

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Lucie Slámová

Liniová plasticita leukemických buněk

Nový subtyp BCP ALL s liniovým přesmykem

Lineage plasticity of leukemic cells

New subtype of BCP ALL with lineage switch

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Ester Mejstříková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 9.9.2014

LUCIE SLÁMOVÁ

Podpis

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce MUDr. Ester Mejstříkové, Ph.D. za výborné odborné vedení v průběhu postgraduálního studia. Prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. děkuji za umožnění práce a realizaci dizertační práce v laboratořích CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague), Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol. Klíčovou a nezastupitelnou roli v mém projektu odehráli kolegové ze švýcarského Curychu, PD Dr. Bourquin Jean-Pierre a Dr. Beat Bornhauser. Velký dík patří Mgr. Júlii Starkové, Ph.D., jejíž rady a nápady mě provázely celým studiem. Celé pracovní skupině CLIP děkuji za přátelské pracovní prostředí, za ochotu a trpělivost. Prof. MUDr. Janu Starému, DrSc. děkuji za dlouhotrvající podporu laboratorního výzkumu v laboratořích CLIP. Velké poděkování patří celé mé rodině za podporu a trpělivost v průběhu studia.

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

SLÁMOVÁ, Lucie. Plasticita leukemických buněk [Lineage plasticity of leukemic cells]. Praha, 2014. Strany 92, počet příloh 4. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol. Vedoucí závěrečné práce/Školitel MUDr. Ester Mejstříková, Ph.D.

Obsah:

| | |
|---|-----------|
| Klíčová slova | 7 |
| Abstrakt: | 7 |
| Keywords | 8 |
| Abstract | 8 |
| 1. Úvod | 9 |
| Akutní lymfoblastická leukemie | 9 |
| Morfologie | 9 |
| Cytogenetika | 9 |
| Početní změny chromosomů | 10 |
| Strukturní změny chromosomů | 10 |
| Akutní myeloidní leukemie | 11 |
| Morfologie | 11 |
| Cytogenetika | 13 |
| Akutní hybridní leukemie | 14 |
| Imunofenotypizace | 14 |
| Imunofenotypizace akutní lymfoblastické leukemie | 16 |
| Imunofenotypizace akutní myeloidní leukemie | 17 |
| Minimální reziduální nemoc | 18 |
| Průtoková cytometrie | 18 |
| Přestavby genů pro imunoglobuliny a receptory T lymfocytů | 19 |
| Fúzní geny | 19 |
| Masivně paralelní sekvenování | 20 |
| Léčba akutní lymfoblastické a myeloidní leukemie | 20 |
| Akutní lymfoblastická leukemie - léčba a stratifikace | 20 |
| Akutní myeloidní leukemie - léčba a stratifikace..... | 22 |
| Vývoj hematopoetických buněk | 23 |
| Změna buněčného osudu | 26 |
| C/EBPα gen (CCAAT enhancer binding protein alpha) | 27 |
| Liniový přesmyk | 28 |
| Epigenetika | 30 |
| Methylace v leukemogenezi | 31 |
| Myší modely v leukemogenezi | 32 |
| 2. Cíle práce | 34 |
| 3. Materiál a metody | 35 |
| Charakteristika kohorty pacientů | 35 |
| Průtoková cytometrie a sortovací experimenty | 35 |
| Izolace RNA, DNA, reverzní transkripce | 36 |
| Screening přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory a stanovení minimální reziduální nemoci | 36 |
| Bisulfitové sekvenování | 37 |
| Expresce genu C/EBP α a kontrolního genu ABL1 | 38 |
| mRNA exprese cytokinových receptorů | 39 |
| Cytokinové receptory na proteinové úrovni..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| Identifikace a validace leukemicky specifických markerů | 39 |
| Genová exprese 90 genů | 40 |
| <i>In vitro</i> funkční experimenty..... | 44 |
| Vytvoření myšího modelu..... | 44 |
| Statistická analýza | 45 |
| 4. Výsledky | 46 |
| Jaká je incidence fenoménu liniového přesmyku do monocytoidní linie u dětské BCP ALL? | 46 |
| Lze definovat typický expresní vzorec, podle kterého probíhá liniový přesmyk? | 47 |
| Jsou lymfoidní a myeloidní leukemické buňky geneticky příbuzné nebo se jedná o různé klony? | 48 |
| Existují společné charakteristiky pacientů s fenoménem liniového přesmyku do monocytoidní linie (imunologické, genetické, epigenetické)? | 49 |
| Lze modelovat liniový přesmyk v <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> podmínkách? | 56 |
| Jakým způsobem lze hledat nové cíle vhodné pro reziduální nemoc cytometricky nejen u pacientů se swALL? | 58 |
| 5. Diskuze a závěr | 60 |
| 6. Souhrn | 63 |
| 7. Summary | 65 |
| 8. Seznam použitých zkratk | 67 |
| 9. Seznam použité literatury dle ISO-690 | 73 |
| 10. Přílohy | 87 |

Klíčová slova: akutní leukemie, C/EBP α gen, antigen CD2, liniový přesmyk

Abstrakt:

Liniový přesmyk z lymfoidní do myeloidní linie během léčby B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie (BCP ALL) je raritní a byl dosud popisován především u pacientů s přestavbou *MLL* genu. Podařilo se nám objevit zcela novou skupinu BCP ALL, u které dochází k liniovému přesmyku do monocytoidní linie během časně fáze léčby – swALL (“switching” ALL). U žádného pacienta se swALL fenoménem jsme nenašli přestavbu genu *MLL*. Zastoupení swALL pacientů mezi BCP ALL bylo neočekávaně vysoké (3-4%). Všichni swALL pacienti měli aberantní expresi antigenu CD2 (LFA-2). Zvýšená exprese *C/EBP α* genu a hypomethylace CEBPA promotoru byly přítomny u většiny swALL pacientů již při diagnóze onemocnění, dříve než jsme pozorovali liniový přesmyk. U pacientů se swALL jsme identifikovali v průběhu liniového přesmyku subpopulaci buněk exprimujících současně B lymfoidní a monocytární znaky. V průběhu transdiferenciace typicky dochází k zvýšení exprese cytokinových receptorů pro *M-CSF* a *GM-CSF*. Liniový přesmyk je možné rekapitulovat v *in vivo* a v *in vitro* podmínkách. Dětsí pacienti se swALL odpovídají pomaleji na iniciační léčbu, často vyžadují intenzivnější léčbu, ale jejich prognóza se zdá být srovnatelná s „ostatními“ BCP ALL.

Keywords: acute leukemia, C/EBP α gene, antigen CD2, lineage switch

Abstract:

So far, the lymphoid to myeloid lineage switch during the treatment of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP ALL) was identified only rarely in patients with the *MLL* gene rearrangement. We discovered a novel BCP ALL subset switching to monocytoid lineage during an early phase of the treatment – swALL with no *MLL* gene rearrangement. The proportion of swALL cases among BCP ALLs was unexpectedly high (3-4%). All swALLs have expressed the CD2 antigen (LFA-2). The upregulation of C/EBP α gene and hypomethylation of the CEBPA promoter were significant in blasts already at diagnosis, preceding the lineage switch in the majority of the cases. SwALL patients were characterized by unique subpopulation of the cells coexpressing B lymphoid and monocytoid markers. Changes in the expression of *M-CSFR*, *GM-CSFR* and other genes accompanied the lineage switch. The lineage switch could be recapitulated *in vivo* and *in vitro*. Even if the children patient with swALL respond slowly to initial therapy, the prognosis is comparable to “other” BCP ALLs. Risk-based ALL therapy appears to be the treatment of choice for swALL.

1. Úvod

Akutní lymfoblastická leukemie

Slovo leukemie pochází z řeckého leukos λευκός, "bílý" a haima αίμα, "krev". Termínem leukemie označujeme heterogenní skupinu maligních onemocnění postihujících hematopoetický systém. Hematopoetický systém kostní dřeně je složen z nediferencovaných pluripotentních kmenových buněk, které proliferují a diferencují do myeloidní a lymfoidní linie. Maligní transformací různě diferencovaných krevních buněk vzniká akutní myeloidní leukemie (AML) a akutní lymfoblastická leukemie (ALL). Na základě nejnovějších poznatků můžeme vyčlenit řadu podskupin s různým klinickým a laboratorním nálezem, prognózou i odpovědí na léčbu. Leukemie představují spolu s nádory centrálního nervového systému nejčastější onkologická onemocnění v dětském věku.

ALL je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku vyjímku tvoří pouze oblasti s endemickým výskytem Burkittova lymfomu. V České republice onemocnělo za rok 2013 celkem 86 dětí akutní lymfoblastickou leukémií.

Morfologie

Morfologicky se akutní lymfoblastická leukemie klasifikuje dle FAB (francouzsko-americko-britské) klasifikace do tří skupin L1-L3. FAB klasifikace má z hlediska léčby a prognózy v současné době omezený význam. L1 blasty jsou uniformní, malé lymfoblasty s kulatým a pravidelným jádrem. L1 blasty se vyskytují nejčastěji (v 70-80%) u akutních lymfoblastických leukémií z B lymfocytárních prekurzorů (tzv. B-cell precursor ALL, BCP ALL). L2 blasty jsou lymfoblasty rozdílné velikosti s jádry různého tvaru a tvoří 20-25% akutních leukémií. L3 blasty jsou uniformní, velké lymfoblasty, s pravidelným jádrem, se silně bazofilní cytoplazmou a častou vakuolizací. L3 blasty se nacházejí vzácně, jsou spojovány se zralou B ALL (Mayer et al. 2002).

Cytogenetika

Chromosomové změny u akutních lymfoblastických leukémií nacházíme u 70-95% případů. Některé změny korelují s podtypem ALL, definovaným morfologicky a imunologicky. Změny můžeme rozdělit na změny týkající se počtu chromosomů a změny zahrnující struktury chromosomů.

Početní změny chromosomů

Numerické abnormality jsou klasifikovány podle počtu chromozómů v buňce. Hyperdiploidie s počtem větším než 46 chromosomů se vyskytuje u více než 30% dětských ALL. Hyperdiploidie s počtem více než 50 chromosomů je spojena s dobrou prognózou. Hyperdiploidie nejčastěji zahrnuje trizomie chromosomů 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 a 21. Hypodiploidie s počtem nižším než 46 chromosomů je pozorována asi u 5% dětských ALL a je spojená se špatnou prognózou (Harrison et al. 2004; Nachman et al. 2007).

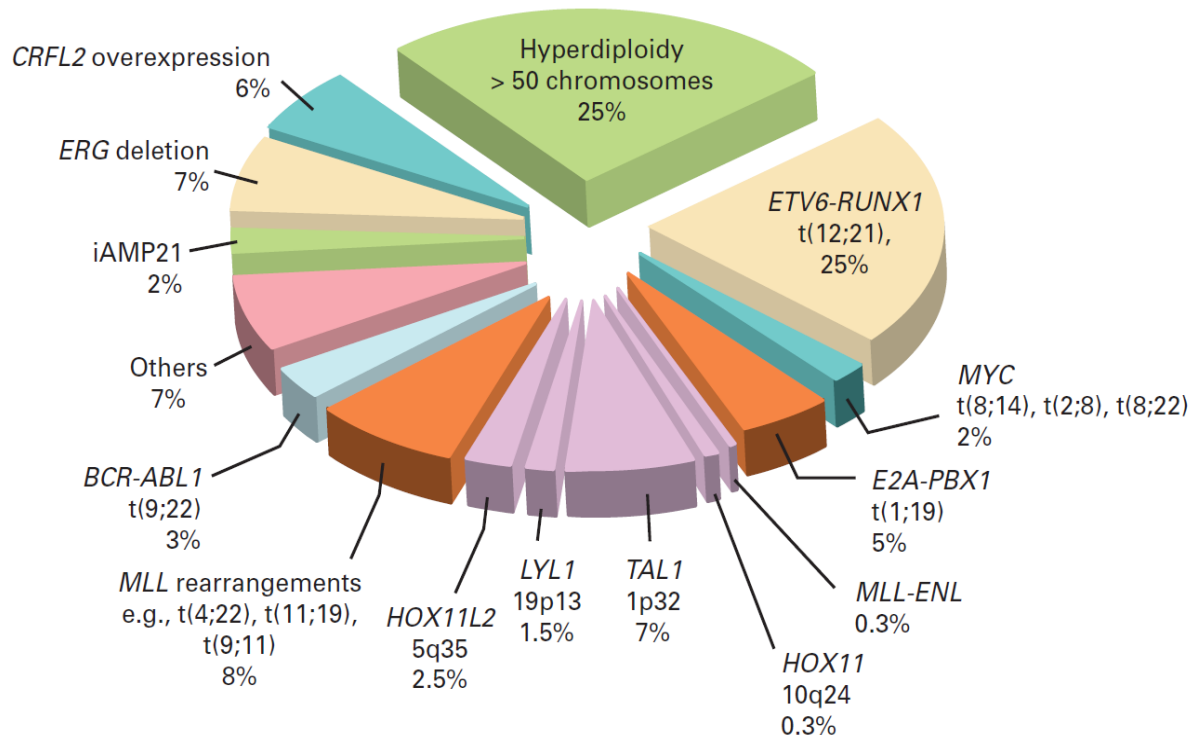
Strukturní změny chromosomů

Strukturální abnormality zahrnují translokace, delece, inverze, abnormální exprese proto-onkogenů a další genové změny s onkogenetickým potenciálem, které vedou k přerušení specifické buněčné diferenciaci, proliferaci, zastavení apoptotických signálů a k leukemogenezi (Pui 2004). Chromosomální translokace vedou ke vzniku fúzních genů. Evoluce leukemického klonu vyžaduje několik genetických zásahů, v pozdních fázích nacházíme mnohočetné genetické abnormality (Obrázek 1.).

Nejčastější genetickou změnou u BCP ALL je fúzní gen *ETV6/RUNX1*, který vzniká translokací t(12;21). Fúzní gen *ETV6/RUNX1* je spojen s dobrou prognózou (Zuna et al. 1999), zatímco fúzní geny *BCR/ABL1* a přestavby *MLL* genu jsou spojovány s nepříznivou prognózou (Arico et al. 2000; Pieters et al. 2007). *BCR/ABL1* vzniká translokací t(9;22). Nové metody molekulární genetiky vedou k objevování nových genetických změn a prognostických faktorů. Byly zachyceny změny v genech důležitých pro vývoj B lymfocytů (delece genů *PAX-5*, *EBF1*, *IKZF1*), regulací buněčného cyklu (*CDKN2A*, *RBI*) a cytokinovou signalizaci (*CRLF2*, *JAK3*).

U 6-7% BCP ALL pacientů nacházíme zvýšenou expresi *CRLF2* genu, která může být způsobena translokací či mutací v samotném genu. Změny v *CRLF2* genu jsou v některých zemích spojovány s nepříznivou prognózou (Harvey et al. 2010; Mullighan et al. 2009; Cario et al. 2010). Nedávno byl popsán pomocí expresního profilování nový subtyp, tzv. *BCR/ABL1*-like leukemie. Více než 80% pacientů s *BCR/ABL1*-like má více než jednu abnormalitu v genech, které jsou zapojeny do B lymfocytárního vývoje, např. *IKZF1*, *E2A*, *EBF1*, *PAX-5*, *PDGFRβ* a *VPREB*. *BCR/ABL1*-like subtyp tvoří 15-20% BCP ALL a je spojován s nepříznivou prognózou (Boer et al. 2009). Vzhledem k tomu, že subtyp je definován pomocí expresního profilování, lze poměrně obtížně u jednotlivých prospektivně diagnostikovaných pacientů definovat, zda jsou či nejsou *BCR/ABL1*-like. *BCR/ABL1*-like

pacienti s přestavbou *EBF1-PDGFRB* profitují z podání tyrosinových inhibitorů, pozorována u nich byla minimální odpověď na indukční léčbě, ale remise onemocnění bylo dosaženo po podání tyrosinových inhibitorů (Weston et al. 2013).



Obrázek 1. Převzato z (Pui et al. 2011), grafické zastoupení genetických abnormalit u B prekurzorových akutních lymfoblastických leukémií.

Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je heterogenní onemocnění charakterizované nekontrolovaným dělením myeloidních buněk a tvoří asi 15% akutních leukemií v dětském věku. Zvýšené riziko vzniku AML mají děti s Downovým syndromem, Fanconiho anemií, ataxií-teleangiektázií a dalšími onemocněními. V České republice bylo diagnostikováno v roce 2013 celkem 13 pacientů s akutní myeloidní leukémií v dětském věku.

Morfologie

FAB klasifikace rozděluje akutní myeloidní leukemie na subtypy M0 – M7. FAB klasifikace AML byla vytvořena v roce 1976 (Bennett et al. 1976). Vychází z morfoloických a cytochemických poznatků (Tabulka 1.). Světová zdravotnická organizace (WHO) navrhla v roce 2008 novou klasifikaci. WHO klasifikace spojuje morfoloické, cytogenetické poznatky a klinické aspekty (Vardiman et al. 2009) (Tabulka 2.).

| Typ | Název | Cytogenetická abnormalita asociovaná s FAB subtypem |
|------|---|---|
| M0 | akutní myeloblastická leukemie minimálně diferencovaná | |
| M1 | akutní myeloblastická leukemie bez vyzrávání | |
| M2 | akutní myeloblastická leukemie s granulocytárním vyzráváním | t(8;21)(q22;q22), t(6;9) |
| M3 | akutní promyelocytární leukemie | t(15;17) |
| M4 | akutní monomyelocytární leukemie | inv(16)(p13q22), del(16q) |
| M4eo | akutní monomyelocytární leukemie varianta s eozinofilii | inv(16), t(16;16) |
| M5 | akutní monocytární leukemie | del(11q), t(9;11), t(11;19) |
| M6 | erytroleukemie (M6a) a vzácná čistě erytroidní leukemie (M6b) | |
| M7 | akutní megakaryoblastová leukemie | t(1;22) |

Tabulka 1. Klasifikace FAB pro akutní myeloidní leukémii (Bennett et al. 1976).

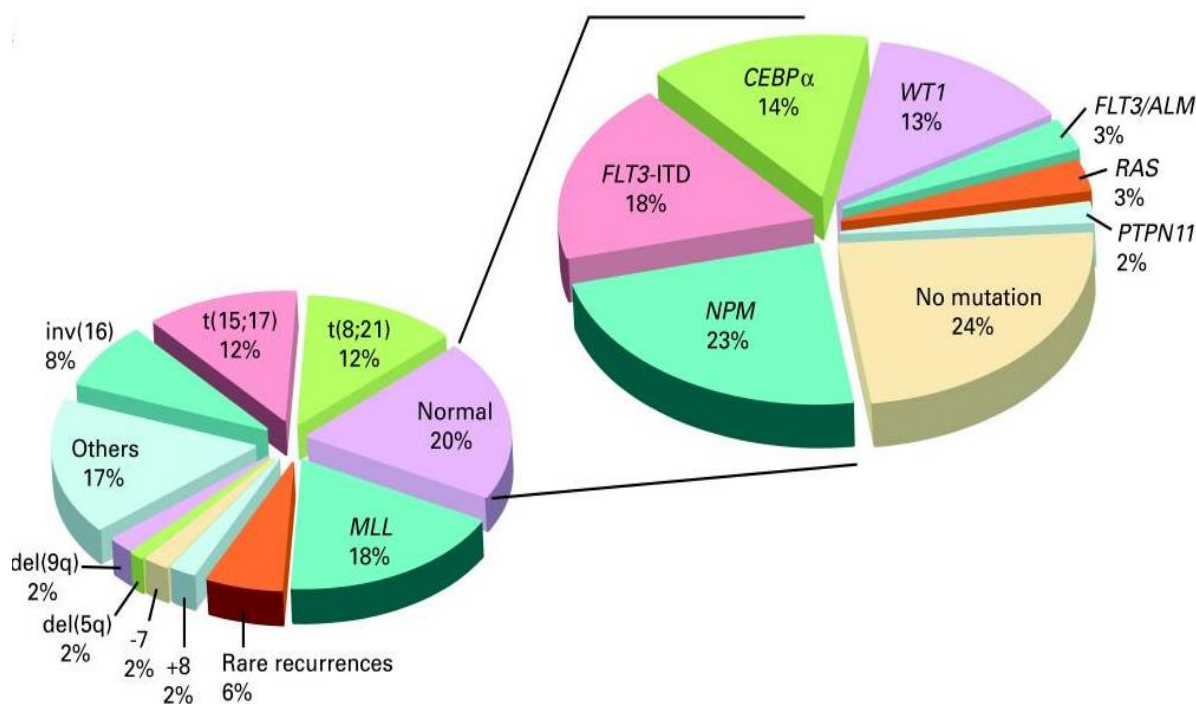
| AML s rekurentní cytogenetickou translokací: |
|---|
| AML s t(8;21) (q22;q22), AML1/ETO APL s t(15;17) (q22;q11-12) a variantami, PML/RAR α AML s inverzí chromosomu 16, inv(16) (p13q22) nebo t(16;16)(p13;q11), CBF β /MYH11 AML s translokací v chromosomu 9 a 11, t(9;11), MLLT3/MLL |
| AML s multilineární dysplázií |
| s předchozím MDS bez předchozího MDS |
| AML a MDS se vztahem k léčbě |
| alkylačními činidly epipodofylotoxiny jiné typy |
| AML jinak nezařaditelné |
| AML s minimální diferenciací AML bez vyzrávání AML s vyzráváním akutní myelomonocytární leukemie akutní monocytární leukemie akutní erytroidní a megakaryocytární leukemie akutní bazofilní leukemie akutní panmyelóza s myelofibrózou |
| Akutní bifenotypické leukemie |

Tabulka 2. WHO klasifikace pro akutní myeloidní leukemie (Vardiman et al. 2009).

Cytogenetika

Genotypová klasifikace odráží heterogenitu akutních myeloidních leukémií. Mezi nejčastější chromosomové aberace patří translokace *AML1/ETO* (t(8;21)(q22;q22), která koreluje s M2 podtypem, translokace *PML-RAR α* (t(15;17)(q22;q12), která koreluje s podtypem M3, inv16(p13;q22) (*MYH11-CBF β*) korelující s podtypem M4eo a translokace *MLL* genu (Pui et al. 1992). Genové aberace vyskytující se u AML můžeme rozdělit do několika základních skupin (Obrázek 2):

- 1) mutace genů vedoucí k indukci buněčné proliferace (*FLT3/ITD*, mutace *FLT3*, *c-Kit*, *Ras*, *PTPN11*)
- 2) mutace genů blokujících myeloidní diferenciaci (*RUNX1*, *C/EBP α* , *WT1*)
- 3) mutace genů regulujících buněčný cyklus a apoptózu (*P53*, *NPM1*) (Renneville et al. 2008).



Obrázek 2. Převzato z (Pui et al. 2011), grafické zastoupení genetických abnormalit u akutních myeloidních leukémií.

Akutní hybridní leukemie

Akutní hybridní leukemie (AHL, MPAL = Mixed Phenotype Acute Leukemia) je případ leukemie, kde není jednoznačná příslušnost leukemického klonu k vývojové linii. Pokud nalézáme expresi antigenu z jiné linie, nazývá se takováto exprese aberantní. Aberantní exprese může být způsobena deregulací genové exprese v průběhu vývoje akutní leukemie, nezralostí leukemických klonů nebo imunofenotyp odpovídá fyziologickému progenitoru, který má potenciál diferencovat do různých vývojových linií (Greaves et al. 1986). Akutní hybridní leukemie představují 2-5% z akutních leukémií. Leukemie, která může být složena ze dvou odlišných populací, jež identifikujeme na základě morfologie a imunofenotypu, je nazývána akutní bilineární leukemie. Leukemie s určitými cytogenetickými změnami jsou spojovány s hybridním imunofenotypem, k těmto leukémiím patří např. AML s t(8;21), ALL s t(9;22) či translokací 11q23 (Weinberg et al. 2010). V rámci naší skupiny se zabýváme hybridními leukemiemi dlouhodobě. V roce 2010 jsme publikovali soubor pacientů diagnostikovaných v letech 1996 až 2006. Primární linie byla vždy stanovená imunofenotypizací pomocí kritérií vycházející z EGIL klasifikace (The European Group for the Immunological Classification of Leukemias), znaky z jiné linie jsme hodnotili jako aberantní. Celkem 28 pacientů mělo hybridní leukémii primárně zařazenou jako BCP ALL s koexpresí myeloidních znaků. Primární AML s významnou koexpresí T lymfoidních znaků byla identifikována u 4 pacientů, u žádného z nich jsme retrospektivně nenašli přestavby TCR receptorů. U 3/5 akutních hybridních leukémií, primárně klasifikovaných jako T ALL, nebyly překvapivě nalezeny TCR přestavby (Mejstrikova et al. 2010b).

Imunofenotypizace

Imunocytologická diagnostika se stala důležitou součástí diagnostického procesu hematologických onemocnění. Imunodiagnostika, prováděna průtokovou cytometrií, odhaluje a klasifikuje maligní klon, určuje rozsah onemocnění, sleduje průběh onemocnění a charakterizuje sekundární změny po chemoterapii.

Každému vývojovému stádiu leukocyty odpovídá určitý imunofenotyp, což je soubor antigenů exprimovaných v cytoplazmě a nebo na povrchu buňky. Klonální populace hematologických malignit mohou exprimovat antigeny, které je jednoznačně odlišují od normálních hematopoetických buněk. Při imunofenotypizaci leukemických buněk nacházíme molekuly odpovídající fyziologickému ekvivalentu, molekuly asynchronní, které odpovídají

jinému stupni vývoje v rámci téže vývojové řady a molekuly aberantní, které odpovídají jinému typu buněk (Hrusak et al. 2002). U části leukémií smíšeného fenotypu nacházíme mnohočetnou koexpresi antigenů z jiné linie. Zpravidla lze definovat primární linii leukemie a které znaky jsou aberantní a podle primární linie vést terapii (Mejstrikova et al. 2010b). Opačným případem jsou akutní nediferencované leukemie, kde nelze i při použití širokého panelu monoklonálních protilátek stanovit jednoznačně původ malignity. Akutní nediferencovaná leukemie je blízká leukémii z prekursorů NK buněk, která byla zařazena jako provizorní jednotka do WHO klasifikace 2008 (Borowitz et al. 2008a). WHO klasifikace 2008 leukemie smíšeného fenotypu a nediferencované leukemie spojuje do jedné kategorie Mixed phenotype acute leukemia – MPAL (Tabulka 3.) (Weinberg et al. 2010; Borowitz et al. 2008b). Starší klasifikace EGIL, publikovaná již v roce 1995, je stále použitelnou klasifikací především pro definici primární linie hemoblastózy (Bene et al. 1995; Mejstrikova et al. 2010b) (Tabulka 4.). WHO 2008 a EGIL klasifikace byla porovnána u pacientů, kteří byli diagnostikováni v letech 2000 – 2008. WHO 2008 zařadila 1,5% zatímco EGIL klasifikace 5,8% pacientů s diagnózou AHL. 1,1% případů je klasifikováno shodně oběma klasifikace jako AHL (van den Ancker et al. 2010).

| Linie | Znaky |
|--------------------------|--|
| Myeloidní | Myeloperoxidasa |
| | NEBO |
| | monocytární diferenciaci alespoň dva z následujících znaků: |
| | NSE, CD11c, CD14, CD64, lysosym |
| | |
| T lymfoidní linie | cytoplazmatická CD3 |
| | NEBO |
| | povrchová CD3 |
| | |
| B lymfoidní linie | Silná CD19 A silná exprese alespoň jednoho znaků: CD79a, cytoplazmatická CD22 nebo CD10 |
| | NEBO |
| | slabá exprese CD19 silná exprese alespoň dvou znaků: CD79a, cytoplazmatická CD22 nebo CD10 |

Tabulka 3. WHO 2008 klasifikace pro AHL (MPAL).

| Počet bodů | B lymfoidní linie | T lymfoidní linie | Myeloidní linie |
|------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| 2 | CD79a | CD3 (cyt/m) | MPO |
| | cyt IgM | TCR $\alpha\beta$ | (lysosym) |
| 1 | CD19 | TCR $\gamma\delta$ | |
| | CD10 | CD2 | CD13 |
| | CD20 | CD5 | CD33 |
| | | CD8 | CDw65 |
| | | CD10 | CD117 |
| 0.5 | TdT | TdT | CD14 |
| | CD24 | CD7 | CD15 |
| | | CD1a | CD64 |

Tabulka 4. EGIL skórovací systém

Imunofenotypizace akutní lymfoblastické leukemie

Klasifikace imunofenotypu ALL se opírá stále především o EGIL klasifikaci. Akutní lymfoblastické leukemie, vycházející z B řady, rozdělujeme na ALL z prekursorů B buněk (BCP ALL, tvoří 80%) a zralou B ALL. BCP ALL je nejčastějším maligním onemocněním dětského věku. BCP ALL dělíme na nezralou proB ALL, která neexprimuje antigen CD10 ani intracelulární IgM (μ řetězec), common ALL (cALL), která je CD10 pozitivní a intracelulární IgM je negativní a preB ALL, které exprimují intracelulární IgM a zpravidla i antigen CD10. U zralé B ALL nacházíme povrchovou expresi jednoho z lehkých řetězců Ig (κ nebo λ), povrchové IgM a CD79a. T ALL tvoří 10-15% dětských akutních leukémií, vycházejí z prekursorů T lymfocytů a bývaly spojovány s horší prognózou (Tabulka 5.). Na současných léčebných protokolech T ALL často jsou typické pomalejší odpovědi na léčbu oproti BCP ALL (Conter et al. 2014).

| <i>typ</i> | <i>podtyp</i> | <i>imunofenotyp</i> | <i>molekulární genetik</i> |
|---------------------------------------|--|---|---|
| BCP ALL | proB ALL | CD10 ⁻ | <i>MLL/AF4</i> , přestavby <i>MLL</i> genu |
| | cALL | CD10 ⁺ , cytoplazmatické IgM ⁻ | bez fúzi, <i>ETV6/RUNX1</i> hyperdiploidní, <i>BCR/ABL1</i> , <i>E2A/PBX1</i> |
| BCP ALL - společná charakteristika | preB ALL | CD10 ⁺ , cytoplazmatické IgM ⁺ CD19 ⁺ a/nebo CD22 ⁺ a/nebo CD79a ⁺ CD3 ⁻ , povrchové Igκ ⁻ , Igλ ⁻ obvykle CD7 ⁻ , HLA DR ⁺ | |
| | zralá B | povrchové Igκ ⁺ , Igλ ⁺ povrchové IgM ⁺ , CD10 ⁺ (50%) antigeny B řady | fúze onkogenu <i>Myc</i> |
| T ALL | proT ALL | CD2 ⁻ , CD5 ⁻ , CD8 ⁻ | |
| | preT ALL intermediární T ALL | CD2 ⁺ a/nebo CD5 ⁺ a/nebo CD8 ⁺ CD1a ⁺ | |
| | zralá T ALL TCRαβ ⁺ zralá T ALL | CD3 ⁺ , CD1a ⁺ TCRαβ ⁺ | |
| | TCRγδ ⁺ zralá T ALL | TCRγδ ⁺ | |
| | T ALL - společná charakteristika | CD7 ⁺ , CD3 ⁺ cytoplazmaticky a/nebo povrchově | fúze <i>TCRαδ</i> , <i>TCRβ</i> delece a fúze genu <i>TAL</i> |

Tabulka 5. Adaptovaná EGIL klasifikace akutní lymfoblastické leukemie pro protokol ALL IC BFM 2002.

Imunofenotypizace akutní myeloidní leukemie

Primární diagnostika akutních myeloidních leukémií se dosud významně opírá o morfologickou FAB klasifikaci. Imunofenotypizace potvrzuje diagnózu AML (zcela zásadní je pro subtypy AML M0 a M7) a určuje specifickou kombinaci antigenů pro sledování minimální reziduální nemoci (Creutzig et al. 1995, 2012) (Tabulka 6.). Pro AML M0 je charakteristická exprese antigenů CD13, CD33, CD65. U podtypu M7 nacházíme expresi megakaryocytárních antigenů – CD41, CD42 a CD61.

| | pozitivní antigeny | negativní antigeny | aberantní antigeny |
|----------------------|---|---|---------------------------|
| AML | CD13, CD33, cMPO, HLA-DR CD45dim | | CD7, CD4, CD19 |
| FAB subtyp | | | |
| M0 | CD34 ⁺ , CD117 ⁺ , TdT ⁺ (polovina a více) | CD14 ⁻ , HLA-DR ^{-(polovina)} , CD33 ^{-(fetina)} | |
| M1 | CD34 ⁺ , CD117 ⁺ , CD7 ⁺ (polovina a více) | CD14 ⁻ | |
| M1 Auer ⁺ | CD34 ⁺ , TdT ⁺ (polovina), CD7 ⁺ (polovina), HLA-DR ⁺ | CD14 ⁻ , CD15 ⁻ | |
| M2 | CD33 ⁺ , CDw65 ⁺ | HLA-DR ^{-(polovina)} | |
| M2 Auer ⁺ | HLA-DR ⁺ , CD13 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺ (fetina) | CD14 ⁻ , CD4 ⁻ | |
| M3 | CD33 ⁺ , CDw65 ⁺ | HLA-DR ^{-(polovina)} , CD34 ⁻ , CD14 ⁻ , CD15 ⁻ | |
| M4 | HLA-DR ⁺ , CD33 ⁺ , CDw65 ⁺ | | |

Tabulka 6. Imunofenotypové nálezy u jednotlivých FAB podtypů AML (Mayer et al. 2002).

Minimální reziduální nemoc

Zbytkové leukemické buňky, které přetrvávají po terapii či předtransplantační přípravě, jsou hlavním zdrojem relapsu onemocnění a komplikují léčbu leukemie. Přítomnost reziduálních leukemických buněk u pacientů, kteří jsou v hematologické remisi, se nazývá minimální reziduální nemoc (MRN). Podle metody detekce leukemických buněk rozlišujeme hematologickou remisi (morfologické sledování), cytogenetickou remisi (absence chromosomálních změn) a molekulárně-genetickou remisi (dle specifických genetických změn specifických pro leukemický klon). Limitujícím faktorem detekce MRN je citlivost daných metod. Hematologické metody založené na mikroskopii stejně jako klasické cytogenetické metody se pohybují v řádu procent. Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace dosahuje v ideálním případě citlivosti 0.1%. Molekulárně-genetické sledování s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR), dosahuje citlivosti až 0.0001%. Citlivost 0.0001% znamená, že detekujeme jednu leukemickou buňku mezi 10 000 normálních buněk (Fronkova et al. 2008).

Průtoková cytometrie

K detekci minimální reziduální nemoci lze využít i průtokovou cytometrii. U ALL je stále zlatým standardem detekce klonálně specifických přestaveb imunoreceptorových genů pomocí molekulárně-genetických technik. Během minulých dvou dekad došlo k objevení pouze omezeného počtu povrchových znaků, které by se vyskytovaly výhradně na leukemických buňkách a nevyskytovaly se na nemaligních buňkách stejné linie. Kombinací znaků, které se fyziologicky na dané linii nevyskytují, spolu s odlišnou intenzitou exprese liniově příslušného znaku či asynchronní exprese znaků lze odlišit leukemickou populaci od nemaligních buněk. Hodnocení odpovědi na léčbu průtokovou cytometrií u ALL je nejpřesnější v indukční fázi terapie, kdy interpretaci nekomplikuje regenerující nemaligní pozadí (Mejstrikova et al. 2010a). Dostupné znaky pro průtokovou cytometrii nám vždy neumožňují rozlišit maligní buňky od pozadí regenerující kostní dřeně, což snižuje specifitu a sensitivitu průtokové cytometrie v odlišení leukemické buňky. Širší znalosti o nových znacích, které by byly klinicky významné a nacházely se na povrchu leukemických buněk, jsou nezbytné, proto se výzkum zaměřuje na identifikaci nových povrchových znaků pomocí např. expresního profilování (Coustan-smith et al. 2011) nebo proteomických metod, (Mirkowska et al. 2013).

Přestavby genů pro imunoglobuliny a receptory T lymfocytů

Leukemické lymfoidní blasty pocházejí ze společné prekurzorové buňky, nesou identické přestavby genů pro imunoglobuliny (Ig) a receptory T lymfocytů (TCR) (Ig/TCR). Ig/TCR přestavby kvantifikujeme, abychom mohli stanovit minimální reziduální nemoc. Tato metoda může být ovlivněna existencí subklonů s různými přestavbami, které mohou vést k chybnému výběru cíle pro sledování minimální reziduální nemoci a klonální evolucí v průběhu léčby (Eckert et al. 2011).

Molekuly imunoglobulinů se skládají ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Na chromosomu 14 se nacházejí geny pro těžké imunoglobulinové řetězce. Na chromosomu 2 lehký řetězec kappa a na chromosomu 22 lehký řetězec lambda. Přeskupování těžkých řetězců začíná mezi genovými segmenty D (diversity, 27 úseků) a J (joining, 6 úseků). Následně dojde k přeskupování mezi nově vzniklým DJ segmentem a V segmentem. Lehké řetězce neobsahují D segmenty a mají menší množství V (variable) a J segmentů. Při produktivní přestavbě a expresi povrchového imunoglobulinu se buňky diferencují do nezralých B lymfocytů (Matsuda et al. 1998). TCR má dva typy receptorů - TCR $\alpha\beta$ a TCR $\gamma\delta$. Přestavby TCR β a TCR δ jsou kódovány libovolnou kombinací V, D a J segmentů a TCR α a TCR γ nemají D segmenty (Davis et al. 1988). Proces přeskupování je řízen enzymatickou aktivitou rekombináz *RAG1* a *RAG2*, které se nacházejí na vyvíjejících se lymfocytech. Ke zvyšování variability sekvencí dochází vkládáním náhodných nukleotidů. Tento proces je řízen terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT) (Szczepanski et al. 2001). Naše skupina se zaměřila na korelaci MRN v kostní dřeni a periferní krvi. Korelace hladin MRN mezi kostní dření a periferní krví je velmi dobrá u T-ALL zatímco u BCP ALL byla MRN v periferní krvi detekována o jeden řád nižší než v kostní dřeni. V rámci BCP ALL existují podskupiny s dobrou korelací MRN mezi kostní dření a periferní krví, a to proB ALL, ALL s fúzním genem *BCR/ABL1* (Volejnikova et al. 2012).

Fúzní geny

Chromosomální aberace se vznikem fúzních genů jsou identifikovány u akutních leukémií, které hrají klíčovou roli ve vývoji a funkci lymfoidních a myeloidních buněk. Často kódují transkripční faktory, ale také regulátory buněčného cyklu, přenašeče signálu. Chromosomální aberace, které mají pro leukemii specifický region fúzního genu se používají k detekci minimální reziduální nemoci za pomoci PCR. MRN je senzitivní v rozmezí 0,001 do 0,000001%. Analýza fúzních genů dle PCR navrhuje oligonukleotidové primery na opačné straně zlomového místa fúzního genu, takže PCR produkt obsahuje leukemii specifickou

sekvenci fúzního genu. BIOMED-1 navrhl standardizované protokoly využívající PCR v reálném čase (RT-PCR) systém, zároveň navrhly primery, které identifikují následující fúzní geny (*E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *AML1-ETO*, *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *PML-RAR α* , *CBFB-MYH11*, *SIL-TALI*) (van Dongen et al. 1999).

Masivně paralelní sekvenování

Masivně paralelní sekvenování je novou technologií, která by do budoucna mohla sloužit k detekci minimální reziduální nemoci akutních leukémií. Nová technologie by překonala technické limitace předchozích metod detekce MRN. V nových studiích dochází k porovnání standardních metod detekce MRN a detekce za pomoci masivně paralelního sekvenování. Byla pozorována dobrá korelace mezi oběma metodami ($R = 0,791$) a výborná korelace u 79,6% pacientů, nicméně je potřeba dalších validací pro potvrzení těchto výsledků (Ladetto et al. 2014).

Léčba akutní lymfoblastické a myeloidní leukemie

Akutní lymfoblastická leukemie - léčba a stratifikace

V České Republice jsou dětští pacienti s akutní leukémií léčeni podle protokolů skupiny BFM.

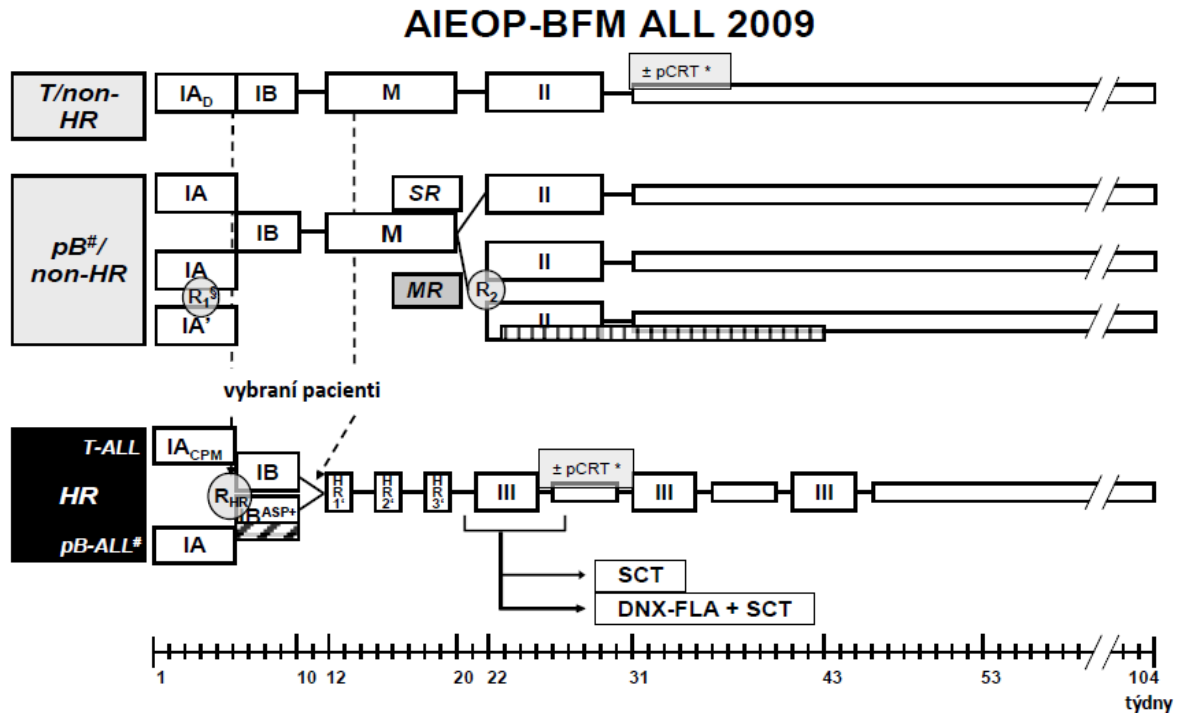
Studijní skupina BFM byla založena v roce 1975 v Německu. Zahrnovala Berlín (B), Frankfurt (F) a Münster (M) a uskutečnila první studii BFM. První léčebný protokol byl založen na využití velmi intenzivní chemoterapie, což vedlo k dramatické změně prognózy pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií v dětském věku. I (International) -BFM studijní skupina se i nadále zabývá optimalizací léčebných protokolů na základě zkušeností účastnících se center. V současné době se I-BFM studijní skupiny účastní celkem 34 zemí včetně České Republiky.

Pacienti, kterými jsem se zabývala ve své práci, byli léčeni podle následujících léčebných protokolů – ALL – BFM 95 (1996-2002), ALL-IC-BFM 2002 (2002-2007), ALL-BFM 2000 Interim (2007-2010) a AIEOP-BFM 2009 (2010 až do současnosti). V léčebné studii ALL-IC-BFM 2002 byli pacienti rozřazeni do skupiny standardního (SR), středního (MR) a vysokého rizika (HR). Pacienti byli rozděleni na základě věku, leukocytózy, časné odpovědi na léčbu (dle % blastů v kostní dřeni v den 15 a 33), odpovědi na prednison (tzv. dobrá odpověď definovaná méně než 1000 blastů na μL v periferní krvi v den 8) a imunofenotypu (Stary et al. 2014). Do vysokého rizika dále byli zařazeni pacienti s fúzním genem *BCR/ABL1*, $t(9;22)$ nebo *MLL/AF4*, $t(4;11)$ a špatnou odpovědí na léčbu v den 8, 15 nebo 33. Léčebný protokol ALL-BFM 2000 Interim stratifikoval pacienty do tří skupin

standardního (SR), středního (MR) a vysokého rizika (HR). Pacienti byli rozděleni do rizikových skupin podle odpovědi na prednison, minimální reziduální nemoc pomocí přestaveb Ig/TCR v den 33 a týden 12 a podle přítomnosti *BCR/ABL1*, t(9;22) a *MLL/AF4*, t(4;11), podle minimální reziduální nemoci pomocí průtokové cytometrie v den 15 léčby (Cario et al. 2014). Léčebný protokol ALL-BFM 95 stratifikoval pacienty dle věku, počtu bílých krvinek v diagnóze, imunofenotypu, cytogenetiky (*BCR/ABL1*, t(9;22) nebo *MLL/AF4*, t(4;11)) a odpovědi na prednison (Möricke et al. 2010).

Od roku 2010 jsou děti v České republice s ALL léčeny podle studie AIEOP-BFM ALL 2009. Léčebná studie AIEOP-BFM ALL 2009 je studií, která má za cíl zlepšit účinnost léčby a optimalizovat chemoterapii na základě nejnovějších poznatků a zkušeností z předchozích studií. Na základě absence či přítomnosti rizikových faktorů stratifikujeme pacienty do tří skupin, s rozdílným rizikem relapsu leukemie a rozdílnou intenzitou léčby, standardního (SR), středního (MR) a vysokého rizika (HR). Podobně jako v předchozích protokolech jedním ze stratifikačních kritérií je i odpověď na léčbu prednisonem. Dále jsou pacienti standardního rizika definováni pomocí PCR (mají negativní MRN v den 33 a týden 12 léčby). Pokud není PCR-MRN dostupná, používá se stanovení MRN pomocí průtokové cytometrie v den 15, která u SR pacientů by měla být nižší než 0,1%. Kritérii pro vysoké riziko je špatná odpověď na prednison, nález rovný nebo nad 10% blastů pomocí průtokové cytometrie v den 15 léčby, nedosažení kompletní remise v den 33 léčby, pozitivita *MLL/AF4*, t(4;11), hypodiploidie (pod 45 chromosomů) a PCR-MRN rovna nebo více než 0,001% v den 33 či v týdnu 12.

Všichni pacienti jsou léčeni intenzivní chemoterapií dle protokolu I, který trvá přibližně 9 týdnů. Skupina standardního rizika nebo středního rizika navazuje protokolem M (8 týdnů) a protokolem II (7 týdnů). Pacienti vysokého rizika dostanou místo protokolu M tři krátké, ale velmi intenzivní léčebné bloky (HR bloky), které jsou opakovány po 3 týdnech, a následují je tři protokoly III (4 týdny). Část pacientů vysokého rizika je indikována k transplantaci kmenových buněk krvetvorby po třetím HR bloku. Následuje udržovací léčba. Tuto ale neobdrží pacienti po transplantaci kmenových buněk krvetvorby. Délka léčby od stanovení diagnózy je celkem 2 roky (Obrázek 3.).



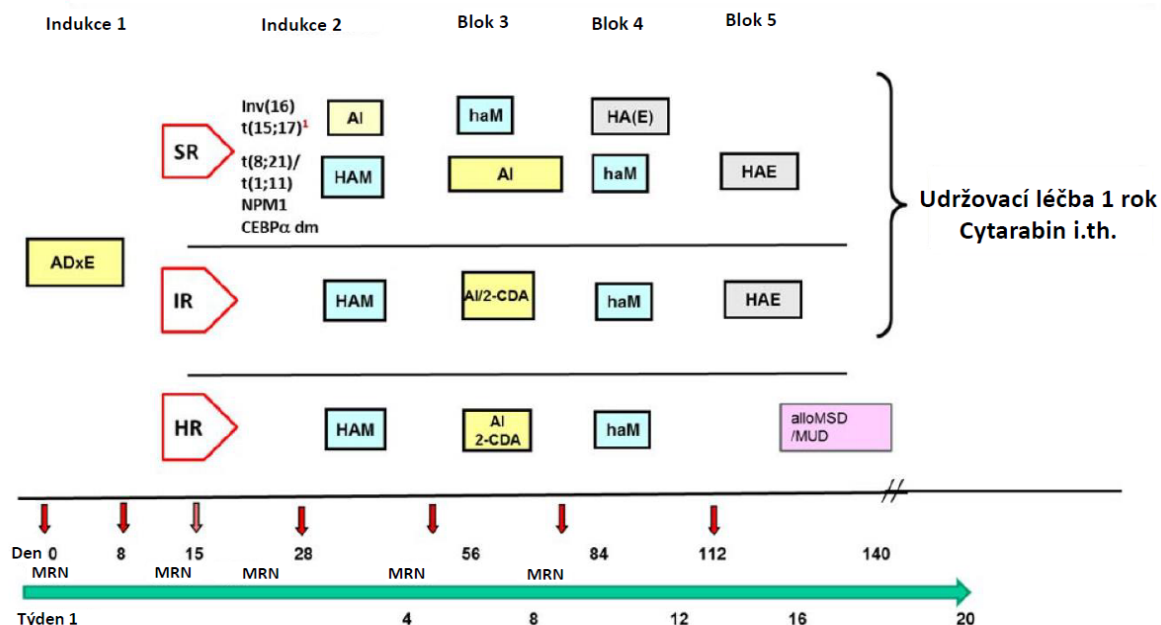
Obrázek 3. Schéma léčebného protokolu AIEOP-BFM ALL 2009, zachycující počet týdnů léčby pro jednotlivé subtypy ALL: (T/non HR (T akutní lymfoblastická leukemie, nezařazení do vysokého rizika (HR, (high risk)), pB/non HR (B prekurzorová akutní lymfoblastická leukemie, nezařazení do vysokého rizika), HR T-ALL (T akutní lymfoblastická leukemie) a HR pB –ALL (B prekurzorová akutní lymfoblastická leukemie) zařazení do vysokého rizika, MR (pacienti středního rizika), SR (pacienti standardního rizika). Názvy jednotlivých protokolů: IA, IA', IA_{CPM}, IB, IB^{ASP+}, M, II, HR1', HR2', HR3, III. pCRT (preventivní ozáření kránie (preventive cranial radiotherapy)), SCT (transplantace kmenových buněk (stem cell transplantation)), DNX (DaunoXome), FLA (FLAG). Randomizace R₁, R₂, R_{HR}.

Akutní myeloidní leukemie - léčba a stratifikace

Pacienti s AML jsou v České republice léčeni v současné době dle protokolu AML BFM-2012, který stratifikuje pacienty do tří skupin: standardního rizika (SR), středního rizika (MR) a vysokého rizika (HR). Do SR skupiny patří pacienti s přítomností t(8;21), resp. fúzním genem *AML1/ETO*, inv(16), resp. fúzním genem *CBFβ/MYH11*, t(15;17), resp. fúzním genem *PML/RARα*, t(1;11), normálním karyotypem a NPM1 mutací, normálním karyotypem a dvojitou mutací *C/EBPα*. U HR pacientů nacházíme následující aberace: 12p/t(2;12), monozomii 7, t(4;11), t(5;11), t(6;11), t(10;11), t(6;9), t(7;12), t(9;22), komplexní karyotyp, mutaci v genu *WT1* a pozitivitu *FLT3-ITD*. Pokud se zachytí v den 28 léčby více než 20%

leukemických buněk, jsou pacienti ze standardního rizika přeřazeni do středního rizika. Na základě špatné odpovědi na léčbu zjištěné molekulárně-geneticky a cytogeneticky jsou pacienti přeřazeni do vysokého rizika (Obrázek 4.).

Registr AML-BFM 2012



Obrázek 4. Schéma léčebného protokolu Register AML-BFM 2012. Schéma zachycující počet týdnů léčby, v jakých časových bodech se provádí detekce minimální reziduální nemoci (MRN), rozdělení pacientů dle rizika na SR (standardní riziko), IR (střední riziko (intermediate risk)) a HR (vysokého rizika). Názvy jednotlivých protokolů: ADxE, AI, HAM, haM, AI/2 – CDA, HAE, HA(E). Allo MSD/MUD (matched sibling donor (MSD), matched unrelated donor (MUD) allogenic transplantation (Allo)).

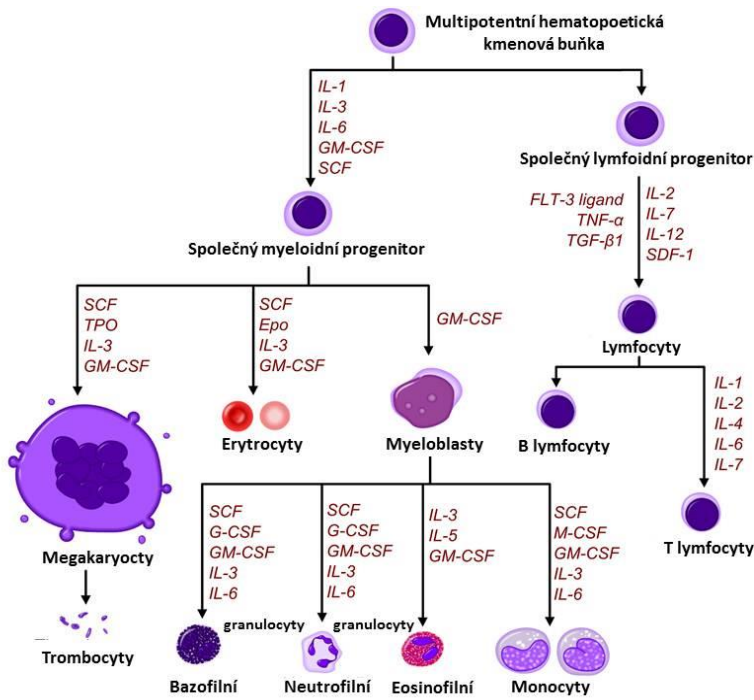
Vývoj hematopoetických buněk

Krevní buňky- erytrocyty, leukocyty a trombocyty, mají omezenou dobu života, proto existuje buněčná populace, která je jejich nepřetržitým zdrojem. Výchozí buňkou je multipotentní kmenová buňka, která má kapacitu dát vznik specifickým buněčným liniím. Kmenové buňky jsou primitivní, nediferencované, jsou schopné sebeobnovy a diferenciací do individuálních vývojových linií. Z kmenových buněk vznikají progenitorové buňky, která se dělí a diferencují do stále zralejších progenitorů. Pro vyzrání je nutné cytokinové prostředí a mikroprostředí kostní dřeně.

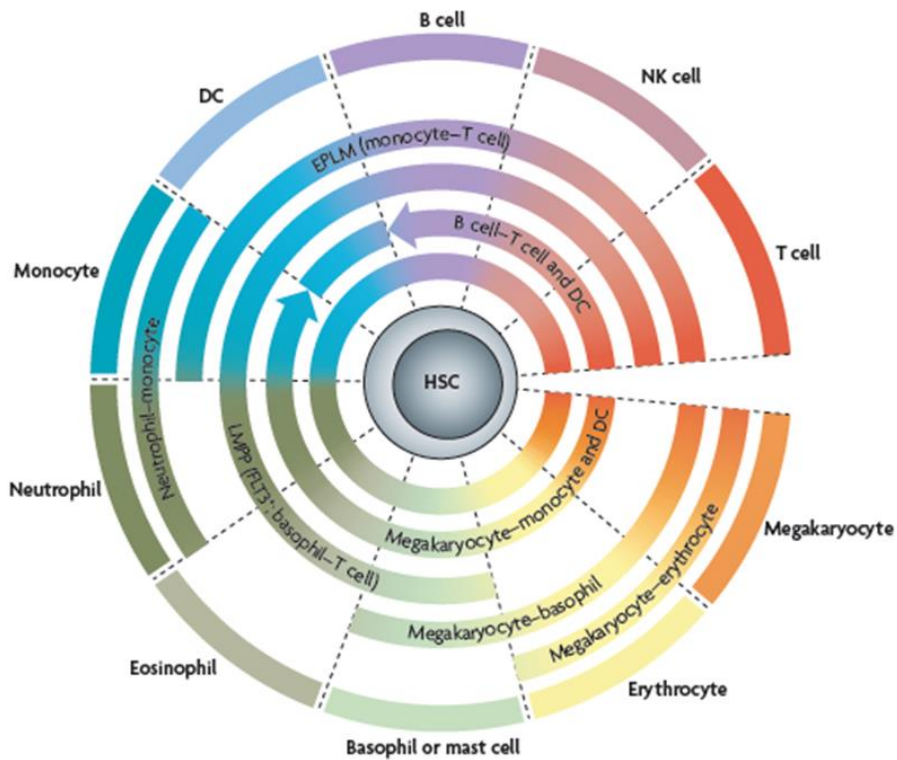
Hematopoetické kmenové buňky (HSCs) jsou dále definovány přítomností antigenu CD34 (Civin et al. 1996) a neexprimují definiční antigeny jednotlivých linií jako např. CD19, CD20, CD16, CD56, CD2, CD3, CD4, CD8 (Wognum et al. 2003). V kostní dřeni nalézáme 1-4% buněk exprimujících CD34 a vykazujících schopnost dlouhodobé obnovy. Dle klasických modelů hematopoézy dochází z HSCs k diferenciaci striktně oddělených progenitorů pro lymfoidní a myeloidní linii. Z lymfoidního progenitoru vznikají přes unipotentní progenitory T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňky (Kondo et al. 1997). Ze společného myeloidního progenitoru dále diferencují stádia společných multipotentních progenitorů – CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte- Erythrocyte- Monocyte- Megakaryocyte) a dále CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocyte- Monocyte) a CFU-MegE (Colony Forming Unit Erythrocyte- Megakaryocyte). Následuje unipotentní progenitor a zralé granulocyty, monocyty, trombocyty a erytrocyty (Akashi et al. 2000).

Kromě klasických modelů hematopoézy (Obrázek 5.), které předpokládají striktní rozdělení lymfoidní a myeloidní linie, existují alternativní modely, které předpokládají existenci mezi-progenitoru, který má jak lymfoidní, tak myeloidní potenciál (Kawamoto et al. 2009). Diferenciace do jednotlivých vývojových linií může být chápána i jako kontinuum, kde se jednotlivé linie vzájemně ovlivňují. HSCs mohou mít specifický buněčný osud přes více mezi-progenitorů (Doulatov et al. 2010) (Obrázek 6.).

Hematopoéza je řízena transkripčními faktory a cytokiny. Transkripční faktory GATA-1, GATA-2, FOG1 jsou důležité pro megakaryocyty-erytrocyty, bazofily nebo eozinofily. Transkripční faktor PU.1 řídí HSCs nebo progenitory do myeloidní linie. *CEBP/α* exprese je nutná pro myelomonocytární vývoj. PAX-5 transkripční faktor je důležitý pro vývoj lymfoidních linií (Doulatov et al. 2010).



Obrázek 5. Klasické schéma hematopoézy (Lodish et al. 2003).



Obrázek 6. Alternativní schémata hematopoézy (Doulatov et al. 2010).

Změna buněčného osudu

Vývoj hematopoetických linií od multipotentního progenitoru probíhá přes liniově specifické transkripční faktory (Hanna et al. 2008). B lymfocytům, které nejsou plně diferenciované, můžeme změnit buněčný osud směrem do pluripotentního stádia za pomoci čtyř transkripčních faktorů – *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* a *c-Myc* (Hanna et al. 2008). U plně diferencovaných B lymfocytů je třeba k reprogramování použít další transkripční faktory. Těmito transkripčními faktory jsou zejména *C/EBP α* a *PAX-5*, přičemž zvýšení exprese *C/EBP α* a snížení exprese *PAX-5* vede k transdiferenciaci do myeloidní linie.

Expresí transkripčních faktorů *C/EBP α* a *C/EBP β* v diferencovaných B lymfocytech vede k rychlému a účinnému reprogramování a transdiferenciaci do makrofágů. Transkripční faktory *C/EBP α* a *CEBP β* způsobují změnu buněčného osudu inhibicí liniově specifického transkripčního faktoru *PAX-5*. Inhibice *PAX-5* vede ke snížení exprese antigenu CD19 souběžně s endogenní expresí transkripčního faktoru *PU.1*, následně dochází ke zvýšení exprese myeloidních znaků včetně Mac-1. *C/EBP α* a *C/EBP β* dokáží změnit transkripční síť B lymfocytů postupnými a souběžnými změnami, které vyžadují transkripční faktor *PU.1* (Xie et al. 2004).

Ektopická exprese *C/EBP α* může vyvolat přeměnu i B leukemických blastů do makrofágů. Buňky v průběhu reprogramování zvyšují hladiny transkriptů makrofágových znaků a snižují hladiny transkriptů pro B lymfocyty, zvyšují přilnavost, granularitu, buněčnou velikost, fagocytární kapacitu a následně dochází ke klidové fázi (Rapino et al. 2013).

U *C/EBP α* indukovaného reprogramování pre-B lymfocytů do makrofágů nebylo prokázáno zpětné reprogramování směrem k méně zralému prekurzorů. Byla popsána přechodná změna exprese genů, které jsou znakem prekurzorů pro granulocyty a makrofágy, genů omezených na progenitory (*Kit*, *Flt3*), genů regulační sítě mezi B lymfocyty a makrofágy (*Nfe2*, T buněčné znaky). Význam těchto genů pro reprogramování je ale sporný. *C/EBP α* každopádně utlumuje B lymfocytární geny a zároveň blokuje erytroidní a T lymfocytární geny (Di Tullio et al. 2011).

Reprogramování versus transdiferenciace mohou být popsány jako dva procesy, které se od sebe navzájem liší. Proces transdiferenciace je rychlý v buňkách, které nepodléhají buněčnému dělení. Procento nedělících se buněk se zvyšuje se zvyšující se hladinou transkriptu mRNA *C/EBP α* genu. Buněčné dělení tedy není nutné k procesu transdiferenciace,

kteřá je odlišná od procesu reprogramování k pluripotentnímu stádiu. Reprogramování vyžaduje průchod buněčným cyklem, protože zahrnuje širší škálu epigenetických změn. Během reprogramování dochází k obnově funkce genů *Nanog*, *Pou5f1* přes DNA metylaci, celý proces trvá více než týden a pravděpodobně vyžaduje DNA replikaci. V procesu transdiferenciace nebyly pozorovány změny DNA methylace v promotorech genů, pozorovány byly pouze histonové modifikace (Bekker-jensen et al. 2012).

Transdiferenciace B lymfocytů do makrofágů byla zkoumána z hlediska změn v DNA metylaci. Výsledky byly překvapivé, protože nedocházelo k methylačním změnám ve specifických genech pro B lymfocyty a makrofágy. Změny nebyly nalezeny ani v diferenciálně exprimovaných genech v porovnáních mezi B lymfocyty a makrofágy. H3 histonové modifikace se ale měnily dle hladiny exprese jednotlivých genů (Rodríguez-Ubrea et al. 2012).

C/EBP α gen (CCAAT enhancer binding protein alpha)

C/EBP α jaderný gen je tvořen jedním exonem a je lokalizovaný na 19. chromosomu (19q13.11). C- koncová doména je tvořena základním leucinovým zipem (bZIP), který tvoří DNA-vázací doménu, přes kterou dochází k homodimerizaci *C/EBP α* a heterodimerizaci ostatních členů *C/EBP* rodiny. Tato doména je zapojena do protein-proteinové interakce s transkripčními faktory, které jsou zapojeny v liniové diferenciaci a proliferaci. N-terminální doména je trans-aktivační doména zprostředkovávající transkripční proces pro mRNA a následně proteiny důležité v kontrole buněčného cyklu. Existují dvě translační izoformy s rozdílným startovacím kodónem, plně dlouhý protein má 42kDa a zkrácená forma jen 30kDa. Poměr izoform je důležitý pro proliferaci a diferenciaci (Hendricks-Taylor et al. 1992).

C/EBP α je exprimován v různých buněčných typech (ve střevech, plicích, nadledvinkách, prsu, ovariích či placentě (Koschmieder et al. 2009)). Hraje důležitou roli ve vývoji jaterních a tukových buněk, nejvyšší koncentrace dosahuje v konečně diferencovaných buňkách. Ve vývoji krvetvorných buněk je exprimován v myeloidních buňkách a řídí granulocytární diferenciaci.

Zárodečná mutace *C/EBP α* byla nalezena u 2 familiárních případů AML. Jedna rodina nesla heterozygotní zárodečnou mutaci del (C) v nukleotidu 212, která způsobila předčasné ukončení proteinu v kodonu 158 a byla přítomna pouze 30kDa dlouhá izoforma (Smith et al.

2004). Druhá rodina nesla heterozygotní zárodečnou mutaci ins (C) v nukleotidu 217 (Sellick et al. 2005).

Somatické mutace můžeme rozdělit na mutace postihující N- koncovou a C-koncovou doménu. V N-koncové doméně dochází k bodovým mutacím, inserci či delecí, které způsobujících posun čtecího rámce a tvorbu zkrácených proteinů, tvoří se pouze izoforma 30kDa, které chybí trans-aktivační doména. V C-koncové doméně dochází k mutacím v rámci čtecího rámce či missense mutace, které přerušují základní leucinový zip a ovlivňují DNA vazbu. Vyskytují se rovněž bialelické mutace (Fitzgibbon et al. 2004).

Mutace *C/EBPα* se nacházejí u 10% akutních myeloidních leukémií, často jsou spojeny s normálním karyotypem. Bialelická mutace je spojena s příznivou prognózou (Taskesen et al. 2011). *C/EBPα* exprese je snižena u AML s fúzním genem *AML1/ETO*, který způsobuje inhibici promotoru CEBPA (Pabst et al. 2001). K potlačení translace dochází přes kalretikulin u AML s *inv(16)(p13q22)* a fúzním genem *AML1-MDS1-EVII* (Helbling et al. 2004). Vzácně se *C/EBPα* mutace nacházejí u myelodysplastického syndromu, plicních nádorů a nádorů prostaty. Snižená exprese *C/EBPα* genu byla rovněž zaznamenána v blastické krizi chronické myeloidní leukemie (Perrotti et al. 2002). Translokace genu *C/EBPα* jsou vzácné. U BCP ALL byla nalezena *t(14;19)(q32;q13)* kde je *C/EBPα* je translokována k těžkému imunoglobulinovému řetězci, což vede ke zvýšení exprese *C/EBPα* bez popsáných imunofenotypových změn (Robinson et al. 2004; Chapiro et al. 2006).

Liniový přesmyk

Liniový přesmyk popisuje situaci, kdy akutní leukemie splní v diagnóze kritéria lymfoidní či myeloidní linie, ale během léčby dojde ke změně do druhé linie. Jedná se však o jeden leukemický klon, který sdílí cytogenetické a molekulárně- genetické charakteristiky. Tento jev je poměrně vzácný. Literárně nacházíme především popis jednotlivých kazuistik. Větší kohortu pacientů s liniovým přesmykem publikoval v roce 2012 Jorge Rossi z Argentiny (Rossi et al. 2012). V publikovaném souboru tvořila incidence liniového přesmyku 0,6%, většina pacientů nesla přestavbu *MLL* genu, který je spojován s liniovou promiskuitou a špatnou prognózou, což se v publikovaném souboru potvrdilo. Stasik et al. publikoval kazuistiku pacienta s liniovým přesmykem s přestavbou *MLL* genu, liniový přesmyk se odehrál z lymfoidní do myeloidní linie (Stasik et al. 2006).

Liniový přesmyk byl pozorován také u pacientů bez přítomnosti přestavby *MLL* genu, změna liniové příslušnosti se odehrála z lymfoidní do myeloidní linie a v relapsu onemocnění

se identifikovala lymfoidní linie. Ve všech stádiích liniového přesmyku byly identifikovány stejné specifické přestavby pro imunoglobuliny a receptory T lymfocytů (Bierings et al. 2001). Zajímavá je kazuistika pacientky, která byla diagnostikována jako BCP ALL s normálním karyotypem. Po indukční léčbě byla pacientka v hematologické remisi. Pro progredující hepatomegalii byla provedena biopsie, která prokázala leukemickou infiltraci, následně se v periferní krvi objevila leukemická infiltrace s monocytární morfologií a imunofenotypem. Ve fázi přesmyku na leukemických blastech byl popsán myeloidní znak CD33 a lymfoidní znak CD2, CD19 na rozdíl od diagnózy byla negativní (Imataki et al. 2010).

Liniový přesmyk je spojován i s dalšími genetickými abnormalitami jako je monozomií 7 a filadelfským chromosomem. Liniový přesmyk byl pozorován u pacientky s prokázaným filadelfským chromosomem přes myeloidně-lymfoidní linii do plně lymfoidního imunofenotypu (Hassan et al. 2004). Izolovaná monozomie 7 je vzácná cytogenetická abnormalita u dětských akutních lymfoblastických leukémií. Prokázán byl liniový přesmyk z lymfoidní do myeloidní linie (monocytární diferenciaci), leukemické blasty měly prokázanou perzistenci izolované monozomie 7 (Fujisaki et al. 1999). Byly popsány případy, kdy k liniovému přesmyku došlo až v relapsu onemocnění. V relapsu byly popsány liniové přesmyky do akutní myeloidní leukemie, kde v myeloidních leukemických buňkách byly popsány následující translokace t(9;11) nebo t(8;16) (Park et al. 2011). V relapsu byl pozorován případ přesmyku z B lymfoidní linie do T lymfoidní linie a následně do myeloidní linie, která exprimovala antigeny CD2, CD14, CD33. Pacientka měla popsanou translokaci t(4;11) prodělala liniový přesmyk z lymfoidní do myeloidní linie, aberantně exprimovala antigeny CD2, CD14 a CD33 (Park et al. 2011).

Ukazuje se, že hematopoetický systém má neočekávanou liniovou plasticitu. Existují prekurzory B lymfocytární/ makrofágové, které se vyskytují v kostní dřeni a jsou schopni se diferencovat do B lymfocytů nebo myeloidních směrem (Montecino-Rodriguez et al. 2001). Prokazuje se, že neoplázie nejprve vycházejí z lymfoidních linií mohou vyvíjet za určitých podmínek do myeloidních malignit jako jsou sarkomy vycházející z histiocytů, dendritických. Společný původ neoplázií se prokazuje pomocí klonální příbuznosti maligních buněk. Mechanismus a podmínky, za kterých dochází k přeměně lymfoidních linií do myeloidních linií u těchto malignit, zatím není objasněn (McClure et al. 2010). Kazuistika uvádí případ pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií, u kterého se po dvou letech objevila atypická non-Langerhansova histiocytóza. Zkoumána byla klonální příbuznost histiocytů a původního

klonu ALL. Dle specifických Ig/TCR přestaveb byla prokázána klonální příbuznost histiocytů a leukemických buněk, což ukazuje na jejich společný původ. V histiocytárních buňkách pacienta prokázali sníženou expresi *PAX-5* genu a zvýšenou expresi genu *C/EBP α* a *β* , což ukazuje na to, že tyto transkripční faktory řídí liniovou promiskuitu u hematopoetických malignit (Pagni et al. 2014).

Epigenetika

Epigenetika je vědní podobor genetiky, jenž studuje změny, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA. Epigenetická informace může být děděna z buňky na buňku a z generace na generaci, tedy jak při mitóze, tak při meióze. Genom včetně epigenetických změn se označuje jako epigenom. Mezi epigenetické mechanismy řadíme modifikaci histonů či metylaci DNA. V genetice člověka se epigenetika uplatňuje například při inaktivaci chromosomu X, v genovém imprintingu, během vývoje a rozvoji patologických mechanismů onemocnění. Zásadní roli hraje v onkogenezi, kde hraje roli ve vývoji nádorových onemocnění včetně hematologických malignit (Burke et al. 2014).

DNA methylace u obratlovců se odehrává v CpG dinukleotidech, cytosin-fosfát (p)-guaninových místech, kde je cytosin přímo následovaný guaninem v DNA sekvenci. Methylocí rozumíme změnu z cytosinu na 5-methylcytosin, která je katalyzována enzymy nazývanými DNA methyltransferasa. Dnmt1 je udržovací metyltransferasa, která methyloje nově vzniklý řetězec DNA při replikaci dle methylačního vzoru starého řetězce. Dnmt3a a Dnmt3b jsou tzv. *de novo* methyltransferasy, které methylují dosud nemethylované cytosinové báze. Lidská DNA obsahuje 80-90% methylovaných CpG dinukleotidů. Methylocé je zpravidla spojena s inaktivací genové exprese. Methylocé brání vazbě transkripčních faktorů, nebo umožňuje vazbu inhibičních komplexů, obsahujících histon deacetylasy a další faktory, které vedou k přestavbě chromatinu do inaktivní podoby. Methylocé v genovém těle pozitivně koreluje s vysokou genovou expresí, zatímco methylocé v promotoru je spojena s nízkou hladinou genové exprese. Hlubší význam methylocé v genovém těle se zkoumá (Jones 2012). DNA methylocé CpA,CpT a CpC se nazývá methylocé non – CpG dinukleotidů. Pluripotentní buňky nesou methylocé non-CpG dinukleotidů, methylocé klesá s diferenciací a somatické buňky nemají methylované non-CpG dinukleotidy. Během reprogramování pluripotentních kmenových buněk dochází k obnově methylocé non-CpG dinukleotidů, popisována je vysoká variabilita mezi rozdílnými pluripotentními buňkami. Zajímavé je, že non-CpG dinukleotidy se vyskytují v těsné blízkosti CpG ostrůvků (Ziller et al. 2011).

Histony jsou bazické nukleoproteiny, které se podílí na výstavbě chromatinu. Rozlišuje se pět typů histonů: H1/H5, H2A, H2B, H3 a H4. Histony H2A, H2B, H3 a H4 jsou skupinou histonů tvořících jádro nukleosomu, H1/H5 jsou spojovacími histony. Histony podléhají posttranslačním modifikacím jako je acetylace, methylace, fosforylace. Fosforylace histonu H1 souvisí s kondenzací chromosomů, defosforylace s dekonduzací. Stejně tak acetylace a deacetylace histonů souvisí se změnami kondenzace chromosomů a s regulací genové aktivity. Histony jsou acetylovány v transkripčně aktivním chromatinu a deacetylovány v neaktivním chromatinu. Acetylace ruší pozitivní náboj histonů a umožňuje uvolnění vazby s DNA a transkripci. Deacetylace histonů vede ke zvýšení pozitivního náboje a k těsné elektrostatické vazbě s DNA v inaktivním chromatinu. Tyto modifikace zajišťují enzymy histon acetyltransferasy a histon deacetylasy. Mnoho transkripčních faktorů má aktivitu histon acetyltransferasy, která působí jako koaktivátor transkripce, nebo histon deacetylasy, pak působí jako korepresor genové exprese.

Deacetylace histonů souvisí s DNA methylací a přestavbou chromatinu do inaktivní podoby. Enzymatický komplex obsahující histon deacetylasy se váže na methylovanou DNA prostřednictvím vazebných proteinů, to vede ke změnám struktury chromatinu. Je-li tento proces narušen, dochází ke změně transkripční aktivity genů.

Methylace v leukemogenezi

Specifická DNA methylace je charakteristická pro nádorové buňky včetně myeloidních malignit. Mutace v enzymech modifikujících epigenetické pozadí byly identifikovány u AML, kde nacházíme charakteristickou DNA methylací. Epigenetická deregulace se zdá být nezávislá na genetickém pozadí. Nový model epigenetické deregulace předpokládá, že hematopoetická kmenová buňka získává náhodné genetické mutace a některé tyto mutace způsobují epigenetickou deregulaci. Evoluce epigenetických změn může být časným krokem leukemické transformace. *TET2* mutace se nacházejí v preleukemických buňkách a shodují se se specifickými změnami DNA methylace (Schoofs et al. 2014).

Aberantní DNA methylace byla zkoumána u cytogeneticky normálních AML. Epigenetické změny *CEBPA* promotoru byly heterogenní a vyskytovaly se v distální části, proximální části i v jádře promotoru. Převahu tvořily změny v distální části (38,2%), vzácné jsou změny v jádře promotoru (2,5%). Změny v distální části promotoru korelovaly se sníženou expresí *C/EBPα*, zvýšeným počtem bílých krvinek v diagnóze, specifickým genovým profilem a T-myeloidním imunofenotypem. Změna distální části promotoru byla

zastoupena v menší míře i u pacientů s *FLT3*, *NPM1* či *TET2* mutacemi, byla však více zastoupena u pacientů s *RUNX1* a *IDH2R140* mutacemi. *C/EBPα* epigenetické změny a *C/EBPα* mutace jsou vzájemně jedinečné. Methylační změny v *CEBPA* promotoru neovlivňují přímo prognózu. Negativním prognostickým faktorem je epigenetická změna vedoucí k snížení hladiny transkriptu mRNA *C/EBPα* genu (Fasan et al. 2013). Mutace *C/EBPα* genu jsou spojeny s lepší prognózou než případy u kterých byl pozorován silencing *C/EBPα* genu (5-leté přežití 88% versus 25%, $p=0,003$) (Figuroa et al. 2010). Spekuluje se, že k methylaci v *C/EBPα* genu dochází v kontextu celkové hypermethylace.

Zkoumána byla též role methylace u dětských BCP ALL, kde převážnou část tvoří pacienti s fúzním genem *ETV6/RUNX1*. Methylační změny byly pozorovány v genech *MYOD1*, *PPARG*, *SFRP1*, *FOXE3*, *TCF3*, *ERG4* a *BTG4*. Hypomethylace se vyskytovala v genech *TCF3*, *POU2AF1* a *RAG1*. Jelikož se neliší DNA methylace mezi jednotlivými cytogenetickými subtypy BCP ALL, můžeme spekulovat o sekundární změně v leukemogenezi, která vede k deregulaci (Wong et al. 2012).

Polykombová skupina proteinů je známa jako epigenetický regulátor transkripce, klíčové jsou v diferenciaci, u kmenových buněk a hrají roli v liniové plasticitě. Vyskytují se v proteinových komplexech nazývané polykombové represivní komplexy, které modifikují histony a tím dochází k umlčení cílových genů. Hypermetylační změny převážně postihují CpG dinukleotidy polykombových skupin, hypermethylace pak způsobí ztrátu liniové plasticity a získávání schopnost neomezené proliferace. Polykombové skupiny jsou více methylovány v relapsových vzorcích v porovnání s diagnostickými (Nordlund et al. 2013).

Myší modely v leukemogenezi

Slovo xenotransplantace pochází z řeckého *xenos*-, "cizí". Xenotransplantací rozumíme transplantaci živých buněk, tkání a orgánů z jednoho živočišného druhu do jiného. Xenogenní transplantace leukemických buněk poskytuje důležitý nástroj pro studium leukemogeneze, umožňuje nám namnožení leukemických buněk *in vivo* a hodnocení nových léčebných přístupů. V xenograftech dochází k rekapitulaci klinických rysů ALL a AML. Leukemické buňky v myších modelech jsou vystaveny, podobně jako v lidském organismu, příznivým a nepříznivým podmínkám pro přihojování, je rekapitulován selekční tlak pro vývoj leukemických subklonů.

Před 25 lety byl vyvinut myší model s mutací, která způsobuje těžkou kombinovanou imunodeficienci (SCID), které mají mutaci v *Prkdc* genu (Bosma et al. 1988) Vývoj SCID

myší poskytl možnost transplantace hematopoetických buněk bez odhojení štěpu. Nicméně přetrvávající imunita SCID myší limitovala xenogenní transplantace. Zvýšené kapacity přijímání se dosáhlo s vývojem myšího kmene, který má prohloubené imunodeficitní vlastnosti (NOD/SCID – The non-obese diabetic/severe combined immune deficiency). V dalším kroku byl vyvinut myší kmen s poškozenou vrozenou imunitou a nefunkčními NK buňkami, který má defekt v gama řetězci receptoru pro interleukin 2 (NSG myš). NSG kmeny neexprimují gen *Prkdc* a taktéž nemají expresi X-vázaného genu *Il2rg*. NSG myší kmen je charakterizován až 100% přijímáním a *in vivo* diferenciací transplantovaných hematopoetických kmenových buněk (Schmitz et al. 2011). Ukázalo se, že růst leukemických buněk je v myších modelech ovlivňován hladinou růstových faktorů a cytokinů. Humanizované myší kmeny, které produkují transgenní lidské cytokiny posunuly možnosti přijímání leukemických buněk. Úspěšné přijímání leukemických buněk nezávisí pouze na výběru vhodného myšího kmene. Důležitým faktorem je, zda se jedná o čerstvý materiál či zda jde o kryoprezervované leukemické buňky. Delší doba k přijímání štěpu byla prokázána u kryoprezervovaných vzorků. Technika transplantace ovlivňuje přijímání, transplantace přímo do mikroprostředí kostní dřeně obchází „homing“ proces a vede ke zvýšené frekvenci přijímání ve srovnání se systémovou aplikací leukemických buněk intravenózně. Humanizované modely nacházejí využití u AML, které se přijímají s nižší četností než ALL (Rongvaux et al. 2011). Neúspěšné přijímání je dáno vnitřními charakteristikami leukemických myeloidních buněk a nikoliv počtem transplantovaných buněk (Meyer et al. 2011).

2. Cíle práce

Liniový přesmyk akutních leukémií během časné fáze léčby je vzácný. Často jsou ale pozorovány změny imunofenotypu, které nevedou ke změně zařazení leukemie (Gaipa et al. 2008; Dworzak et al. 2008, 2010). Na léčebném protokolu ALL IC BFM 2002, kde byla hodnocena minimální reziduální nemoc jako výzkumná otázka a hladina minimální reziduální nemoci tak nesloužila k úpravě intenzity léčby, jsme pozorovali u dvou pacientů se špatnou odpovědí na léčbu významnou změnu fenotypu směrem k monocytární linii v den 8 léčby. Postupně jsme si kladli následující otázky, respektive cíle:

- 1) Jaká je incidence fenoménu liniového přesmyku do monocytoidní linie (swALL) u dětské BCP ALL?
- 2) Lze definovat typický expresní vzorec, podle kterého probíhá liniový přesmyk?
- 3) Jsou lymfoidní a myeloidní leukemické buňky geneticky příbuzné nebo se jedná o různé klony?
- 4) Existují společné charakteristiky pacientů s fenoménem liniového přesmyku do monocytoidní linie (imunologické, genetické, epigenetické)?
- 5) Lze modelovat liniový přesmyk v *in vitro* a *in vivo* podmínkách?
- 6) Jak závisí četnost fenoménu liniového přesmyku do monocytoidní linie na frekvenci hodnocení minimální reziduální nemoci v indukční fázi léčby?
- 7) Jaký je vztah mezi kategorií akutní leukemie s liniovým přesmykem a bilineární leukemie?
- 8) Jakým způsobem lze hledat nové cíle vhodné pro reziduální nemoc cytometricky nejen u pacientů se swALL?

3. Materiál a metody

Charakteristika kohorty pacientů

Celkem 708 pacientů bylo centrálně diagnostikováno jako primární BCP ALL pomocí imunofenotypu. Léčba probíhala dle následujících léčebných protokolů: ALL-BFM 95 (09/1996-10/2002, n=269, včetně 2 pacientů, kteří zemřeli v den diagnózy), ALL-IC-BFM 2002 (11/2002-10/2007 n=257), ALL-BFM 2000 (11/2007-05/2010, n=154). Kojenci byli léčeni dle léčebných protokolů POG9407 (n=5), Interfant 1999 (n=12, z toho jedna pacientka zemřela v den diagnózy) a Interfant 2006 (n=11). Pacienti, kteří zemřeli v den diagnózy, byli vyřazeni z výpočtů incidence swALL, ale byli zahrnuti do analýzy exprese antigenu CD2 v diagnóze. Od 05/2010 jsme diagnostikovali dalších 9 pacientů se swALL.

Průtoková cytometrie a sortovací experimenty

V rámci léčebných protokolů pacientů s akutními leukemiemi je v laboratořích CLIP vyšetřován imunofenotyp leukemických buněk pomocí standardních panelů monoklonálních protilátek. V laboratoři průtokové cytometrie máme k dispozici přístroje CYAN (Dako, Glostrup, Denmark), FACS LSR II a CANTO II (BD Biosciences, San José, USA) a FACS ARIA II (BD Biosciences, San José, USA), který umožňuje separaci buněk do požadovaných frakcí dle exprese jednotlivých znaků.

Všichni pacienti, kteří byli zařazeni do naší studie, splnili definici BCP ALL. Pacienti byly vyšetřeny na aberantní expresi antigenu CD2 (Immunotech, klon 39 C1.5) v diagnóze, celkem se nám podařilo vyšetřit 704 pacientů. Prospektivní kohorta byla vyšetřena námi navrženou 8-barevnou kombinací monoklonálních protilátek, která zachycuje B lymfoidní a monocytoidní vývoj. Osmi barevný panel swALL se skládá z následujících antigenů CD45/CD14/CD10/CD20/CD19/CD34/CD33/CD3. Osmi barevný panel se skládá z následujících protilátek, v uvedených fluorochromech, od uvedených výrobců a uvedených klonech - CD45-FITC (fluoresceinisothiocyanat) (Immunotech, Marseille, Francie, klon KC56), CD14-PE (phycoerythrin) (Immunotech, klon 116), CD34-PercP-Cy5.5 (peridinin chlorophyll protein conjugated with cyanin dye) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, klon 8G12), CD10-ECD (phycoerythrin-Texas Red conjugate) (Immunotech, klon ALB1), CD20-PB (pacific blue) (Exbio Praha, ČR, klon LT-20 nebo Biolegend, San Diego, CA, USA, klon

2H7), CD19-PC7 (phycoerythrin conjugated with Cyanine 7) (Immunotech, klon J3-119) a CD33-APC (allophycocyanin) (Immunotech, klon D3HL60.251). Antigen CD3 (Exbio, klon MEM-57) byl zařazen do panelu, protože má být negativní na obou leukemických populacích (B- a myelo-). Pacienti byli diagnostikováni mezi zářím 2007 a květnem 2010, celkem 179 pacientů, kteří měli dostatek materiálu v diagnóze, den 8, den 15 a den 33 léčby, byli vyšetřeni osmi barevným panelem.

Izolace RNA, DNA, reverzní transkripce

RNA izolace byla prováděna pomocí modifikované metody podle Chomczynského a Sacchi (Chomczynski 1987), pomocí RNA Mini a Micro kitu (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) dle návodů od výrobce. Kvalita a koncentrace RNA byla kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) nebo pomocí čipové technologie využívající kapilární elektroforézu (Agilent 2100, Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

DNA izolace byla provedena pomocí izolačních technologií od Qiaagen – DNA Mini a Micro kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. Kvalita a koncentrace byla kontrolována spektrofotometricky.

Pro přepis mRNA do cDNA pomocí reverzní transkripce využíváme kit iScript (BioRad, Hercules, USA). Kit využívá schopnosti modifikované reverzní transkriptázy MMLV RT syntetizovat komplementární DNA k templátovému řetězci RNA za použití oligo(dT) a náhodných hexamerových primerů. Používáme termální profil skládající se ze třech kroků, 25°C 5 minut, 42°C 30 minut, 85 °C 5 minut.

Screening přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory a stanovení minimální reziduální nemoci

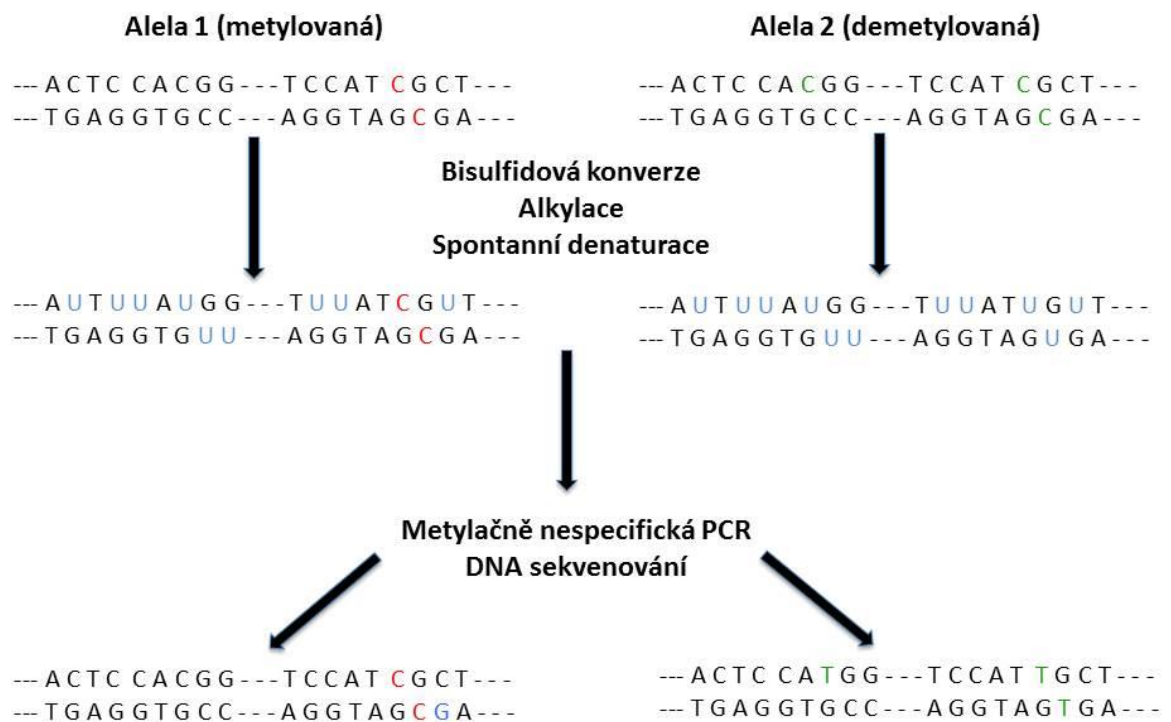
Tato komplexní metodika vychází z toho, že leukemická buňka vznikla transformací z jednoho lymfocytárního prekursoru. Proto leukemické buňky nesou identické, pro danou leukemii specifické, přestavby Ig/TCR, které můžeme sledovat v průběhu léčby.

Specifická kombinace primerů se používá pro identifikaci přestaveb Ig/TCR genů. U BCP ALL vyšetřujeme ne/kompletní V-(D)-J přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů, delece lehkého řetězce kappa, nekompletní přestavby T-buněčného receptoru δ a přestavby T-buněčného receptoru γ . U T ALL vyšetřujeme kompletní a nekompletní přestavby T-buněčného receptoru δ a γ . Všechny primery byly publikovány skupinou BIOMED –I

(Pongers-Willemsse et al. 1999) nebo BIOMED – II (van Dongen et al. 2003). Jednotlivé sekvenční vyhodnocujeme za pomoci programu VECTOR NTI 8 Suite Software (INFORMAX, Bethesda, MD, USA). V dalším kroku navrhujeme specifické primery pro každého pacienta a systémy optimalizujeme. Při optimalizaci vytvoříme ředící řadu z DNA, kterou získáme z diagnostického materiálu od pacienta. Snažíme se dosáhnout nejlepší sensitivity a specificity (van der Velden et al. 2009; van Dongen et al. 2003; van der Velden et al. 2007, 2003).

Bisulfitové sekvenování

Bisulfitové sekvenování jsme použili pro nalezení methylačních změn v CEBPA promotoru. Metoda je založena na bisulfitové konverzi cytosinu na uracil, zatímco 5-methylcytosin je ponechán beze změn. Hypometylované cytosiny jsou nakonec zobrazovány jako thyminy (Obrázek 7.).



Obrázek 7. Schéma bisulfitové konverze.

DNA byla ošetřena EZ DNA Methylation-Gold™ Kitem (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA), následně amplifikována pomocí CEBPA promotorově specifických primerů: Fwd 5'-GAA TTA TAG GGG TAG TTT GGA GAT TA-3', Rev 5'-CCC TCC TCC TAC CTA CCC TAA A-3'. PCR produkty byly zaklonovány do pCR®2.1 vektoru pomocí TOPO® TA Cloning® Kitu (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Transfekované kompetentní buňky *E.coli* byly vysety na odpovídající selekční půdy InMedia AmpBlue (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Vybrané kolonie byly namnoženy v LB médiu. DNA z plasmidů byla izolována pomocí komerčně dostupným QIAprep Spin Miniprep Kitem (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) a sekvenována.

Expese genu C/EBPα a kontrolního genu ABL1

K detekci exprese genu *C/EBPα* jsme použili metodu kvantitativní reverzně-transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakci (qRT-PCR). Navrhli jsme systém využívající k detekci PCR produktu QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) a specifické primery *CEBPα* : Fwd: GGAGCTGAGATCCCGACA, *C/EBPα* Rev: TTCTAAGGACAGGCGTGGAG. SYBR green I interkaluje do dvouřetězcové DNA (dsDNA), každý PCR cyklus zvyšuje množství dsDNA exponenciálně. Metoda využívá hydrolyzační Taqman sondu, která je značena jak fluoroforem, tak zhášečem. Pokud je zhášeč v blízkosti sondy dojde k potlačení fluorescence. V průběhu elongační fáze dochází k rozštěpení sondy exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy. Když dojde k oddálení fluoroforu a zhášeče, fluorofor emituje detekovatelné záření. Teplotní profil byl při 95°C 15 minut a následovalo 50 cyklů 94°C 15s, 63°C 60s a 15°C donekonečna. Měření probíhalo na přístroji PRISM® 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Následně byla provedena analýza dle teploty tání amplifikovaného produktu. Expese *C/EBPα* genu byla normalizována k expresi kontrolního genu, kterým je gen *ABL1*. *ABL1* specifické primery: Fwd: CTCTAAGCATAACTAAAGGTGAAAAGC, Rev: GATGTAGTTGCTTGGGAC CCA, *ABL1* próba: CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT. *ABL1* se nachází na devátém chromosomu v oblasti 9q34.13, kóduje tyrosinovou kinázu. Normalizace minimalizuje kvantitativní a kvalitativní rozdíly biologického materiálu.

mRNA exprese cytokinových receptorů

CSF2RA (Colony Stimulating Factor 2 Receptor Alpha) a *CSF1R* (Colony stimulating factor 1 receptor) genová exprese byla měřena pomocí systému TaqMan® Gene Expression Assays na přístroji ABI PRISM® 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Teplotní podmínky byly 50°C 2 minuty, 95°C 10 minut, 50 cyklů 95°C 15s, 60°C 60s a 15°C donekonečna. Genová exprese byla normalizována ke kontrolnímu genu *ABL1*.

Cytokinové receptory na proteinové úrovni

Pomocí průtokové cytometrie jsme vyšetřily receptory pro M-CSF (faktor stimulující kolonie makrofágů - CD115), TPOR (trombopoetinový receptor – CD110) a GM-CSF (faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie - CD116). Použité byly protilátky: CD115 (BioLegend, San Diego, CA, USA, klon 9-4D2-1E4), CD116 (BioLegend, San Diego, CA, USA, klon 4H1) a TPOR (R&D, Minneapolis, USA, klon 167639), všechny protilátky byly konjugované s phycoerythrinem (PE). Měření probíhalo na přístroji CYAN (Dako, Glostrup, Dánsko).

Identifikace a validace leukemicky specifických markerů

Vzorky kostní dřeně byly získány buď z kryoprezerovaných vzorků nebo z čerstvých vzorků aspirátů kostní dřeně. Zaměřili jsme se na nové znaky identifikované pomocí proteomiky potenciálně vhodné pro detekci minimální reziduální průtokovou cytometrií. Validovány byly cíle pro monoklonální protilátky: CD18 (BioLegend, San Diego, CA, USA, klon TS1/18), CD31 (BioLegend, klon WM59) a CD58 (Immunotech, Marseille, Francie, klon AICD58), všechny konjugované s FITC, CD63 (BioLegend, klon H5C6), CD97 (BioLegend, klon VIM3b), CD102 (BD, San Jose, CA, klon CBR-1C2/2), CD157 (eBioscience, San Diego, CA, USA, klon SY11B5), CD317 (BioLegend, klon RS38E), všechny konjugované s PE, CD305 PE (eBioscience, klon NKTA255) nebo CD305 AlexaFluor 647 (BioLegend, klon NKTA255) a CD217 PE (eBioscience, klon J10MBS) nebo CD217 APC (eBioscience, klon 424LTS).

Validované protilátky byly součástí pěti barevné kombinace: CD34 PerCP-Cy5.5 (BD, klon 8G12), CD19 PECy7 (Immunotech, klon J3-119), CD10 APC (BD Biosciences, klon HI10a) nebo CD10 FITC (BD Biosciences, klon HI10a), CD20 APC-H7 (allophycocyanin hilite 7) (BD Biosciences, klon L27) nebo CD20 PB (BioLegend, klon 2H7), CD38 APC-AlexaFluor

750 (Immunotech, klon LS198-4-3) a CD45 PO (Pacific Orange) (Invitrogen, Carlsbad, CA klon HI30) nebo CD45 KO (Krome Orange) (Immunotech, klon J.33). Data byla měřena na přístroji CANTO II (BD, San José, USA).

Genová exprese 90 genů

Genová exprese 90 genů (Tabulka 8.) byla analyzována na buněčných subpopulacích (Tabulka 9). RT-PCR byla provedena v duplikátech pomocí TaqMan® expresních analýz, TaqMan® univerzálního Master Mixu II na přístroji ABI PRISM® 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Metoda využívající delta Ct byla použita pro výpočet relativní mRNA exprese vztažená ke kontrolním genům (*GUSB*, *HPRT1*).

| gen | Taqman®systémové číslo |
|---------------|-------------------------------|
| <i>ABL1</i> | Hs01104728_m1 |
| <i>AIF1</i> | Hs00610419_g1 |
| <i>IKZF3</i> | Hs00232635_m1 |
| <i>RUNX 1</i> | Hs00231079_m1 |
| <i>B2M</i> | Hs00984230_m1 |
| <i>BCL11A</i> | Hs00256254_m1 |
| <i>BCL11B</i> | Hs00256257_m1 |
| <i>BCR</i> | Hs00244716_m1 |
| <i>BLNK</i> | Hs00179459_m1 |
| <i>CCDC26</i> | Hs01886265_s1 |
| <i>KIT</i> | Hs00174029_m1 |
| <i>CD14</i> | Hs00169122_g1 |
| <i>CD19</i> | Hs00174333_m1 |
| <i>CD2</i> | Hs00233515_m1 |
| <i>CD22</i> | Hs00233533_m1 |
| <i>CD24</i> | Hs00273561_s1 |
| <i>CD25</i> | Hs00907779_m1 |
| <i>CD2AP</i> | Hs00961451_m1 |
| <i>CD3E</i> | Hs01062241_m1 |
| <i>CD4</i> | Hs00181217_m1 |

| | |
|---------------|---------------|
| <i>CD79A</i> | Hs00233566_m1 |
| <i>CD8A</i> | Hs00233520_m1 |
| <i>CEBPA</i> | Hs00269972_s1 |
| <i>CEBPB</i> | Hs00270923_s1 |
| <i>CEBPD</i> | Hs00270931_s1 |
| <i>CEBPE</i> | Hs00357657_m1 |
| <i>CRLF2</i> | Hs00845692_m1 |
| <i>CSF1</i> | Hs00174164_m1 |
| <i>CSF3R</i> | Hs00167918_m1 |
| <i>CUL1</i> | Hs01118950_m1 |
| <i>CDKN1A</i> | Hs00355782_m1 |
| <i>TCF3</i> | Hs01012685_m1 |
| <i>EBF1</i> | Hs00395513_m1 |
| <i>IKZF4</i> | Hs00223842_m1 |
| <i>EpoR</i> | Hs00959427_m1 |
| <i>FCGR3A</i> | Hs01569121_m1 |
| <i>FCGR2A</i> | Hs01017702_g1 |
| <i>FLT3</i> | Hs00174690_m1 |
| <i>FOXC1</i> | Hs00559473_s1 |
| <i>FOXO1</i> | Hs01054576_m1 |
| <i>FOXO3</i> | Hs00818121_m1 |
| <i>FOXP3</i> | Hs01085834_m1 |
| <i>GAPDH</i> | Hs99999905_m1 |
| <i>GATA1</i> | Hs01085823_m1 |
| <i>GATA3</i> | Hs00231122_m1 |
| <i>GLS</i> | Hs00248163_m1 |
| <i>GUSB</i> | Hs00939627_m1 |
| <i>HOXA10</i> | Hs00172012_m1 |
| <i>HOXA9</i> | Hs00365956_m1 |
| <i>HOXB3</i> | Hs00231127_m1 |
| <i>HOXB4</i> | Hs00256884_m1 |

| | |
|----------------|-----------------|
| <i>HPRT</i> | Hs01003267_m1 |
| <i>ID2</i> | Hs00747379_m1 |
| <i>IKZF1</i> | Hs00172991_m1 |
| <i>IKZF2</i> | Hs00212361_m1 |
| <i>IL6R</i> | Hs01075667_m1 |
| <i>IRF4</i> | Hs01056533_m1 T |
| <i>IRF8</i> | Hs01128710_m1 |
| <i>ITGA6</i> | Hs01041011_m1 |
| <i>LTK</i> | Hs00950634_m1 |
| <i>KLF4</i> | Hs00358836_m1 |
| <i>CAECAM6</i> | Hs00366002_m1 |
| <i>MAFB</i> | Hs00534343_s1 |
| <i>LAT</i> | Hs01065378_g1 |
| <i>LCK</i> | Hs00178427_m1 |
| <i>LGALS1</i> | Hs00355202_m1 |
| <i>LILRA2</i> | Hs00429044_m1 |
| <i>LMO2</i> | Hs00153473_m1 |
| <i>LTF</i> | Hs00914334_m1 |
| <i>MLL</i> | Hs00610538_m1 |
| <i>MNDA</i> | Hs00159210_m1 |
| <i>MSH6</i> | Hs00264721_m1 |
| <i>MYB</i> | Hs00920554_m1 |
| <i>MYC</i> | Hs00905030_m1 |
| <i>NDN</i> | Hs00267349_s1 |
| <i>NFIL3</i> | Hs00705412_s1 |
| <i>NOTCH1</i> | Hs01062014_m1 |
| <i>NOTCH3</i> | Hs01128541_m1 |
| <i>PAWR</i> | Hs01088574_m1 |
| <i>PAX-5</i> | Hs00172003_m1 |
| <i>PBX1</i> | Hs00231228_m1 |
| <i>POU2AF1</i> | Hs01573371_m1 |

| | |
|----------------|---------------|
| <i>SPI1</i> | Hs02786711_m1 |
| <i>RAG1</i> | Hs00822415_m1 |
| <i>RBM47</i> | Hs00219308_m1 |
| <i>RNF130</i> | Hs00218335_m1 |
| <i>SI00A10</i> | Hs00741221_m1 |
| <i>STAT5A</i> | Hs00234181_m1 |
| <i>TCF7</i> | Hs00175273_m1 |
| <i>TNFSF10</i> | Hs00921974_m1 |
| <i>TOP3A</i> | Hs00172806_m1 |
| <i>RNF125</i> | Hs00215201_m1 |
| <i>TRAP1</i> | Hs00212474_m1 |
| <i>TSC2</i> | Hs01020387_m1 |
| <i>UBASH3A</i> | Hs00957643_m1 |

Tabulka 8. Seznam genů pro PCR v reálném čase. Všechny TaqMan® sondy byly značeny pomocí FAM.

| Subpopulace | Linie | Tkáň |
|---|--------------|----------------|
| CD34 ⁺ CD19 ⁺ CD10 ⁺ CD20 ⁻ | B | Kostní dřeň |
| CD34 ⁺ CD19 ⁺ CD10 ⁺ | B | Kostní dřeň |
| CD34 ⁺ CD1a ⁻ CD7 ⁺ | T | Thymus |
| CD34 ⁺ CD1a ⁺ CD7 ⁺ | T | Thymus |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ | T | Thymus |
| CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ | T | Thymus |
| CD33 ⁺⁺ CD4 ⁺ CD14 ⁻ | Mo | Kostní dřeň |
| CD33 ⁺⁺ CD4 ⁺ CD14 ⁺ | Mo | Kostní dřeň |
| CD33 ⁺⁺ CD4 ⁺ CD14 ⁺ | Mo | Periferní krev |

Tabulka 9. Popis jednotlivých subpopulací.

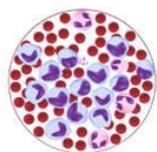
In vitro funkční experimenty

Získali jsme leukemické buňky celkem od 12 pacientů (4 pacienti swALL a 8 pacientů s jiným BCP ALL subtypem). Leukemické buňky byly izolovány centrifugací v sacharózovém gradientu (Ficoll-Paque Reseach Grade, Pharma Tech, New Jersey, USA). Ve výsledném hustotním gradientu představuje frakce mononukleárních buněk prstenec, který se nachází mezi fází krevní plazmy a cukerného roztoku. Leukemické buňky byly kultivovány v RPMI 1640 médiu (Life technologies, Carlsbad, USA), které bylo doplněno o 10% inaktivované fetální kravské sérum (Life technologies, Carlsbad, USA) a antibiotiky - penicilin-streptomycin (Life technologies, Carlsbad, USA). Buňky byly pěstovány v kultivátorech s 5% CO₂ (HERAcell 150CO2 (ThermoScientific, Wilmington, USA)). Celková doba kultivace byla v rozmezí 4-8 dní v přítomnosti tří různých koncentrací prednisonu. Používali jsme koncentrace 0, 5, 10 nebo 100 µg/mL prednisonu. Změny imunofenotypu byly měřeny pomocí osmi barevné kombinace monoklonálních protilátek každých 24 hodin.

Vytvoření myšího modelu

Na xenotranplantační model jsme použili *NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ* (NOD-scid IL2R γ null, NSG) myší kmen. Používali jsme ortotopický model, ve kterém se transplantují buňky intrafemorálně (Obrázek 8). Nesortované buňky z diagnózy swALL byly standardním procesem zmrazeny. Po rozmražení jsme testovali buněčnou viabilitu trypanovou modří. Transplantovali jsme swALL od sedmi pacientů. Proces přijímání byl sledován pomocí průtokové cytometrie každé 2-4 týdny, monoklonálními protilátkami proti lidskému CD45 (KO, Immunotech, Marseille, Francie, clone J.33), proti myšímu CD45 (eFlour 450, eBioscience San Diego, CA, USA, clone 30-F11) a proti lidskému CD19 (PE, Biolegend, San Diego, CA, USA, clone HIB19).

1. Leukemické buňky (1 milion)



2. Intrafemorální transplantace leukemických buněk



3. Sledování přihojení leukemických buněk mCD45/hCD45



4. Získání amplifikovaných leukemických buněk



Obrázek 8. Schéma myšního modelu. mCD45 (myši CD45 (mouse)), hCD45 (lidská CD45 (human)).

Při simulaci liniového přesmyku byly myši léčeny prednisonem v dávce 30 mg/kg/den nebo samotným rozpouštěcím médiem, kterým byla voda. Prednison byl aplikován intraperitoneálně vždy po 24 hodinách.

Statistická analýza

Výsledky byly zpracovány ve statistickém softwaru Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA), StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA). Sekvence primerů a sond jsme navrhli v programu Vector NTI 8 Suite Software (Informax, Bethesda, USA), sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas Lite 2.01 (Technelysium, volně dostupný program). Data z průtokové cytometrie jsme analyzovali pomocí softwaru FlowJo 9.2 (TreeStar, Oregon, USA) a BD FACSDiva™ (BD, San Jose, CA, USA). Po porovnání dat mezi danými skupinami jsme použili neparametrické testy Mann-Whitney a Kruskal-Wallis.

4. Výsledky

Jaká je incidence fenoménu liniového přesmyku do monocytoidní linie u dětské BCP ALL?

Incidence swALL byla stanovena z prospektivní skupiny pacientů, kterým byla diagnostikována primární B prekurzorová akutní lymfoblastická leukemie v letech 2007-2010. Pacienti byli vyšetřeni osmi barevnou kombinací monoklonálních protilátek. Celkem jsme v uvedeném období diagnostikovali 179 pacientů, 7 pacientů bylo klasifikováno jako swALL. Incidence swALL byla neočekávaně vysoká, 3,9%. Aberantní exprese antigenu CD2 v diagnóze B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie byla nalezena u celkem 16 pacientů, incidence swALL mezi CD2^{poz} pacienty byla 44%.

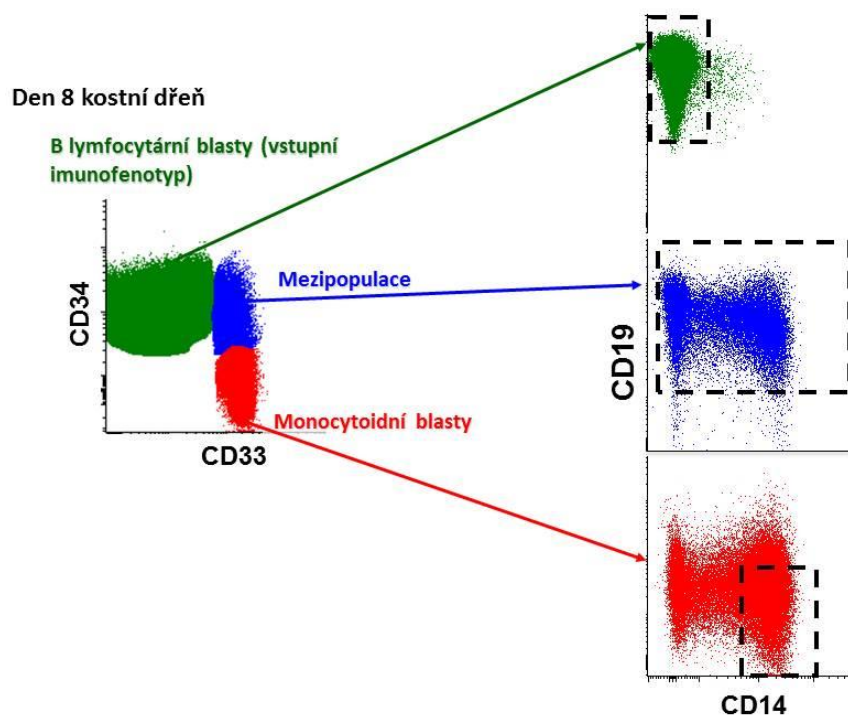
V retrospektivní skupině z let 1996 - 2007, jsme našli celkem 5 pacientů CD2^{poz}, s fenoménem liniového přesmyku, všichni měli špatnou odpověď na prednison. Celkem bylo diagnostikováno 526 pacientů s B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií. V retrospektivní kohortě nebyla měřena osmi barevná kombinace monoklonálních protilátek, která zachycuje vývoj liniového přesmyku a frekvence hodnocení MRN a tedy odběrů byla u části pacientů zejména léčených protokolem ALL BFM 95 výrazně nižší (nehodnotil se zcela den 8 a částečně nebyl hodnocen ani den 15). Pravděpodobně nedošlo k záchytu všech pacientů, u kterých se mohl fenomén liniového přesmyku vyskytnout.

V prospektivní kohortě rakouských pacientů byli popsáni 2/44 pacientů s CD2^{poz} BCP ALL a swALL fenoménem. Ve švýcarském Curychu byl identifikován jeden pacient CD2^{poz} BCP ALL, u kterého jsme zachytili swALL fenomén v den 8 (periferní krev) a v den 15 (kostní dřeň) léčby za pomoci námi navržené osmi barevné kombinace monoklonálních protilátek.

Podářilo se nám zachytit liniový přesmyk u jednoho pacienta s *MLL* přestavbou, jedné pacientky s B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií s aberantní expresí antigenu CD56 v diagnóze a u pacienta s cytogenetickými změnami *CBFB* genu (20% translokace *CBFB* genu (16q22), 70% delece 3' oblasti *CBFB*).

Lze definovat typický expresní vzorec, podle kterého probíhá liniový přesmyk?

Celkem jsme identifikovali 21 pacientů se swALL. Jedinečný fenomén liniového přesmyku se odehrává přes tři stádia. Prvním stádiem je iniciální populace B lymfoblastů, která je definována pomocí průtokové cytometrie dle exprese následujících antigenů: $CD34^{poz}CD33^{neg}CD19^{poz}CD14^{neg}$. Druhým stádiem je jedinečná populace, která je definována současnou expresí myeloidních a lymfoidních znaků. Nazýváme ji mezipopulace a exprimuje následující antigeny: $CD34^{poz}CD33^{poz}CD19^{poz}CD14^{poz}$. Třetím stádiem liniového přesmyku jsou monocytoidní blasty, které jsou popsány těmito antigeny: $CD34^{neg}CD33^{poz}CD19^{neg}CD14^{poz}$ (Obrázek 9.). Fenomén liniového přesmyku je dynamický proces, ve kterém dochází k expanzi blastů, které najednou začnou exprimovat znaky lymfoidní i myeloidní linie najednou a následně dojde k liniovému přesmyku do monocytoidní linie. U všech swALL pacientů jsme byli schopni identifikovat stádia liniového přesmyku v průběhu indukční léčby.



Obrázek 9. Schéma liniového přesmyku u swALL pacienta v den 8 léčby, který se odehrává v kostní dřeni. Identifikujeme dynamický vývoj tří stádií, která jsou tvořena iniciálním imunofenotypem, mezipopulace (současná exprese myeloidních a lymfoidních znaků) a monocytoidní populace.

Jsou lymfoidní a myeloidní leukemické buňky geneticky příbuzné nebo se jedná o různé klony?

Alespoň jedna specifická Ig/TCR přestavba pro leukemické buňky a přestavba specifická pro klon byla prokázána u všech pacientů se swALL. Specifická Ig/TCR přestavba či přestavby sloužily k monitorování průběhu onemocnění. Zároveň byly Ig/TCR přestavby vhodným nástrojem pro prokázání fenoménu liniovému přesmyku do monocytoidní linie, monocytoidní blasty by měly nést identické Ig/TCR přestavby jako blasty lymfoidní.

U pacientů se swALL s dostupným materiálem byly provedeny sortovací experimenty, kdy jsme separovali jednotlivá stádia liniového přesmyku. Sortovali jsme vzorky z diagnózy, ze dne 8, dne 15 a dne 33 léčby. Z jednotlivých populací byla izolována DNA. V monocytoidních buňkách jsme našli Ig/TCR přestavby (specifické pro lymfoidní blasty) v 76 % vzorcích od swALL pacientů. U 75% pacientů jsme našli již ve vzorcích z diagnózy monocytoidní populaci, která nesla, stejně jako lymfoidní blasty, leukemické Ig/TCR přestavby. Unikátní mezipopulace, která byla separována od sedmi swALL pacientů během časné fáze léčby, také nesla specifické Ig/TCR přestavby. Mezi CD2^{neg} BCP ALL vzorky jsme specifické Ig/TCR přestavby našli v monocytoidních buňkách pouze v jednom případě ze čtrnácti.

U pacientů se swALL pozorujeme opakovaně nesoulad mezi hladinou minimální reziduální nemocí měřenou pomocí průtokové cytometrie a molekulárně-genetickými metodami. Frekvence leukemických buněk vyšší než 0.1% měřená pomocí Ig/TCR přestaveb neodpovídala nedetekovatelné (či na nízké hladině detekovatelné) přítomnosti leukemických buněk charakteru BCP ALL měřené pomocí průtokové cytometrie. Leukemické buňky ztrácí charakteristiku B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie, unikají do monocytárního kompartmentu, kde je pomocí průtokové cytometrie zpravidla podle současných znalostí nedokážeme odlišit od fyziologických monocytů. U části pacientů jsme nicméně byli schopni odlišit monocytoidní blasty od fyziologických monocytů pomocí exprese antigenu CD2 a CD45 RA. U kontrolních vzorků jsme žádné nesrovnalosti v detekci MRN oběma metodami nezachytili.

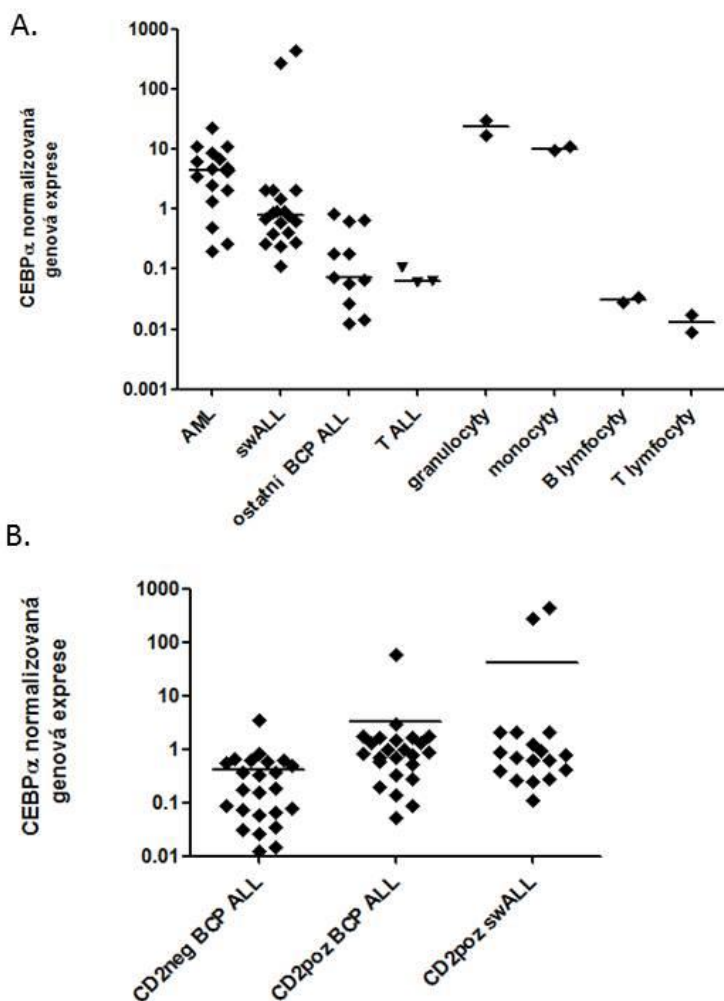
Existují společné charakteristiky pacientů s fenoménem liniového přesmyku do monocytoidní linie (imunologické, genetické, epigenetické)?

Společným znakem všech swALL případů je aberantní exprese antigenu CD2 v diagnóze. Celkem 41% CD2^{poz} BCP ALL splnilo kritéria swALL.

Pro pacienty se swALL je charakteristická přítomnost mezipopulace, která je definována expresí myeloidních a lymfoidních znaků současně. Procentuální zastoupení mezipopulace u CD2^{poz} BCP ALL bylo signifikantně vyšší v den 8 léčby v kostní dřeni ve srovnání s CD2^{neg} BCP ALL a zároveň signifikantně nižší oproti swALL. Výsledky nasvědčují tomu, že mezi CD2^{poz} se nacházejí swALL pacienti, které se nám nepodařilo zachytit.

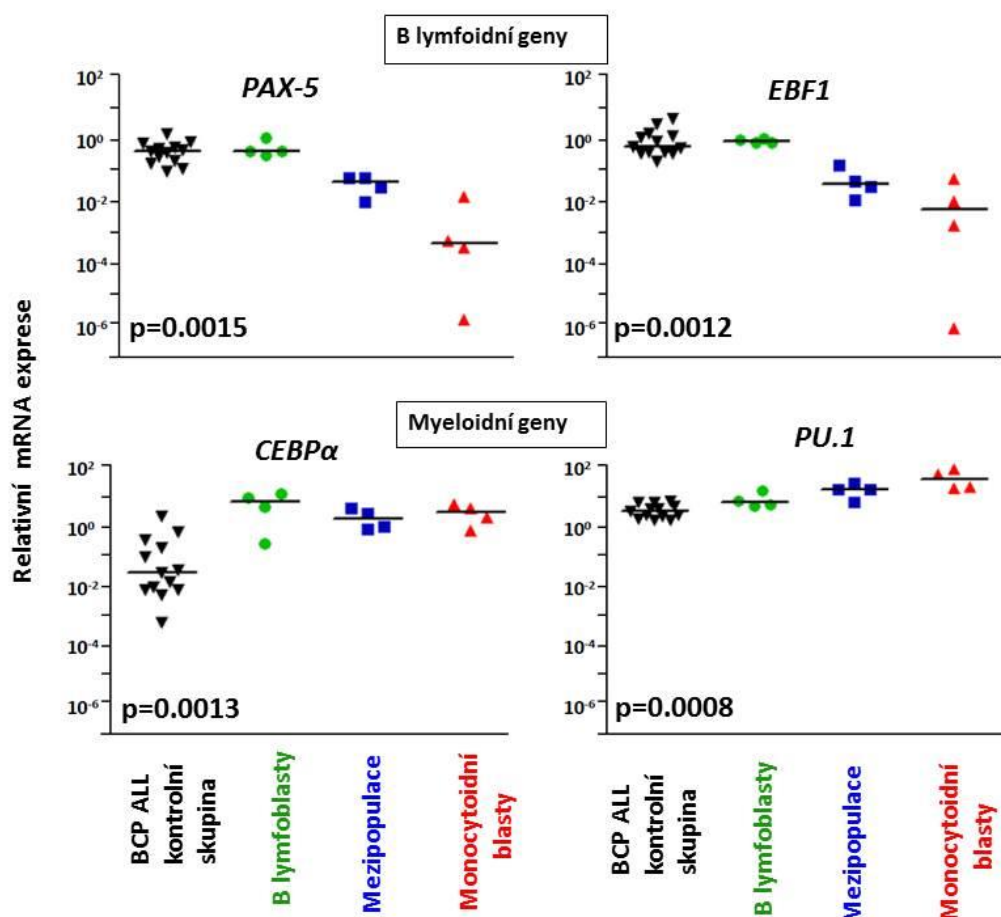
SwALL pacienti jsou euploidní dle DNA indexu. U žádného pacienta nebyla přítomna přestavba *MLL* genu, fúzní geny *FLT3/ITD*, *BCR-ABL1*, *E2A-PBX1* nebo *ETV6/RUNX1*. Cytogeneticky jsme nenalezli žádnou běžnou genetickou aberaci.

Klíčovým regulátorem pro monocytární linii je *C/EBPα* gen. Zkoumali jsme roli *C/EBPα* genu v liniovém přesmyku do monocytoidní linie. Zaměřili jsme se na nesortované vzorky z diagnózy od pacientů s akutní myeloidní leukémií (n=19), T akutní lymfoblastickou leukémií (n=5), B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií (n=52, CD2^{poz} 26 pacientů, „ostatní“ BCP ALL 7 pacientů, hyperdiploidie u 6 pacientů, přestavba *MLL* genu u 5 pacientů, *ETV6/RUNX1* u 5 pacientů a 3 pacienti s *BCR/ABL1* translokací) a swALL (n=18). Systémem qRT-PCR jsme zjišťovali expresi *C/EBPα* genu (Obrázek 10-A). Vyšší hladinu exprese *C/EBPα* genu jsme identifikovali u swALL ve srovnání s „ostatními“ BCP ALL (p = 0,0009) a nižší hladinu ve srovnání s AML (p = 0,0136). V naprosté většině případů hladina exprese *C/EBPα* genu nedosahovala fyziologické exprese v monocytech. Dále jsme se zaměřili na pacienty s CD2^{poz} blasty v diagnóze. Rozdíl v *C/EBPα* genové expresi nebyl mezi vzorky s pozorovaným a nepozorovaným liniovým přesmykem (p = 0,989). CD2^{poz} subtyp jako celek měl signifikantně vyšší hladinu exprese *C/EBPα* genu proti CD2^{neg} subtypu (p = 0,0006 pro CD2^{poz} swALL a p = 0,0003 pro CD2^{poz} bez prokázaného liniového přesmyku) (Obrázek 10-B).



Obrázek 10. Normalizovaná genová exprese *C/EBPα* genu.

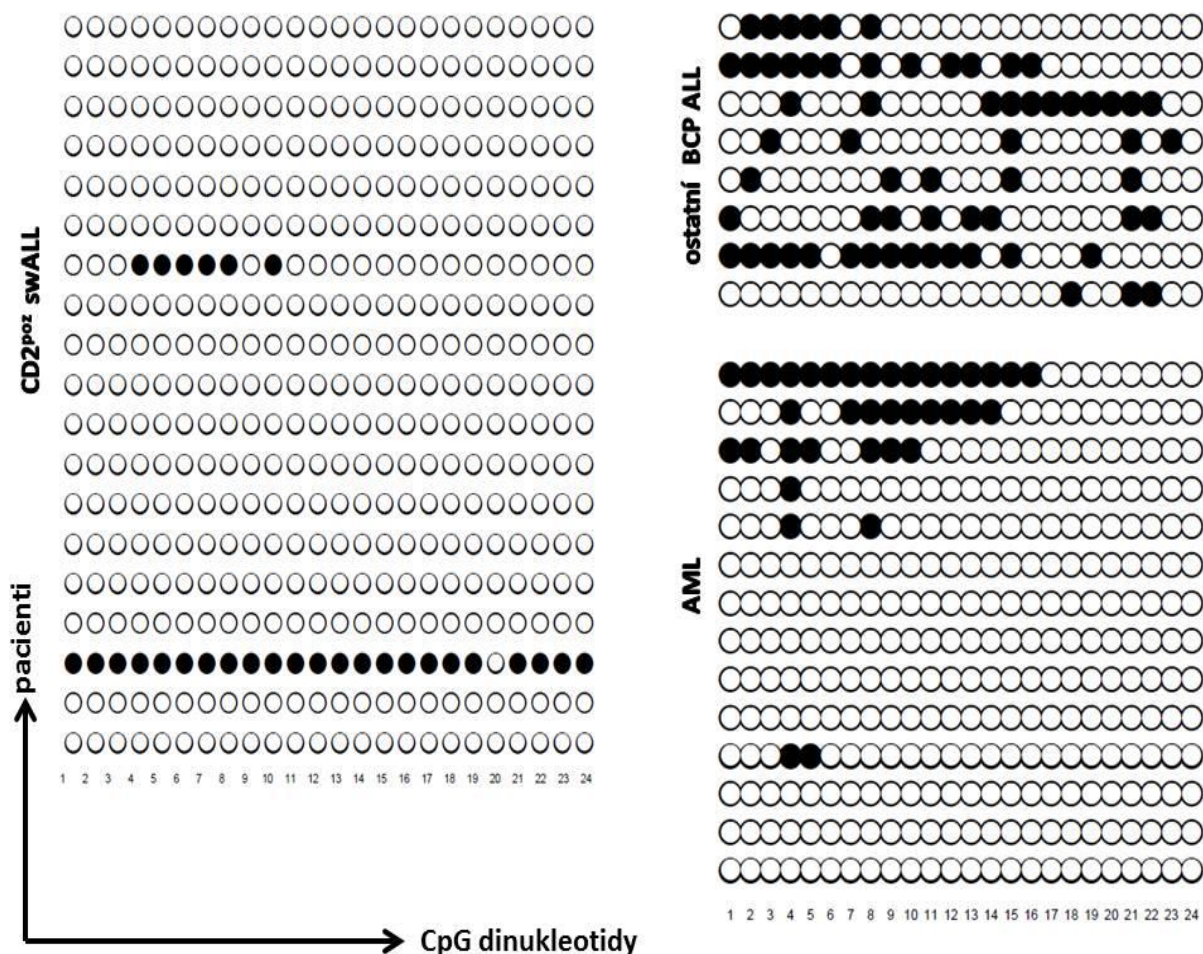
Následně jsme vyšetřili expresi 90 genů v 62 separovaných vzorcích od pacientů se swALL a kontrolních vzorků BCP ALL. Součástí byli i swALL vzorky, které obsahovaly všechny stadia liniového přesmyku, který byl zachycen v den 8 léčby. B lymfoblasty swALL se podobali B lymfoblastům „ostatních“ BCP ALL. Monocytoidní blasty se blížili vývojově k fyziologickým monocytům. Mezipopulace se nacházela uprostřed mezi monocytoidními buňkami a B lymfoblasty. V průběhu liniového přesmyku od B-lymfoblastů k monocytoidním buňkám došlo ke zvýšení hladiny myeloidních genů (*PU.1*), zatímco lymfoidní geny (*EBF1*, *PAX-5*) se signifikantně snížily. *C/EBPα* gen byl stacionární v průběhu liniového přesmyku (Obrázek 11). Při porovnání relativních hladin mRNA jsme získali kandidátní geny, které mohou odlišit swALL kohortu od pacientů bez liniového přesmyku. Mezi geny se zvýšenou hladinou patřili *C/EBPα*, *C/EBPβ*, *GATA-3*, *CSF1*, *S100A10*, *ITGA6*, *Id2* a *IKZF2*, mezi geny se sníženou expresí mRNA *C/EBPε*, *LTK* a *AIF1*.



Obrázek 11. Vývoj lymfoidních a myeloidních genů v průběhu swALL.

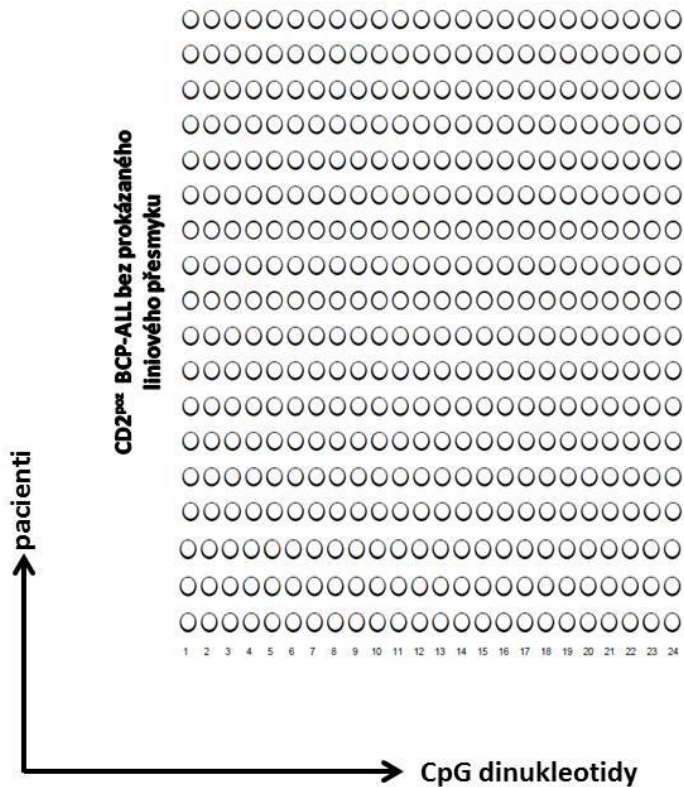
Zvýšená hladina exprese *C/EBPα* genu může být způsobena epigenetickými mechanismy a to změnami v DNA methylaci. Promotor *CEBPA* genu jsme vyšetřili celkem u 19 swALL, 14 pacientů s AML, 5 pacientů s T-ALL, 47 pacientů s BCP ALL (*CD2^{poz}* 18 pacientů, „ostatní“ BCP ALL 7 pacientů, hyperdiploidie u 6 pacientů, přestavba *MLL* genu u 5 pacientů, *ETV6/RUNX1* u 6 pacientů a 5 pacientů s *BCR/ABL1* translokací).

U 17/19 swALL pacientů jsme prokázali hypomethylační změny *CEBPA* promotoru ve srovnání s pacienty *CD2^{neg}* BCP ALL (ti měli *CEBPA* promotor hypermetylovaný). Ve skupině „ostatní“ BCP ALL jsme také pozorovali hypomethylační změny v *CEBPA* promotoru, ale pouze u *CD2^{poz}* vzorků. 8/14 pacientů s AML mělo *CEBPA* promotor také hypometylovaný. Methylační změny *CEBPA* promotoru nekorelovaly s genovou expresí *CEBPA* genu u ALL s *MLL* přestavbou (kde při vysoké expresi byly zachyceny hypermethylační změny) a u *BCR/ABL1* ALL (kde při nízké expresi byla zachyceny hypomethylační změny). Tato pozorovaná skutečnost souvisí s jinými mechanismy *C/EBPα* regulace u těchto subtypů AL (Obrázek 12).



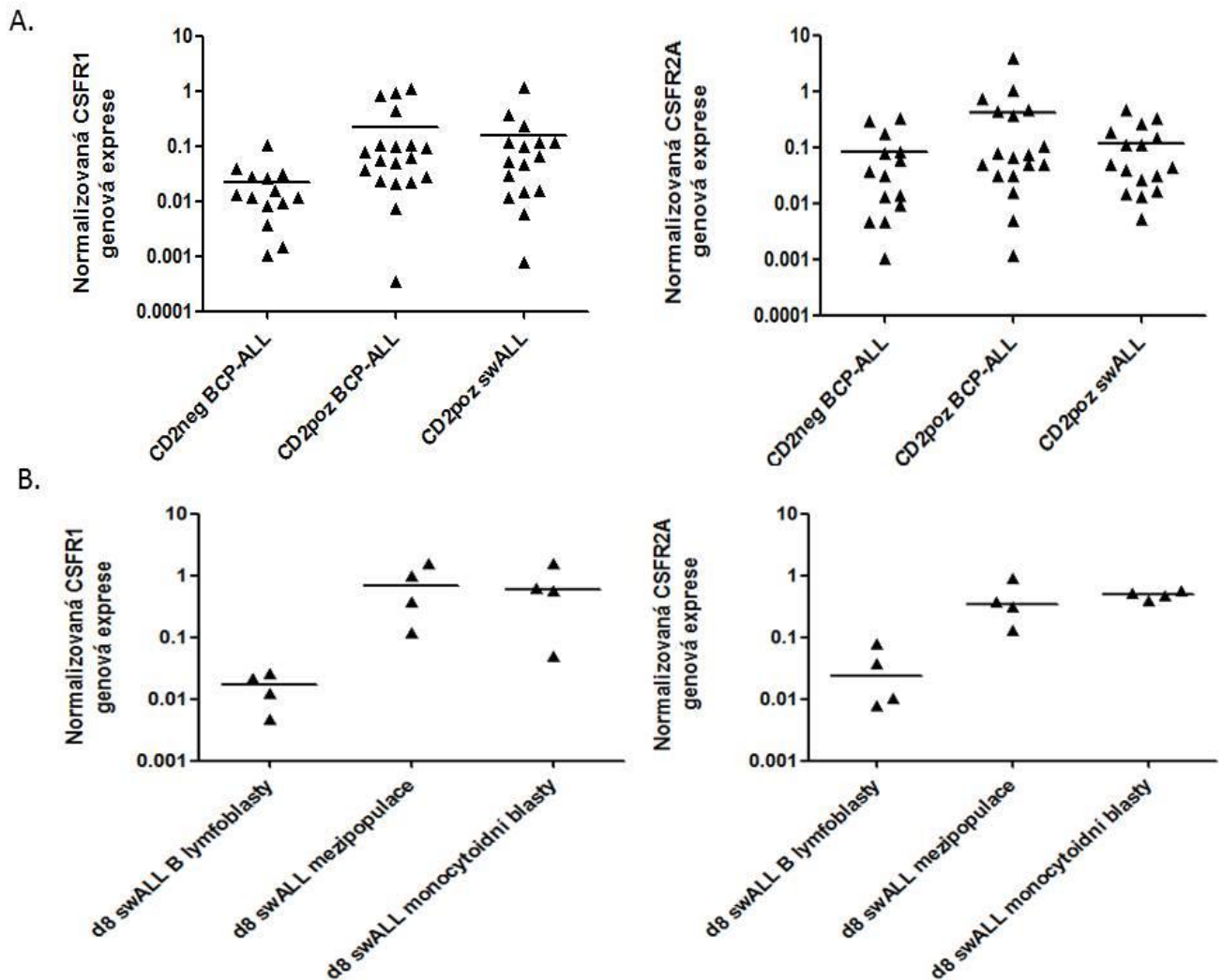
Obrázek 12. Epigenetické pozadí CEBPA promotoru. Celkem jsme vyšetřili 24 CpG dinucleotidů, které jsou označeny čísly 1-24. Bílé kuličky znamenají hypomethylaci a černé znamenají hypermethylaci.

Když jsem srovnali methylační změny CEBPA promotoru u swALL pacientů a pacientů s CD2^{poz} BCP ALL bez prokázaného liniového přesmyku do monocytoidní linie, zjistili jsme, že naprostá většina CD2^{poz} subtypu nesla hypomethylační změny CEBPA promotoru, bez rozdílu zda jsme u nich liniový přesmyk pozorovali či nikoliv (Obrázek 13).



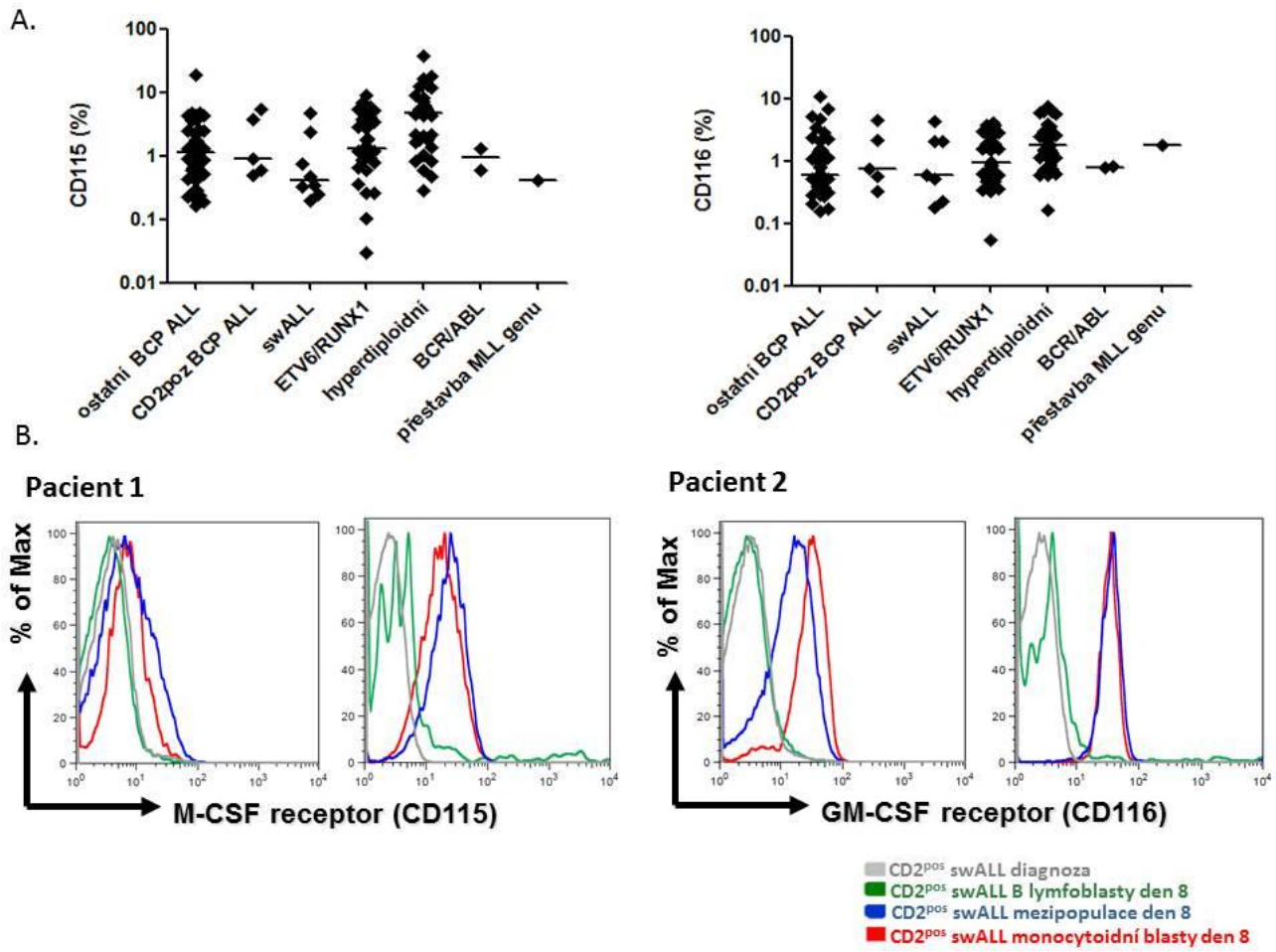
Obrázek 13. Epigenetické pozadí CEBPA promotoru. Celkem jsme vyšetřili 24 CpG dinucleotidů, které jsou označeny čísly 1-24. Bílé kuličky znamenají hypomethylaci a černé znamenají hypermethylaci.

Cytokinové receptory pro faktor stimulující kolonie makrofágů (*M-CSF*, *CSFR1* gen) a faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie (*GM-CSF*, *CSFR2A* gen) jsme vyšetřili metodou qRT-PCR celkem u 17 swALL, 32 pacientů s BCP ALL (CD2^{poz} 18 pacientů, „ostatní“ BCP ALL 2 pacienti, hyperdiploidie u 3 pacientů, *ETV6/RUNX1* u 6 pacientů a 3 pacienti s *mBCR/ABL1* translokací). Jednotlivá stádia liniového přesmyku jsme vyšetřili u 4 pacientů, kde jsme měli možnost separovat jednotlivé populace ze dne 8 léčby. Hladina genové exprese *CSFR1* (gen pro *M-CSFR*, Colony stimulating factor 1 receptor) byla vyšší u swALL ($p = 0,0134$) a CD2^{poz} BCP ALL bez pozorovaného přesmyku ($p = 0,0042$) ve srovnání s CD2^{neg} subtypem BCP ALL. Hladina genové exprese *CSFR2A* (gen pro *GM-CSFR*, Colony Stimulating Factor 2 Receptor Alpha) se nelišila mezi jednotlivými subtypy. Během liniového přesmyku došlo ke zvýšení genové exprese *CSFR1* a *CSFR2A*, výrazná byla zejména změna z B lymfoblastů do mezipopulace ($p = 0,0286$) (Obrázek 14).



Obrázek 14. Normalizovaná genová exprese CSFR1 a CSFR2A.

Expresi proteinu pro cytokinové receptory jsme zkoumali průtokovou cytometrií celkem u 31 pacientů s AML, 20 pacientů s T ALL, 8 pacientů se swALL a u pacientů s BCP ALL (CD2^{poz} 5 pacientů, 51 „ostatních“ BCP ALL 32 pacientů s hyperdiploidií, 38 *ETV6/RUNX1* pacientů, 2 pacienti s *BCR/ABL1* a 1 pacient s *MLL* přestavbou). Podařilo se nám zachytit liniový přesmyk u 2 pacientů s dostatkem blastů, kde jsme tak mohli vyšetřit cytokinové receptory na proteinové úrovni na jednotlivých subpopulacích. Signifikantní změny na proteinové úrovni jsme nezaznamenali mezi jednotlivými subtypy BCP ALL (Obrázek 15 - A). V dynamickém průběhu liniového přesmyku jsme pozorovali zvýšení na hladiny proteinů v mezipopulaci a v monocytoidních blastech, jak pro receptor M-CSF (CD115), tak pro GM-CSF receptor (CD116) (Obrázek 15 - B).



Obrázek 15. Expresse cytokinových receptorů pro M-CSF (CD115) a GM-CSF (CD116).

Lze modelovat liniový přesmyk v in vitro a in vivo podmínkách?

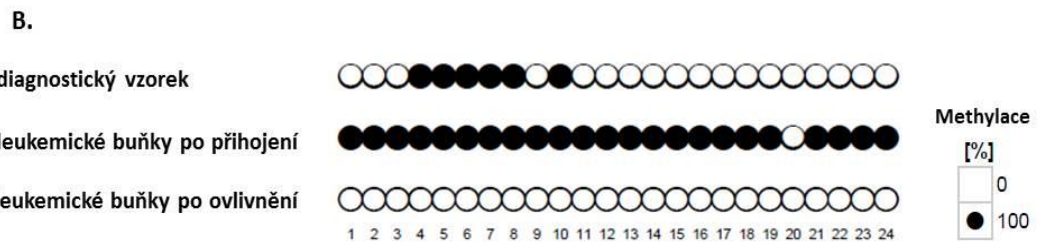
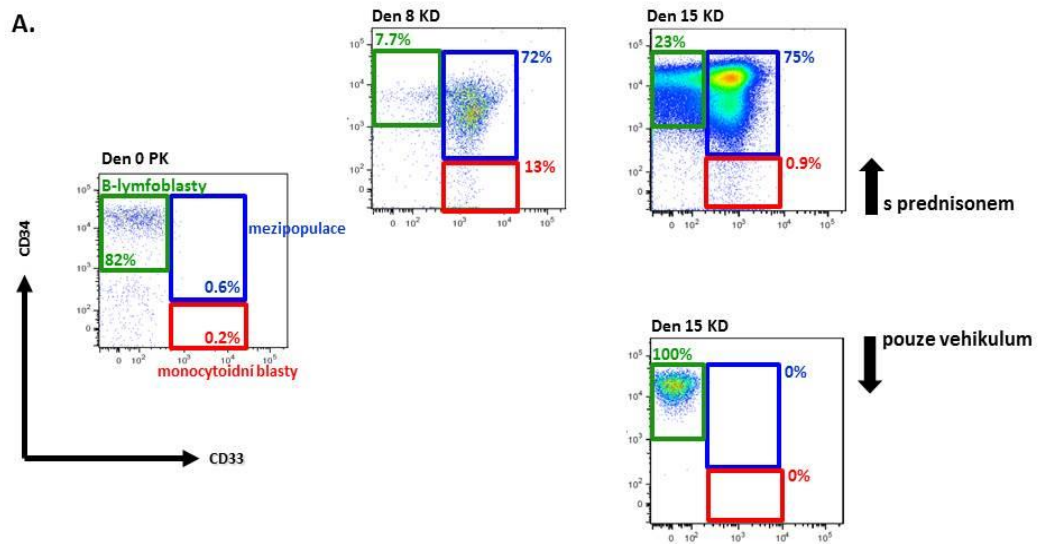
Pacienti jsou během časné fáze léčby do dne 8 léčení pomocí glukokortikoidů a metotrexátu intrathékálně. Pomocí glukokortikoidů jsme chtěli simulovat indukční fázi léčby ALL. Leukemické buňky jsme ovlivnili glukokortikoidy (prednisonem) v *in vitro* podmínkách ve třech různých koncentracích. Dostatek materiálu pro *in vitro* test jsme získali od 4 swALL pacientů a 8 pacientů s BCP ALL. SwALL leukemické buňky reagovaly na ovlivnění prednisonem sníženou expresí lymfoidních antigenů CD19 a CD34, která byla provázena zvýšenou expresí antigenů myeloidních - CD14 a CD33. Leukemické buňky od „ostatních“ kontrolních BCP ALL pacientů imunofenotypové charakteristiky neměnily.

NOD-scid IL2R γ null myší kmen jsme využili pro vytvoření myšího modelu swALL. Do ortotopického modelu jsme transplantovali leukemické buňky celkem od 6 pacientů se swALL. Úspěšného příhojení jsme dosáhli pouze ve dvou případech swALL (33%). Přejídné příhojení, kdy jsme zachytili leukemické buňky v periferní krvi transplantovaných myší, jsme detekovali u dvou swALL případů. U přejídně příhojených leukemických buněk swALL jsme nepozorovali příhojení leukemických buněk ani v kostní dřeni, ani ve slezině. Podařilo se nám tedy namnožit leukemické buňky od dvou swALL pacientů. Výtěžek byl 10^7

leukemických buněk ze sleziny a 5×10^6 leukemických buněk z kostní dřeni. Výtěžky byly ale nižší, než je obvykle pozorováno po amplifikaci BCP ALL v tomto myším modelu.

Jelikož došlo k příhojení pouze u dvou případů swALL, zaměřili jsme se na molekulárně-genetické pozadí. K úspěšnému příhojení došlo u pacientů, kteří jako jediní ze skupiny swALL nesli hypermetylační změny v CEBPA promotoru (tyto změny jsme našli i v leukemických buňkách po úspěšném příhojení).

In vivo jsme simulovali časnou fázi léčby prednisonem v dávkách, které jsou ekvivalentní léčebným hodnotám. Cílem bylo simulovat liniový přesmyk během časné fáze léčby. Leukemické buňky od jednoho pacienta se swALL byly příhojeny na hladině 60%, intraperitoneální aplikace prednisonu probíhala à 24 hodin. V den 8 léčby a v den 15 léčby jsme zaznamenali imunofenotypové změny blastů směrem do monocytoidní linie. Docházelo ke snížení exprese antigenu CD34 a zvýšení exprese antigenu CD33, nicméně změny v antigenech CD19 a CD14 jsme nepozorovali (Obrázek 16. – A). V kontrolní skupině NSG myšího modelu jsme žádné změny nezaznamenali. Leukemické buňky jsme následně po stimulaci glukokortikoidy podrobili epigenetické analýze. V CEBPA promotoru došlo po léčbě prednisonem k hypomethylaci (Obrázek 16. – B).



Obrázek 16. *In vivo* modelace liniového přesmyku.

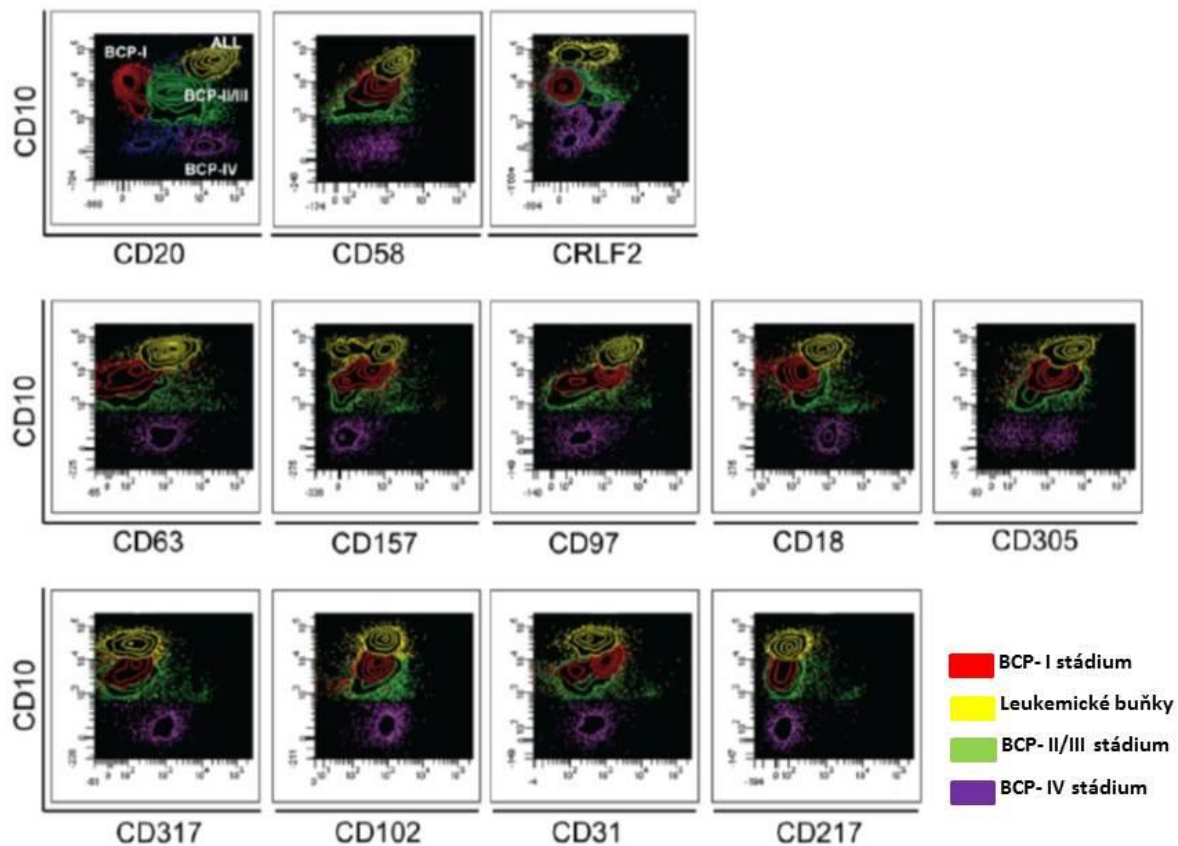
Jakým způsobem lze hledat nové cíle vhodné pro reziduální nemoc cytometricky nejen u pacientů se swALL?

Proteomická analýza leukemických buněk odhaluje nové znaky, které jsou asociované s leukemiemi a mohou zlepšit diagnostický proces a následné monitorování minimální reziduální nemoci. Na spolupracujícím pracovišti byl vytvořen nový koncept, který spojuje využití leukemických xenotransplantačních modelů s chemoproteomickou technologií CSC (Cell Surface Capture), který umožňuje komplexně zkoumat povrchové znaky buněk. Identifikace nových znaků, které jsou asociované s leukemiemi, byla provedena porovnáním povrchovými znaky oproti genové expresi na normálních hematopoetických buňkách. Celkem jsme se zaměřili na devět kandidátních antigenů, které byly měřeny pomocí průtokové cytometrie (Mirkowska et al. 2013).

Kandidátními antigeny, které by pomohly rozlišit leukemické buňky od fyziologických protějšků byly CD157 (adenosin 5'- difosfát – ribosyl cyklasa 2), CD97, CD18 (integrin β 2), CD102 (intracelulární adhezní molekula 2), CD305 (leukocyty asociovaný a podobný imunoglobulinovému receptoru receptor 1) a CD63 (granulophysin). Zejména významné by byly při stanovení minimální reziduální nemoci pomocí průtokové cytometrie.

Stabilita kandidátních antigenů byla testována u pacientů, od kterých jsme měli dostatek materiálu z diagnózy a ze dne 15 léčby. V průběhu léčby jsme nepozorovali změny v antigenech CD97 a CD157, zatímco antigeny CD102 a CD317 snižovaly expresi a CD305 a CD63 zvyšovaly expresi. CD157 a CD63 byly navíc statisticky signifikantně více exprimovány na leukemických buňkách ALL ve srovnání s nemaligními B buněčnými populacemi. U některých vzorků jsme také pozorovali nižší expresi CD18 oproti kontrolním populacím nemaligních B buněk.

Pacient s diagnostikovaným izolovaným relapsem akutní lymfoblastické leukemie v centrálním nervovém systému měl v kostní dřeni minimální diseminovaná nemoc Leukemickou populaci v kostní dřeni jsme identifikovali dle exprese klasických antigenů CD10, CD58 a CRLF2 na pozadí nemaligního vývoje B lymfocytů. U antigenů CD63, CD157, CD97, CD18 a CD305 jsme našli vyšší expresi na leukemických buňkách, exprese antigenů CD317, CD102, CD31 a CD217 se nelišila od prvního vývojového stádia nemaligních B lymfocytů (Obrázek 17.).



Obrázek 17. Identifikace leukemických buněk u pacienta s relapsem BCP ALL v centrálním nervovém systému (Mirkowska et al. 2013). Červeně je zobrazena fyziologická populace BCP-I, která je definována jako $CD10^+$, $CD20^-$, zeleně je zobrazena populace BCP-II/III, definována jako $CD10^+$, $CD20^+$, fialově je zobrazena populace BCP-IV, definována jako $CD10^-$, $CD20^+$. Leukemická populace je znázorněna žlutě.

5. Diskuze a závěr

Objevili jsme unikátní skupinu pacientů s B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií, u kterých dochází k liniovému přesmyku do monocytoidní linie během časné fáze léčby. Incidence tohoto subtypu je neočekávaně vysoká, mezi „ostatními“ subtypy B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie tvoří 3-4%. swALL pacienti nenesou genetické aberace, které byly popsány u liniové nestability jako je monozomie 7 a přestavby *MLL* genu (Rossi et al. 2012; Stasik et al. 2006; Fujisaki et al. 1999).

Všichni pacienti swALL jsou definováni aberantní expresí antigenu CD2 v diagnóze. Antigen CD2 je adhezivní molekula, která se nachází na povrchu T lymfocytů a na buňkách NK buňkách. Je součástí imunoglobulinové rodiny, skládá se ze dvou domén, které jsou podobné imunoglobulinům. CD2 se váže na další adhezivní molekuly (CD58) a podílí se též na kostimulaci T a NK buněk (Yang et al. 2001). V prospektivní kohortě jsme našli 41% pacientů, kteří měli aberantní expresi antigenu CD2 v diagnóze a zároveň jsme u nich pozorovali jedinečný swALL fenomén.

V průběhu liniovému přesmyku jsme identifikovali mezipopulaci, která sdílí lymfoidní a myeloidní znaky. Tato mezipopulace je důležitou součástí naší definice ALL s liniovým přesmykem do monocytoidní linie. V den 8 léčby byla mezipopulace signifikantně více zastoupena u pacientů se swALL oproti CD2^{poz} vzorkům bez pozorovaného liniového přesmyku a CD2^{neg} vzorkům. Zajímavé je, že se mezipopulace vyskytovala i u kohorty CD2^{poz} vzorků bez pozorovaného liniového přesmyku v porovnání s CD2^{neg} vzorky bez liniového přesmyku, u kterých se mezipopulace nevyskytuje. Myslíme si, že mezi pacienty s aberantní expresí antigenu CD2 a bez pozorovaného liniového přesmyku mohou být i pacienti, u kterých bychom dokázali zachytit liniový přesmyk při častější frekvenci vyšetřování (např. den 1, 2, 3 od diagnózy). Liniový přesmyk je dynamický proces, ke kterému dochází v prvních dnech léčby, v pozdějších časových bodech proto můžeme minout záchyt tohoto fenoménu. Při následné monitoraci minimální reziduální nemoci pomocí průtokové cytometrie dochází k selhání protilátkových panelů navržených pro sledování B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie. Průtoková cytometrie má omezené možnosti v identifikaci minimální reziduální nemoci u swALL. Dochází k diskrepancím mezi minimální reziduální nemocí měřenou pomocí průtokové cytometrie a pomocí přestaveb Ig/

TCR, protože swALL buňky mění v průběhu léčby imunofenotypové vlastnosti, ale přestavby Ig/TCR si zachovávají.

SwALL leukemické blasty snižují expresi antigenů CD19 a CD34 a zvyšují expresi antigenů CD33 a CD14, které však nejsou součástí standardních panelů pro sledování BCP ALL. V posledním stádiu liniového přesmyku blastů zatím nejsme schopni odlišit nemaligní monocyty od maligních dle imunofenotypových znaků.

Liniový přesmyk můžeme charakterizovat jako proces, kdy buňky procházejí jednotlivými stádii od B lymfoblastů, přes mezipopulaci, která nese myeloidní i lymfoidní charakteristiky, do posledního stádia monocytoidních blastů. Nejedná se o existenci dvou klonů leukemických buněk či o leukemické buňky, které exprimují znaky z více linií. Že se jedná o původní klon leukemických buněk, ověřujeme pomocí klonálně specifických přestaveb Ig/TCR.

Zvýšení exprese *C/EBPα* genu dokáže změnit buněčný osud. Dochází k transdiferenciaci B lymfocytů do makrofágů (Di Tullio et al. 2011; Xie et al. 2004). V experimentálních modelech je někdy vyžadována i změna exprese dalšího transkripčního faktoru (*PU.1*), aby došlo k plné diferenciaci do makrofágů (Laslo et al. 2006). *C/EBPα* gen přímo reguluje expresi *PU.1* transkripčního faktoru a receptoru pro *GM-CSF* (Hohaus et al. 1995)(Yeaman et al. 2007). U swALL jsme prokázali signifikantně sníženou expresi *C/EBPα* genu v porovnání s AML a signifikantně zvýšenou v porovnání s B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií. V separované mezipopulaci pozorujeme stabilní hladinu exprese *C/EBPα* genu, zvýšenou hladinu exprese myeloidních genů *PU.1* a *GM-CSF* receptoru a sníženou hladinu B lymfoidních genů *EBF-1* a *PAX-5*. Změny v genové expresi ukazují na změnu buněčného typu z B lymfoidního do myeloidního. Zvýšená exprese *C/EBPα* genu byla prokázána u pacientů s B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií, kteří nesou chromosomální translokaci t(14;19)(q32;q13) (Robinson et al. 2004). U žádného pacienta se swALL jsme neprokázali popsanou translokaci, která by mohla způsobit zvýšenou hladinu exprese *C/EBPα* genu. *C/EBPα* gen je regulován methylačními změnami v CEBPA promotoru (Wouters et al. 2009). Naprostá většina pacientů se swALL (17 z 19) měla hypometylovaný CEBPA promotor, což ukazuje na mechanismus, kterým zřejmě dochází ke zvýšené expresi *C/EBPα* genu. Popsán byl nový subset BCP ALL, u kterého byla zachycena *ERG* delece, ukázalo se, že je převážně tvořen CD2^{poz} pacienty. Leukemické buňky se podobaly monocytoidním buňkám pomocí morfologie (Clappier et al. 2013; Zaliouva et al. 2013). V našem souboru swALL jsme zachytili *ERG* deleci u 4/15 pacientů.

Xenotransplantační modely jsou využívány k amplifikaci vzácného materiálu od pacientů s akutní leukémií a poskytují zároveň možnost simulace onemocnění *in vivo* (Meyer et al. 2011). Leukemické buňky z B prekurzorových akutních lymfoblastických leukémií se v NSG myším kmeni přihojí s frekvencí větší než 70% (Schmitz et al. 2011). Vzorky swALL se však úspěšně přihojili pouze ve 33%. Nepřihojil se žádný vzorek, který by nesl hypomethylační změny v CEBPA promotoru. Přihojili se pouze dva swALL vzorky, které nesly methylační změny CEBPA promotoru. Omezené možnosti přihojení swALL v NSG myším kmeni mohou být dány vlastnostmi, které jsou charakteristické pro tyto leukemické buňky (Meyer et al. 2011). Bylo ukázáno, že v *in vivo* modelech může převažovat tumor supresorová aktivita *C/EBPα* genu, po níž následně nedochází k úspěšnému přihojování (Quintana-Bustamante et al. 2012). Úspěšně přihojených swALL leukemických buněk jsme využili k *in vivo* simulaci časné fáze léčby pomocí glukokortikoidů. V den 8 a den 15 léčby jsme dokázali zachytit liniový přesmyk, který však nebyl plně vyjádřený. Leukemické buňky zároveň při stimulaci glukokortikoidy měnily epigenetické pozadí ve smyslu hypomethylace CEBPA promotoru. Liniový přesmyk pod vlivem glukokortikoidů jsem simulovali i *in vitro*, kde jsme pozorovali sníženou expresi lymfoidních znaků provázenou zvýšenou expresí antigenů myeloidních, tedy fenomén liniového přesmyku.

Počáteční pomalá odpověď na léčbu je jedním z faktorů, který předurčuje zvýšené riziko relapsu onemocnění (Conter et al. 2010). U většiny pacientů se swALL (11 z 18) jsme zachytili v den 33 léčby vyšší hladinu minimální reziduální nemoci (rovnou nebo větší než 10^{-3}) pomocí Ig/TCR přestaveb. Protože swALL pacienti odpovídají pomaleji na počáteční fázi léčby (den 0- týden 12), léčba zohledňující rozdělení pacientů podle minimální reziduální nemoci měřené molekulárně-geneticky je tedy vhodná pro pacienty se swALL. Prognóza swALL pacientů se neukazuje být horší než u skupiny „ostatní“ BCP ALL. Nicméně je nutno tento fskt ověřit na větší kohortě pacientů. Pacienti přestavbou genu *MLL* a s liniovým přesmykem mají však prognózu velmi špatnou (Rossi et al. 2012).

6. Souhrn

Akutní leukemie můžeme rozdělit na leukemie z myeloidní linie (akutní myeloidní leukemie) a z lymfoidní linie (akutní lymfoblastická leukemie). Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastější maligním onemocněním v dětském věku. Akutní myeloidní a akutní lymfoblastická leukemie se liší jak léčbou, tak prognózou onemocnění. K liniovému přesmyku během časné fáze léčby dochází vzácně. Liniový přesmyk je definovaný kompletní změnou hematopoetické vývojové linie. Ačkoli dochází ke změně liniového zařazení, tak si buňky stále zachovávají molekulárně-genetické a cytogenetické vlastnosti.

Podarilo se nám objevit jedinečnou skupinu pacientů, u kterých dochází k liniovému přesmyku do monocytoidní linie během časné fáze léčby z původně diagnostikované B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie. Skupinu těchto pacientů nazýváme swALL (“switching” ALL, lineage switch).

Cílem naší práce bylo definovat vzorec liniového přesmyku, podle kterého můžeme pacienty identifikovat, potvrdit, že se jedná o stejný leukemický klon, nalézt společné molekulárně-genetické vlastnosti a namodelovat liniový přesmyk v laboratorních *in vitro* a *in vivo* podmínkách.

swALL vzorky definujeme aberantní expresí antigenu CD2 v diagnóze B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie. Popsali jsme jednotlivá stádia liniového přesmyku. Prvním stádiem je populace B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie, která nese znaky CD19 a CD34. Druhým stádiem je populace, která se vyznačují expresí jak lymfoidních, tak myeloidních znaků a nazýváme ji mezipopulace. Mezipopulace exprimuje znaky CD19, CD34, CD33 a CD14 současně. Třetím stádiem je populace monocytoidních blastů, které exprimují antigeny CD14 a CD33. Liniový přesmyk je dynamický proces, ke kterému dochází v prvních dnech léčby. Zachycení liniového přesmyku závisí tudíž na možnostech pravidelné a časté monitorace onemocnění v průběhu léčby. V jednotlivých stádiích liniového přesmyku jsme identifikovali shodné Ig/TCR přestavby a potvrdili tak, že se jedná o jediný klon buněk, který prochází procesem transdiferenciace.

swALL skupina B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie je euploidní podle DNA indexu. U žádného swALL vzorku jsme neidentifikovali přestavby genu *MLL*, ani přestavby *FLT3/ITD*, *BCR-ABL1*, *E2A-PBX1* nebo *ETV6/RUNX1*. Cytogeneticky jsme nezachytili žádné

běžné genetické aberace. U většiny swALL pacientů jsme ale našli zvýšenou expresi genu *C/EBPα*, která byla doprovázena epigenetickými změnami v CEBPA promotoru. Hypomethylační změny v CEBPA promotoru korelovaly se zvýšenou hladinou exprese genu *C/EBPα*. V průběhu liniového přesmyku do monocytoidní dochází v separovaných subpopulacích ke zvyšování exprese myeloidních genů a snižování exprese lymfoidních genů. Cytokinové receptory charakteristické pro myeloidní buňky (M-CSF a GM-CSF) byly na proteinové úrovni zvýšené na monocytoidních blastech. K rozlišení swALL a podskupiny „ostatní“ BCP ALL mohou podle genové exprese pomoci následující kandidátní geny. Ke skupině genů se zvýšenou hladinou u swALL patří *C/EBPα*, *C/EBPβ*, *GATA-3*, *CSF1*, *S100A10*, *ITGA6*, *Id2* a *IKZF2*, ke genům se sníženou mRNA hladinou patří *C/EBPε*, *LTK* a *AIF1*.

Modelace liniového přesmyku v podmínkách *in vitro* probíhá po ovlivnění leukemických buněk glukokortikoidy, které se používají v prvních dnech léčby dle léčebných protokolů. Leukemické buňky jsou schopné liniového přesmyku v *in vitro* podmínkách. V *in vivo* podmínkách se v myším modelu přihojili pouze leukemické buňky od dvou pacientů se swALL, kteří jsou ale charakterističtí hypermethylovanými v CEBPA promotoru. Přihojené swALL leukemické buňky byly schopné při stimulaci glukokortikoidy částečně zrekapitulovat liniový přesmyk. Po ovlivnění glukokortikoidy došlo k rychlé hypomethylaci CEBPA promotoru, který pozorujeme u všech ostatních swALL pacientů.

Tato práce identifikovala novou skupinu B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie s přesmykem do monocytoidní linie během časně fáze léčby a popsala imunofenotypové a molekulárně-genetické vlastnosti, kterými se swALL liší od ostatních subtypů akutních leukémií.

7. Summary

Acute leukemia can be divided into leukemia arising from myeloid lineage (acute myeloid leukemia) and lymphoid lineage (acute lymphoblastic leukemia). Acute lymphoblastic leukemia is the most common malignancy in childhood. Acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic differ in the treatment strategy and prognosis. The lineage switch during the early phase of the treatment is rare event. Lineage switch is defined by a complete change of hematopoietic lineage. Although the lineage switch occurs the cells still retain the molecular – genetic and cytogenetic features.

We discovered a unique group of patients with B cell precursor leukemia with lineage switch towards monocytoid lineage during the early phase of the treatment. We call this leukemia subtype as swALL ("switching" ALL, lineage switch).

The aim of my project was to define the algorithm for swALL identification, analyze the relation between lymphoid and monocytoid fraction, search for common molecular-genetic characteristics of swALLs and simulate the lineage switch *in vitro* and *in vivo*.

SwALL samples were characterised by the aberrant expression of CD2 antigen on blasts at diagnosis. We described the stages of lineage switch phenomenon. The first stage is a population of precursor B acute lymphoblastic leukemia, which is characterized by expression of CD19 and CD34 antigens, the second stage is called interpopulation and is characterized by the co - expression of lymphoid and myeloid markers (especially CD19 and CD14) The third stage is the population of monocytoid blasts which express antigens CD14 and CD33 and lacks CD19. Lineage switch is a dynamic process, which occurs in the first weeks of the treatment. For recognition of lineage switch phenomenon is needed frequent cytometric monitoring during the first two weeks of the therapy. We identified the same Ig / TCR rearrangements in each stage of lineage switch phenomenon and transdifferentiation of one clone is the most probably explanation of swALL phenomenon.

SwALL group of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia is euploid according to DNA index. None of swALL samples carried rearrangements of *MLL* gene or fusion genes as *FLT3/ITD*, *BCR-ABL1*, *E2A-PBX1* or *ETV6/RUNX1*. Common genetic aberrations were not found by cytogenetic. Majority of swALL patients had increased expression of *C/EBP α* gene, which was followed by epigenetic changes in CEBPA promoter. Hypomethylation

changes in CEBPA promoter correlated with increased levels of *C/EBPα* gene expression. In sorted subpopulations from the lineage switch towards monocytoid lineage we observed increased expression of myeloid genes and decreased expression of lymphoid genes. Cytokine receptors (*M-CSF* and *GM-CSF*) were expressed on monocytoid blasts. Levels of mRNAs of following genes were increased in swALLs in comparison to other BCP ALL subtypes: *C/EBPα*, *C/EBPβ*, *GATA-3*, *CSF1*, *S100A10*, *ITGA6*, *Id2* and *IKZF2*. Levels of following genes were decreased in swALLs: *C/EBPε*, *LTK* and *AIF1*. Thawed swALL blasts influenced by glucocorticoids recapitulated lineage switch phenomenon *in vitro*. The successful engraftment in mouse model was achieved only with leukemic cells from two swALL patients who were characterized by hypermethylation in the CEBPA promoter. Engrafted swALL leukemic cells were also able to recapitulate the lineage switch phenomenon after the glucocorticoid treatment. In my PhD project I studied various aspects of a new subtype of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with lineage switch towards monocytoid lineage during the early phase of the treatment. The lineage switch phenomenon can be expected in patients with aberrant expression of CD2 and during the switch characteristic immunophenotypic features typical. Lineage switch is accompanied by significant changes in expression of lymphoid and myeloid genes and hypomethylation in CEBPA promoter is present in almost all swALL cases.

8. Seznam použitých zkratk

| | |
|--------|---|
| ABL1 | Abelson gene |
| AIEOP | Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica Associazione |
| AHL | acute hybrid leukemia |
| AL | akutní leukémie, acute leukemia |
| ALL | akutní lymfoblastická leukemie |
| allo | allogenic transplanattion |
| AML | akutní myeloidní leukemie |
| APC | allophycocyanin |
| APC-H7 | allophycocyanin hilite 7 |
| BCP | B cell precursor |
| BCR | breakpoint cluster region |
| BFM | Berlin – Frankfurt – Münster (pracovní skupina) |
| bp | base pair |
| BSA | bovine serum albumin |
| BTG4 | B-cell translocation gene 4 |
| bZIP | The Basic Leucine Zipper Domain |
| cALL | common ALL |
| CD | cluster of differentiation |
| cDNA | complementary DNA |
| CDKN2A | cyclin-dependent kinase inhibitor 2A |

| | |
|-----------------|--|
| C/EBP α | CCAAT enhancer binding protein alpha |
| C/EBP β | CCAAT enhancer binding protein beta |
| CFU-GEMM | Colony Forming Unit Granulocyte- Erythrocyte- Monocyte- Megakaryocyte |
| CFU-MegE | Colony Forming Unit Erythrocyte- Megakaryocyte |
| CFU-GM | Colony Forming Unit Granulocyte- Monocyte |
| CLIP | Childhood Leukemia Investigation Prague |
| CO ₂ | oxid uhličítý |
| c-KIT | gen pro receptor pro stem cell faktor |
| CR | complete remission |
| CRLF2 | cytokine receptor-like factor 2 |
| CSC | Cell Surface Capture |
| CSF1R | Colony stimulating factor 1 receptor |
| CSF2RA | Colony Stimulating Factor 2 Receptor Alpha |
| Cy | cyanine dye |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| Dnmt | DNA (cytosine-5-)- methyltransferase |
| dNTPs | deoxynukleotidy |
| DNX | DaunoXome |
| dsDNA | double-stranded DNA |
| E2A | immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47 |
| EBF1 | early B cell factor 1 |

| | |
|----------|---|
| ECD | phycoerythrin-Texas Red conjugate |
| EDTA | ethylenediamine tetraacetic acid |
| EGIL | The European Group for the Immunological classification of Leukemias |
| ela2 | neutrophil Elastase Neutrophil Elastase 2 |
| FAB | French-American-British cooperative group |
| FBS | fetal bovine serum |
| FITC | fluoresceinisothiocyanat |
| FLA | FLAG |
| FLT3-ITD | Internal tandem duplications of Flt3 |
| FOXE3 | Forkhead box protein E3 |
| Fwd | forward |
| GM-CSFR | receptor for Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HSCs | hematopoietic stem cells |
| HR | high risk |
| H7 | hilite 7 |
| Ig | imunoglobulin |
| Ig/TCR | přestavby genů pro imunoglobuliny a receptory T lymfocytů |
| IKZF1 | Ikaros family zinc finger 1 |
| IR | střední riziko, intermediate risk |
| JAK | Janus kinase |
| Klf4 | Kruppel-like factor 4 |

| | |
|---------|---|
| KD | kostní dřeň |
| KO | krome orange |
| LB | Luria Broth Base |
| Mac- 1 | macrophage-1 antigen |
| M-CSFR | receptor for macrophage colony- stimulating factor |
| MLL | mixed lineage leukemia |
| MMLV RT | Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase |
| MPAL | Mixed - phenotype acute leukemia |
| MR | medium risk |
| MRN | minimální reziduální nemoc |
| MSD | matched sibling donor |
| MUD | matched unrelated donor |
| mRNA | messenger RNA |
| MYOD1 | myogenic differentiation 1 |
| Nfe2 | nuclear factor, erythroid 2 |
| NOD | non-obese diabetic |
| NPM1 | nucleophosmin |
| NSG | NOD scid gamma |
| Oct-4 | octamer-binding transcription factor 4 |
| PAX-5 | paired box gene 5 |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PB | pacific blue |

| | |
|-----------|---|
| pB | BCP ALL |
| pB/non HR | BCP ALL non high risk |
| PerCP | peridinin chlorophyll protein |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PC7 | phycoerythrin conjugated with Cyanine 7 |
| pCRT | preventive cranial radiotherapy |
| PE | phycoerythrin |
| PPARG | peroxisome proliferator-activated receptor gamma |
| PGR | prednisin good response |
| PO | pacific orange |
| Pou5f1 | POU class 5 homeobox 1 |
| PPR | prednison poor response |
| PTPN11 | tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 |
| qPCR | quantitative polymerase chain reaction |
| qRT-PCR | quantitative reverse transcription polymerase chain reaction |
| RAG | recombination activating gene |
| Rev | reverse |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RT | reverzní transkripce |
| RUNX1 | Runt-related transcription factor 1/ acute myeloid leukemia 1 protein |
| SCID | severe combined immunodeficiency disease |
| SCT | stem cell transplantation |

| | |
|----------|-------------------------------------|
| SFRP1 | secreted frizzled-related protein 1 |
| SOX2 | sex-determining region Y (SRY)-Box2 |
| SR | standard risk |
| swALL | “switching” ALL |
| T ALL | akutní T lymfoblastická leukemie |
| TCF3 | transcription factor 3 |
| TCR | T cell receptor |
| TET2 | tet methylcytosine dioxygenase 2 |
| T/non HR | T ALL non high risk |
| VPREB | Immunoglobulin Iota Chain |
| WHO | World Health Organization |
| WT1 | Wilms tumor 1 |

9. Seznam použité literatury dle ISO-690

AKASHI, K, D TRAVER, T MIYAMOTO and I L WEISSMAN, 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* [online]. vol. 404, no. 6774, pp. 193–197. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10724173

ARICO, M, M G VALSECCHI, B CAMITTA, M SCHRAPPE, J CHESSELLS, A BARUCHEL, P GAYNON, L SILVERMAN, G JANKA-SCHAUB, W KAMPS, C H PUI and G MASERA, 2000. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* [online]. vol. 342, no. 14, pp. 998–1006. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10749961

BEKKER-JENSEN, Simon, Niels MAILAND and Ubiquitin Signaling GROUP, 2012. Cell Cycle News & Views Ubiquitin and the DNA damage response : A new handle on histones. pp. 3153–3158.

BENE ET AL., 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. vol. 9, no. 10, pp. 1783–6.

BENNETT, J M, D CATOVSKY, M T DANIEL, G FLANDRIN, D A GALTON, H R GRALNICK and C SULTAN, 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* [online]. 8., vol. 33, no. 4, pp. 451–8 [accessed. 7. August 2014]. ISSN 0007-1048. Retrieved z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/188440>

BIERINGS, M, T SZCZEPANSKI, E R VAN WERING, M J WILLEMSE, A W LANGERAK, T REVESZ and J J VAN DONGEN, 2001. Two consecutive immunophenotypic switches in a child with immunogenotypically stable acute leukaemia. *Br J Haematol* [online]. 2001/06/19 ed. vol. 113, no. 3, pp. 757–762. Retrieved z: doi:bjh2772 [pii]

BOER, Monique L Den, Marjon Van SLEGTENHORST, Renée X De MENEZES, Laura J C M Van ZUTVEN, H Berna BEVERLOO, Peter J Van Der SPEK, Gaby ESCHERICH, Martin A HORSTMANN and Gritta E JANKA-SCHAUB, 2009. NIH Public Access [online]. vol. 10, no. 2, pp. 125–134. Retrieved z: doi:10.1016/S1470-2045(08)70339-5.A

BOROWITZ ET AL., 2008a. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *WHO Press, Geneva*. pp. 176–8, 171–5, 168–70, 150–1.

BOROWITZ, M J, M -C. BÉNÉ, N L HARRIS, A PORWIT and E MATUTES, 2008b. *Acute leukemias of ambiguous lineage*. Geneva: WHO Press.

BOSMA, M, W SCHULER and G BOSMA, 1988. The scid mouse mutant. *Current topics in microbiology and immunology* [online]. 1., vol. 137, pp. 197–202 [accessed. 25. August 2014]. ISSN 0070-217X. Retrieved z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3416632>

BURKE ET AL., 2014. Epigenetic modifications in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in pediatrics* [online]. 1., vol. 2, no. May, p. 42 [accessed. 9. August 2014]. ISSN 2296-2360. Retrieved z: [doi:10.3389/fped.2014.00042](https://doi.org/10.3389/fped.2014.00042)

CARIO, G, M ZIMMERMANN, R ROMÉY, S GESK, I VATER, J HARBOTT, A SCHRAUDER, A MOERICKE, S IZRAELI, T AKASAKA, M J DYER, R SIEBERT, M SCHRAPPE and M STANULLA, 2010. 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* [online]. vol. 115, no. 26, pp. 5393–5397. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20378752

CARIO, Gunnar, Peter RHEIN, Rita MITLÖHNER, Martin ZIMMERMANN, Obul R BANDAPALLI, Renja ROMÉY, Anja MOERICKE, Wolf-Dieter LUDWIG, Richard RATEI, Martina U MUCKENTHALER, Andreas E KULOZIK, Martin SCHRAPPE, Martin STANULLA and Leonid KARAWAJEW, 2014. High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica* [online]. 1., vol. 99, no. 1, pp. 103–110 [accessed. 9. June 2014]. ISSN 1592-8721. Retrieved z: [doi:10.3324/haematol.2013.090225](https://doi.org/10.3324/haematol.2013.090225)

CIVIN, C I, T TRISCHMANN, N S KADAN, J DAVIS, S NOGA, K COHEN, B DUFFY, I GROENEWEGEN, J WILEY, P LAW, A HARDWICK, F OLDHAM and A GEE, 1996. Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* [online]. vol. 14, no. 8, pp. 2224–2233. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8708711

CLAPPIER, E, M F AUCLERC, J RAPION, M BAKKUS, A CAYE, A KHEMIRI, C GIROUX, L HERNANDEZ, E KABONGO, S SAVOLA, T LEBLANC, K YAKOUBEN, G PLAT, V COSTA, A FERSTER, S GIRARD, O FENNETEAU, J M CAYUELA, F SIGAUX, N DASTUGUE, S SUCIU, Y BENOIT, Y BERTRAND, J SOULIER and H CAVE, 2013. An intragenic ERG deletion (ERG) is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia* [online]. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24064621

CONTER ET AL., 2014. Childhood high-risk acute lymphoblastic leukemia in first remission: results after chemotherapy or transplant from the AIEOP ALL 2000 study. *Blood* [online]. 6.3., vol. 123, no. 10, pp. 1470–8 [accessed. 25. August 2014]. ISSN 1528-0020. Retrieved z: [doi:10.1182/blood-2013-10-532598](https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532598)

CONTER, V, C R BARTRAM, M G VALSECCHI, A SCHRAUDER, R PANZER-GRUMAYER, A MORICKE, M ARICO, M ZIMMERMANN, G MANN, G DE ROSSI, M STANULLA, F LOCATELLI, G BASSO, F NIGGLI, E BARISONE, G HENZE, W D LUDWIG, O A HAAS, G CAZZANIGA, R KOEHLER, D SILVESTRI, J BRADTKE, R PARASOLE, R BEIER, J J VAN DONGEN, A BIONDI and M SCHRAPPE, 2010. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* [online]. vol. 115, no. 16, pp. 3206–3214. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20154213

COUSTAN-SMITH, Elaine, Guangchun SONG, Christopher CLARK, Laura KEY, Peixin LIU, Mohammad MEHRPOOYA, Patricia STOW, Xiaoping SU, Sheila SHURTLEFF, Ching-hon PUI, James R DOWNING and Dario CAMPANA, 2011. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia [online]. vol. 117, no. 23, pp. 1–3. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2010-12-324004.The

CREUTZIG, U, J HARBOTT, C SPERLING, J RITTER, M ZIMMERMANN, H LÖFFLER, H RIEHM, G SCHELLONG and W D LUDWIG, 1995. Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood* [online]. 15.10., vol. 86, no. 8, pp. 3097–108. ISSN 0006-4971. Retrieved z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579404>

CREUTZIG, Ursula, Marry M Van Den HEUVEL-EIBRINK, Brenda GIBSON, Michael N DWORZAK, Souichi ADACHI, Eveline De BONT, Jochen HARBOTT, Henrik HASLE, Donna JOHNSTON, Akitoshi KINOSHITA, Thomas LEHRNBECHER, Guy LEVERGER, Ester MEJSTRIKOVA, Soheil MESHINCHI, Andrea PESSION, Susana C RAIMONDI and Lillian SUNG, 2012. Review article Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents : recommendations from an international expert panel [online]. vol. 120, no. 16, pp. 3187–3205. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2012-03-362608.

DAVIS ET AL., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* [online]. vol. 334, pp. 395–402. ISSN 0028-0836. Retrieved z: doi:10.1038/334395a0

DI TULLIO, A, T P MANH, A SCHUBERT, R MANSSON and T GRAF, 2011. CCAAT/enhancer binding protein {alpha} (C/EBP{alpha})-induced transdifferentiation of pre-B cells into macrophages involves no overt retrodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. 2011/10/05 ed. vol. 108, no. 41, pp. 17016–17021. Retrieved z: doi:1112169108 [pii] 10.1073/pnas.1112169108

DOULATOV, S, F NOTTA, K EPPERT, L T NGUYEN, P S OHASHI and J E DICK, 2010. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* [online]. vol. 11, no. 7, pp. 585–593. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20543838

DWORZAK, M N, G GAIPA, A SCHUMICH, O MAGLIA, R RATEI, M VELTRONI, Z HUSAK, G BASSO, L KARAWAJEW, H GADNER and A BIONDI, 2010. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy

is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* [online]. 2010/03/05 ed. vol. 78, no. 3, pp. 147–153. Retrieved z: doi:10.1002/cyto.b.20516

DWORZAK, M N, A SCHUMICH, D PRINTZ, U POTSCHEGER, Z HUSAK, A ATTARBASCHI, G BASSO, G GAIPA, R RATEI, G MANN and H GADNER, 2008. CD20 up-regulation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction treatment: setting the stage for anti-CD20 directed immunotherapy. *Blood* [online]. 2008/09/11 ed. vol. 112, no. 10, pp. 3982–3988. Retrieved z: doi:blood-2008-06-164129 [pii] 10.1182/blood-2008-06-164129

ECKERT, C, T FLOHR, R KOEHLER, N HAGEDORN, a MOERICKE, M STANULLA, R KIRSCHNER-SCHWABE, G CARIO, Av STACKELBERG, C R BARTRAM, G HENZE, M SCHRAPPE and a SCHRAUDER, 2011. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. *Leukemia* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, 8., vol. 25, no. 8, pp. 1305–13 [accessed. 11. August 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2011.89

FASAN, Annette, Tamara ALPERMANN, Claudia HAFERLACH, Vera GROSSMANN, Andreas ROLLER, Alexander KOHLMANN, Christiane EDER, Wolfgang KERN, Torsten HAFERLACH and Susanne SCHNITTGER, 2013. Frequency and Prognostic Impact of CEBPA Proximal, Distal and Core Promoter Methylation in Normal Karyotype AML: A Study on 623 Cases. *PLoS ONE*. vol. 8, no. 2.

FIGUEROA, Maria E, Sanne LUGTHART, Yushan LI, Claudia ERPELINCK-VERSCHUEREN, Paul J CHRISTOS, Elizabeth SCHIFANO, James BOOTH, Wim Van PUTTEN, Fabien CAMPAGNE, Madhu MAZUMDAR, John M GREALLY, J M PETER, Bob LÖWENBERG, Ruud DELWEL and Ari MELNICK, 2010. NIH Public Access [online]. vol. 17, no. 1, pp. 13–27. Retrieved z: doi:10.1016/j.ccr.2009.11.020.DNA

FITZGIBBON ET AL., 2004. Mutation of CEBPA in Familial Acute Myeloid Leukemia. pp. 2403–2407.

FRONKOVA, E, E MEJSTRIKOVA, S AVIGAD, K W CHIK, L CASTILLO, S MANOR, L REZNICKOVA, T VALOVA, K ZDRAHALOVA, O HRUSAK, Y JABALI, M SCHRAPPE, V CONTER, S IZRAELI, C K LI, B STARK, J STARY and J TRKA, 2008. 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* [online]. 2008/02/29 ed. vol. 22, no. 5, pp. 989–997. Retrieved z: doi:leu200822 [pii] 10.1038/leu.2008.22

FUJISAKI, H, J HARA, K TAKAI, K NAKANISHI, Y MATSUDA, H OHTA, Y OSUGI, S TOKIMASA, M TANIKE, G HOSOI, M SAKO and S OKADA, 1999. Lineage switch in childhood leukemia with monosomy 7 and reverse of lineage switch in severe combined immunodeficient mice. *Exp Hematol* [online]. 1999/05/26 ed. vol. 27, no. 5, pp. 826–833. Retrieved z: doi:S0301-472X(99)00008-9 [pii]

GAIPA, G, G BASSO, S ALIPRANDI, M MIGLIAVACCA, C VALLINOTO, O MAGLIA, A FAINI, M VELTRONI, D HUSAK, A SCHUMICH, R RATEI, A BIONDI and M N

DWORZAK, 2008. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom* [online]. 2008/02/14 ed. vol. 74, no. 3, pp. 150–155. Retrieved z: doi:10.1002/cyto.b.20408

GREAVES, M F, L C CHAN, A J FURLEY, S M WATT and H V MOLGAARD, 1986. Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* [online]. vol. 67, no. 1, pp. 1–11. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3079640

HANNA, Jacob, Styliani MARKOULAKI, Patrick SCHORDERET, Bryce W CAREY, Caroline BEARD, Marius WERNIG, Menno P CREYGHTON, Eveline J STEINE, John P CASSADY, Ruth FOREMAN, Christopher J LENGNER, Jessica a DAUSMAN and Rudolf JAENISCH, 2008. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* [online]. 18.4., vol. 133, no. 2, pp. 250–64 [accessed. 24. May 2014]. ISSN 1097-4172. Retrieved z: doi:10.1016/j.cell.2008.03.028

HARRISON, Christine J, Anthony V MOORMAN, Zoë J BROADFIELD, Kan L CHEUNG, Rachel L HARRIS, G REZA JALALI, Hazel M ROBINSON, Kerry E BARBER, Sue M RICHARDS, Christopher D MITCHELL, Tim O B EDEN, Ian M HANN, Frank G H HILL, Sally E KINSEY, Brenda E S GIBSON, John LILLEYMAN, Ajay VORA, Anthony H GOLDSTONE, Ian M FRANKLIN, Jill DURRANT and Mary MARTINEAU, 2004. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* [online]. 6., vol. 125, no. 5, pp. 552–9 [accessed. 11. August 2014]. ISSN 0007-1048. Retrieved z: doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04948.x

HARVEY, R C, C G MULLIGHAN, I M CHEN, W WHARTON, F M MIKHAIL, A J CARROLL, H KANG, W LIU, K K DOBBIN, M A SMITH, W L CARROLL, M DEVIDAS, W P BOWMAN, B M CAMITTA, G H REAMAN, S P HUNGER, J R DOWNING and C L WILLMAN, 2010. 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* [online]. vol. 115, no. 26, pp. 5312–5321. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20139093

HASSAN, R, I OTAZU, M H ORNELLAS, V PIRES, M K CARRICO, H SEUANEZ, D TABAK and I ZALCBERG, 2004. A child with Philadelphia positive (Ph+)-acute leukemia with myeloid morphology: one case of stem cell origin. *Leuk Lymphoma* [online]. 2004/06/30 ed. vol. 45, no. 9, pp. 1925–1929. Retrieved z: doi:10.1080/10428190410001663662 R9D86YCTD4YRHKAE [pii]

HELBLING, Daniel, Beatrice U MUELLER, Nikolai a TIMCHENKO, Anne HAGEMEIJER, Martine JOTTERAND, Sandrine MEYER-MONARD, Andrew LISTER, Janet D ROWLEY, Barbara HUEGLI, Martin F FEY and Thomas PABST, 2004. The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EV11 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 7.9., vol. 101, no. 36, pp. 13312–7. ISSN 0027-8424. Retrieved z: doi:10.1073/pnas.0404731101

HENDRICKS-TAYLOR, L R, L L BACHINSKI, M J SICILIANO, a FERTITTA, B TRASK, P J DE JONG, D H LEDBETTER and G J DARLINGTON, 1992. The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* [online]. 9., vol. 14, no. 1, pp. 12–7. ISSN 0888-7543. Retrieved z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1427819>

HOHAUS, S, M S PETROVICK, M T VOSO, Z SUN, D E ZHANG and D G TENEN, 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* [online]. vol. 15, no. 10, pp. 5830–5845. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7565736

HRUSAK ET AL., 2002. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* [online]. vol. 16, no. 7, pp. 1233–58 [accessed. 29. July 2014]. ISSN 0887-6924. Retrieved z: [doi:10.1038/sj.leu.2402504](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402504)

CHAPIRO, E, L RUSSELL, I RADFORD-WEISS, C BASTARD, M LESSARD, S STRUSKI, H CAVE, S FERT-FERRER, C BARIN, O MAAREK, V DELLA-VALLE, J C STREFFORD, R BERGER, C J HARRISON, O A BERNARD and F NGUYEN-KHAC, 2006. Overexpression of CEBPA resulting from the translocation t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [online]. vol. 108, no. 10, pp. 3560–3563. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16873674

CHOMCZYNSKI, Piotr, 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. vol. 159, pp. 156–159.

IMATAKI, O, H OHNISHI, G YAMAOKA, T ARAI, A KITANAKA, Y KUBOTA, Y KUSHIDA, T ISHIDA and T TANAKA, 2010. Lineage switch from precursor B cell acute lymphoblastic leukemia to acute monocytic leukemia at relapse. *Int J Clin Oncol* [online]. 2010/01/13 ed. vol. 15, no. 1, pp. 112–115. Retrieved z: [doi:10.1007/s10147-009-0007-3](https://doi.org/10.1007/s10147-009-0007-3)

JONES, Peter a, 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews. Genetics* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, 7., vol. 13, no. 7, pp. 484–92 [accessed. 10. July 2014]. ISSN 1471-0064. Retrieved z: [doi:10.1038/nrg3230](https://doi.org/10.1038/nrg3230)

KAWAMOTO ET AL., 2009. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* [online]. 2009/04/10 ed. vol. 30, no. 5, pp. 193–200. Retrieved z: [doi:S1471-4906\(09\)00065-9 \[pii\] 10.1016/j.it.2009.03.001](https://doi.org/10.1016/j.it.2009.03.001)

KONDO, M, I L WEISSMAN and K AKASHI, 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* [online]. vol. 91, no. 5, pp. 661–672. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9393859

KOSCHMIEDER, S, B HALMOS, E LEVANTINI and D G TENEN, 2009. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* [online]. vol. 27, no. 4, pp. 619–628. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19075268

LADETTO, M, M BRÜGGEMANN, L MONITILLO, S FERRERO, F PEPIN, D DRANDI, D BARBERO, a PALUMBO, R PASSERA, M BOCCADORO, M RITGEN, N GÖKBUGET, J ZHENG, V CARLTON, H TRAUTMANN, M FAHAM and C POTT, 2014. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* [online]. 6., vol. 28, no. 6, pp. 1299–307 [accessed. 9. July 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2013.375

LASLO, P, C J SPOONER, A WARMFLASH, D W LANCKI, H J LEE, R SCIAMMAS, B N GANTNER, A R DINNER and H SINGH, 2006. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* [online]. vol. 126, no. 4, pp. 755–766. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16923394

LODISH ET AL., 2003. Molecular cell biology. *Freeman and Co.*

MATSUDA, F, K ISHII, P BOURVAGNET, K I KUMA, H HAYASHIDA, T MIYATA and T HONJO, 1998. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *The Journal of experimental medicine* [online]. 7.12., vol. 188, no. 11, pp. 2151–62. ISSN 0022-1007. Retrieved z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

MAYER, Jiří, Jan STARÝ and ET AL., 2002. *Leukemie.*

MCCLURE, R, J KHOURY, A FELDMAN and R KETTERLING, 2010. Clonal relationship between precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia and histiocytic sarcoma: a case report and discussion in the context of similar cases. *Leuk Res* [online]. 2009/09/12 ed. vol. 34, no. 2, pp. e71–3. Retrieved z: doi:S0145-2126(09)00431-7 [pii] 10.1016/j.leukres.2009.08.020

MEJSTRIKOVA, E, E FRONKOVA, T KALINA, M OMELKA, D BATINIC, K DUBRAVCIC, K POSPISILOVA, M VASKOVA, D LURIA, S H CHENG, M NG, Y LEUNG, J KAPPELMAYER, F KISS, S IZRAELI, B STARK, M SCHRAPPE, J TRKA, J STARY and O HRUSAK, 2010a. Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* [online]. 2009/09/18 ed. vol. 54, no. 1, pp. 62–70. Retrieved z: doi:10.1002/pbc.22261

MEJSTRIKOVA, Ester, Jana VOLEJNIKOVA, Eva FRONKOVA, Katerina ZDRAHALOVA, Tomas KALINA, Jaroslav STERBA, Yahia JABALI, Vladimir MIHAL, Bohumir BLAZEK, Zdena CERNA, Daniela PROCHAZKOVA, Jiri HAK, Zuzana ZEMANOVA, Marie JAROSOVA, Alexandra OLTOVA, Petr SEDLACEK, Jiri SCHWARZ, Jan ZUNA, Jan TRKA, Jan STARY and Ondrej HRUSAK, 2010b. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent

immunophenotypic criteria. *Haematologica* [online]. 6., vol. 95, no. 6, pp. 928–35 [accessed. 26. May 2014]. ISSN 1592-8721. Retrieved z: doi:10.3324/haematol.2009.014506

MEYER ET AL., 2011. Diversity of human leukemia xenograft mouse models: implications for disease biology. *Cancer research* [online]. 12., vol. 71, no. 23, pp. 7141–4. ISSN 1538-7445. Retrieved z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1732

MIRKOWSKA, Paulina, Andreas HOFMANN, Lukasz SEDEK, Lucie SLAMOVA, Ester MEJSTRIKOVA, Tomasz SZCZEPANSKI, Maike SCHMITZ, Gunnar CARIO, Martin STANULLA, Martin SCHRAPPE, Vincent H J VAN DER VELDEN, Beat C BORNHAUSER, Bernd WOLLSCHIED and Jean-Pierre BOURQUIN, 2013. Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features. *Blood* [online]. 20.6., vol. 121, no. 25, pp. e149–59 [accessed. 18. July 2014]. ISSN 1528-0020. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2012-11-468702

MONTECINO-RODRIGUEZ, E, H LEATHERS and K DORSHKIND, 2001. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol* [online]. 2001/03/29 ed. vol. 2, no. 1, pp. 83–88. Retrieved z: doi:10.1038/83210

MÖRICKE, a, M ZIMMERMANN, a REITER, G HENZE, a SCHRAUDER, H GADNER, W D LUDWIG, J RITTER, J HARBOTT, G MANN, T KLINGEBIEL, F ZINTL, C NIEMEYER, B KREMENS, F NIGGLI, D NIETHAMMER, K WELTE, M STANULLA, E ODENWALD, H RIEHM and M SCHRAPPE, 2010. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* [online]. 2., vol. 24, no. 2, pp. 265–84 [accessed. 4. June 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2009.257

MULLIGHAN, C G, J R COLLINS-UNDERWOOD, L A PHILLIPS, M G LOUDIN, W LIU, J ZHANG, J MA, E COUSTAN-SMITH, R C HARVEY, C L WILLMAN, F M MIKHAIL, J MEYER, A J CARROLL, R T WILLIAMS, J CHENG, N A HEEREMA, G BASSO, A PESSION, C H PUI, S C RAIMONDI, S P HUNGER, J R DOWNING, W L CARROLL and K R RABIN, 2009. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* [online]. vol. 41, no. 11, pp. 1243–1246. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19838194

NACHMAN, James B, Nyla A HEEREMA, Harland SATHER, Bruce CAMITTA, Erik FORESTIER, Christine J HARRISON, Nicole DASTUGUE, Martin SCHRAPPE, Ching-hon PUI, Giuseppe BASSO, Lewis B SILVERMAN and Gritta E JANKA-SCHAUB, 2007. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia [online]. vol. 110, no. 4, pp. 1112–1115. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2006-07-038299.The

NORDLUND, Jessica, Christofer L BÄCKLIN, Per WAHLBERG, Stephan BUSCHE, Eva C BERGLUND, Maija-Leena ELORANTA, Trond FLAEGSTAD, Erik FORESTIER, Britt-Marie FROST, Arja HARILA-SAARI, Mats HEYMAN, Olafur G JÓNSSON, Rolf LARSSON, Josefine PALLE, Lars RÖNNBLÖM, Kjeld SCHMIEGELOW, Daniel SINNETT, Stefan SÖDERHÄLL, Tomi PASTINEN, Mats G GUSTAFSSON, Gudmar LÖNNERHOLM and Ann-Christine SYVÄNEN, 2013. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome biology*

[online]. 1., vol. 14, no. 9, p. r105 [accessed. 5. June 2014]. ISSN 1465-6914. Retrieved z: doi:10.1186/gb-2013-14-9-r105

PABST, T, B U MUELLER, N HARAKAWA, C SCHOCH, T HAFERLACH, G BEHRE, W HIDDEMANN, D E ZHANG and D G TENEN, 2001. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBP α in t(8;21) myeloid leukemia. *Nature medicine* [online]. vol. 7, pp. 444–451. ISSN 1078-8956. Retrieved z: doi:10.1038/86515

PAGNI, F, G FAZIO, S ZANNELLA, M SPINELLI, C DE ANGELIS, C CUSI, F CROSTI, L CORRAL, C BUGARIN, a BIONDI, G CAZZANIGA, G ISIMBALDI and G CATTORETTI, 2014. The role of PAX5 and C/EBP α/β in atypical non-Langerhans cell histiocytic tumor post acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* [online]. 6., vol. 28, no. 6, pp. 1377–9 [accessed. 12. June 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2014.87

PARK, Meerim, Kyung Nam KOH, Bo Eun KIM, Ho Joon IM, Seongsoo JANG, Chan-Jeoung PARK, Hyun-Sook CHI and Jong Jin SEO, 2011. Lineage switch at relapse of childhood acute leukemia: a report of four cases. *Journal of Korean medical science* [online]. 6., vol. 26, no. 6, pp. 829–31 [accessed. 11. June 2014]. ISSN 1598-6357. Retrieved z: doi:10.3346/jkms.2011.26.6.829

PERROTTI, Danilo, Vincenzo CESI, Rossana TROTTA, Clara GUERZONI, Giorgia SANTILLI, Kenneth CAMPBELL, Angela IERVOLINO, Fabrizio CONDORELLI, Carlo GAMBACORTI-PASSERINI, Michael A CALIGIURI and Bruno CALABRETTA, 2002. BCR-ABL suppresses C/EBP[α] expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* [online]. 1., vol. 30, no. 1, pp. 48–58. ISSN 1061-4036. Retrieved z: <http://dx.doi.org/10.1038/ng791>

PIETERS, R, M SCHRAPPE, P DE LORENZO, I HANN, G DE ROSSI, M FELICE, L HOVI, T LEBLANC, T SZCZEPANSKI, A FERSTER, G JANKA, J RUBNITZ, L SILVERMAN, J STARY, M CAMPBELL, C K LI, G MANN, R SUPPIAH, A BIONDI, A VORA and M G VALSECCHI, 2007. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* [online]. 2007/07/31 ed. vol. 370, no. 9583, pp. 240–250. Retrieved z: doi:S0140-6736(07)61126-X [pii] 10.1016/S0140-6736(07)61126-X

PONGERS-WILLEMSE, M J, T SERIU, F STOLZ, E D'ANIELLO, P GAMEIRO, P PISA, M GONZALEZ, C R BARTRAM, E R PANZER-GRUMAYER, A BIONDI, J F SAN MIGUEL and J J VAN DONGEN, 1999. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investiga. *Leukemia* [online]. vol. 13, no. 1, pp. 110–118. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10049045

PUI, C H, 2004. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc* [online]. vol. 103, no. 2, pp. 85–95. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15083238

PUI, C H, W L CARROLL, S MESHINCHI and R J ARCECI, 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* [online]. vol. 29, no. 5, pp. 551–565. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21220611

QUINTANA-BUSTAMANTE, O, S LAN-LAN SMITH, E GRIESSINGER, Y REYAL, J VARGAFTIG, T a LISTER, J FITZGIBBON and D BONNET, 2012. Overexpression of wild-type or mutants forms of CEBPA alter normal human hematopoiesis. *Leukemia* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, 7., vol. 26, no. 7, pp. 1537–46 [accessed. 17. July 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2012.38

RAPINO, F, E F ROBLES, J A RICHTER-LARREA, E M KALLIN, J A MARTINEZ-CLIMENT and T GRAF, 2013. C/EBPalpha induces highly efficient macrophage transdifferentiation of B lymphoma and leukemia cell lines and impairs their tumorigenicity. *Cell Rep* [online]. vol. 3, no. 4, pp. 1153–1163. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23545498

RENNEVILLE, A, C ROUMIER, V BIGGIO, O NIBOUREL, N BOISSEL, P FENAUX and C PREUDHOMME, 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* [online]. vol. 22, no. 5, pp. 915–931. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18288131

ROBINSON, H M, K E TAYLOR, G R JALALI, K L CHEUNG, C J HARRISON and A V MOORMAN, 2004. t(14;19)(q32;q13): a recurrent translocation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* [online]. vol. 39, no. 1, pp. 88–92. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14603446

RODRÍGUEZ-UBREVA, Javier, Laura CIUDAD, David GÓMEZ-CABRERO, Maribel PARRA, Lars H BUSSMANN, Alessandro DI TULLIO, Eric M KALLIN, Jesper TEGNÉR, Thomas GRAF and Esteban BALLESTAR, 2012. Pre-B cell to macrophage transdifferentiation without significant promoter DNA methylation changes. *Nucleic acids research* [online]. 3., vol. 40, no. 5, pp. 1954–68 [accessed. 5. June 2014]. ISSN 1362-4962. Retrieved z: doi:10.1093/nar/gkr1015

RONGVAUX, Anthony, Tim WILLINGER, Hitoshi TAKIZAWA, Chozhavendan RATHINAM, Wojtek AUERBACH, Andrew J MURPHY, David M VALENZUELA, George D YANCOPOULOS, Elizabeth E EYNON, Sean STEVENS, Markus G MANZ and Richard a FLAVELL, 2011. Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 8.2., vol. 108, no. 6, pp. 2378–83 [accessed. 25. May 2014]. ISSN 1091-6490. Retrieved z: doi:10.1073/pnas.1019524108

ROSSI, J G, A R BERNASCONI, C N ALONSO, P L RUBIO, M S GALLEGU, C A CARRARA, M R GUITTER, S E EBERLE, M COCCE, P A ZUBIZARRETA and M S FELICE, 2012. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor

outcome. *Am J Hematol* [online]. Retrieved z:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22685031

SELLICK, G S, H E SPENDLOVE, D CATOVSKY, K PRITCHARD-JONES and R S HOULSTON, 2005. Further evidence that germline CEBPA mutations cause dominant inheritance of acute myeloid leukaemia. *Leukemia* [online]. 7., vol. 19, no. 7, pp. 1276–8 [accessed. 15. August 2014]. ISSN 0887-6924. Retrieved z: doi:10.1038/sj.leu.2403788

SCHMITZ, M, P BREITHAUPT, N SCHEIDEGGER, G CARIO, L BONAPACE, B MEISSNER, P MIRKOWSKA, J TCHINDA, F K NIGGLI, M STANULLA, M SCHRAPPE, A SCHRAUDER, B C BORNHAUSER and J P BOURQUIN, 2011. Xenografts of highly resistant leukemia recapitulate the clonal composition of the leukemogenic compartment. *Blood* [online]. vol. 118, no. 7, pp. 1854–1864. Retrieved z:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21670474

SCHOOFS, T, W E BERDEL and C MÜLLER-TIDOW, 2014. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* [online]. vol. 28, no. 1, pp. 1–14. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2013.242

SMITH ET AL., 2004. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. vol. 2, no. 351, pp. 2403–2407.

STARY, Jan, Martin ZIMMERMANN, Myriam CAMPBELL, Luis CASTILLO, Eduardo DIBAR, Svetlana DONSKA, Alejandro GONZALEZ, Shai IZRAELI, Dragana JANIC, Janez JAZBEC, Josip KONJA, Emilia KAISEROVA, Jerzy KOWALCZYK, Gabor KOVACS, Chi-Kong LI, Edina MAGYAROSY, Alexander POPA, Batia STARK, Yahia JABALI, Jan TRKA, Ondrej HRUSAK, Hansjörg RIEHM, Giuseppe MASERA and Martin SCHRAPPE, 2014. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [online]. 20.1., vol. 32, no. 3, pp. 174–84 [accessed. 30. May 2014]. ISSN 1527-7755. Retrieved z: doi:10.1200/JCO.2013.48.6522

STASIK, C, S GANGULY, M T CUNNINGHAM, S HAGEMMEISTER and D L PERSONS, 2006. Infant acute lymphoblastic leukemia with t(11;16)(q23;p13.3) and lineage switch into acute monoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* [online]. 2006/07/18 ed. vol. 168, no. 2, pp. 146–149. Retrieved z: doi:S0165-4608(06)00107-5 [pii] 10.1016/j.cancergencyto.2006.02.013

SZCZEPANSKI, Tomasz, Alberto ORFAO, Vincent H J VAN DER VELDEN, Jesus F. SAN MIGUEL and Jacques J M VAN DONGEN, 2001. *Minimal residual disease in leukaemia patients* [online]. 2001. ISBN 1470-2045 (Print)r1470-2045. Retrieved z: doi:10.1016/S1470-2045(00)00418-6

TASKESEN, Erdogan, Lars BULLINGER, Andrea CORBACIOGLU, Mathijs A SANDERS, Claudia A J ERPELINCK, Bas J WOUTERS, Sonja C Van Der Poel-van De LUYTGAARDE, Frederik DAMM, Arnold GANSER, Richard F SCHLENK, Bob LO, Ruud DELWEL and Hartmut DO, 2011. Prognostic impact , concurrent genetic mutations , and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically

normal AML patients : further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity [online]. vol. 117, no. 8, pp. 2469–2475. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2010-09-307280.

VAN DEN ANCKER, W, M TERWIJN, T M WESTERS, P a MERLE, E VAN BECKHOVEN, a M DRÄGER, G J OSSENKOPPELE and a a VAN DE LOOSDRECHT, 2010. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO2008 classification. *Leukemia* [online]. 7., vol. 24, no. 7, pp. 1392–6 [accessed. 25. August 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2010.119

VAN DER VELDEN ET AL., 2009. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* [online]. 2009/03/12 ed. vol. 538, pp. 115–150. Retrieved z: doi:10.1007/978-1-59745-418-6_7

VAN DER VELDEN, V H, G CAZZANIGA, A SCHRAUDER, J HANCOCK, P BADER, E R PANZER-GRUMAYER, T FLOHR, R SUTTON, H CAVE, H O MADSEN, J M CAYUELA, J TRKA, C ECKERT, L FORONI, U ZUR STADT, K BELDJORD, T RAFF, C E VAN DER SCHOOT and J J VAN DONGEN, 2007. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* [online]. 2007/02/09 ed. vol. 21, no. 4, pp. 604–611. Retrieved z: doi:2404586 [pii] 10.1038/sj.leu.2404586

VAN DER VELDEN, V H, A HOCHHAUS, G CAZZANIGA, T SZCZEPANSKI, J GABERT and J J VAN DONGEN, 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* [online]. vol. 17, no. 6, pp. 1013–1034. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12764363

VAN DONGEN, J J, A W LANGERAK, M BRUGGEMANN, P A EVANS, M HUMMEL, F L LAVENDER, E DELABESSE, F DAVI, E SCHUURING, R GARCIA-SANZ, J H VAN KRIEKEN, J DROESE, D GONZALEZ, C BASTARD, H E WHITE, M SPAARGAREN, M GONZALEZ, A PARREIRA, J L SMITH, G J MORGAN, M KNEBA and E A MACINTYRE, 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* [online]. vol. 17, no. 12, pp. 2257–2317. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14671650

VAN DONGEN, J J, E a MACINTYRE, J a GABERT, E DELABESSE, V ROSSI, G SAGLIO, E GOTTARDI, a RAMBALDI, G DOTTI, F GRIESINGER, a PARREIRA, P GAMEIRO, M G DIÁZ, M MALEC, a W LANGERAK, J F SAN MIGUEL and a BIONDI, 1999. 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* [online]. 12., vol. 13, no. 12, pp. 1901–28. ISSN 0887-6924. Retrieved z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602411>

VARDIMAN, J W, J THIELE, D A ARBER, R D BRUNNING, M J BOROWITZ, A PORWIT, N L HARRIS, M M LE BEAU, E HELLSTROM-LINDBERG, A TEFFERI and C D BLOOMFIELD, 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* [online]. 2009/04/10 ed. vol. 114, no. 5, pp. 937–951. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2009-03-209262 [pii] 10.1182/blood-2009-03-209262

VOLEJNIKOVA ET AL., 2012. Stanovení mimodřeňové leukemické infiltrace u dětské akutní lymfoblastické leukémie a jeho klinické využití. *Transfuze Hematol. dnes.* vol. 3, pp. 124–129.

WEINBERG ET AL., 2010. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, 11., vol. 24, no. 11, pp. 1844–51 [accessed. 11. June 2014]. ISSN 1476-5551. Retrieved z: doi:10.1038/leu.2010.202

WESTON, Brent W, Melissa A HAYDEN, Kathryn G ROBERTS, Susan BOWYER, Johann HSU, George FEDORIW, Kathleen W RAO and Charles G MULLIGHAN, 2013. Tyrosine kinase inhibitor therapy induces remission in a patient with refractory EBF1-PDGFRB-positive acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [online]. 1.9., vol. 31, no. 25, pp. e413–6 [accessed. 3. August 2014]. ISSN 1527-7755. Retrieved z: doi:10.1200/JCO.2012.47.6770

WOGNUM, A W, A C EAVES and T E THOMAS, 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* [online]. vol. 34, no. 6, pp. 461–475. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14734086

WONG, Nicholas C, David ASHLEY, Zac CHATTERTON, Mandy PARKINSON-BATES, Hong Kiat NG, Minhee S HALEMBA, Adam KOWALCZYK, Justin BEDO, Qiao WANG, Katrina BELL, Elizabeth ALGAR, Jeffrey M CRAIG and Richard SAFFERY, 2012. A distinct DNA methylation signature defines pediatric pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* [online]. 1.6., vol. 7, no. 6, pp. 535–41. ISSN 1559-2308. Retrieved z: doi:10.4161/epi.20193

WOUTERS, B J, B LOWENBERG, C A ERPELINCK-VERSCHUEREN, W L VAN PUTTEN, P J VALK and R DELWEL, 2009. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* [online]. 2009/01/28 ed. vol. 113, no. 13, pp. 3088–3091. Retrieved z: doi:10.1182/blood-2008-09-179895 [pii] 10.1182/blood-2008-09-179895

XIE, H, M YE, R FENG and T GRAF, 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* [online]. 2004/05/28 ed. vol. 117, no. 5, pp. 663–676. Retrieved z: doi:10.1016/j.cell.2004.04.019 [pii] doi:S0092867404004192 [pii]

YANG, J J, Y YE, A CARROLL, W YANG and H W LEE, 2001. Structural biology of the cell adhesion protein CD2: alternatively folded states and structure-function relation. *Curr Protein Pept Sci* [online]. 2002/10/09 ed. vol. 2, no. 1, pp. 1–17. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12369898

YEAMANS, C, D WANG, I PAZ-PRIEL, B E TORBETT, D G TENEN and A D FRIEDMAN, 2007. C/EBPalpha binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment. *Blood* [online]. vol. 110, no. 9, pp. 3136–3142. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17671233

ZALIOVA, M, O ZIMMERMANOVA, P DORGE, C ECKERT, A MORICKE, M ZIMMERMANN, J STUCHLY, A TEIGLER-SCHLEGEL, B MEISSNER, R KOEHLER, C R BARTRAM, L KARAWAJEW, P RHEIN, J ZUNA, M SCHRAPPE, G CARIO and M STANULLA, 2013. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* [online]. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24072102

ZILLER, Michael J., Fabian M??LLER, Jing LIAO, Yingying ZHANG, Hongcang GU, Christoph BOCK, Patrick BOYLE, Charles B. EPSTEIN, Bradley E. BERNSTEIN, Thomas LENGAUER, Andreas GNIRKE and Alexander MEISSNER, 2011. Genomic distribution and Inter-Sample variation of Non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genetics* [online]. vol. 7. ISSN 15537390. Retrieved z: doi:10.1371/journal.pgen.1002389

ZUNA, J, O HRUSAK, M KALINOVA, K MUZIKOVA, J STARY and J TRKA, 1999. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* [online]. vol. 13, no. 1, pp. 22–24. Retrieved z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10049055

10. Přílohy

P1. Slamova L, Starkova J, Fronkova E, Zaliova M, Reznickova L, van Delft FW, Vodickova E, Volejnikova J, Zemanova Z, Polgarova K, Cario G, Figueroa M, Kalina T, Fiser K, Bourquin JP, Bornhauser B, Dworzak M, Zuna J, Trka J, Stary J, Hrusak O, Mejstrikova E. CD2-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to the monocytic lineage. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):609-20. IF = 10,164.

P2.Mirkowska P, Hofmann A, Sedek L, Slamova L, Mejstrikova E, Szczepanski T, Schmitz M, Cario G, Stanulla M, Schrappe M, van der Velden VH, Bornhauser BC, Wollscheid B, Bourquin JP. Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features. *Blood*. 2013 Jun 20;121(25):e149-59 IF= 9,060

P3. Volejníková J, Mejstříková E, Slámová L, Mihál V, Štěrba J, Jabali Y, Procházková D, Blažek B, Hak J, Černá Z, Hrušák O, Starý J, Trka J, Froňková E. Stanovení mimodřeňové leukemické infiltrace u dětské akutní lymfoblastické leukemie a jeho klinické využití. Přehledný článek a vlastní výsledky. *Transfuze Hematol. dnes*, 18, 2012, No. 3, p. 124-129.

P4.

Abstrakta v časopisech s IF:

Ester Mejstrikova, **Lucie Slamova**, Eva Fronkova, Jan Zuna, Jean-Pierre Bourquin, Elena Vodickova, Katerina Muzikova, Zuzana Zemanova, Vendula Pelkova, Frederik Van Delft, Tomas Kalina, Karel Fiser, Petr Smisek, Jan Trka, Jan Stary, and Ondrej Hrusak, MD. B Precursor ALL Subset with Aberrant CD2 Expression and a Specific Predisposition to Early Monocytic Transdifferentiation Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2010 116: Abstract 1708, 2010 American Society of Hematology

Ester Mejstrikova, **Lucie Slamova**, Eva Fronkova, Jana Volejnikova, Katerina Muzikova, Jiri Domansky, Jaroslav Sterba, Ondrej Zapletal, Zuzana Zemanova, Libuse Lizcova, Elena Vodickova, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Stary and Ondrej Hrusak. Acute Bilineal Leukemia Is a Very Rare Entity in Childhood Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011 118: Abstract 4871, 2011 American Society of Hematology

Jean-Pierre Bourquin, Paulina Mirkowska, Ester Mejstrikova, **Lucie Slamova**, Tomasz Szczepanski, Lukasz Sedek, Maike Schmitz, Vincent H.J. van der Velden, Andreas Hofmann, Gunnar Cario, Martin Stanulla, Beat C Bornhauser, and Bernd Wollscheid. Proteomic Exploration of the Cell Surface Landscape Reveals New Leukemia Associated Features. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012 120: Abstract 2506, American Society of Hematology

Lucie Slamova, Julia Starkova, Karel Fiser, Eva Fronkova, Leona Rezkova Reznickova, Marketa Kubricanova Zaliova, Kamila Polgarova, Jan Stary, Jan Trka, Ondrej Hrusak and Ester Mejstrikova. Epigenetic Status Of CEBPA Promoter and Expression Of CEBP α Correlates With Molecular Genetic Subtype and CD2 Aberrant Expression In B Cell Precursor ALL November 15, 2013; Blood: 122 (21)

Přednášky:

Lucie Slámová, Julia Starková, Karel Fišer, Eva Froňková, Leona Rezková Řezníčková, Markéta Kubričanová-Žaliová, Kamila Polgárová, Jan Starý, Jan Trka, Ondřej Hrušák, Ester Mejstříková. Korelace epigenetického pozadí a genové exprese CEBP α genu s molekulárně-

genetickými subtypy BCP-ALL a aberantní expresí antigen CD2. Vědecká konference 2. LF UK, Praha (2014)

Lucie Slámová, Julia Starková, Karel Fišer, Eva Froňková, Leona Rezková Řezníčková, Markéta Kubričanová-Žaliová, Kamila Polgárová, Jan Starý, Jan Trka, Ondřej Hrušák, Ester Mejstříková. Correlation of CEBP α status, aberrant expression of CD2 antigen and molecular genetic subtype in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. 7th Symposium on Advances in Molecular Hematology, Olomouc (2014)

Lucie Slamova, Julia Starkova, Beat C Bornhauser, Eva Fronkova, Marketa Kubricanova Zaliova, Leona Reznickova, Jana Volejnikova, Elena Vodickova, Frederik W Van Delft, Zuzana Zemanova, Gunnar Cario, Tomas Kalina, Karel Fiser, Maria E. Figueroa, Michael Dworzak, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Sary, Ondrej Hrusak, Jean-Pierre Bourquin and Ester Mejstrikova. Epigenetic Changes in CEBP α Gene and Xenotransplantation Model of B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Switching to Monocytoid Lineage During the Early Phase of the Treatment Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012 120: Abstract 876, American Society of Hematology, Oral presentation, Atlanta, USA (2012).

Lucie Slámová, Júlia Starková, Beat C. Bornhauser, Eva Froňková, Leona Řezníčková, Jan Zuna, Karel Fišer, Jan Trka, Jan Starý, Ondřej Hrušák, Jean-Pierre Bourquin, Ester Mejstříková. Xenotransplantační model a epigenetické pozadí transdiferenciace B prekurzorových leukemických blastů do monocytoidní linie. Vědecká konference 2. LF UK, Praha (2012)

Slámová L, Starková J, Bornhauser B.C., Froňková E, Řezníčková L, Zuna J, Fišer K, Zemanová Z, Trka J, Starý J, Hrušák O, Figueroa K, Bourquin JP, Mejstříková E. Xenotransplantační model a epigenetické pozadí liniového přesmyku B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie do monocytoidní linie. XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd, Brno (2012)

Lucie Slamova, Julia Starkova, Beat C. Bornhauser, Eva Fronkova, Marketa Kubricanova Zaliova, Kamila Polgarova, Leona Reznickova, Jana Volejnikova, Elena Vodickova, Frederik

W. van Delft, Zuzana Zemanova, Gunnar Cario, Tomas Kalina, Karel Fiser, M. E. Figueroa, Michael Dworzak, Jan Zuna, Jan Trka, Jan Sary, Ondrej Hrusak, Jean Pierre Bourquin, Ester Mejstříková. Epigenetic Changes in CEBP α Gene and Xenotransplantation Model of B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Switching to Monocytoid Lineage during the Early Phase of the Treatment. 9th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové (2012)