S. et al. A novel role for carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Research* **64**, 3987-93(2004).
48. Singer, B.B. et al. Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLOS One* **5**, e8747(2010).
49. Blumenthal, R.D. et al. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer* **7**, 2(2007).
50. Gangopadhyay, A., Lazure, D.A. & Thomas, P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clinical & Experimental Metastasis* **16**, 703-712(1998).
51. Duxbury, M.S. et al. CEACAM6 cross-linking induces caveolin-1-dependent, Src-mediated focal adhesion kinase phosphorylation in BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 23176-23182(2004).
52. Ordoñez, C. et al. Human Carcinoembryonic Antigen Functions as a General Inhibitor of Anoikis. *Cancer Research* **60**, 3419-3424(2000).



53. Duxbury, M.S. et al. Systemic siRNA-Mediated Gene Silencing. *Annals of Surgery* **240**, 667-676(2004).
54. Blumenthal, R.D., Hansen, H.J. & Goldenberg, D.M. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Research* **65**, 8809-8817(2005).
55. Riley, C.J. et al. Design and activity of a murine and humanized anti-CEACAM6 single-chain variable fragment in the treatment of pancreatic cancer. *Cancer Research* **69**, 1933-1940(2009).
56. Duxbury, M.S. et al. CEACAM6 as a novel target for indirect type 1 immunotoxin-based therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317**, 837-843(2004).
57. Oikawa, S. et al. Extracellular N-domain alone can mediate specific heterophilic adhesion between members of the carcinoembryonic antigen family, CEACAM6 and CEACAM8. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **278**, 564-568(2000).
58. Skubitz, K.M., Campbell, K.D. & Skubitz, K.D. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *The Journal of Leukocyte Biology* **60**, 106-117(1996).
59. Nair, K.S. & Zingde, S.M. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cellular Immunology* **208**, 96-106(2001).
60. Boccuni, P. et al. CD66c antigen expression is myeloid restricted in normal bone marrow but is a common feature of CD10+ early-B-cell malignancies. *Tissue Antigens* **52**, 1-8(1998).
61. Hrušák, O. et al. Aberrant expression of KOR-SA3544 antigen in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts TEL-AML1 negativity. *Leukemia* **12**, 1064-1070(1998).
62. Sugita, K. et al. The KOR-SA3544 antigen predominantly expressed on the surface of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells is nonspecific cross-reacting antigen-50/90 (CD66c) and invariably expressed in cytoplasm of human leukemia cells. *Leukemia* **13**, 779-785(1999).
63. Schabath, H. et al. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *Journal of Cell Science* **119**, 314-325(2006).
64. Suzuki, T. et al. CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *The Journal of Immunology* **166**, 5567-77(2001).

65. Taguchi, T. et al. Pre-B cell antigen receptor-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *The Journal of Immunology* **170**, 252-60(2003).
66. Bubnoff, N.V. et al. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571 : a prospective study. *The Lancet* **359**, 487-491(2002).
67. Roecklein, B.A. & Torok-Storb, B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* **85**, 997-1005(1995).
68. Ordonez, C. et al. GPI-Anchored CEA Family Glycoproteins CEA and CEACAM6 Mediate Their Biological Effects Through Enhanced Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Fibronectin Interaction. *Journal of Cellular Physiology* **0561**, 1-9(2006).
69. Runz, S. et al. CD24 induces localization of beta1 integrin to lipid raft domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **365**, 35-41(2008).
70. Hořejší, V. Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunology Letters* **92**, 43-49(2004).
71. Chan, C.H.F. & Stanners, C.P. Recent advances in the tumour biology of the GPI-anchored carcinoembryonic antigen family members CEACAM5 and CEACAM6. *Current Oncology* **14**, 70-73(2007).
72. Tedoldi, S. et al. Transmembrane adaptor molecules: a new category of lymphoid-cell markers. *Blood* **107**, 213-221(2006).
73. Hrdinka, M. et al. PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells involved in regulation of T cell receptor (TCR) signaling and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1-22(2011).
74. Brdicka, T. et al. Non-T Cell Activation Linker (NTAL): A Transmembrane Adaptor Protein Involved in Immunoreceptor Signaling. *The Journal of Experimental Medicine* **196**, 1617-1626(2002).
75. Stork, B. et al. Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulating signal circuit in B lymphocytes. *Immunity* **21**, 681-691(2004).
76. Zhu, M. et al. Negative regulation of T cell activation and autoimmunity by the transmembrane adaptor protein LAB. *Immunity* **25**, 757-768(2006).
77. Svojgr, K. et al. Adaptor molecules expression in normal lymphopoiesis and in childhood leukemia. *Immunology Letters* **122**, 185-192(2009).

78. Kox, C. et al. The favorable effect of activating NOTCH1 receptor mutations on long-term outcome in T-ALL patients treated on the ALL-BFM 2000 protocol can be separated from FBXW7 loss of function. *Leukemia* **24**, 2005-2013(2010).
79. Teixeira, E. & Daniels, M.A. ERK and cell death: ERK location and T cell selection. *The FEBS Journal* **277**, 30-38(2010).
80. Perez, O.D., Krutzik, P.O. & Nolan, G.P. Flow Cytometric Analysis of Kinase Signaling Cascades. *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols, 2nd edition, NJ: Humana Press* (2004).
81. Weerkamp, F. et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia* **23**, 1106-1117(2009).
82. Nolan, J.P. & Mandy, F. Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry* **69**, 318-325(2006).
83. Valk, P.J.M. et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* **350**, 1617-1628(2004).
84. Flotho, C. et al. A set of genes that regulate cell proliferation predicts treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**, 1271-1277(2007).
85. Yeoh, E.-J. et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**, 133-143(2002).
86. Tian, Q. et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**, 960-969(2004).
87. Kornblau, S.M. et al. Functional proteomic profiling of AML predicts response and survival. *Blood* **113**, 154-164(2009).
88. Vaskova, M. et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **19**, 876-878(2005).
89. Hofmann, A. et al. Proteomic cell surface phenotyping of differentiating acute myeloid leukemia cells. *Blood* **26-34**(2010).
90. Irish, J.M. Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. *Nature Reviews Cancer* **6**, 146-155(2006).
91. Irish, J.M. et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* **118**, 217-228(2004).

92. Jacobberger, J.W. et al. Immunoreactivity of Stat5 phosphorylated on tyrosine as a cell-based measure of Bcr/Abl kinase activity. *Cytometry* **54**, 75-88(2003).
93. Kotecha, N. et al. Single Cell Profiling Identifies Aberrant STAT5 Activation in Myeloid Malignancies with Specific Clinical and Biologic Correlates. *Cancer Cell* **14**, 335-343(2008).
94. Hsu, H.-Y., Joos, T.O. & Koga, H. Multiplex microsphere-based flow cytometric platforms for protein analysis and their application in clinical proteomics - from assays to results. *Electrophoresis* **30**, 4008-4019(2009).
95. Tibes, R. et al. Reverse phase protein array: validation of a novel proteomic technology and utility for analysis of primary leukemia specimens and hematopoietic stem cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 2512-2521(2006).
96. Wu, W. et al. Antibody array analysis with label-based detection and resolution of protein size. *Molecular and Cellular Proteomics* **8**, 245-257(2009).
97. Holm, A., Wu, W. & Lund-Johansen, F. Antibody-array analysis of labelled proteomes: how can we control specificity? *New Biotechnology* **Aug 4**, (2011).
98. Kaufmann, L. & Rousseeuw, P. Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis. *New York: Wiley* (1990).
99. Drexler, H.G., MacLeod, R.A.F. & Uphoff, C.C. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia Research* **23**, 207-215(1999).
100. Titz, B. et al. The proximal signaling network of the BCR-ABL1 oncogene shows a modular organization. *Oncogene* **29**, 5895-5910(2010).
101. Lee, C.F. et al. Assessment of downstream effectors of BCR/ABL protein tyrosine kinase using combined proteomic approaches. *Proteomics* 3321-3342(2010).
102. Montiel-Duarte, C. et al. Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leukemia Research* **32**, 709-16(2008).
103. Hazlehurst, L. a et al. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. *Cancer Control* **16**, 100-107(2009).
104. Xiong, L. et al. Global Proteome Quantification for Discovering Imatinib-Induced Perturbation of Multiple Biological Pathways in K562 Human Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Journal of Proteome Research* **9**, 6007-6015(2010).

105. Hofmann, W.-K. et al. Mechanisms of disease Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles : a gene-expression study. *The Lancet* **359**, 481-486(2002).
106. Gorre, M.E. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880(2001).
107. Preisinger, C. & Kolch, W. The Bcr-Abl kinase regulates the actin cytoskeleton via a GADS/Slp-76/Nck1 adaptor protein pathway. *Cellular Signalling* **22**, 848-856(2010).
108. Oetzel, C. et al. The Tyrosine Kinase Inhibitor CGP 57148 ( ST1 571 ) Induces Apoptosis in BCR-ABL-positive Cells by Down-Regulating BCL-X. *Clinical Cancer Research* **6**, 1958-1968(2000).
109. Keeshan, K., Cotter, T.G. & McKenna, S.L. Bcr-Abl upregulates cytosolic p21WAF-1/CIP-1 by a phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-independent pathway. *British Journal of Haematology* **123**, 34-44(2003).
110. Jonuleit, T. et al. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* **96**, 1933-1939(2000).
111. Van der Kuip, H. et al. Adhesion to fibronectin selectively protects Bcr-Abl+ cells from DNA damage-induced apoptosis. *Blood* **98**, 1532-1541(2001).
112. Burchert, A. et al. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* **19**, 1774-1782(2005).
113. Renneville, A. et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* **22**, 915-931(2008).
114. Casasnovas, R.O. et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* **17**, 515-527(2003).
115. Lo Coco, F., Pisegna, S. & Diverio, D. THE AML1 GENE : A TRANSCRIPTION FACTOR INVOLVED IN THE PATHOGENESIS OF MYELOID AND LYMPHOID LEUKEMIAS. *Haematologica* **82**, 364-370(1997).
116. Ma, S.K., Wan, T.S.K. & Chan, L.C. CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF CHILDHOOD LEUKEMIA. *Hematological Oncology* **17**, 91-105(1999).
117. Segalla, S. et al. Retinoic Acid Receptor Alpha Fusion to PML Affects Its Transcriptional and Chromatin-Remodeling Properties. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 8795-8808(2003).
118. Hansen, L.A. et al. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* **21**, 1271-1279(2000).

119. Insinga, A., Pelicci, P.G. & Minucci, S. Leukemia-Associated Fusion Proteins - Multiple Mechanisms of Action to Drive Cell Transformation. *Cell Cycle* **4**, 67-69(2005).
120. Grignani, F. et al. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**, 815-818(1998).
121. Lin, R.J. et al. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**, 811-814(1998).
122. Grimwade, D. et al. Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **90**, 4876-4885(1997).
123. Grimwade, D. et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* **96**, 1297-1308(2000).
124. Dongen, J.J. van et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* **13**, 1901-1928(1999).
125. Chillón, M.C. et al. Two new 3-PML breakpoints in t(15;17)(q22;q21)-positive acute promyelocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* **27**, 35-43(2000).
126. Sanz, M.A. & Montesinos, P. Open issues on bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *Thrombosis Research* **125**, S51-S54(2010).
127. Hardy, R.R., Kincade, P.W. & Dorshkind, K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* **26**, 703-714(2007).
128. Warnatz, K. & Schlesier, M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry. Part B.* **74**, 261-271(2008).
129. Hardy, R.R. & Hayakawa, K. B cell development pathways. *Cancer* **19**, 595-621(2001).
130. Bartholdy, B. & Matthias, P. Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* **327**, 1-23(2004).
131. Monroe, J.G. & Dorshkind, K. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. *Advances in Immunology* **95**, 1-50(2007).
132. Suryani, S. et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* **115**, 519-529(2010).

133. Pillai, S. & Cariappa, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology* **9**, 767-777(2009).
134. Cariappa, A. et al. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* **14**, 603-615(2001).
135. Carsetti, R. et al. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**, 412-417(2005).
136. Allman, D. & Pillai, S. Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* **20**, 149-157(2008).
137. Bernasconi, N.L., Onai, N. & Lanzavecchia, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity : up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Immunobiology* **101**, 4500-4504(2003).
138. Rubtsov, A.V. et al. TLR Agonists Promote Marginal Zone B Cell Activation and Facilitate T-Dependent IgM Responses. *The Journal of Immunology* 3882-3888(2011).
139. Roozendaal, R. & Carroll, M.C. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunological Reviews* **219**, 157-166(2007).
140. Guinamard, R. et al. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nature Immunology* **1**, 31-36(2000).
141. Ferguson, A.R., Youd, M.E. & Corley, R.B. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *International Immunology* **16**, 1411-1422(2004).
142. Allan, L.L. et al. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic Acid receptor signaling. *The Journal of Immunology* **186**, 5261-5272(2011).
143. Gatto, D. & Brink, R. The germinal center reaction. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **126**, 898-907(2010).
144. Cariappa, A. et al. The recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell populations. *The Journal of Immunology* **179**, 2270-2281(2007).
145. Eibel, H., Salzer, U. & Warnatz, K. Common variable immunodeficiency at the end of a prospering decade: towards novel gene defects and beyond. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **10**, 526-533(2010).

146. Grimbacher, B. et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature Immunology* **4**, 261-268(2003).
147. Zelm, M.C. van et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England Journal of Medicine* **354**, 1901-1912(2006).
148. Warnatz, K. et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13945-13950(2009).
149. Rakhmanov, M. et al. Circulating CD21<sup>low</sup> B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13451-13456(2009).
150. Viau, M. et al. Down-modulation of the antigen receptor by a superantigen for human B cells. *Immunology Letters* **92**, 91-96(2004).
151. Galibert, B.L. et al. CD40 and B Cell Antigen Receptor Dual Triggering of Resting B Lymphocytes Turns on a Partial Germinal Center Phenotype. *The Journal of Experimental Medicine* **183**, 77-85(1996).
152. Foerster, C. et al. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. *The Journal of Immunology* **184**, 7305-7313(2010).
153. Zelm, M.C. van et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 645-655(2007).