

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a Toxikologická analýza



Bc. Michal Plodík

STUDIUM ÚČINKŮ BLINATUMOMABU A INHIBITORŮ TYROZINOVÝCH
KINÁZ NA ADHEZNÍ SIGNALIZACI BUNĚK AKUTNÍ B-LYMFOLASTICKÉ
LEUKEMIE

The effect of blinatumomab and tyrosine kinase inhibitors on B-acute lymphoblastic
leukemia cell adhesion signaling

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Adam Obr, Ph.D.

Konzultantka: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

PRAHA, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

Poděkování

Nejdříve bych chtěl poděkovat vedoucímu mé práce RNDr. Adamu Obrovi, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Mé poděkování také patří kolegyni Barboře Frdlíkové za pomoc při experimentální části práce. Dále bych chtěl poděkovat kolegům z oddělení proteomiky na Ústavu hematologie a krevní transfuze, za podporu a cenné rady. Poděkování patří také konzultantce prof. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc za spolupráci na formálních záležitostech spojených s provedením práce mimo fakultu. V neposlední řadě děkuji své rodině, přítelkyni a blízkým za plnou psychickou podporu během práce.

Abstrakt

Adhezní signalizace hraje klíčovou roli v mnoha biologických procesech, včetně tvorby imunologických synapsí, které jsou důležité pro efektivní interakci mezi efektorovými a cílovými buňkami imunitního systému. Poruchy adhezních mechanismů mohou vést k progresi onkologických onemocnění, a to jak v rámci rozvoje leukemie, tak i při rezistenci na léčbu a relapsu onemocnění. Cílem této diplomové práce je studium účinků blinatumomabu a inhibitorů tyrozinových kináz (TKI) na adhezní signalizaci buněk akutní B-lymfoblastické leukémie (B-ALL). V práci je podrobně popsán vliv blinatumomabu, bispecifické protilátky zaměřené na CD3 a CD19, a TKI (včetně dasatinibu a ponatinibu) na proliferaci, viabilitu a expresi adhezních molekul na povrchu B-ALL buněk. Součástí práce je i experimentální vyhodnocení vlivu těchto léčiv na klíčové potenciálně onkogenní signální dráhy, zejména Src kináz, a změny ve fosforylaci klíčových proteinů, jako jsou kinázy Erk a Akt zajišťující regulaci proliferace a životaschopnosti buněk. Zjištění této práce ukazují, že kombinace blinatumomabu a TKI může mít významný dopad na adhezní vlastnosti leukemických buněk, což by mohlo přispět k vysvětlení zvýšené incidence relapsů v extramedulárních tkáních u pacientů léčených blinatumomabem.

Klíčová slova

Akutní leukémie, cytotoxická synapse, adhezní molekuly, blinatumomab, inhibitory tyrozinových kináz (TKI), Src kinázy (SFK), Lck, Fyn, Lyn, Erk, Akt, CD19, CD62L, imatinib, dasatinib, ponatinib

Abstract

Adhesion signalling plays a key role in biological processes, including the formation of immunological synapses that are important for efficient interaction between effector and target cells of the immune system. Disturbances in adhesion mechanisms can lead to cancer progression in the development of leukemia and in treatment resistance and relapsing disease. The aim of this thesis is to study the effects of blinatumomab and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) on adhesion signalling in B-lymphoblastic acute leukemia (B-ALL) cells. The effect of blinatumomab, a bispecific antibody targeting CD3 and CD19, and TKIs (including dasatinib and ponatinib) on the proliferation, viability, and expression of adhesion molecules on the surface of B-ALL cells are described in detail. Thesis includes experimental evaluation of the effect of these drugs on key potentially oncogenic signalling pathways, particularly Src family kinases, and changes in phosphorylation of key proteins such as Erk and Akt kinases that provide regulation of cell proliferation and viability. The findings of this work suggest that the combination of blinatumomab and TKIs may have a significant impact on the adhesion properties of leukemia cells, which could help explain the increased incidence of relapse in extramedullary tissues in patients treated with blinatumomab.

Key words

Acute leukemia, cytotoxic synapse, adhesion molecules, blinatumomab, tyrosine kinase inhibitors (TKIs), Src kinase inhibitors (SFKs), Lck, Fyn, Lyn, Erk, Akt, CD19, CD62L, imatinib, dasatinib, ponatinib

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ	9
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Cytotoxická Synapse	11
2.1.1 Struktura cytotoxické synapse.....	11
2.1.2 Rozpoznání cílové buňky a polarizace CTL.....	13
2.1.3 Adheze buněk v imunologické synapsi	13
2.1.4 Interakce s nádorovými buňkami	14
2.2 Blinatumomab	15
2.3 Buněčná adheze.....	17
2.3.1 Buněčná adheze hematopoetických buněk	17
2.3.2 Signalizační dráhy ovlivňující adhezi	18
2.4 Tyrozinkinázy	19
2.4.1 SRC kinázy	19
2.4.2 Struktura a regulace SFK.....	20
2.4.3 Fyn a Lck.....	22
2.4.4 Lyn.....	23
2.4.5 SRC v Hematopoetických b.....	25
2.4.6 SFK v adhezních procesech.....	25
2.5 Proliferační / aktivační kaskády.....	25
2.5.1 ERK.....	26
2.5.2 AKT.....	26
2.6 Akutní leukemie	27
2.6.1 Výskyt a mortalita	27
2.6.2 B-ALL	28
2.6.3 Terapie ALL.....	28
2.7 TKI (Inhibitory tyrozinových kináz)	29
2.7.1 Imatinib.....	29
2.7.2 Dasatinib	30
2.7.3 Ponatinib	31
2.8 Kombinace TKI a Blinatumomabu v klinické praxi	32
2.9 Efekt TKI na expresi CD62L.....	33

3	CÍLE PRÁCE	34
4	MATERIÁL A METODY	35
4.1	Chemikálie	35
4.1.1	<i>Protilátky.....</i>	<i>36</i>
4.2	Buněčné linie	37
4.3	Růstový test	37
4.4	SDS-polyakrylamidová elektroforéza a Western Blotting.....	38
4.4.1	<i>Ošetření buněk pro SDS-elektroforézu</i>	<i>38</i>
4.5	Průtoková cytometrie (cytotoxický test)	39
4.5.1	<i>Základní uspořádání experimentu.....</i>	<i>39</i>
4.5.2	<i>Lymfocyty</i>	<i>40</i>
4.5.3	<i>Cílové buňky</i>	<i>40</i>
4.5.4	<i>Cytotoxický test</i>	<i>40</i>
5	VÝSLEDKY.....	43
5.1	Růstové testy a viabilita B-ALL linií.....	43
5.2	Expres AKT a ERK	47
5.2.1	<i>Expres a fosforylace kinázy Erk v jednotlivých liniích</i>	<i>48</i>
5.2.2	<i>Expres kinázy AKT v jednotlivých liniích</i>	<i>51</i>
5.3	Expres SFK.....	54
5.3.1	<i>Expres P-SRC v linii RAJI</i>	<i>55</i>
5.3.2	<i>Expres P-LCK/FYN</i>	<i>56</i>
5.3.3	<i>Expres kinázy Lyn.....</i>	<i>59</i>
5.4	Cytotoxický test.....	61
5.4.1	<i>Příprava buněk pro cytotoxické testy</i>	<i>61</i>
5.4.2	<i>Výsledky cytotoxického testu.....</i>	<i>61</i>
6	DISKUSE	64
7	ZÁVĚR	73
8	LITERATURA	74

Seznam Zkratek

ALL	- akutní lymfoblastická leukemie
AML	- akutní myeloidní leukemie
APC	- antigen presenting cell, antigen prezentující buňka
B-ALL	- B-lymfoblastická leukemie
BCR	- B-cell receptor, B buněčný receptor
BSA	- bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
CTL	- cytotoxický lymfocyt
ECM	- extracelulární matrice
ICAM	- intercellular adhesion molecule, mezibuněčná adhezní molekula
IFN	- interferon
MDSC	- myeloid derived suppressor cells, myeloidní supresorové buňky
MHC	- major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MTOC	- microtubule-organizing center, organizační centrum mikrotubulů
NK buňka	- Natural killer buňka
Ph	- Philadelphia chromosome, filadelfský chromozom
SDS-PAGE	- polyakrylamidová gelová elektroforéza
SFK	- Src family kinases, kinázy rodiny Src
SH	- Src homology domain, Src homologní doména
SMAC	- supramolecular activation cluster,
TCR	- T-cell receptor, T buněčný receptor
TKI	- Tyrozin kinázový inhibitor

Seznam obrázků

Obr. 1 Cytotoxická synapse	12
Obr. 2 Blinatumomab.....	16
Obr. 3 Regulace Rho-GTPáz v ranné fázi adheze.....	19
Obr. 4 Struktura a regulace kináz rodiny Src.....	21
Obr. 5 Mechanismy aktivace Src kináz.....	22
Obr. 6 Role kinázy Lyn v imunitních buňkách	24
Obr. 7 Struktura imatinibu (medchemexpress.com/Imatinib.html)	30
Obr. 8 Struktura dasatinibu (medchemexpress.com/Dasatinib.html)	30
Obr. 9 Struktura ponatinibu (medchemexpress.com/Ponatinib.html)	31
Obr. 10 Vliv TKI na expresi CD62L na povrchu B-ALL buněk	33
Obr. 11 Reprezentativní souhrn gatovací strategie cytotoxického testu	42
Obr. 12 Vliv inhibitorů tyrozinových kináz na proliferaci B-ALL buněk.....	44
Obr. 13 Vliv inhibitorů tyrozinových kináz na viabilitu B-ALL buněk	45
Obr. 14 Vliv dasatinibu na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk.....	46
Obr. 15 Vliv blinatumomabu na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk	47
Obr. 16 Reprezentativní WB pro p42/p44 Erk na liniích RAJI (A) a ARH-77 (B).....	48
Obr. 17 Reprezentativní imunoblot pro nulovou aktivitu kinázy Erk v linii REH	49
Obr. 18 Relativní změna fosforylace Y202/204 kináz Erk v liniích RAJI a ARH-77	50
Obr. 19 Reprezentativní WB pro P-S473 Akt na liniích ARH-77 (A) a RAJI (B).....	51
Obr. 20 Změny fosforylace S473 kinázy Akt v liniích RAJI, ARH-77 a REH.....	53
Obr. 21 Reprezentativní WB pro nevýrazné aktivity SFK (P-Y416).....	55
Obr. 22 Reprezentativní WB pro P-Y416 SFK na linii RAJI	55
Obr. 23 Změny fosforylace Y416 SFK (P-SRC) v linii RAJI	56
Obr. 24 Reprezentativní WB pro P-Y416 LCK a FYN na liniích ARH-77 (A) a REH (B).....	56
Obr. 25 Změny fosforylace aktivačního místa kináz Lck a Fyn v liniích ARH-77 a REH	58
Obr. 26 Reprezentativní WB pro Lyn na liniích ARH-77 (A) a REH (B).....	59
Obr. 27 Exprese kinázy Lyn (LYN) v liniích ARH-77 a REH	60
Obr. 28 Cytotoxický efekt T-lymfocytů na Ph- B-ALL linie.	62

1 Úvod

Buňky vnímají své okolí a reagují na něj pomocí mechanismů, kterým říkáme buněčná signalizace. Ta je zodpovědná za všechny stavy a jejich změny, které v buňkách může jejich okolí vyvolat.

Jednou z funkčních podkapitol buněčné signalizace je signalizace adhezní. Adhezní mechanismy umožňují buňce kontaktovat okolí, ať už jiné buňky či nebuněčné části organismu, jako je například extracelulární matrix. To má zásadní vliv na buněčný metabolismus, vývoj buněk (například dozrávání krevních buněk v kostní dřeni), či distribuci v organismu (například v případě cílené extravazace leukocytů), ale také na procesy spojené s imunitní reakcí, kdy funkční spojení dvou buněk nazýváme imunologickou synapsí. Adhezní procesy přitom ve formaci a udržení imunologické synapse hrají klíčovou roli, jak si ukážeme později.

Adhezní procesy hrají roli také v mnoha onemocněních – v našem případě u leukémií, a to od momentu vývoje buňky v kostní dřeni (kdy porucha v adhezi může způsobit předčasné vyplavení nezralých, a tudíž nefunkčních buněk do krevního oběhu), přes účinnost (nejen) imunologické terapie (kdy záleží na efektivitě adhezního spojení mezi maligní a efektorovou buňkou), až po eventuální relapsy onemocnění (kdy změna v adhezních vlastnostech maligní buňky může teoreticky vést k zacílení leukemické buňky do nové tkáně, ve které v důsledku může vzniknout relaps).

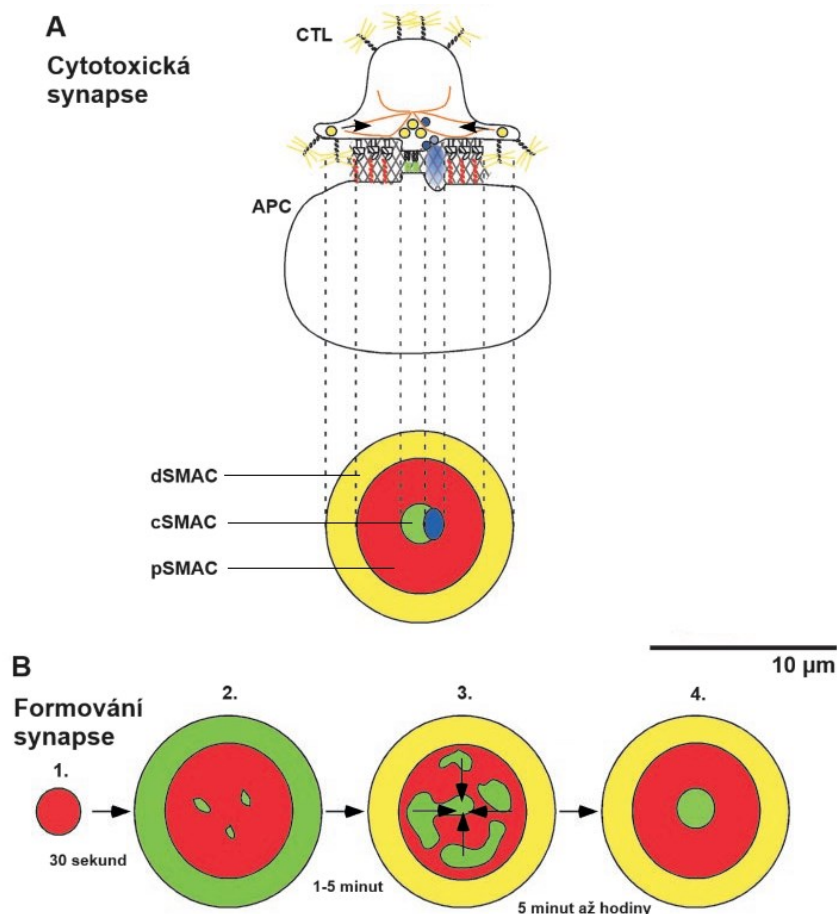
2 Teoretická část

2.1 Cytotoxická Synapse

Cytotoxická synapse je speciální druh mezibuněčného spojení sloužící zpravidla k eliminaci nežádoucí buňky cytotoxickým T lymfocylem (CTL). Po identifikaci cílové buňky jako nežádoucí dochází k vytvoření krátkodobého, ale pevného adhezního spojení mezi cytotoxickým lymfocylem a cílovou buňkou, lymfocyt se polarizuje a do utěsněného prostoru mezi oběma buňkami vyloučí granula obsahující granzymy a perforin. To vede ke smrti cílové buňky (Dustin and Colman, 2002). Studium těchto synapsí poskytuje cenné informace pro vývoj nových terapeutických postupů zaměřených na zlepšení imunitní odpovědi.

2.1.1 Struktura cytotoxické synapse

Cytotoxická synapse svým uspořádáním připomíná terč (**Obr. 1**), jehož funkční „vrstvy“ jsou tvořeny různými druhy molekul. Uprostřed mezibuněčného spoje je centrální supramolekulární aktivační cluster (cSMAC), který obsahuje T buněčné receptory (TCR) a další koaktivační molekuly sloužící k identifikaci stavu cílové buňky a rozhodují o tom, zda bude cytotoxický lymfocyt plně aktivován. cSMAC je obklopen periferním pSMAC, který obsahuje hlavně adhezní molekuly. Ty slouží k stabilizaci samotné synapse a „utěsnění“ spoje (přiblížením membrán obou buněk co nejvíce k sobě). Oblast nejvzdálenější od centra tvoří distální SMAC (dSMAC), který je tvořen hlavně aktinovými filamenty v CTL a slouží k „prozkoumání“ povrchu cílové buňky a zpevnění celé synapse (Dieckmann et al., 2016; Dustin and Colman, 2002; Wurzer et al., 2019).



Obr. 1 | Cytotoxická synapse

A – Skladba cytotoxické synapse mezi cytotoxickým lymfocytem (CTL) a antigen prezentující buňkou (APC). Směrem od středu ke krajům synapse cSMAC (tvořený TCR a koaktivačními molekulami, zelená), pSMAC (obsahující adhezní molekuly, červená), dSMAC (aktinový cytoskelet, žlutá).

B – časový průběh formování synapse. Po prvotním kontaktu buněk (1.) nastává fáze 2., kdy CTL pomocí adhezních molekul spolu s důležitými receptory zjišťuje povahu peptidů prezentovaných APC. Třetí fáze (3.) nastává po úspěšném rozpoznání buňky jako potenciálního cíle pro zničení. Prvotní kontaktní molekuly se shlukují uprostřed synapse a utváří cSMAC jako místo hlavního přenosu informací a cytotoxických částic. Kolem centra vznikají pSMAC a dSMAC obsahující podpůrné adhezní molekuly spolu s aktinovými vlákny. Kompletní synapse (4.) má tedy centrum synapse kde probíhají hlavní cytotoxické děje a okolí, které zajišťuje pevnost a stabilitu synapse. Obrázek převzat a upraven (Dustin and Colman, 2002).

2.1.2 Rozpoznání cílové buňky a polarizace CTL

Téměř všechny buňky v těle mají na svém povrchu molekuly histokompatibilního komplexu MHC-I. Jeho rolí je prezentovat na povrchu buňky fragmenty cytosolických molekul. S peptidy prezentovanými na MHC-I specificky interagují cytotoxické lymfocyty. V případě, že CTL v MHC-I rozpoznají peptid, který nepochází z endogenní molekuly (a tedy signalizuje, že je buňka například napadena virem, nebo že v ní vznikly mutace vedoucí ke změnám v exprimovaných proteinech), dojde ke zpevnění vazby mezi CTL a cílovou buňkou a aktivaci cytotoxických mechanismů (Klemmensen et al., 2003). TCR:MHCp interakce zastaví migraci CTL a spouští navazující signální dráhy imunitní odpovědi (Dustin et al., 1997).

Současným krokem je polarizace obsahu T-buňky, která se synapse účastní, neaktivované buňky totiž cirkulují organismem bez významnější organizace intracelulárního obsahu. Hlavním smyslem polarizace je přiblížit důležité části CTL cílové buňce tak, aby imunitní odpověď byla co nejjednodušší (Sánchez-Madrid and del Pozo, 1999). Dochází například k reorganizaci aktinových filament, posunu MTOC a Golgiho aparátu v buňce a tvorbě nových struktur (Sánchez-Madrid and del Pozo, 1999; Stinchcombe et al., 2001).

2.1.3 Adheze buněk v imunologické synapsi

TCR:MHCp je pouze jedna z několika receptor:antigen interakcí, která je příčinou zastavení migrujícího CTL. Této interakci předchází a doprovází ji řada dalších. Obě buňky mají totiž na svém povrchu negativně nabitý glykokalyx a tento negativní náboj způsobuje elektrostatickou repulzi obou buněk. Na povrchu buněk jsou proto důležité molekuly s dostatečnou délkou, aby mohlo dojít k jejich vzájemnému kontaktu i přes elektrostatické síly. Po aktivaci T-lymfocytů navíc dochází k snížení celkového negativního

náboje na jejich povrchu a odpudivá síla se tak snižuje (Bell et al., 1984; Springer, 1990).

TCR i MCHp molekuly jsou poměrně krátké na to, aby samy překonaly elektrostatickou repulzi. Jedná se o velmi specifickou interakci s poměrně nízkou afinitou, navíc s malým počtem interagujících párů na obou buňkách (Demotz et al., 1990; Matsui et al., 1991; Springer, 1990).

Adhezní molekuly LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated antigen 1) a jejich receptory ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), mají dostatečně velké extracelulární domény a komplex LFA-1/ICAM-1 je tedy jedním z iniciačních a zároveň i stabilizačních v rámci imunologické synapse (Tominaga et al., 1998).

Po předchozí výměně informací mezi T-buňkou a cílovou buňkou se utváří třetí část synapse, dSMAC, kde jsou hlavním komponentem aktinová vlákna. Vznikající aktinová síť pod povrchem CTL zajišťuje jeho rozprostření po povrchu cílové buňky a zároveň tvoří vnitřní síť, která umožňuje cílený přesun dalších molekul do místa synapse (Bunnell et al., 2001; Valitutti et al., 1995). Podle novějších studií má změna a utváření cytoskeletu hlavní roli v tvorbě a uspořádání všech tří částí cytotoxické synapse (Wurzer et al., 2019).

Hlavním cytotoxickým mechanismem T lymfocytů je uvolňování granulí obsahujících perforin a granzymy. Granula obsahující perforiny a granzymy se v buňce shromažďují kolem centrozomu a následně jsou přesouvány k centru synapse, kde fúzí s membránou, čímž dojde k vyloučení jejich obsahu do prostoru mezi buňkami. Perforin tvoří vstupní póry v cílové buňce a těmito póry vstupují granzymy, serinové proteázy, jejichž činnost způsobí smrt cílové buňky (Ritter et al., 2015).

2.1.4 Interakce s nádorovými buňkami

Nádorové buňky vyvíjí mechanismy, které jim umožní únik před imunitní odpovědí. Cílem je pozměnit vnitřní nebo vnější mechanismy tak, aby se staly špatně detekovatelnými pro buňky imunitního systému.

Patří zde například změny v prezentaci antigenů, mutace zasahující transportéry zapojené do zpracování antigenu, proteazomu nebo do struktury a funkce MCH I.

Další změnou ve vnitřních mechanismech jsou změny signálních drah, které přispívají k rezistenci na imunoterapie například downregulace nebo změny signální dráhy IFN- γ (Interferon gamma), ztráta funkce genů kódujících JAK1/2 (Janus kinase 1/2) nebo změny aktivátorů transkripce STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1). Výsledkem všech těchto změn je opět nefunkční signalizace MHC I (Darnell et al., 1994; Gao et al., 2016).

Vnější mechanismy zahrnují produkci molekul nebo stimulaci expanze buněčných populací, které inhibují imunitní odpověď. Příkladem je zvýšení exprese molekul PD-L1 (programmed cell death receptor – ligand 1), což je ligand, který způsobuje apoptózu CD8+ T buněk, inhibuje proliferaci CD4+ T buněk a ovlivňuje aktivitu NK buněk (Chen et al., 2018), případně stimulace proliferace buněčných populací, které mají tlumící efekt na imunitu (Bai et al., 2020; Marvel and Gabilovich, 2015).

2.2 Blinatumomab

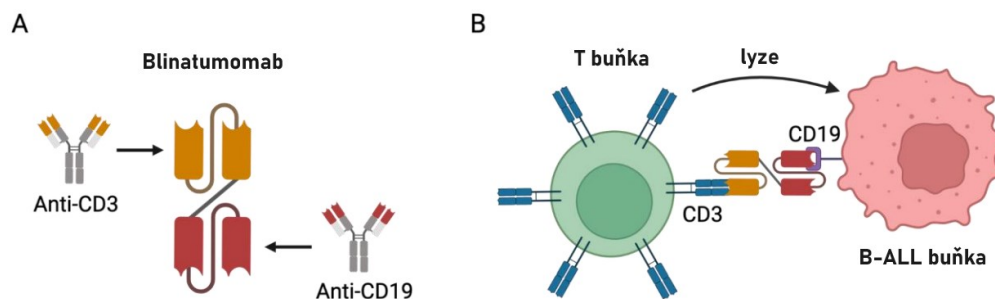
Blinatumomab je bispecifická protilátka (bi-specific T cell engager, BiTE), která se využívá při léčbě různých hematologických malignit, odvozených od B lymfocytů a jejich prekurzorů, jako je akutní lymfoblastická leukémie (Zinzani and Minotti, 2021).

Blinatumomab je fúzní protein složený ze dvou jedno-řetězcových protilátek a krátké spojky (5 aminokyselin) bez imunogenních vlastností. Na obrázku **Obr. 2 – A** je schematická struktura molekuly. Lehké a těžké řetězcové domény protilátek jsou klonovány z anti-CD19 HD37 a anti-CD3 TR66 myších hybridomů. Výsledný konstrukt o velikosti 55 kDa je zhruba třetinové velikosti oproti typickým monoklonálním protilátkám (Oak and Bartlett, 2015).

Mechanismus účinku blinatumomabu spočívá v utvoření přechodného spojení cílových buněk exprimujících CD19 s cytotoxickými T buňkami tím, že se váže na podjednotku CD3 ϵ T buněčného receptoru. Po vazbě na oba ligandy se flexibilní fragmenty řetězce otáčejí a přibližují membrány obou buněk k sobě viz. **Obr. 2 – B**. Přiblížení je první a klíčový krok pro vznik cytotoxické imunologické synapse a následné cytotoxické aktivitě T lymfocytu (Do et al., 2020).

Aktivované lymfocyty nejsou během tohoto procesu lyzovány a jsou schopny přecházet na další CD19+ buňky. Zapojení T-lymfocytů je nezávislé na MHC, což znesnadňuje maligním buňkám uniknout cytotoxickým T lymfocytům (viz kapitola **2.1.4**, Nagorsen et al., 2009; Oak and Bartlett, 2015).

Schopnost blinatumomabu aktivovat T buňky k proliferaci, produkci cytokinů a uvolňování granzymu B zdůrazňuje jeho imunomodulační vlastnosti a potenciál posílit imunitní odpověď (Burt et al., 2019).



Obr. 2 | Blinatumomab

A – schématické znázornění bispecifické protilátky blinatumomabu s vyznačenými vazebnými místy pro antigeny CD3 na T buňkách a CD19 na B-ALL buňkách. **B** – orientační znázornění adhezního kontaktu T buňky s B-ALL buňkou, zprostředkovaného blinatumomabem, respektive jeho vazbou na oba antigeny. Obrázek převzat a přeložen (Aureli et al., 2023).

2.3 Buněčná adheze

Většina buněk v organismu je organizována do tkání. Jejich tvorba by nebyla možná bez schopnosti buněk adherovat k extracelulární matrici (ECM, extracellular matrix) a k jiným buňkám. ECM obvykle tvoří jakýsi skelet orgánu a je tvořena komplexními systémy molekul, se kterým buňka přichází do kontaktu. Tyto interakce zajišťují adhezní molekuly, které se liší svými vlastnostmi. Jejich interakce mají velmi rozdílnou afinitu, od pevných spojů tvořících strukturu tkání po přechodné, slabší interakce například u leukocytů (Buckley et al., 1998).

2.3.1 *Buněčná adheze hematopoetických buněk*

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) interagují s buňkami mikroprostředí kostní dřeně, které poskytuje podpůrné signály pro jejich diferenciaci a proliferaci (Arai et al., 2004).

Správný vývoj nezralých buněk je tedy silně závislý na interakcích s mikroprostředím kostní dřeně. Naopak zralé buňky využívají adhezní molekuly k interakci s endotelem cév a s jinými buňkami během imunitních odpovědí nebo v procesech spojených s krevní srážlivostí. Leukocyty používají integriny a selektiny k diapedéze, tedy procesu, při kterém přecházejí z krevního oběhu do tkání. Dalším příkladem je účast adhezních molekul v již zmiňované cytotoxické imunologické synapsi (Arai et al., 2004; Kulkarni and Kale, 2020).

Adhezní molekuly také hrají důležitou roli v migraci B buněk do sekundárních lymfatických orgánů a jejich „homingu“ během imunitních odpovědí. Integriny a chemokiny regulují pohyb B buněk a jejich interakce s endotelem a stromálními buňkami během přesunu a imunitních reakcí. Chybné mechanismy v signalizačních drahách ovlivňující adhezi mohou způsobit zmenšenou nebo nadměrnou expresi adhezních molekul a tím tak ovlivnit správnou migraci, případně zachycení takto poškozených buněk (Heath et al., 2019).

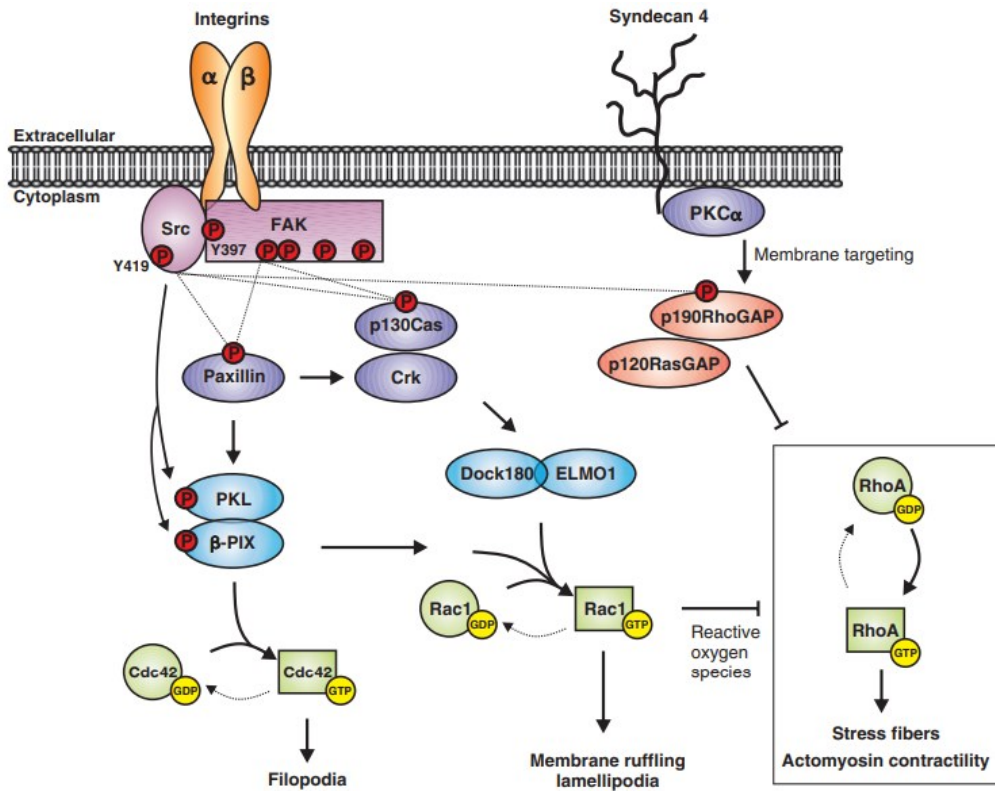
2.3.2 Signalizační dráhy ovlivňující adhezi

Adheze k ECM je regulována řadou receptorů, intracelulárních signálních drah a dalších molekul.

Mezi důležité receptory patří integriny. Integriny jsou transmembránové receptory, které fungují jako obousměrné přenašeče signálu. V cytoplazmě je aktivita integrinů řízena hlavně interakcemi s cytoskeletálními adaptorovými proteiny, kdy vazbou kontrolují aktivitu extracelulární části receptoru (tzv. inside-out regulace). Naopak extracelulární vazba ligandu na integriny zvyšuje afinitu cytoplazmatické části k různým cytoskeletálním proteinům (tzv. outside-in regulace). Aktivovaný integrin umožňuje vazbu a autofosforylaci kinázy fokální adheze (FAK, focal adhesion kinase), která dále zapojuje do signalizace kinázy rodiny Src (Src family kinases, SFK) a nepřímo rodinu malých Rho GTPáz (Hynes, 2002).

Po autofosforylaci FAK vzniká na jejím řetězci vazebné místo pro SH2 doménu SFK. Aktivované SFK následně zpětně fosforylují tyrozinové zbytky na FAK, tím zvyšují její kinázovou aktivitu a tvoří další vazebná místa (Mitra and Schlaepfer, 2006). Následující interakce úzce souvisí s Rho GTPázami a proteiny s nimi spřaženými.

Rho GTPázy mají tři kanonické zástupce – RhoA, Rac1 a Cdc42. Během tvorby a zrání adhezního spoje se aktivita těchto tří GTPáz dynamicky mění. První adhezní kontakt iniciují GTPázy Rac1 a Cdc42, naopak RhoA svojí aktivitou způsobuje dozrávání fokální adheze (Huveneers and Danen, 2009).



Obr. 3 | Regulace Rho-GTPáz v ranné fázi adheze

V ranné fázi buněčného kontaktu aktivuje komplex FAK-Src několik signálních drah, které následně vedou k protruzivní aktivitě způsobené GTPázami Rac a Cdc42. Tyto „výběžky“ vznikají v místě vazby integrinů. Současně aktivace tohoto komplexu potlačuje aktivitu GTPázy RhoA. Nízká aktivita RhoA snižuje kontraktilitu aktomyosinu, což zlepšuje schopnost buňky rozprostírat se po povrchu. Obrázek převzat a upraven (Huveneers and Danen, 2009).

2.4 Tyrozinkinázy

Fosforylace některých aminokyselin, jako jsou serin, threonin a tyrosin, patří mezi takzvané posttranslační modifikace proteinů. Fosforylace S/T a Y na různých proteinech slouží k přenosu signálu v buňce (tzv. signální kaskády, kdy se proteiny vzájemně modifikují tak, aby došlo k buněčné odpovědi na signál, který kaskádu spustil; Douville et al., 1992).

2.4.1 SRC kinázy

Kinázy rodiny Src (Src family kinases, SFK) je rodina 8-11 nереceptorových tyrozinkináz, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci,

metabolismus, a v neposlední řadě adhezní procesy a buněčnou migraci. Jednotliví zástupci rodiny Src navíc vykonávají v buňkách různé funkce, a jejich exprese často odlišná v rozdílných tkáních. Jejich aktivita je velmi striktně regulována, a po většinu života buňky je potlačována – pokud je ale porušena, mají SFK velký onkogenní potenciál a hrají roli v celé řadě nádorových onemocnění včetně leukémií (Burnham et al., 2000; Thomas and Brugge, 1997; Tice et al., 1999).

2.4.2 Struktura a regulace SFK

Všichni zástupci SFK mají podobnou strukturu (**Obr. 4**). Na N-konci nalezneme shluk bazických aminokyselin tvořící SH4 (Src-homology 4) doménu, jejíž součástí je Gly2, ke kterému lze posttranslačně připojovat různé mastné kyseliny, a tím je regulováno kotvení kinázy do membrány.

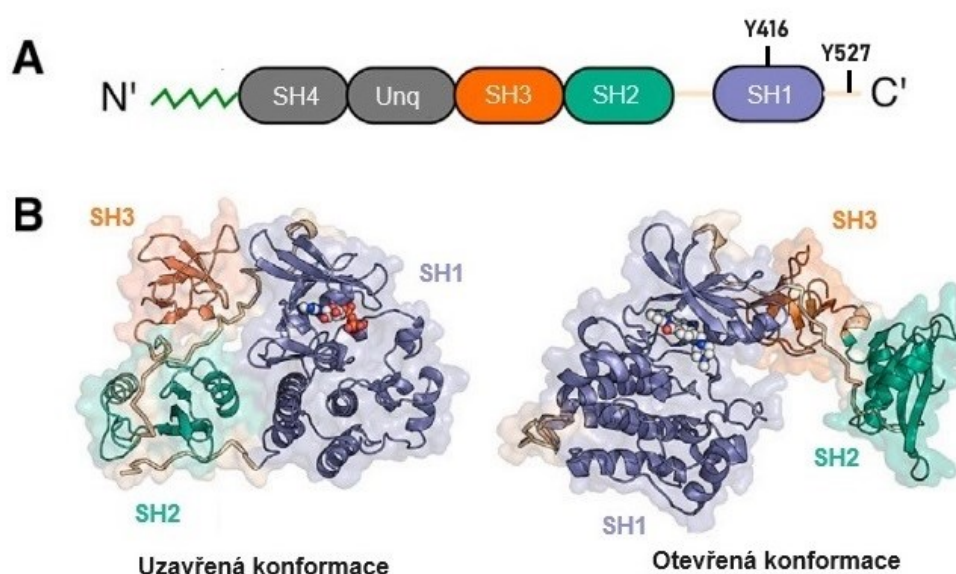
Za SH4 následuje doména, která je unikátní pro jednotlivé zástupce rodiny Src, a je tedy klíčem ke zmíněným specifickým funkcím jednotlivých SFK (Arbesú et al., 2017; Koegl et al., 1994).

Následující SH3 doména je schopna vázat úseky bohaté na prolin. Jeden z takových úseků spojuje v SFK kinázovou doménu s SH2 doménou, a vazba SH3 domény kinázy na tento úsek (v rámci jedné molekuly) obvykle stabilizuje uzavřenou, neaktivní konformaci kinázy. Afinity této vazby není ale příliš silná, a tak pokud je přítomen jiný protein, který obsahuje oblast bohatou na prolin s vyšší afinitou k SH3 doméně SFK (než je intramolekulární interakce), vyváže SH3 doménu kinázy, a naopak podpoří konformační změnu do otevřené (aktivní) podoby (Kurochkina and Guha, 2013).

SH2 doména váže fosforylované tyrozinové zbytky. V rámci jedné kinázy se jedná o Y527 na C-konci, jehož fosforylace pomocí Csk způsobí vazbu SH2 domény na pY527 a tím opět stabilizaci uzavřené formy kinázy (deaktivace), naopak defosforylace Y527 pomocí fosfatázy CD45 tuto interakci uvolní, a umožní kináze změnit konformaci. SH2 doména se také podílí na rozpoznávání substrátů kinázy (Burnham et al., 2000; Tice et al.,

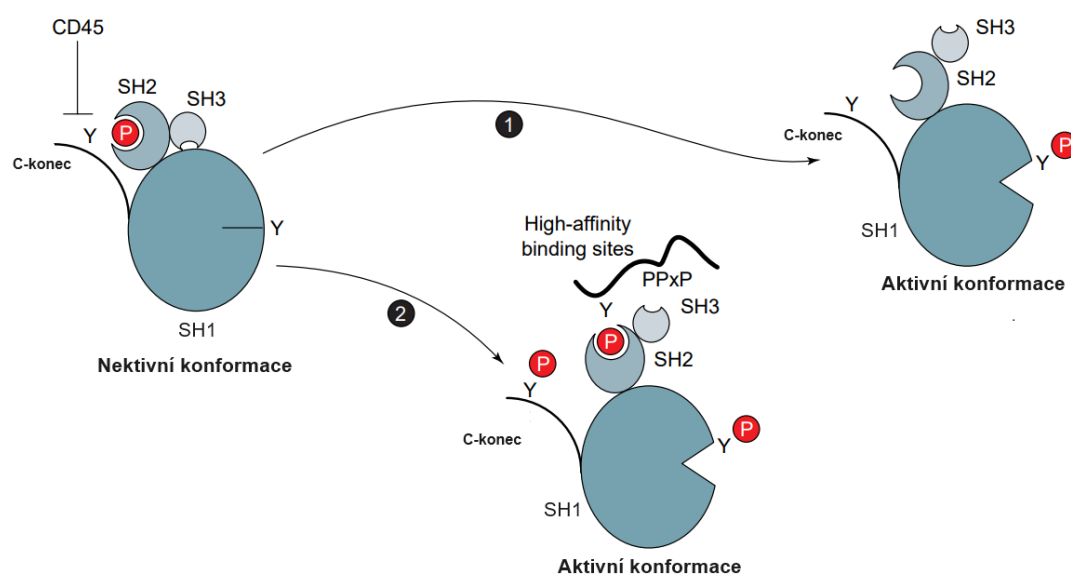
1999). Aktivita SFK s fosforylovaným Y527 klesá až o 98 % (Cooper et al., 1986).

Kinázová doména (SH1) převážně určuje specifitu kináz k různým substrátům a zároveň má katalytickou aktivitu. Obsahuje Y416, v aktivační smyčce kinázy, jehož (auto)fosforylace stabilizuje otevřenou konformaci. Přítomnost fosforylovaného Y416 je brána jako znak aktivní kinázy (Ahler et al., 2019; Tice et al., 1999). Všechny nastíněné mechanismy aktivace jsou shrnuty na **Obr. 5**.



Obr. 4 | Struktura a regulace kináz rodiny Src

A – Schematické znázornění struktury kináz rodiny Src. N' konec obsahuje vazebné místo pro mastnou kyselinu a SH4 doménu. Po ní následuje unikátní doména (odlišná pro všechny zástupce SFK), SH3 doména (schopná vázat oblasti bohaté na prolin), SH2 doména vázající fosforylovaný tyrosin, a kinázová doména SH1 s aktivačním Y416. Na C' konci je inhibiční Y527. **B** – Aktivita SFK je regulována konformačně – zatímco uzavřená forma (vlevo) není schopna vázat substrát a je neaktivní, otevřená forma (vpravo) je substrátu přístupná. Zatímco intramolekulární interakce (SH2 – pY527, SH3 – linker uvnitř kinázy) udržují kinázu v uzavřené konformaci, autofosforylace na Y416 a interakce SH2/SH3 domén s jinými molekulami stabilizuje otevřenou (aktivní) konformaci kinázy. Obrázek převzat a upraven (Ahler et al., 2019).



Obr. 5 | Mechanismy aktivace Src kináz

1 – Aktivace kinázy pomocí regulace fosforylace klíčových tyrozinů 416 a 527. Kináza je aktivována defosforylací Y527 (například pomocí fosfatázy CD45), což uvolní intramolekulární interakci Y527 se SH2 doménou a otevření kinázy. V aktivační smyčce se následně autofosforyluje Y416, jehož fosforylace stabilizuje otevřenou formu kinázy. **2** – Aktivace pomocí interakčních partnerů. SH3 doména v zavřeném stavu váže SH1-SH2 linker s poměrně nízkou afinitou. Přítomnost interakčního partnera schopného vázat SH3 s vyšší afinitou způsobí uvolnění kinázy a její aktivaci. Podobně SH2 doména může místo Y527 vázat jiný pY v interagující molekule, což opět způsobí otevření kinázy. Otevřená konformace je následně stabilizována fosforylací Y416 v aktivační smyčce kinázové domény. Obrázek převzat a upraven (Thomas and Brown, 1999).

2.4.3 Fyn a Lck

Tyrosin kináza Fyn patří do rodiny SFK je v buňce primárně lokalizována na cytoplazmatické membráně. Aktivovaná kináza se účastní transportu receptorů z cytoplazmy na buněčný povrch. Celkem byly identifikovány 3 transkripční izoformy Fyn-B, Fyn-T a Fyn-C (Saito et al., 2010).

Podobně jako ostatní SFK má kináza Fyn vliv na růst a proliferaci buňky. Snížení exprese a inhibice Fyn je spojeno se zastavením růstu buňky. Její funkce je spojena se signalizační dráhou PI3K/Akt (viz. kapitola 2.5.2). Fyn fosforyluje protein PIKE-A (antiapoptický protein), čímž brání jeho štěpení

(Saito et al., 2010). Balliat ve studii uvádí, že Fyn přenáší antiapoptotické signály kinázy Akt nejen ze solubilních růstových faktorů, ale i z interakcí zprostředkovaných extracelulární matrix (Baillat et al., 2008).

Kináza Fyn, stejně jako ostatní SFK dokáže reagovat na změny v mechanických vlastnostech ECM. Její aktivací vzniká na membráně silný proces agregace různých adhezních proteinů, a tím může vzniknou pevnější adheze buňky. Tento proces má potenciál v šíření metastáz při onkologických onemocnění (Niediek et al., 2012).

Aktivita kinázy Fyn se také objevuje v signalizační dráze ERK/MAPK (viz. kapitola 2.5.1 ERK), kde aktivuje dráhu pomocí proteinu Ras (odvozeno od Rat sarcoma virus). Celkově tak urychluje G1 fázi buněčného cyklu a ovlivňuje regulaci buněčné proliferace (Wary et al., 1998).

Tyrosin kináza Lck (p56Lck) patří mezi SFK a hraje klíčovou roli v signalizaci T-lymfocytů. Lck je v buňce primárně asociována s plazmatickou membránou a interaguje s CD4 a CD8 koreceptory T-buněk, což je zásadní pro aktivaci T-buněčného receptoru (TCR) a následnou aktivaci imunitní odpovědi (Love and Hayes, 2010).

Podobně jako jiné SFK kinázy je i aktivita Lck regulována fosforylací. Autoinhibiční fosforylace C-terminálního tyrosinu (Tyr505) udržuje kinázu Lck v neaktivním stavu, zatímco fosforylace Tyr394 v aktivační smyčce Lck kinázu aktivuje (Chakraborty and Weiss, 2014).

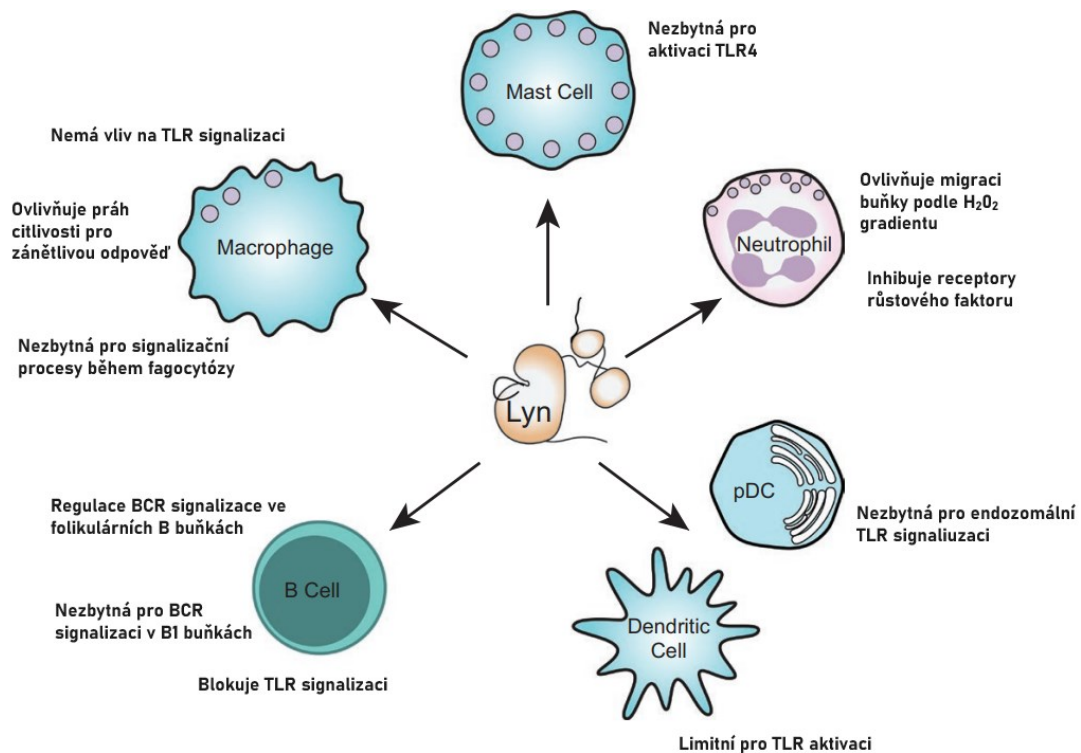
Na úrovni signalizačních drah Lck přispívá k aktivaci několika klíčových cest, včetně dráhy PI3K/Akt a ERK/MAPK. Přes PI3K/Akt dráhu se Lck podílí především na stimulaci přežití T-buněk, zatímco přes ERK/MAPK dráhu ovlivňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci (Palacios and Weiss, 2004)

2.4.4 Lyn

Kináza Lyn je exprimována převážně v hematopoetických buňkách, konkrétně v myeloidních a B buňkách. V B buňkách, kde interaguje s B buněčným receptorem (BCR, B-cell antigen receptor) přes koreceptor

CD19, a zároveň váže nekatalytickou podjednotku PI3K (phospho-inositid 3-kinase), čímž aktivuje signální kaskádu PI3K/Akt (Brian and Freedman, 2021; Yamanashi et al., 1991).

Aktivace kinázy Lyn může mít na buňku aktivační i tlumící vliv (viz. **Obr. 6**). Lyn deficitní kmeny myši mají defekt ve vývoji B buněk hlavně ve fázi progenitorových a plně zralých buněk (Hibbs et al., 1995), ale naopak delece Lyn až ve zralých B buňkách způsobuje zpoždění a zesílení signalizace BCR, což buňky aktivuje a zároveň podporuje jejich diferenciaci. Delece Lyn v těchto buňkách je také činí odolnějšími vůči apoptóze (Brodie et al., 2018).



Obr. 6 | Role kinázy Lyn v imunitních buňkách

Schématické rozdělení regulačních vlivů kinázy Lyn na rozdílné imunitní buňky. U některých buněk (B buňky, neutrofil, makrofágy) má kináza pozitivní i negativní regulační funkce v signálních drahách (viz kapitola 2.4.4). Obrázek převzat a upraven (Brian and Freedman, 2021).

2.4.5 SRC v Hematopoetických b.

U hematopoetických buněk musíme rozlišit dvě skupiny SFK. V jedné skupině jsou SFK, které jsou všudypřítomné ve většině buněk organismu – patří sem kinázy Src, Fyn a Yes. Druhou skupinu tvoří SFK, které jsou exprimovány převážně pouze v hematopoetických buňkách. Do této skupiny patří hlavně kinázy Blk, Fgr, Hck, Lck a Lyn (Parsons and Parsons, 2004; Thomas and Brugge, 1997). Během vývoje buňky se potlačuje exprese první skupiny SFK, a tím se více projevuje vliv SFK, které jsou specifické pro hematopoetické buňky. Nadměrná aktivita těchto kináz je často spojena s horšími prognózami onkologických onemocnění, a tedy i leukémií. (Dwyer et al., 2016; Röselová et al., 2018).

2.4.6 SFK v adhezních procesech

Vliv SFK na adhezi hematopoetických buněk je dlouhodobým předmětem studií. Mezi nejprozkoumanější členy patří první identifikovaný zástupce skupiny, kináza c-Src.

Kináza c-Src je spojena s regulací adheze a migrací adherentních buněk. Má důležitou roli v interakci s kinázou fokální adheze (FAK, focal adhesion kinase), kdy dohromady regulují sílu a zraní fokální adheze buňky. Zároveň je její exprese a aktivita spojena s řadou maligních onemocnění (Guarino, 2010).

Naše laboratoř v minulosti přispěla k výzkumu role kinázy Lyn v adhezních procesech myeloidních buněk (Röselová et al., 2018). Její nízká aktivita vede k snížení migrace neutrofilů a makrofágů (Abram and Lowell, 2008) a je důležitá pro správnou funkci krevních destiček a vzniku krevních sraženin (Zhi et al., 2015).

2.5 Proliferační / aktivační kaskády

Buňka je velmi dynamické prostředí, které prochází opakujícím se buněčným cyklem a s ním i souvisejícími metabolickými procesy.

Pozorováním aktivity určitých signalizačních drah lze odvodit současný stav buňky jako je například reakce na externí podněty, proliferaci nebo apoptózu.

Pozorováním aktivity kináz ERK (extracellular signal-regulated kinase) a AKT (z angl. thymomas of AKR mice), které jsou součástí signalizačních drah regulujících buněčnou proliferaci, lze zkoumat právě proliferační potenciál buněk.

2.5.1 ERK

ERK1 (MAPK3) a ERK2 (MAPK1) jsou lidské formy serin/threoninových kináz souhrnně označovaných jako MAPK (mitogen-activated protein kinase). Jsou součástí kanonické mitogenní signalizační kaskády Ras/Raf/MEK/ERK jejímž výsledkem je fosforylace cílových proteinů v důležitých organelách (mitochondrie, Golgiho aparát) buňky a ovlivnění transkripce genů podporujících syntézu nových proteinů (Plotnikov et al., 2011). Dráha reguluje základní buněčné procesy jako růst, proliferaci, stresové reakce a apoptózu (Lavoie et al., 2020).

Lidské ERK1/2 jsou aktivovány ve dvou krocích – MEK1/2 je fosforyluje na tyrozinech 204/187 a následuje fosforylace na threoninech 202/185. Po fosforylaci na obou aminokyselinách se enzym stává aktivní. Erk, na rozdíl od Raf a MEK, mají velmi široké spektrum účinku. Právě tato vlastnost jim umožňuje regulovat více důležitých pochodů v buňce (Roskoski, 2012).

Zvýšená exprese a aktivita P-ERK byla pozorována v různých typech onkogenních buněk, kde podporuje nadměrnou proliferaci a migraci (Chen et al., 2016; Zheng et al., 2024).

2.5.2 AKT

Proteinkináza B (PKB, též Akt) je serin/threoninová kináza, která je součástí kanonické signalizační dráhy PI3K/AKT/mTOR. Tato dráha reguluje syntézu proteinů v buňce a ovlivňuje buněčný růst, proliferaci a má vliv na přežití

buňky. Kináza Akt je hlavní downstreamovým efektem aktivované fosfatidylinositol kinázy PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) a jejím hlavním cílem je aktivace mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Aktivovaný mTORC1 fosforyluje přímé efekty ovlivňující proteosyntézu s efektem na buněčný cyklus (Nepstad et al., 2020).

V savčích buňkách existují tři strukturní formy Akt1, Akt2 a Akt3. Všechny izoformy obsahují N-terminální doménu, katalytickou oblast s fosforylačním místem threonin 308 a C-terminální regulační doménu s fosforylačním místem serin 473. Aktivace Akt kinázy vyžaduje její přesun z cytosolu k buněčné membráně. Na membráně interaguje s PDK1 a dochází k fosforylaci Thr308, což vede k částečné aktivaci. Pro úplnou aktivaci je nutná druhá fosforylace na Ser473, kterou zajišťuje komplex mTORC2 (Bellacosa et al., 2004; Nepstad et al., 2020).

2.6 Akutní leukemie

Akutní leukémie (leukémie s rychlým průběhem) dělíme na dva základní typy, akutní myeloidní leukémie (AML) a akutní lymfoblastická leukémie (ALL). ALL podle morfologie a cytogeneze maligních buněk dále dělíme na T buněčnou leukémii (T-ALL) a B buněčnou leukémii (B-ALL). U B-ALL je důležitým prognostickým faktorem přítomnost Filadelfského chromozomu (Ph+), jehož produktem je fúzní gen BCR-ABL.

2.6.1 Výskyt a mortalita

ALL je nejčastějším případem rakoviny vyskytující se u dětí, v USA se jedná o 76 % ze všech typů leukemie pro pacienty ve věku od 0 do 19 let. Ze stejných dat vyplývá i velký rozdíl mezi „šancí na přežití v pětiletém horizontu“, kdy u adolescentní a mladší populace má šanci zhruba 90 % pacientů na rozdíl od dospělé populace, pro kterou je šance na přežití pouze 45 % (American Cancer Society, 2024). Tyto rozdíly jak v prevalenci, tak v šanci na přežití, reflektují rozdíl v buněčném vývoji rakoviny u dětí a

dospělých pacientů. Věk zároveň ovlivňuje odpověď organismu na léčbu, která je u starších pacientů mnohem méně efektivní (American Cancer Society, 2024; Faderl et al., 2003).

2.6.2 B-ALL

B-buněčná akutní leukemie je jedno z nejčastějších maligních onemocnění u dětí, ale objevuje se i u části dospělé populace. U většiny dětí se onemocnění začíná rozvíjet již během fetálního vývoje, a to tvorbou chromozomální translokace nebo změnou genetického materiálu (hyperdiploidie, hypodiploidie). Nečastějšími typy těchto aberací jsou: t(4;11) MLL-AF4, t(12;21) ETV6-RUNX1, t(1;19) E2A-PBX1 a t(9;22) BCR-ABL1 (Malouf and Ottersbach, 2017).

Principem tohoto onemocnění je selhání diferenciací nezralých B lymfoidních progenitorů a jejich následná nekontrolovaná proliferace. Tyto buňky se kumulují v kostní dřeni a následně mohou migrovat do periférií jako je slezina, játra, brzlík, CNS a mnoho dalších. Dalším problémem mimo akumulaci je ovlivnění tvorby ostatních krevních částic. Dochází k snížení produkce červených krvinek a krevních destiček což způsobuje další oslabení imunitního i fyziologického systému pacientů (Malouf and Ottersbach, 2017).

2.6.3 Terapie ALL

Léčba akutní lymfoblastické leukémie (ALL) vychází z pediatrických protokolů a skládá se z prefáze a dvou indukčních cyklů. Tyto protokoly jsou adaptovány pro použití na dospělých pacientech.

Prefáze zahrnuje podávání kortikosteroidů, výjimečně v kombinaci s cyklofosfamidem. Tento postup umožňuje snížení nádorové masy před zahájením intenzivní chemoterapie a poskytuje čas na detailnější vyšetření pacienta (Bassan and Hoelzer, 2011).

Následuje série cyklů chemoterapie (typicky vinkristin, asparagináza a cyklofosamid v různých kombinacích) doplněné o imunomodulační látky

(dexamethason, prednison). Pokud pacient nedosáhl remise po opakování obou cyklů bývá druhý indukční cyklus nahrazen intenzivnějšími variantami. (Bassan and Hoelzer, 2011; Hoelzer et al., 1988).

Přítomnost Ph chromozomu představuje negativní prognózu. Zásadní změnou v úspěšnosti léčby u pacientů s Ph+ALL došlo inhibitory tyrozinových kináz (TKI, Tyrosin Kinase Inhibitors). Tyto látky, původně vyvinuté pro léčbu chronické myeloidní leukemie, se díky podobným patofyziologickým vlastnostem začaly využívat i pro léčbu právě Ph+ALL (Fielding et al., 2009). Využitím této kombinované léčby v případech kompletních remisí se snížily dávky standardních chemoterapeutických léčiv, které mají výrazné vedlejší komplikace (Doubek and Mayer, 2020).

2.7 TKI (Inhibitory tyrozinových kináz)

Vzhledem k povaze fúzního proteinu Bcr-Abl (neregulovaná tyrozinkináza) se vývoj léčiv začal v 90. letech zaměřovat právě na inhibici této kinázy. Inhibitory tyrozinových kináz otevřely novou variantu léčby maligních onemocnění hematopoéze s velmi specifickým mechanismem účinku.

Bohužel jako většina onemocnění má i ALL řadu variant způsobených charakteristickými mutacemi v klíčových proteinech. Tyto variace vedly k postupnému vývoji více druhů TKI s jinou specifitou, ať už přímo k Bcr-Abl, nebo jiným kinázám. Nové typy TKI mají navíc afinitu k více typům kináz.

2.7.1 Imatinib

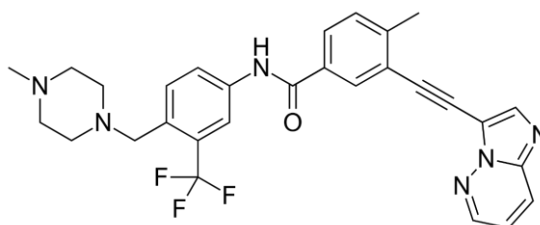
Imatinib (STI571, Gleevec; **Obr. 7**) je derivát 2-fenylaminopyrimidinu a specificky inhibuje kinázy c-Abl, c-Kit a PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). Byl vyvinut v 90. letech Nicholasem Lyndonem, Brianem Drukerem a Charlesem Sawyersem a jeho použití výrazně zlepšilo léčbu především CML.

aktivitou v endoteliálních a myeloidních buňkách nádorového mikroprostředí (Liang et al., 2010; Luo et al., 2006; Shah et al., 2004).

Bylo zjištěno, že dasatinib mimo své proti-onkogenní funkce, také cílí na Btk (Burtonova tyrozinová kináza) tyrosin kinázu, důležitou molekulu v signalizačních drahách aktivovaných vazbou B buněčného receptoru na antigen. Tato interakce s Btk naznačuje, že dasatinib může působit jako imunosupresor, ovlivňující vývoj B-lymfocytů, stejně jako funkci leukocytů, což by mohlo ovlivnit dlouhodobou léčbu leukémie (Hantschel et al., 2007).

2.7.3 Ponatinib

Ponatinib (**Obr. 9**) je silný multitargetový inhibitor tyrozinkináz, využívá se k léčbě zejména CML a ALL. Jako inhibitor cílí na tyrozinkinázy Bcr-Abl a na rodinu tyrozinkináz FGFR, což naznačuje jeho potenciál v léčbě maligních procesů spojených s abnormalitami FGFR1, jako jsou myeloidní a lymfoidní neoplazie. Široký rozsah inhibice kináz ponatinibem je významný pro pacienty s různými hematologickými malignitami s abnormálními signalizačními drahami kináz (Price et al., 2013).



Obr. 9 | Struktura ponatinibu (medchemexpress.com/Ponatinib.html)

Ponatinib byl specificky vyvinut pro účinnou terapii pacientů s CML s mutací Bcr-Abl T315I, která způsobuje rezistenci na jiné inhibitory Bcr-Abl, jako jsou imatinib a dasatinib (Lin et al., 2017). Dále inhibiční aktivita ponatinibu zahrnuje signalizační dráhy spojené s dalšími kinázami, jako jsou FLT3 a TrkA, které jsou relevantní pro AML. Díky širšímu spektru kináz, které je ponatinib schopen inhibovat může jeho použití zlepšit terapeutické

výsledky cílením na více aberantních signalizačních drah současně (Dokla et al., 2022).

2.8 Kombinace TKI a Blinatumomabu v klinické praxi

Studie ukazují, že kombinace blinatumomabu a TKI je vysoce účinná a relativně bezpečná u pacientů s relabující/refrakterní Ph+ ALL (Foà et al., 2020). Příznivé výsledky při použití kombinace léčiv jsou důležité hlavně u vysoce rizikových pacientů s refrakterní nebo relabující povahou nemoci (Assi et al., 2017).

In vitro testování a studie, stejně jako naše výsledky, paradoxně ukazují na opačný efekt této kombinace než efekt, který vykazuje v klinické praxi. TKI jakožto inhibitory různých kináz totiž neovlivňují jen kinázy v rakovinných buňkách, ale mají vliv i na signalizační dráhy ve zdravých lymfocytech. Studie (Kauer et al., 2022) prokázala výrazný potlačující efekt multikinázových inhibitorů (dasatinib, ponatinib) na aktivaci T-lymfocytů, čímž tyto inhibitory brání cytotoxickému účinku, který je hlavním mechanismem fungování blinatumomabu.

Tento zásadní rozdíl v klinických a *in vitro* studiích kombinace TKI a blinatumomabu je předmětem dalšího zkoumání a hledání mechanismů, které by tento fenomén vysvětlily.

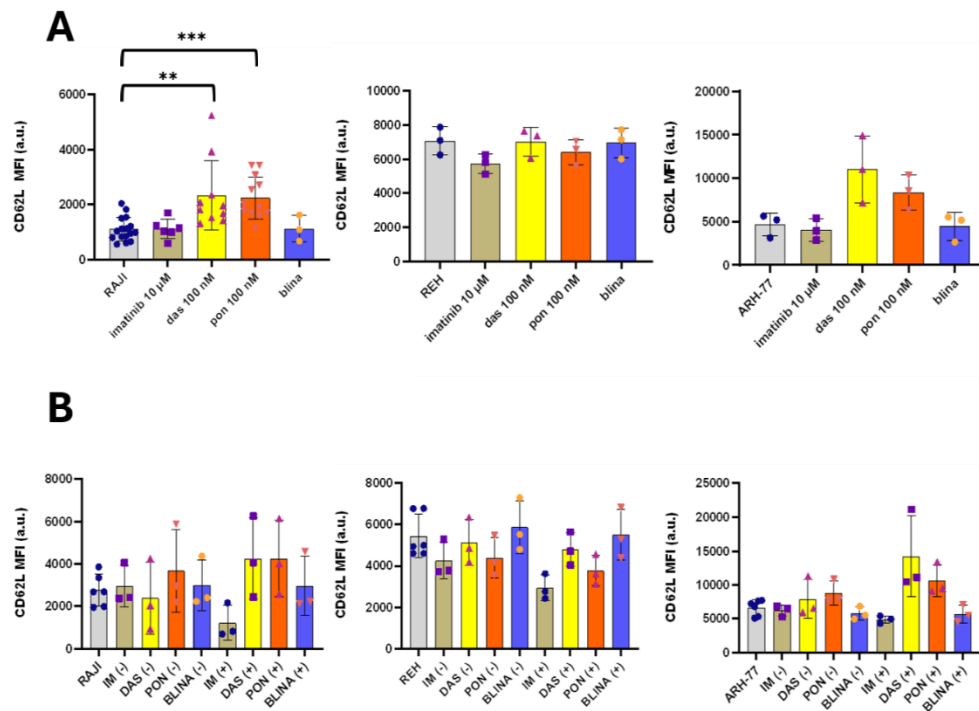
U pacientů léčených blinatumomabem navíc pozorujeme častější relapsy onemocnění v extramedulárních (nehematopoetických) tkáních, jako je například CNS. Takto relabující onemocnění má velmi nepříznivou prognózu. Hypotézou projektu (jehož je tato práce součástí) je účinek blinatumomabu, který svou vazbou na CD19 ovlivňuje intracelulární adhezní signalizaci maligních buněk, což by mohlo mít za následek změny v expresi povrchových adhezních molekul a tím i změnu adhezní specifity B-ALL buněk. Buňky s takto pozměněnou adhezní specifitou by se pak teoreticky mohly lépe přichytit v extramedulárních tkáních a tam způsobovat relapsy onemocnění.

2.9 Efekt TKI na expresi CD62L

Během předchozích výzkumů v laboratoři jsme zjistili, že některé TKI (dasatinib a ponatinib) zvyšují expresi adhezní molekuly L-selectin (CD62L) na povrchu některých B-ALL buněk (**Obr. 10**; Obr et al., 2023)

CD62L je jednou z adhezních molekul účastnících se iniciace cytotoxické synapse a zároveň je potenciálním cílem terapie u jiných druhů leukémií (Burgess et al., 2013; Sopper et al., 2017). Změny v její přítomnosti na povrchu buněk mohou teoreticky ovlivnit účinnost imunoterapie.

Jedním z intracelulárních efektorů signalizace CD62L jsou kinázy rodiny Src (Ivetic et al., 2019) Tato práce směřuje k pochopení potenciálních důsledků tohoto jevu.



Obr. 10 | Vliv TKI na expresi CD62L na povrchu B-ALL buněk

A – Expese CD62L na povrchu buněčných linií po 24 h působení TKI. **B** – Změny v expresi CD62L po 24 h inkubaci s TKI a následném odmytí efektoru na dalších 24 h (-), nebo po 48 h kontinuální inkubaci s TKI (+). Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 9.1 (párový t-test; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je v návaznosti na předchozí výsledky laboratoře detailněji studovat vliv léčiv používaných pro terapii B-akutní lymfoblastické leukémie na intracelulární adhezní signální dráhy, zde reprezentované signalizací kináz rodiny Src.

Vedlejším cílem práce je studium vedlejšího vlivu těchto léčiv na potenciální změny v charakteru interakce nádorových buněk s buňkami imunitního systému, reprezentovanou efektivitou cytotoxických buněk při eliminaci maligních cílů.

4 Materiál a Metody

4.1 Chemikálie

Efektory

Imatinib (Bristol-Meyers Squibb), 2mM zásobní roztok ve sterilní H₂O, skladován v -20 °C

Dasatinib (Selleckchem) 10 mg, 20 mg/ml zásobní roztok ve sterilním DMSO, skladován v -20 °C

Ponatinib (Cayman chemical Co.), 50mM a 10mM zásobní roztoky ve sterilním DMSO, skladován v -20 °C

Blinatumomab (AMG 103, AMGEN, Thousand Oaks, USA) 12 ng/ml ve sterilním PBS, skladován ve 4 °C

SDS-Western blot

Ethanol 96% zkoušeno dle ČL, Penta, skladováno ve 4 °C

Lytický pufr: Pierce™ IP Lysis Buffer, cat. 87788, ThermoFisher Scientific, (složení: 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 and 5% glycerol) vždy čerstvě doplněný o 5 µl/ml inhibitoru fosfatáz

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, cat. P5726, Sigma-Aldrich, skladováno ve 4 °C

Vzorkový pufr: Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate, cat. S3401, Sigma-Aldrich, (složení: 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-merkaptoethanol, 0.004% bromfenolová modř, 0,125 M Tris-HCl, pH 6.8) zásobní roztok skladován v – 20 °C, požívaný alikvót v pokojové teplotě

Elektrodový pufr: 10× Tris/Glycine/SDS Buffer, cat. #1610772, Bio-Rad Laboratories, USA (složení po ředění 1:9 s deionizovanou H₂O - 192 mM glycin; 25 mM Tris base; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3), zásobní roztok (10×) skladován při pokojové teplotě

Precision plus protein standard (All Blue), Bio-Rad Laboratories, USA, cat. #161-0373; zásobní roztok skladován v – 20 °C, požívaný alikvót ve 4 °C

Semi-dry transfer pufr: Trans-Blot Turbo 5× Transfer Buffer, Bio-Rad Laboratories, USA, cat. #1704270 skladováno ve 4 °C, finální ředění 3:1:1 pufr:ethanol:ddH₂O

PBS-T: PBS (phosphate-buffered saline); 0,1% Tween-20 (v / v)

Předpřipravené gely pro SDS:

Mini-Protean TGX, Precast gels 12%, cat. #4561045,

Mini-Protean TGX, Precast gels 10%, cat. #4561035,

- obojí Bio-Rad Laboratories, USA; skladováno ve 4 °C

Trypan Blue, Sigma-Aldrich, cat. T6146; skladován při pokojové teplotě

Substráty pro imunodetekci:

Clarity Western ECL, Bio-Rad Laboratories, USA, cat. #170-506; skladován při pokojové teplotě

Westar supernova, Cyanagen srl, Italy, cat. XLS3; skladován při pokojové teplotě

Průtoková cytometrie

CFSE, Thermo Fisher, cat. C34557; zásobní roztok 20 mM skladován v -20 °C

Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, cat H8889; skladován v -4 °C

Interleukin-2, Sigma-Aldrich, cat. I2644; zásobní alikvóty v -80 °C, následně ve 4 °C; přidáván do média na výslednou koncentraci 500 UI/ml

CellGenix GMP DC Medium, Miltenyi Biotec, cat. 20801-0500; skladován ve 4 °C

Propidium Iodide (PI), ThermoFisher Scientific, cat. BMS500PI; skladován ve 4 °C

4.1.1 Protilátky

Goat anti-Rabbit sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou

Goat anti-Mouse sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou

- obojí Thermo Scientific, 20 µl alikvóty v glycerolu (1:1) v -20 °C

Phospho-Src Family (Tyr416), cat. 4370, antibody made in rabbit,

Phospho-Akt (Ser473) (D9E), cat. 4060 antibody made in rabbit,

p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5), cat. 4695, antibody made in rabbit

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), cat. 4370, antibody made in rabbit

- vše Cell Signaling Technology, Beverley, MA; v -20 °C

Lyn antibody, cat. 610003, made in mouse

- BD Transduction Laboratories, v -20 °C

Phospho-LCK/FYN (Tyr416), cat. PA5-110156, antibody made in rabbit

- ThermoFisher scientific, v -20 °C

4.2 Buněčné linie

Použité buněčné linie byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s přidavkem 4mM L-alanyl-L-glutaminu, 10% fetálního telecího séra, 100U/ml penicilinu a 100µg/ml streptomycinu při 37°C ve zvlhčované atmosféře s 5% CO₂.

Tabulka 1 | Seznam použitých buněčných linií.

Linie	Buněčný typ	Charakteristika	Zdroj
ARH-77	Lidské B lymfoblastické buňky	Ph-	Leibniz institute DSMZ, Braunschweig, Německo
RAJI	Lidský Burkittův lymfom	Ph-	Leibniz institute DSMZ, Braunschweig, Německo
REH	Lidské B buněčné prekurzorové buňky	Ph-	Leibniz institute DSMZ, Braunschweig, Německo

4.3 Růstový test

Buňky (3×10^5 /ml) byly v objemu 1 ml ošetřeny inhibitory a blinatumomabem v indikovaných koncentracích a inkubovány při 37 °C. Vzorky byly v daných časech odebrány do mikrotitračních destiček a smíchány s trypanovou modří v poměru 1:1. Celkový počet buněk a viabilita buněk byly analyzovány pomocí přístroje Bio-Rad Cell Counter TC10™ Alternativně jsme počet buněk analyzovali pomocí přístroje MindRay BC-3000Plus Auto Hematology Analyzer.

4.4 SDS-polyakrylamidová elektroforéza a Western Blotting

Buňky (3×10^6) byly dvakrát promyty PBS (RT; 300 g / 7 min), lyzovány v 130 μ l lytického pufru (15 min, led) a centrifugovány (15 min, 15000 g, 4 °C). Supernatant byl smíchán v poměru 1:1 s Laemmliho vzorkovým pufrům a inkubován 5 minut při 95 °C. Takto připravený vzorek byl uložen do -20 °C, případně ihned dále zpracován.

12 μ l vzorku bylo nanášeno na 10% nebo 12% gel, rozděleno pomocí SDS-PAGE (200 V, 45 min; aparatura Bio-Rad Mini Protean® 3) a přeneseno na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System).

Membrány byly blokovány (50 min, RT, třepačka) v 3% BSA ředěném v PBS-T. Inkubace s primární protilátkou ředěnou v PBS-T probíhala za stálého kývání přes noc při 4 °C, respektive 2,5 h při RT (dle protilátky). Po odmytí přebytečné primární protilátky (5x5 min, PBS-T) byla membrána inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou v PBS-T (50 min, RT) a opět promyta PBS-T.

Signál sekundární protilátky byl vyvolán pomocí substrátů Clarity Western ECL případně Westar supernova dle pokynů výrobce a detekován digitálním systémem G:BOX iChemi XT4 s využitím programu GeneSys ver. 1.8.10.0. Signál na membránách byl vyhodnocen pomocí programu GeneTools ver. 4.3.9.0 (vše Syngene Europe, Cambridge).

4.4.1 Ošetření buněk pro SDS-elektroforézu

Zjednotlivých buněčných linií byly vytvořeny 3 identicky ošetřené sady vzorků pouze s TKI a 3 identicky ošetřené sady s TKI v kombinaci s blinatumomabem. Koncentrace inhibitorů a blinatumomabu pro ošetření obou triplikátů jsou uvedeny v **Tabulka 2** a **Tabulka 3**. Po ošetření efektoř následovala inkubace 24h při 37 °C ve zvlhčované atmosféře s 5 % CO₂.

Tabulka 2 | Výsledné koncentrace efektorů po ošetření jednotlivých vzorků shodné pro celý triplikát. Sada obsahuje buňky ošetřené TKI bez přídavku blinatumomabu.

Vzorek	imatinib [μM]	ponatinib [nM]	dasatinib [nM]
1.	-	-	-
2.	0,1	-	-
3.	1	-	-
4.	10	-	-
5.	-	100	-
6.	-	-	100

Tabulka 3 | Výsledné koncentrace efektorů po ošetření jednotlivých vzorků shodné pro celý triplikát. Sada obsahuje buňky ošetřené TKI v kombinaci s blinatumomabem. Ve výsledných grafech je přídavek TKI k blinatumomabu značen „+“ před jeho koncentrací.

Vzorek	blinatumomab [ng \times ml ⁻¹]	imatinib [μM]	ponatinib [nM]	dasatinib [nM]
1.	-	-	-	-
2.	25	-	-	-
3.	25	1	-	-
4.	25	10	-	-
5.	25	-	100	-
6.	25	-	-	100

4.5 Průtoková cytometrie (cytotoxický test)

Cytotoxické testy jsou jednoduchou metodou, jak stanovit efektivitu cytotoxických lymfocytů vůči cílovým buňkám v daných podmínkách (*in vitro*).

4.5.1 Základní uspořádání experimentu

Lymfocyty od zdravých dárců byly 24 h stimulovány blinatumomabem a následně smíchány v různých poměrech (Effector:Target mezi 5:1 a 20:1) s cílovými buňkami (B-ALL linie značená CFSE). Cytotoxicita byla stanovena

jako % neživotaschopných cílových buněk (PI pozitivní frakce buněk obarvených CFSE) po 24h inkubaci s lymfocyty.

4.5.2 Lymfocyty

Buňky od zdravých dárců byly izolovány standardním postupem přes Histopaque-1077. Plná krev byla naředěna 1:1 se sterilním PBS, opatrně nanesena na vrstvu Histopaque-1077 (10 ml v 50ml centrifugační zkumavce) a centrifugována (30 min / 400 g / RT, bez brzdy na centrifuze, aby se rozdělené buněčné frakce nesmíchaly s Histopaquem). Charakteristický prstýnek složený z PBMC byl odebrán do 15ml centrifugační zkumavky a 3 × promyt 15 ml sterilního PBS za následujících podmínek: (1) 400 g / 10 min, (2) 300 g / 7 min, (3) 300 g / 5 min, vše při RT. Pelet byl resuspendován v 10 ml ohřátého RPMI.

Pro střednědobou kultivaci a expanzi lymfocytů bylo použito médium CellGenix GMP DC s přídavkem rekombinantního IL-2 (500 UI/ml). Buňky byly v prvních dnech expanze stimulovány protilátkami proti CD3 a CD27, čímž došlo k stimulaci proliferace.

Den před použitím na cytotoxický test byly buňky převedeny do média bez IL-2 a stimulovány blinatumomabem (25 ng/ml, 24 h).

4.5.3 Cílové buňky

Přibližně 2×10^6 buněk cílové linie (RAJI, REH, ARH-77) bylo v den cytotoxického testu peletováno (300 g / 5 min) a resuspendováno v 1 ml ohřátého PBS (37 °C) s přídavkem 0,2 μ l 20mM CFSE. Buňky byly inkubovány 20 min v 37 °C a poté smíchány s 5 násobkem PBS se 4% BSA (inkubace 10 min / 37 °C). Po skončení inkubace byly buňky peletovány (300 g / 5 min) a naředěny RPMI na požadovanou hustotu (typicky 1×10^6 buněk/ml).

4.5.4 Cytotoxický test

V den provedení cytotoxického testu byly smíchány lymfocyty s cílovými buňkami (připravené dle návodů – **4.5.2; 4.5.3**) dle následujícího protokolu.

Lymfocyty byly peletovány (300 g / 5 min). Supernatant (kondiciované médium ze stimulovaných lymfocytů) byl použit jako kontrola ke každé testované podmínce. Zbytek lymfocytů byl resuspendován ve zbytku média. Do destičky byly nanесeny nejdříve resuspendované lymfocyty v objemu korespondujícím s kontrolou, poté TKI, a jako poslední cílové buňky, následovala inkubace 24 h / 37 °C.

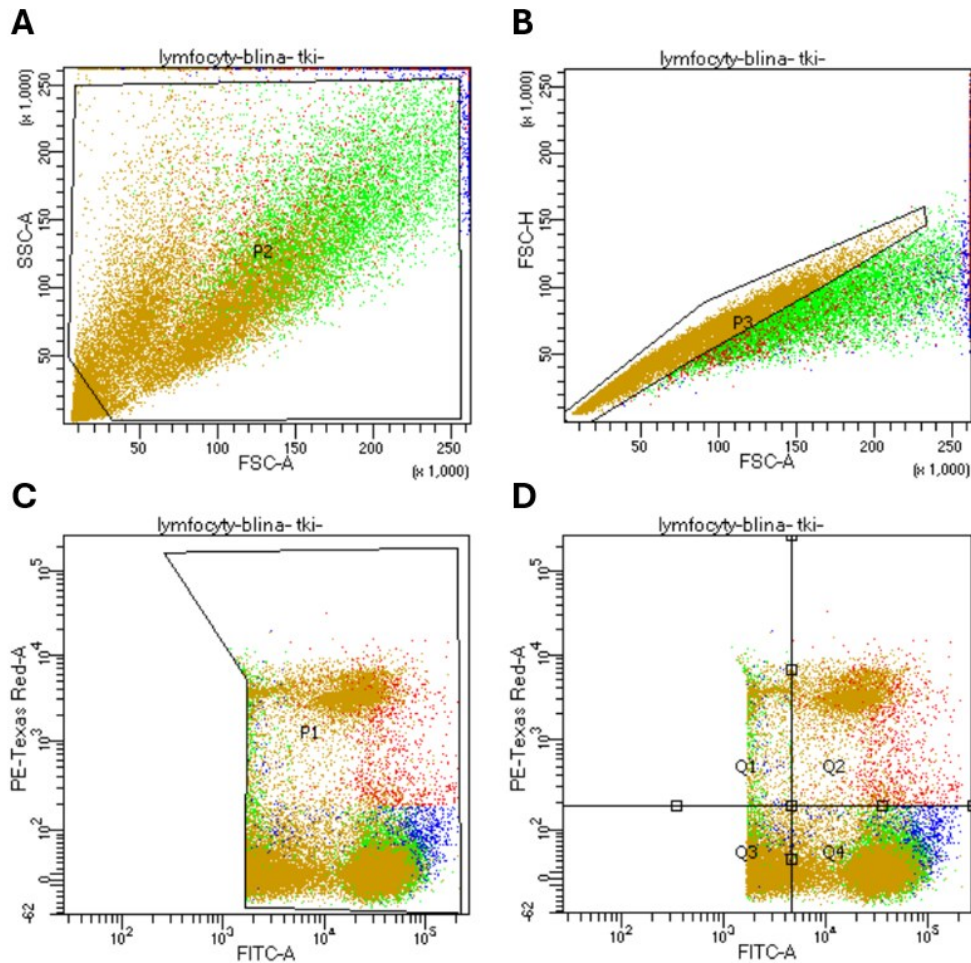
Výsledkem toho protokolu byly tedy dvě jamky pro každou z testovaných podmínek, přičemž první (kontrolní) jamka obsahovala pouze kondiciované médium z kultivace lymfocytů a druhou jamku s lymfocyty a cílovými buňkami.

V den měření byl obsah jamek přenesen do zkumavek pro průtokovou cytometrii, těsně před měřením byl do každé zkumavky přidán 1 μl propidium jodidu (PI) a zkumavka promíchána (vortex). Detekce frakce CFSE+ PI+ buněk probíhala na cytometru LSRFortessa za standardizovaného nastavení fotonásobičů na laserech, data byla vyhodnocena softwarem BD FACS Diva.

Cytotoxicita byla stanovena jako podíl mrtvých (PI+) cílových buněk korigovaných na kontrolu s médiem (dle následujícího vzorce)

Vzorec pro výpočet cytotoxicity

$$x = \frac{(\%) \text{ mrtvých buněk vzorek} - (\%) \text{ mrtvých buněk v kontrole}}{100 - (\%) \text{ mrtvých buněk v kontrole}}$$



Obr. 11 | Reprezentativní souhrn gatovací strategie cytotoxického testu

Selekce frakce CFSE+ PI+ (tedy mrtvých cílových buněk) při analýze na průtokovém cytometru LSRFortesa za pomoci softwaru BD FACS Diva. **A** – Základní scattergram FSC/SSC. Gate P2 odděluje buněčnou populaci od buněčného debris. **B** – Gate P3 odděluje dubletní události. **C** – pomocí cílového gatu P1 jsou vybrány všechny cílové buňky (CFSE+ v kanálu FITC-A). Lymfocyty (CFSE-) jsou zanedbány za účelem selekce relevantních událostí při měření. **D** – Stejné uspořádání jako (C), rozdělením do kvartálů dosáhneme oddělení cílových buněk (Q2 a Q4). V Q2 se nacházejí buňky PI+ (mrtvé cílové buňky, kanál PE-Texas Red A), naopak v Q4 se nachází populace živých cílových buněk (PI-).

5 Výsledky

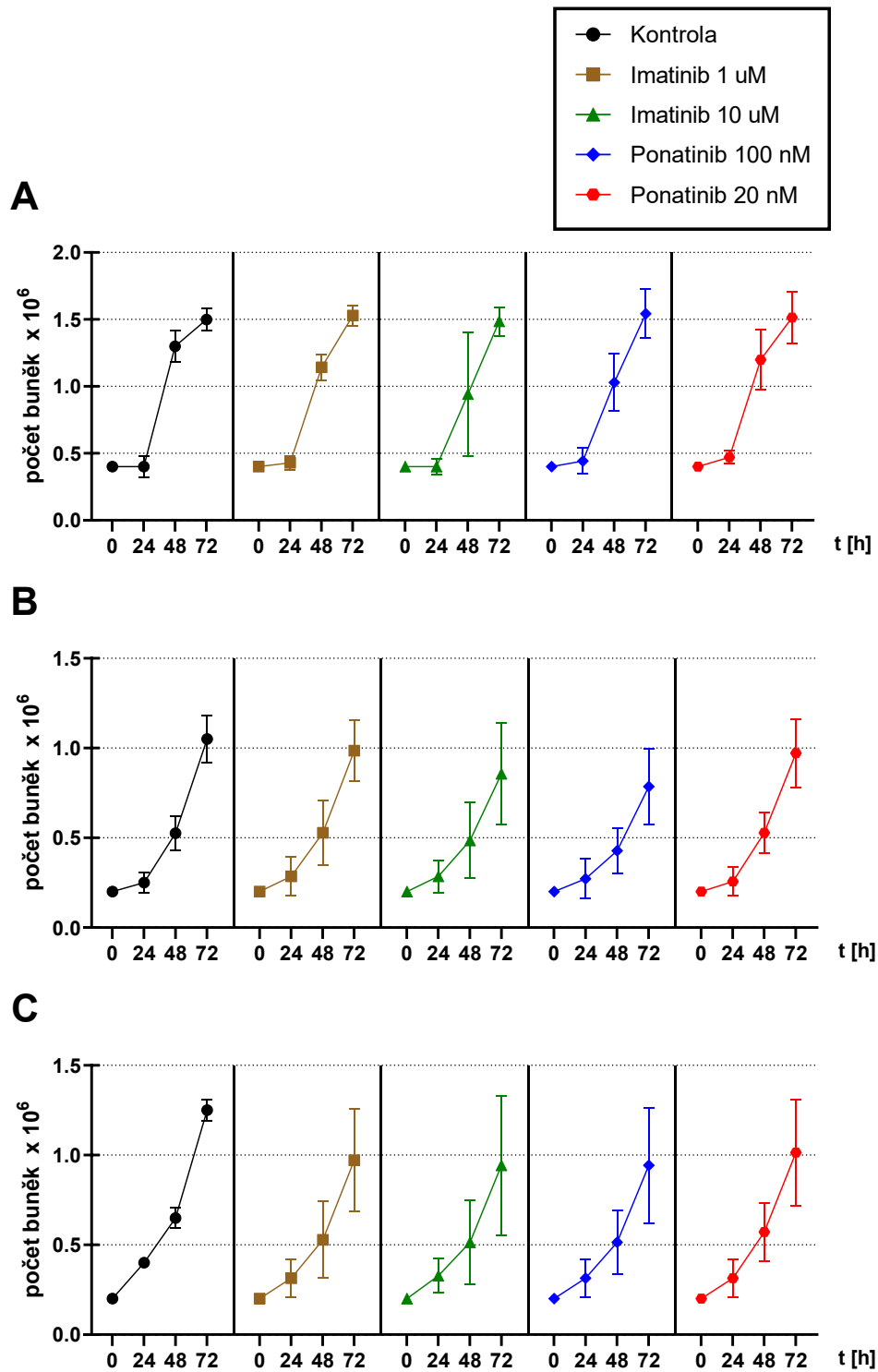
5.1 Růstové testy a viabilita B-ALL linií

Klinická efektivita blinatumomabu a TKI může souviset s jejich přímým vlivem na životaschopnost maligních buněk. Prvním krokem práce tedy bylo stanovení efektu těchto látek na proliferaci a viabilitu B-ALL linií.

Růstové testy na buněčných liniích prokázaly celkovou nezávislost proliferační expanze buněk na přítomnosti TKI nebo blinatumomabu. TKI efektoary (imatinib, ponatinib) neměly statistický významný vliv na změny v proliferaci a viabilitě buněk u všech použitých linií - **Obr. 12** (proliferace), **Obr. 13** (viabilita). Dasatinib byl testován v odděleném experimentu (**Obr. 14**), ale výsledný vliv koreluje s předchozími testy imatinibu s ponatinibem.

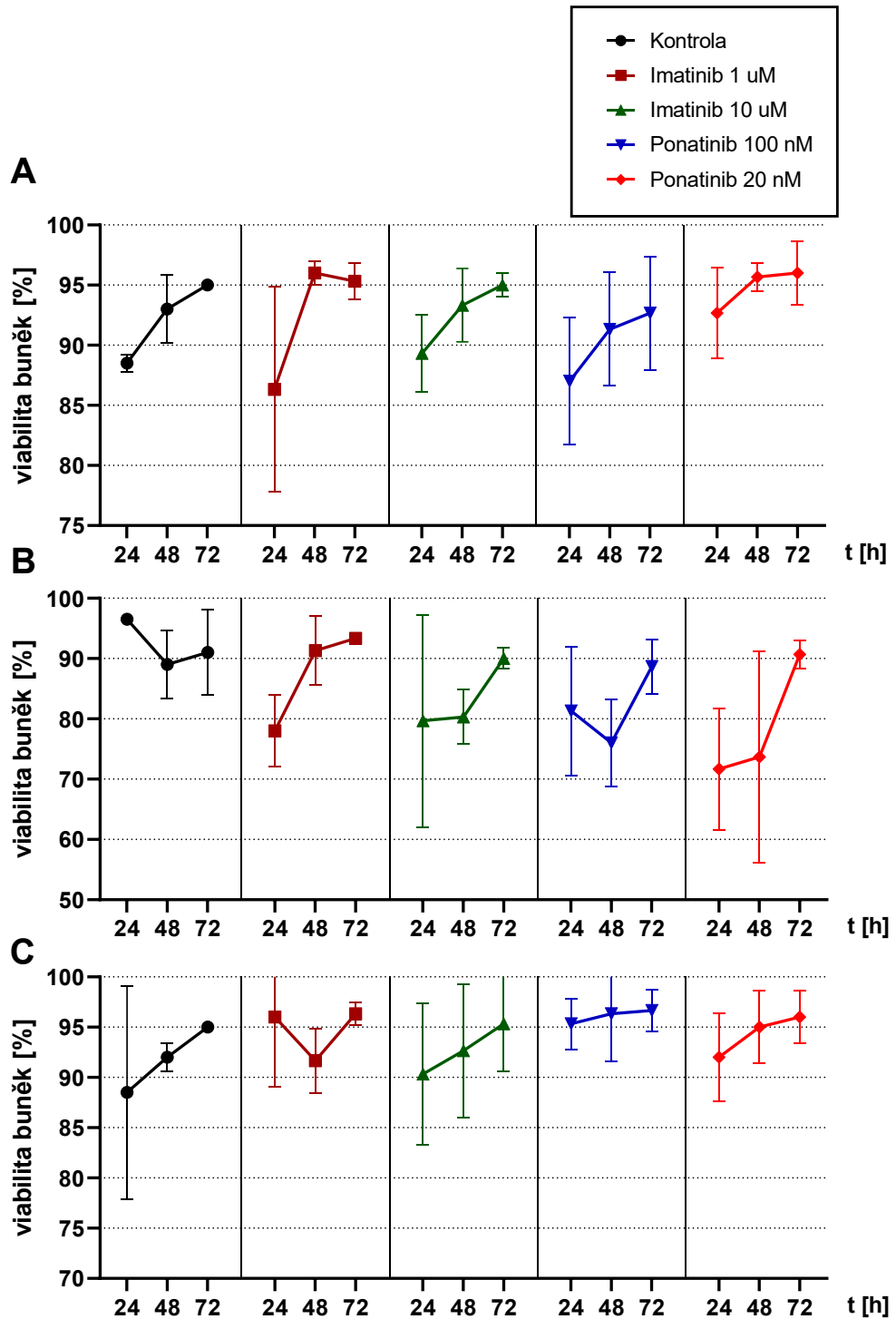
Samostatným testem bylo porovnání vlivu blinatumomabu na proliferaci a viabilitu buněk (**Obr. 15**). I v tomto případě jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi buňkami inkubovanými s blinatumomabem a kontrolními buňkami.

Míra proliferace a viability tedy není nijak zásadně ovlivněná kultivací buněk v prostředí spolu s TKI efektoary a blinatumomabem.



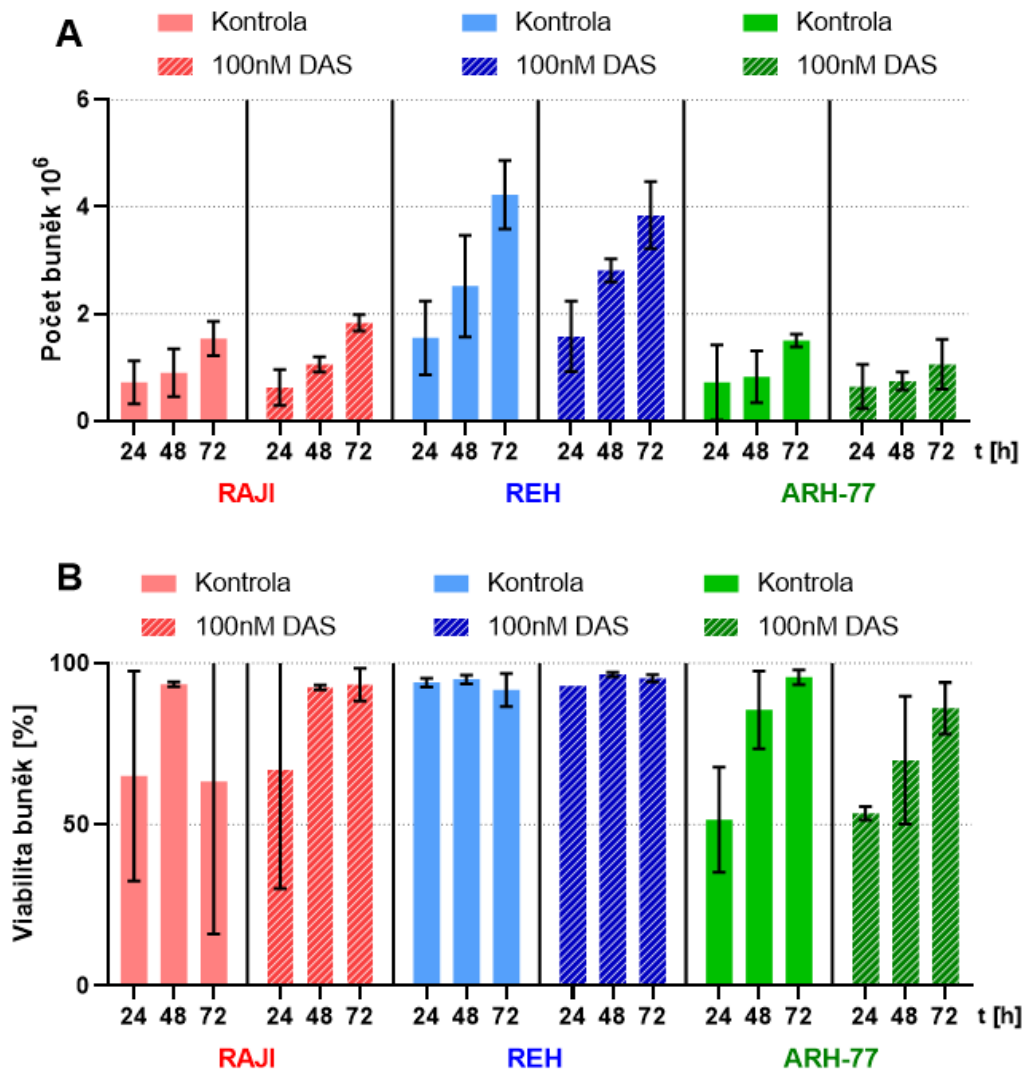
Obr. 12 | Vliv inhibitorů tyrozinových kináz na proliferaci B-ALL buněk

Koncentrace (počet) buněk v jednotlivých vzorcích byla analyzována po 24, 48 a 72 hodinách od přidání inhibitorů. **(A)** RAJI, **(B)** ARH-77, **(C)** REH. Souhrnná data a odchylky ze tří nezávislých experimentů.



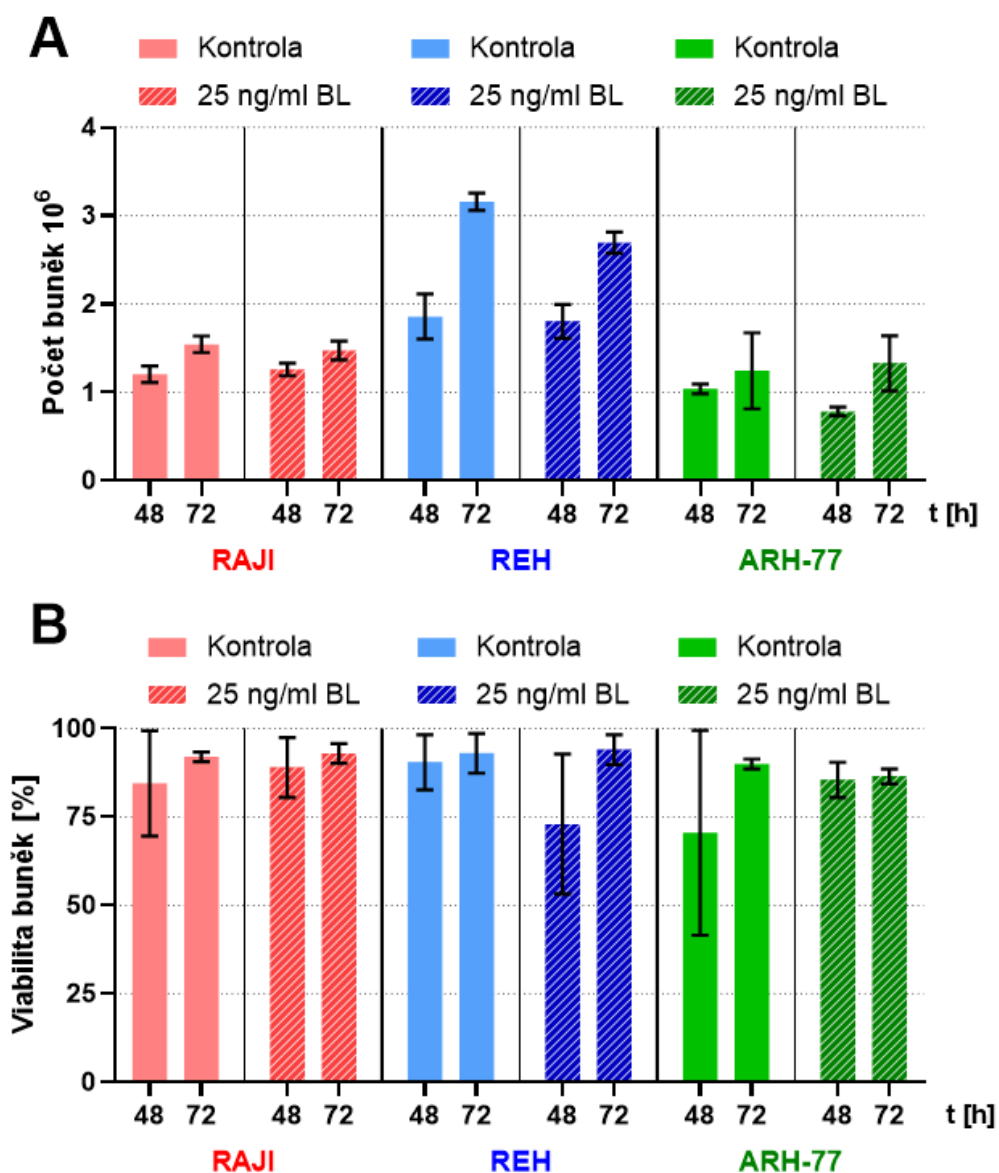
Obr. 13 | Vliv inhibitorů tyrozinových kináz na viabilitu B-ALL buněk

Frakce životaschopných buněk po 24, 48 a 72 hodinách od přidání inhibitorů. **(A)** RAJI, **(B)** ARH-77, **(C)** REH. Souhrnná data a odchylky ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 14 | Vliv dasatinibu na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk

Vzorky byly analyzovány po 24, 48 a 72 hodinách od přidání dasatinibu s výslednou koncentrací 100 nM **A** – viabilita buněk, **B** – proliferace buněk. Souhrnná data a odchylky ze tří nezávislých experimentů



Obr. 15 | Vliv blinatumomabu na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk

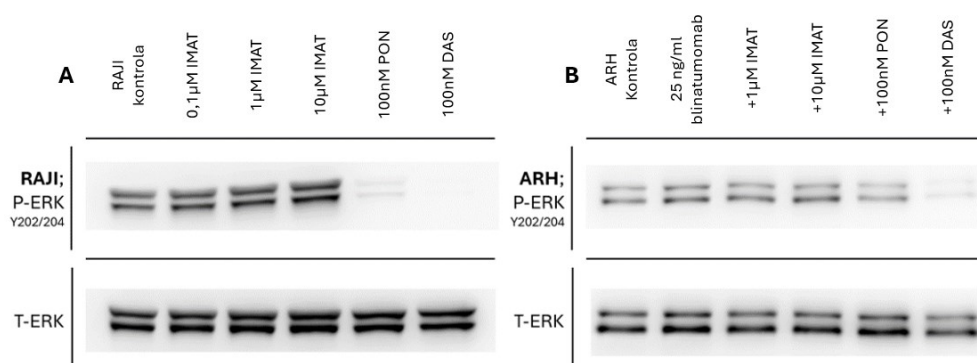
Vzorky byly analyzovány po 48 a 72 hodinách od přidání blinatumomabu. **A** – viabilita buněk, **B** – proliferace buněk. Souhrnná data a odchylky ze dvou nezávislých experimentů.

5.2 Exprese AKT a ERK

Jelikož blinatumomab a TKI mohou ovlivnit vlastnosti B-ALL buněk bez ohledu na jejich přežívání (například zvýšením jejich fragility), použili jsme kinázy Akt a Erk jako zástupné markery buněčných procesů spojených

s proliferací a aktivací B lymfocytů. Expresi těchto kináz v jednotlivých liniích a změny ve fosforylaci klíčových aktivačních zbytků po ošetření jednotlivými efekty jsme detekovali pomocí imunoblotingu s využitím fosfo-specifických protilátek. Reprezentativní výsledky western blotů jsou na **Obr. 16** (Erk) a **Obr. 19** (Akt).

5.2.1 Exprese a fosforylace kinázy Erk v jednotlivých liniích



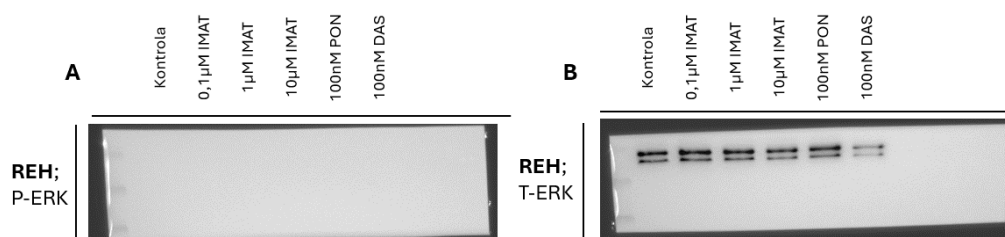
Obr. 16 | Reprezentativní WB pro p42/p44 Erk na liniích RAJI (**A**) a ARH-77 (**B**)

Buňky (3×10^6) byly inkubovány s příslušnými efekty po dobu 24h, lyzáty (6 μ l) byly smíchány se vzorkovým puřem, rozděleny pomocí SDS-PAGE a převedeny na nitrocelulózovou membránu. Imunodetekce probíhala pomocí fosfo-specifické protilátky proti Y202/204 kinázy Erk (**P-ERK**). **A** – linie RAJI ošetřená pouze TKI. **B** – linie ARH-77 ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

Výsledný efekt blinatumomabu na aktivitu Erk kinázy byl napříč liniemi minimální (**Obr. 18 B, D**). Oproti tomu efekt TKI se projevil jak samostatně bez blinatumomabu (**Obr. 18 A, C**), tak v kombinaci s blinatumomabem (**Obr. 18 B, D**). Imatinib měl pozitivní vliv na aktivitu kinázy Erk. Zvýšení aktivity bylo výraznější v buňkách bez přítomnosti blinatumomabu (**Obr. 18 A, C**) než v případě kombinace s blinatumomabem (**Obr. 18 B, D**). U linie RAJI byly tyto rozdíly dokonce statisticky významné. Dasatinib a ponatinib inhibovaly fosforylaci Erk u linie RAJI. U linie ARH-77 jsme pozorovali

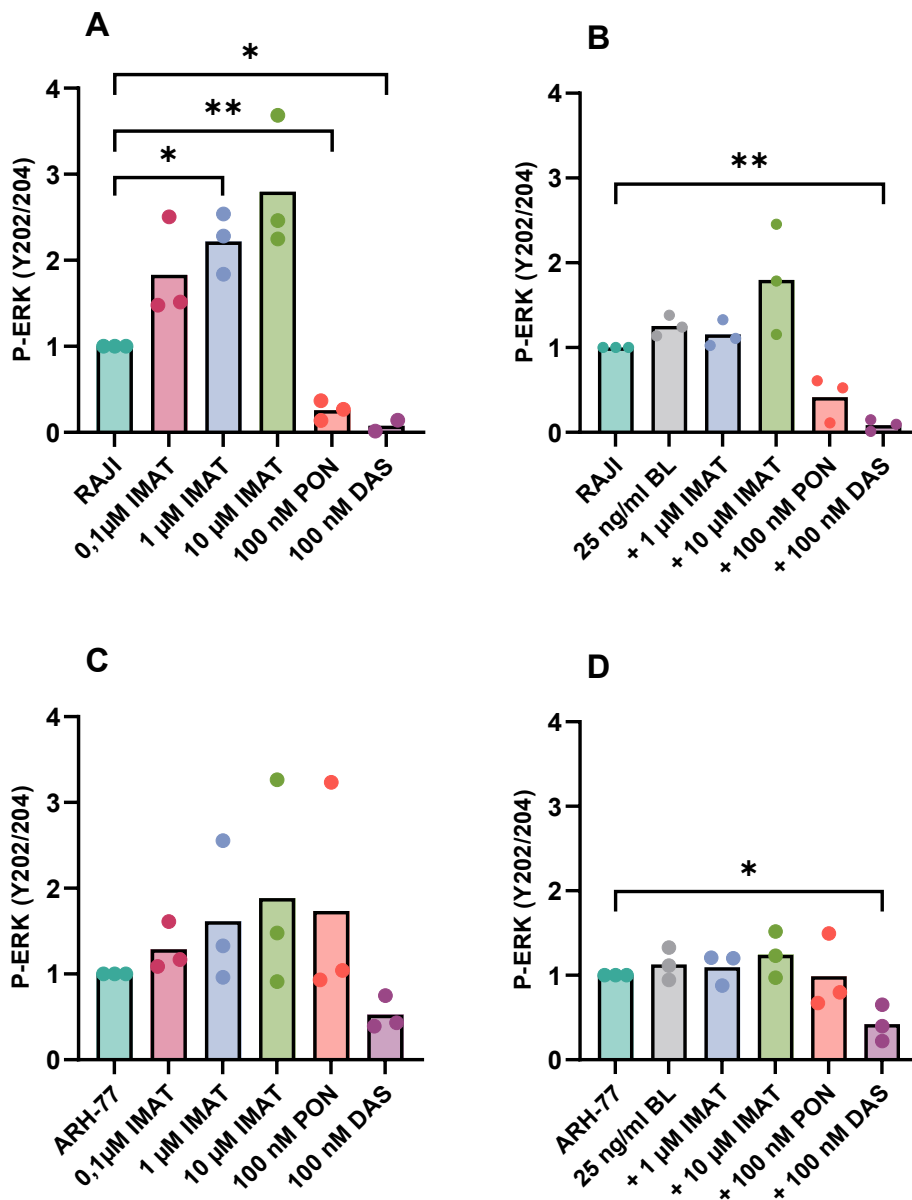
korespondující efekt pouze u dasatinibu (silněji v kombinaci s blinatumomabem, **Obr. 18 D**), zato ponatinib neměl na fosforylaci Erk žádný významný vliv. (**Obr. 18 B, D**).

U linie REH jsme opakovaně nebyli schopni detekovat žádný signál korespondující s fosforylovanou kinázou Erk (**Obr. 17, A**), zároveň i signál protilátky proti celkovému množství kinázy byl poměrně slabý a nestabilní (**Obr. 17, B**). Bloty u linie REH jsme tedy nevyhodnocovali.



Obr. 17 | Reprezentativní imunoblot pro nulovou aktivitu kinázy Erk v linii REH

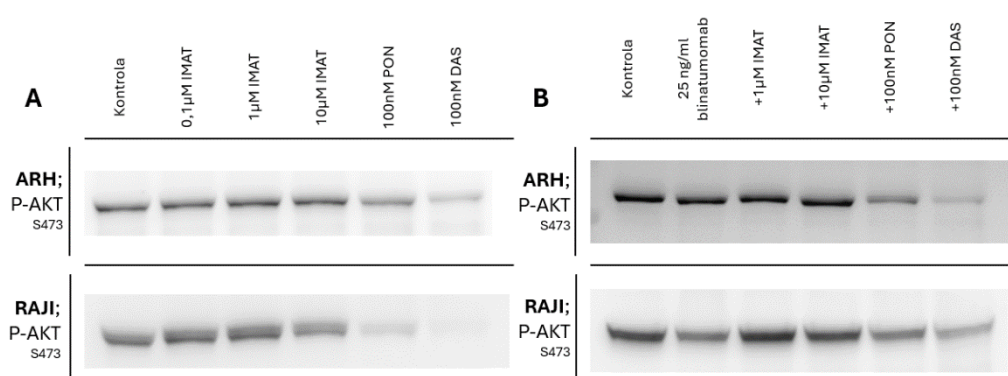
A – metodou imunoblotingu se specifickou protilátkou proti P-Y202/204 Erk nebyla zjištěna přítomnost fosforylované kinázy v linii REH. **B** – celková exprese kinázy Erk v linii REH.



Obr. 18 | Relativní změna fosforylace Y202/204 kináz Erk v liniích RAJI a ARH-77

Relativní změna fosforylace Erk kinázy v buňkách, stanovená pomocí imunoblotingu s využitím fosfo-specifické protilátky proti fosforylované kináze Erk (**P-ERK**) a tyto hodnoty byly vztaženy k celkové expresi Erk kinázy v buňkách, stanovené pomocí celkové protilátky. Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 9.1 (párový t-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **A** – linie RAJI ošetřená pouze TKI. **B** – linie RAJI ošetřená TKI s blinatumomabem. **C** – linie ARH-77 ošetřená pouze TKI. **D** – linie ARH-77 ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

5.2.2 Exprese kinázy AKT v jednotlivých liniích



Obr. 19 | Reprezentativní WB pro P-S473 Akt na liniích ARH-77 (**A**) a RAJI (**B**)

Buňky (3×10^6) byly inkubovány s příslušnými efekty po dobu 24h, lyzáty (12 μ l) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a převedeny na nitrocelulóзовou membránu. Imunodetekce probíhala pomocí fosfo-specifické protilátky proti S473 kinázy Akt (**P-AKT**). **A** – linie ARH-77 a RAJI ošetřené pouze TKI. **B** – linie ARH-77 a RAJI ošetřené TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

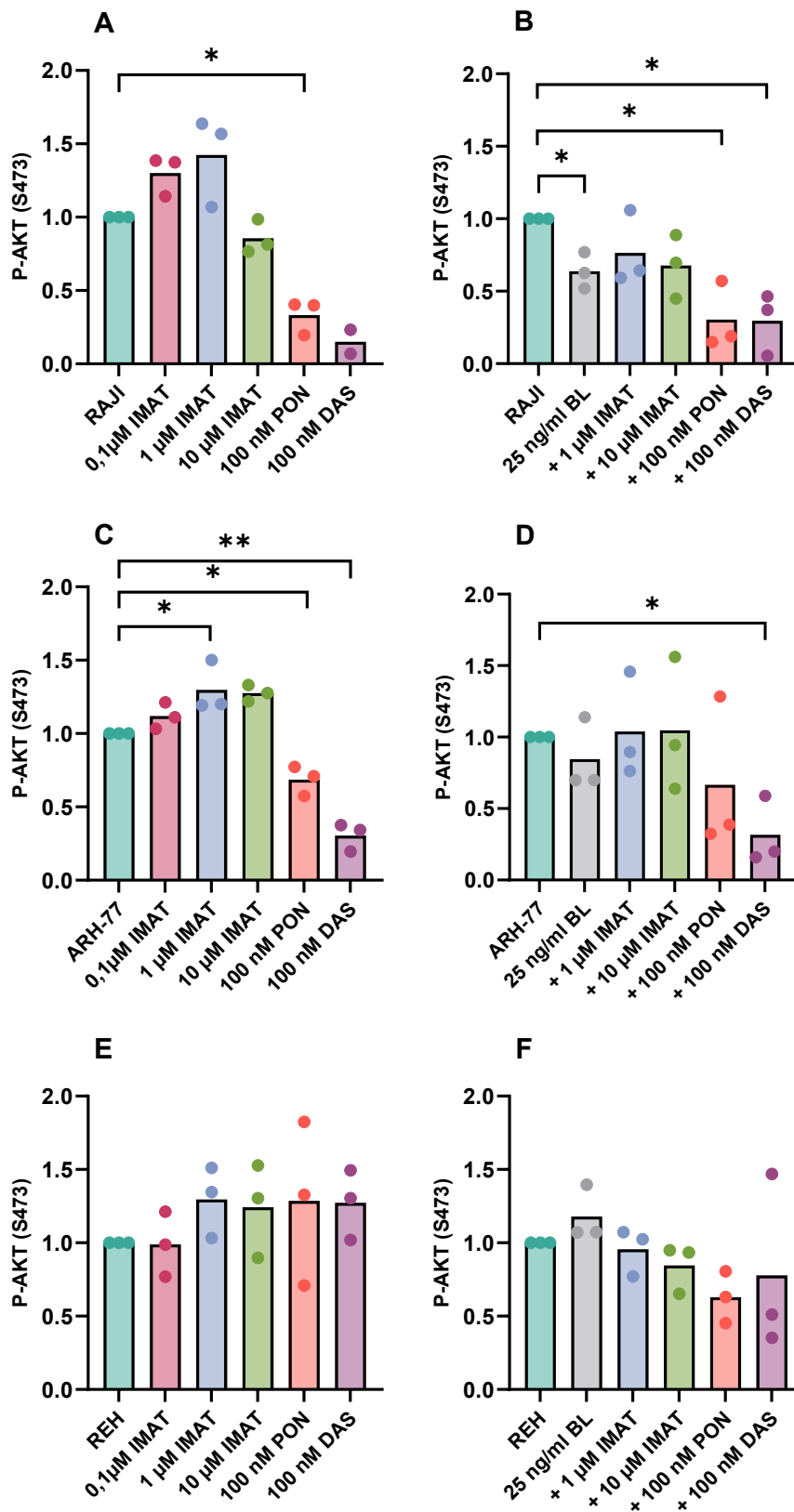
Aktivita kinázy Akt je dalším silným proliferačním znakem, a navíc je regulována mimo jiné signalizací od CD62L/PI3K. Změny v expresi CD62L jsme pozorovali v předchozí práci na projektu (viz kapitola **2.9**, **Obr. 10**).

Zajímalo nás tedy, zda a jak se projeví efekt TKI na tomto zástupném markeru PI3K signalizace. Ke stanovení aktivity kinázy Akt jsme použili protilátku proti S473, jehož fosforylace je hlavním znakem aktivní kinázy.

Blinatumomab u linií RAJI a ARH-77 snižoval fosforylaci S473 Akt, v případě RAJI dokonce statisticky významně (**Obr. 20 C, D**). Naopak u linie REH aktivitu mírně zvyšoval (**Obr. 20 F**).

Vliv TKI na fosforylaci Akt u linií RAJI a ARH-77 byl svou tendencí srovnatelný s jejich vlivem na kinázu Erk. Imatinib samotný způsobil zvýšení fosforylace kinázy Akt a nižší nárůst aktivity byl naměřen i v případech kombinace imatinibu s blinatumomabem. U linie ARH-77 bez přítomnosti blinatumomabu byl pozitivní efekt v koncentraci 1 μ M statisticky významný (**Obr. 20 C**). Ve srovnání s fosforylací Erk, kde jsme pozorovali nejvyšší

účinek u 10 μ M imatinibu (**Obr. 18**), byl maximální účinek na fosforylaci Akt dosažen obvykle už při 1 μ M koncentraci (**Obr. 20**). Multikinázové inhibitory ponatinib s dasatinibem v liniích RAJI a ARH-77 významně tlumily aktivitu kinázy, ve většině případů (na rozdíl od imatinibu) i se statisticky významným rozdílem (**Obr. 20 A, B, C, D**). U linie REH nebyl inhibiční efekt tolik výrazný, ve vzorcích ošetřených pouze TKI byla dokonce pozorována tendence k mírnému nárůstu fosforylace Akt (**Obr. 20 E, F**)



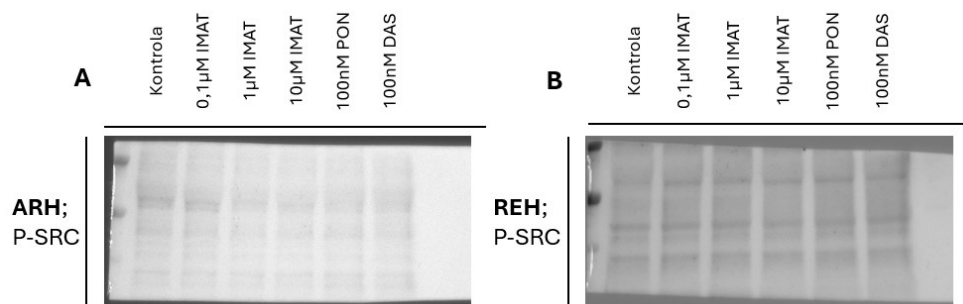
Obr. 20 | Změny fosforylace S473 kinázy Akt v liniích RAJI, ARH-77 a REH

Relativní změna fosforylace Akt kinázy v buňkách, stanovená pomocí imunoblotingu s využitím fosfo-specifické protilátky proti P-S473 Akt (**P-AKT**). Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 9.1 (párový t-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **A** – linie RAJI ošetřená pouze TKI. **B** – linie RAJI ošetřená TKI s blinatumomabem. **C** – linie ARH-77 ošetřená pouze TKI efektor. **D** – linie ARH-77 ošetřená TKI s blinatumomabem. **E** – linie REH ošetřená pouze TKI. **F** – linie REH ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

5.3 Exprese SFK

Nadměrná aktivita a exprese kináz rodiny Src (SFK) velmi často souvisí s nekontrolovanou stimulací buněk k proliferaci a růstu. SFK jsou navíc součástí adhezní signalizace buněk, mimo jiné i dráhy zprostředkované adhezní molekulou CD62L, a účastní se také signalizace od koreceptoru CD19, na který se váže blinatumomab. Změna v aktivitě SFK tedy může ukázat na intracelulární změny v adhezní signalizaci.

Cílem sledování fosforylace SFK bylo zjistit, jestli existuje rozdíl v aktivitě SFK při působení samotných TKI a působením TKI společně s blinatumomabem. Aktivita celé rodiny hematopoetických kináz Src (stanovená pomocí pan-specifické protilátky proti P-Y416 kináz rodiny Src a ekvivalentním) byla zkoumána pouze na linii RAJI, neboť u linií ARH-77 a REH byla celková aktivita nízká a neodlišitelná od pozadí (**Obr. 21**). Zástupně jsme tedy pro tyto linie zvolili protilátku s užší specifitou ke konkrétním kinázám z rodiny SFK, Lck a Fyn, které měly na western blotu měřitelný signál.

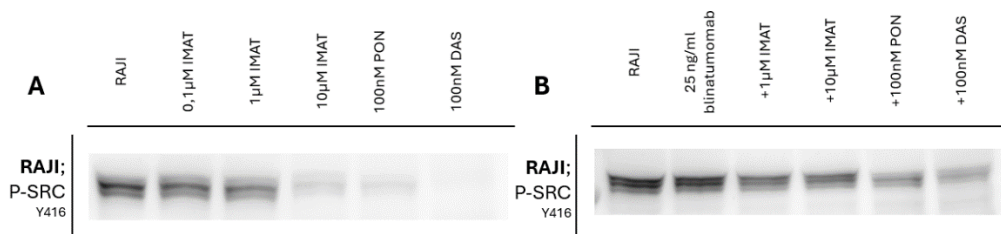


Obr. 21 | Reprezentativní WB pro nevýrazné aktivity SFK (P-Y416)

A – minimální signál pro detekci fosforylovaných kináz SFK u linie ARH-77.

B – minimální signál pro detekci fosforylovaných kináz SFK u linie REH. Při využití fosfo-specifické protilátky proti P-Y416 SFK tedy nebyl detekován žádný spolehlivý signál pro hodnocení těchto dvou linií.

5.3.1 Exprese P-SRC v linii RAJI

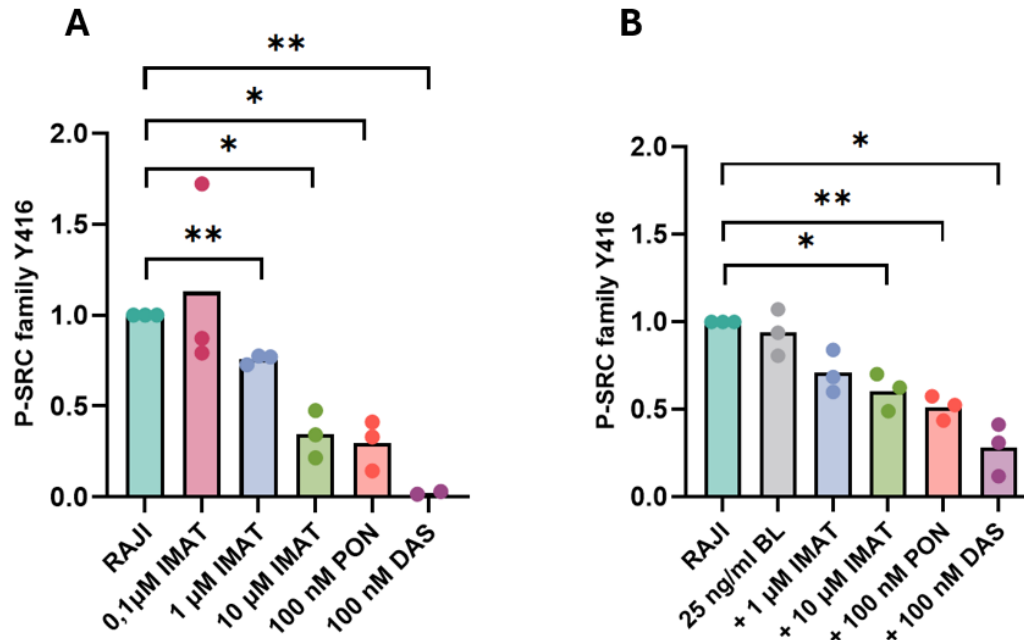


Obr. 22 | Reprezentativní WB pro P-Y416 SFK na linii RAJI

Buňky (3×10^6) byly inkubovány s příslušnými efekty po dobu 24h, lyzáty (12 μ l) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a převedeny na nitrocelulóзовou membránu. Imunodetekce probíhala pomocí fosfo-specifické protilátky proti Y416 (a ekvivalentním zbytkům) kináz rodiny Src (**P-SRC**). **A** – TKI bez blinatumomabu. **B** – TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

Negativní regulační efekt na aktivitu hematopoetických SFK u RAJI byl pozorován u obou případů multikinázových inhibitorů (ponatinib, dasatinib) a to se statisticky významným rozdílem (**Obr. 23 A**). Samotný blinatumomab neměl na fosforylaci kináz významný vliv (**Obr. 23 B**). Potlačení fosforylace SFK způsobily, jak TKI samotné, tak i v kombinaci s blinatumomabem, ovšem v případě kombinace se efekt u všech třech inhibitorů projevil menší intenzitou (stále se statisticky významným rozdílem).

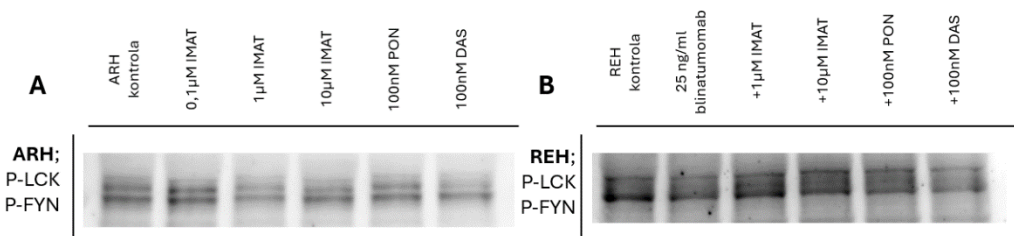
V případě imatinibu, který nemá vůči SFK specifický účinek, jsme i přesto pozorovali statisticky významné snížení fosforylace Y416 SFK u dvou vyšších koncentrací (1 a 10 μM ; **Obr. 23, A**).



Obr. 23 | Změny fosforylace Y416 SFK (P-SRC) v linii RAJI

Relativní změna úrovně fosforylace Y416 SFK stanovená pomocí imunoblotingu s využitím fosfo-specifické protilátky proti Y416 kináz SFK. Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 9.1 (párový t-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **A** – TKI bez blinatumomabu, **B** – TKI s blinatumomabem. Souhrnná data ze 3 nezávislých replikátů. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

5.3.2 Expres P-LCK/FYN

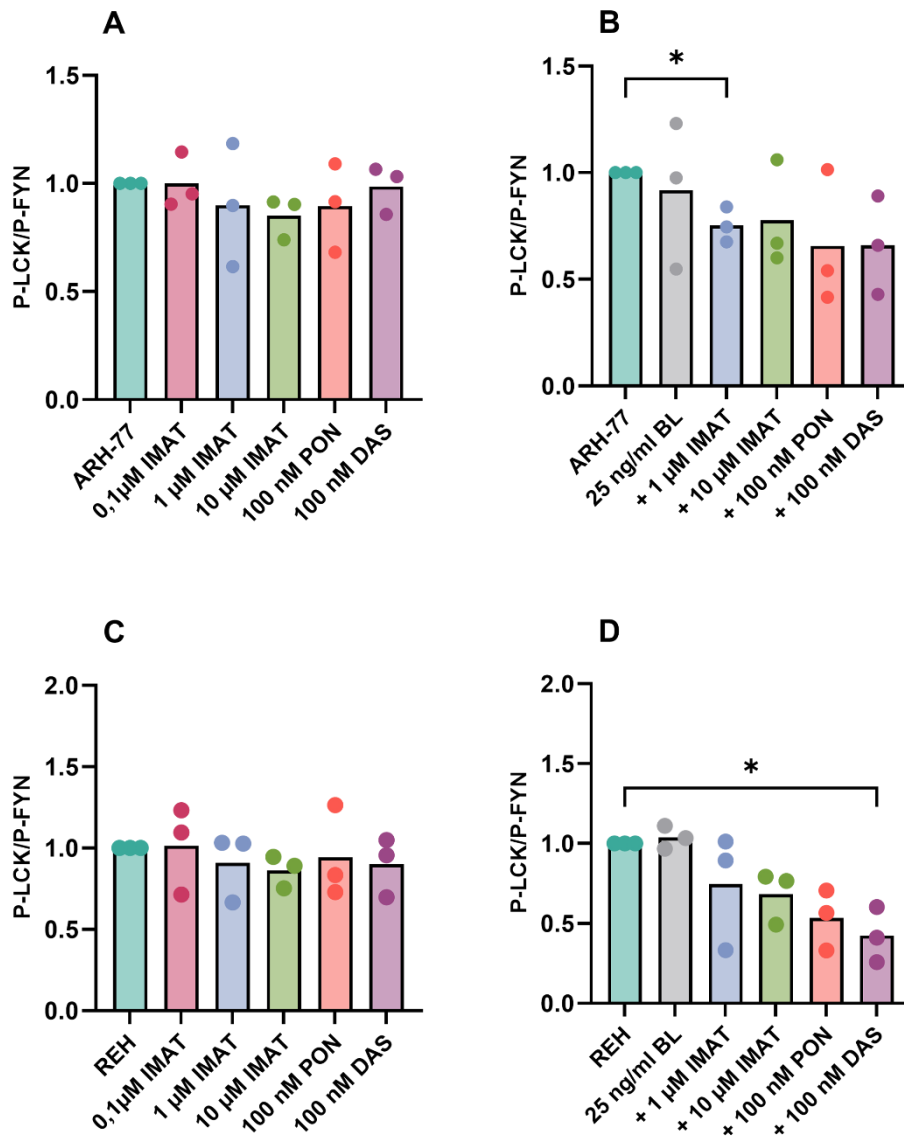


Obr. 24 | Reprezentativní WB pro P-Y416 LCK a FYN na liniích ARH-77 (**A**) a REH (**B**)

Buňky (3×10^6) byly inkubovány s příslušnými efektorů po dobu 24 h, lyzáty (12 μ l) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a převedeny na nitrocelulózovou membránu. Imunodetekce probíhala pomocí fosfo-specifické protilátky proti kinázám Lck a Fyn (**P-LCK/P-LYN**). **A** – linie ARH-77 ošetřená pouze TKI. **B** – linie REH ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

Jelikož jsme u linií ARH-77 a REH nemohli využít multispecifickou protilátku proti aktivačnímu místu kináz SFK (**Obr. 19**), použili jsme u těchto linií protilátku rozpoznávající kinázy Lck a Fyn. Ty jsou exprimovány v B a T lymfocytech a hrají roli v aktivaci a proliferaci buněk. Zároveň jsou stimulovány CD19 (cílovou molekulou pro blinatumomab)

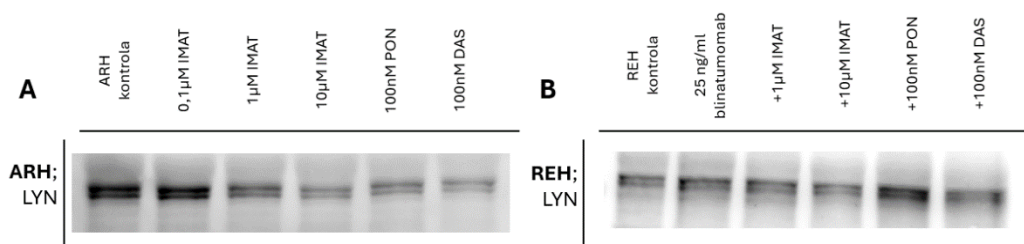
Účinek samotných TKI efektorů na fosforylaci kináz (**Obr. 25 A,C**) nebyl pozorován s žádným statisticky významným rozdílem. Ani v případě multikinázových inhibitorů (ponatinib, dasatinib) nebyl zaznamenán rozdíl ve fosforylaci oproti celkovým SFK na linii RAJI (**Obr. 23**). Kombinace blinatumomabu společně s TKI měla u obou linií slabý negativní regulační vliv na fosforylaci Lck a Fyn. Nejvýraznější úbytek fosforylace byl pozorován u linie REH ošetřené blinatumomabem v kombinaci s 100nM dasatinibem (**Obr. 25 D**). Rozdíl byl v tomto případě statisticky významný.



Obr. 25 | Změny fosforylace aktivačního místa kináz Lck a Fyn v liniích ARH-77 a REH

Relativní změna úrovně fosforylace aktivačního místa kináz Lck a Fyn stanovena pomocí imunoblotingu s využitím fosfo-specifické protilátky proti Lck a Fyn. Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 9.1 (párový t-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **A** – linie ARH-77 ošetřená pouze TKI. **B** – linie ARH-77 ošetřená TKI s blinatumomabem. **C** – linie REH ošetřená pouze TKI. **D** – linie REH ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

5.3.3 Exprese kinázy Lyn

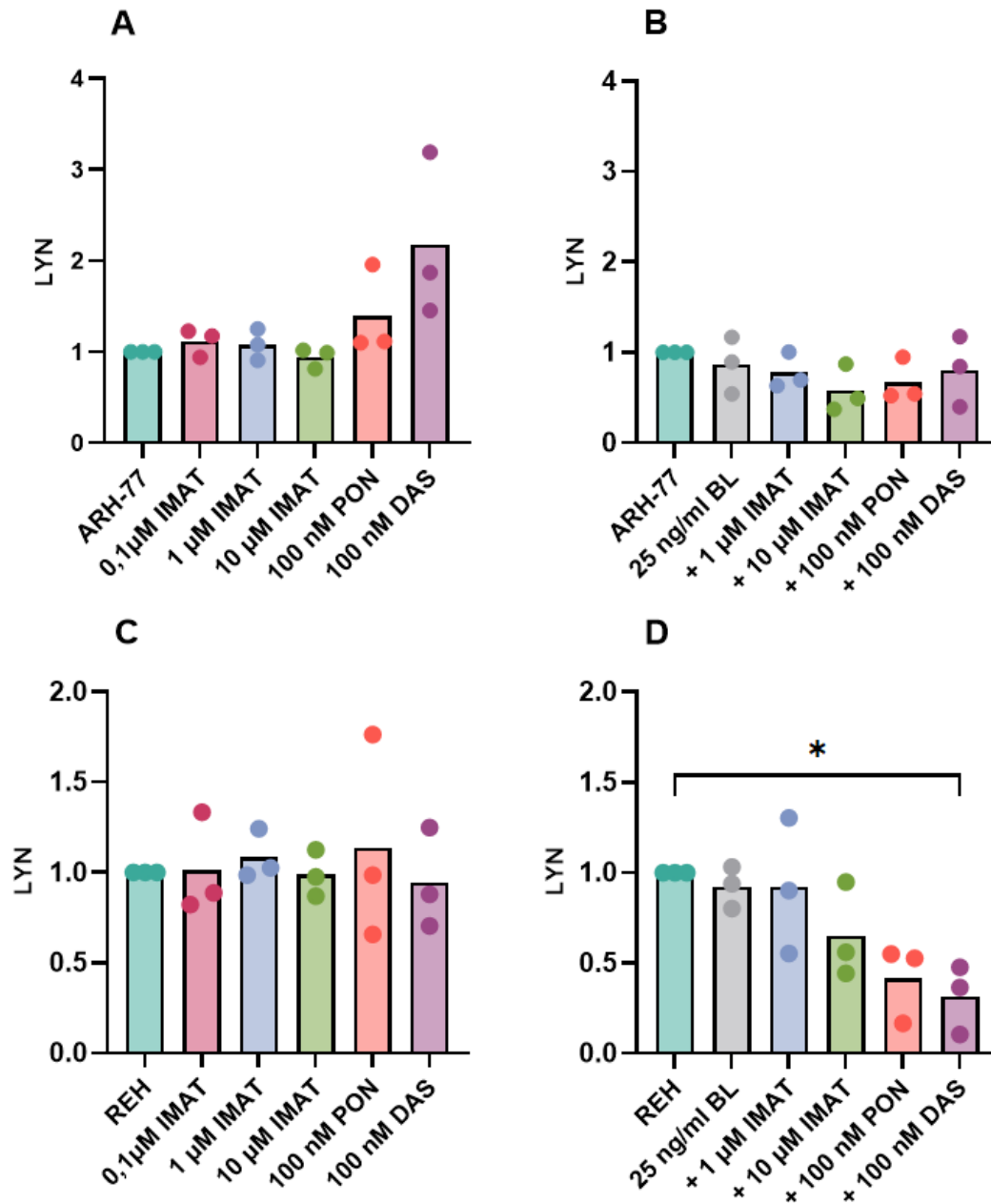


Obr. 26 | Reprezentativní WB pro Lyn na liniích ARH-77 (**A**) a REH (**B**)

Buňky (3×10^6) byly inkubovány s příslušnými efektry po dobu 24h, lyzáty (12 μ l) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a převedeny na nitrocelulóзовou membránu. Imunodetekce probíhala pomocí specifické protilátky proti kináze Lyn (**LYN**). **A** – linie ARH-77 ošetřená pouze TKI. **B** – linie REH ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

Jako alternativu k Lck/Fyn jsme použili protilátku proti kináze Lyn (z časových důvodů pouze v podobě, která detekuje celkové množství kinázy, nikoli její fosforylaci – ta bude předmětem další práce).

Kináza Lyn má v buňce pozitivní i regulační vliv na signální dráhy, které ovlivňují proliferaci, adhezi a expresi signálních molekul (viz **2.4.4 Lyn**). Účinek samotných TKI (**Obr. 27 A,C**) nebyl pozorován s žádným statisticky významným rozdílem. Pouze u linie ARH-77 ošetřené 100nM dasatinibem byl pozorován mírný nárůst exprese kinázy Lyn (**Obr. 27 A**). Kombinace blinatumomabu společně s TKI měla u obou linií (ARH-77, REH) slabý negativní regulační vliv na expresi. Nejvýraznější úbytek kinázy byl pozorován u linie REH ošetřené blinatumomabem v kombinaci s 100nM dasatinibem (**Obr. 27 D**). Rozdíl byl v tomto případě statisticky významný.



Obr. 27 | Expze kinázy Lyn (LYN) v liniích ARH-77 a REH

Relativní změna expze kinázy Lyn stanovená pomocí imunoblotingu s využitím specifické protilátky proti kináze Lyn. Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 9.1 (párový t-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **A** – linie ARH-77 ošetřená pouze TKI. **B** – linie ARH-77 ošetřená TKI s blinatumomabem. **C** – linie REH ošetřená pouze TKI. **D** – linie REH ošetřená TKI s blinatumomabem. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu.

5.4 Cytotoxický test

Jelikož data naznačují, že dasatinib brání cytotoxickému účinku zprostředkovanému blinatumomabem *in vitro* (Leonard et al., 2021), ale zároveň se ukazuje že kombinace dasatinibu a blinatumomabu v klinickém uspořádání vedou k lepším výstupům, než jiné terapeutické postupy (alespoň u Ph+ B-ALL; Foà et al., 2020), rozhodli jsme se tato data rozšířit o další klinicky používané TKI (ponatinib a imatinib) a Ph- B-ALL buňky.

5.4.1 Příprava buněk pro cytotoxické testy

Jako cílové buňky pro cytotoxický test jsme postupně použili všechny tři linie; lymfocyty pocházely od celkem 4 zdravých dárců. Použité koncentrace jednotlivých efektorů jsou uvedeny v **Tabulka 4**. Podrobný protokol je uveden v kapitole 4.5.

Tabulka 4 | Výsledné koncentrace efektorů pro cytotoxický test

Vzorek	blinatumomab [ng × ml ⁻¹]	imatinib [μM]	ponatinib [nM]	dasatinib [nM]
1.	-	-	-	-
2.	25	-	-	-
3.	25	1	-	-
4.	25	10	-	-
5.	25	-	-	2
6.	25	-	-	100
7.	25	-	2	-
8.	25	-	100	-

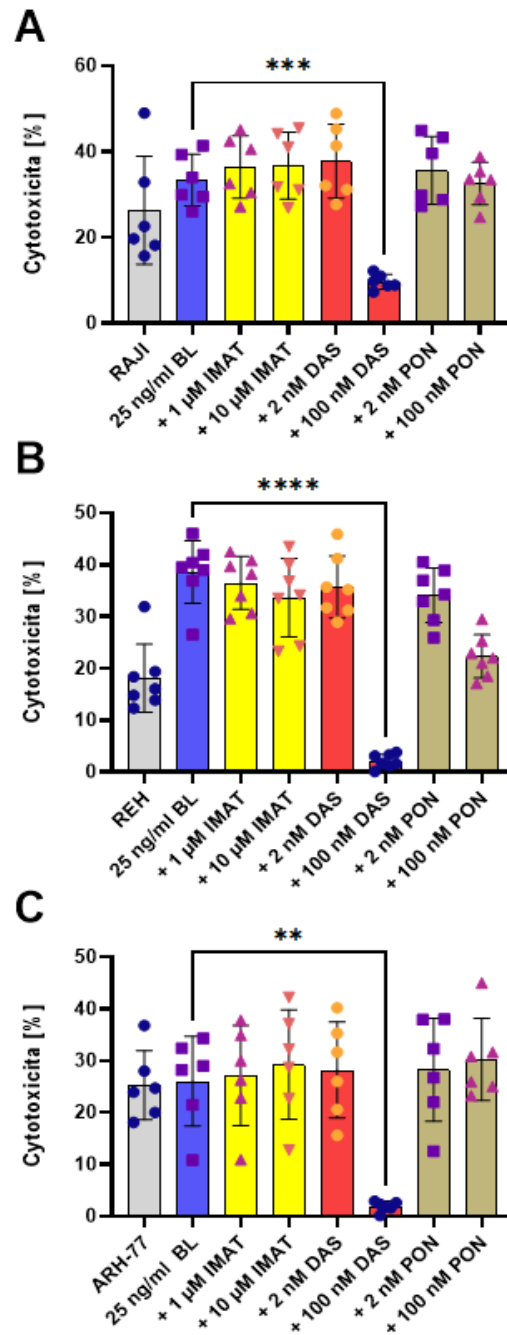
5.4.2 Výsledky cytotoxického testu

Blinatumomab samotný stimuloval cytotoxicitu T-lymfocytů nejvýznamněji vůči linii REH, nevýrazná stimulace byla pozorována i u linie RAJI (

Obr. 28 A, B). Vliv na cytotoxicitu na buňky linie ARH-77 nebyl pozorován.

Vliv TKI efektorů v kombinaci s blinatumomabem byl ve většině případů nevýznamný, respektive cytotoxicita T-lymfocytů nebyla rozdílná při použití samotného blinatumomabu a kombinací s TKI. Pouze 100nM dasatinib výrazně snížil cytotoxicitu lymfocytů u všech třech linií a použitých lymfocytů, a to se statisticky významným rozdílem (

Obr. 28)



Obr. 28 | Cytotoxický efekt T-lymfocytů na Ph- B-ALL linie.

Cytotoxická aktivita T-lymfocytů na B-ALL liniích (**A**) RAJI, (**B**) REH, (**C**) ARH-77, měřená pomocí průtokové cytometrie. Jednotlivé vzorky barveny těsně před měřením pomocí propidium jodidu (PI) a promíchány. Jednotlivé grafy shrnují výsledky ze šesti (**A**, **C**) případně sedmi (**B**) nezávislých experimentů. Detekce frakce CFSE+ PI+ buněk (mrtvé cílové buňky) pomocí LSRFortessa, data byla vyhodnocena softwarem BD FACS Diva. Označení „+“ před koncentrací inhibitoru značí kombinaci s 25 ng/ml blinatumomabu. Grafy zobrazují souhrnná data s použitím lymfocytů od 4 různých dárců.

6 Diskuse

Tato práce navazuje na předchozí výsledky laboratoře, které mimo jiné ukázaly, že některé z klinicky používaných inhibitorů tyrozinových kináz (TKI), konkrétně dasatinib a ponatinib, zvyšují přítomnost adhezního proteinu CD62L (L-selectin) na povrchu B-ALL buněk (**Obr. 10**). CD62L (případně jeho absence) je přitom důležitý faktor pro zacílení hematopoetických buněk do různých kompartmentů, jako je kostní dřev nebo slezina. U T-lymfocytů je ztráta CD62L z povrchu buněk (nikoli snížená exprese) spojena s apoptózou (Kern et al., 2000; Xu et al., 2008).

Inhibitory tyrozinových kináz používané v kombinaci s blinatumomabem v léčbě Ph+ B-ALL (imatinib, dasatinib a ponatinib) mají rozdílnou charakteristiku. Zatímco imatinib je velmi specifický inhibitor, který zasahuje kinázy Abl, PDGFR a c-Kit (není tedy přímým inhibitorem SFK), dasatinib a ponatinib jsou ve své podstatě multikinázové inhibitory, které byly vyvinuty za účelem překonání rezistencí vznikajících při léčbě pacientů imatinibem. Oba inhibitory mají desítky buněčných cílů, mezi nimi také kinázy rodiny Src. Literatura často označuje imatinib jako TKI první generace a dasatinib s ponatinibem jako navazující TKI druhé generace.

Kináza c-Src funguje u adherentních buněčných typů především jako regulátor adhezní signalizace a tvorby fokálních adhezí (tedy kontaktů buněk s extracelulární matricí), ale účastní se i signalizace z mezibuněčných kontaktů (McLachlan et al., 2007). Její role v ovládní dynamiky aktinového cytoskeletu pomocí integrinové signalizace mimo jiné podporuje přežívání buněk (Westhoff et al., 2004).

U hematopoetických buněk mají kinázy rodiny Src (SFK) více rozlišné role, neboť tyto buňky mají jiné adhezní vzorce (migrují po organismu a jejich adhezivita je velmi specificky cílená do místa, kde jsou v dané chvíli vyžadovány). Konkrétně se dle typu buněk jedná o kinázy **Lyn**, **Fyn**, **Fgr**, **Lck**

a Hck. SFK v hematopoetických buňkách regulují mimo jiné jejich aktivaci zprostředkovanou vytvořením imunologické synapse s jinou buňkou (typické pro kinázy Lck a Fyn u B buněk a T buněk), případně se účastní procesů adheze k extracelulární matici (kináza Lyn u myeloidních buněk; Röslová et al., 2018).

Při zkoumání vlivu zvýšené přítomnosti CD62L na povrchu buněk (indukované efektem TKI) na jejich adhezní vlastnosti, bylo logické ověřit přímý vliv TKI na viabilitu a proliferaci buněk. Vzhledem k tomu že se v klinické praxi TKI využívají u B-ALL spolu s blinatumomabem, zahrnuli jsme do testování i vliv blinatumomabu na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk.

Obr. 12 a **Obr. 14 (A)** dokazuje, že vliv TKI na proliferaci Ph- B-ALL linií je zanedbatelný až neexistující, a to samé lze říci o blinatumomabu viz. **Obr. 15**.

Z dřívějších studií víme, že TKI nemají příliš velký efekt na životaschopnost BCR-ABL negativních maligních buněk odvozených od myeloidních poruch (Obr et al., 2014). B lymfocyty jsou (oproti myeloidním derivátům) více ovlivněny signalizací SFK. Nulový efekt na proliferaci a viabilitu, který je výsledkem našeho testu, je tedy poměrně překvapivý a na základě teoretické rešerše nečekaný.

Blinatumomab cílí u B buněk na CD19, kde se váže a tvoří spoj s T lymfocyty. Jelikož klon protilátky použitý v blinatumomabu (HD37; Burt et al., 2019) má na CD19 inhibiční vliv (Pezutto et al., 1987), očekávali jsme i u blinatumomabu, negativní vliv na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk.

Tento očekávaný efekt jsme opět na základě testů nesledovali (viz **Obr. 15**), možný důvod tohoto rozdílu výsledků testu a teoretických poznatků je fakt, kdy je klon HD37 (použitý v blinatumomabu) spojen s negativním efektem na B buněčnou aktivaci jen tehdy, je-li aktivace dosaženo přes B buněčný receptor.

Po vyvrácení přímého vlivu TKI a blinatumomabu na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk jsme se přesunuli na vliv těchto efektorů na intracelulární signalizaci spojenou s přežíváním B-ALL buněk. Jako vhodný proliferační marker, který se účastní této signalizace, jsme zvolili kinázy Erk1/2, respektive jejich aktivitu vyjádřenou její fosforylovanou formou. Fosforylace kináz Erk na jejich aktivačním místě (Y202/204) se téměř shoduje s mírou aktivity těchto kináz. Experimenty byly provedeny pro jednotlivé efekторы samotné (TKI, blinatumomab), a následně i v kombinaci, abychom odhalili případné vzájemné ovlivňování.

Vliv samotného blinatumomabu na množství fosforylované kinázy Erk (P-ERK) byl naprosto minimální (**Obr. 18 B, D**). Naopak výrazný vliv na množství P-ERK měla přítomnost dasatinibu, a to jak samotného, tak v kombinaci s blinatumomabem. Výsledkem byla silná redukce fosforylované formy kinázy u obou linií (RAJI a ARH-77), u kterých jsme byli schopni přítomnost P-ERK detekovat. U linie RAJI se podobným redukčním efektem projevil i účinek ponatinibu.

Aktivita Erk kinázy je závislá na SFK (Hu et al., 2009; Rusanescu et al., 1995). SFK mohou ovlivnit aktivitu Erk dvojitým způsobem - aktivací MEK, což je upstream signalizace v Erk kaskádě, případně inhibicí protein fosfatázy PP2A, která za normálních okolností defosforyluje klíčové aktivační zbytky v Erk.

Tato hypotéza je podpořena aktivitou SFK v jednotlivých liniích. U RAJI jsme detekovali mnohem silnější signál SFK na imunoblotu, než u ARH-77 a REH (**Obr. 21**). U těchto linií byl signál detekovaný pomocí pan-specifické protilátky proti P-SFK velmi slabý, proto jsme pro další analýzy použili specifickou protilátku proti Lck/Fyn, tedy kinázám, které jsou kanonicky exprimované v B a T lymfocytech a mimo jiné hrají roli v regulaci aktivity a

proliferace těchto buněk. Signál protilátky specifické proti Lck a Fyn jsme byli v ARH-77 a REH schopni detekovat poměrně spolehlivě (**Obr. 24**).

P-SFK protilátka by měla spolehlivě rozpoznat mimo jiné právě kinázy Lck a Fyn (a Lyn, o které budeme hovořit později), a je tedy velmi pravděpodobné, že množství fosforylovaných SFK v ARH-77 a REH je výrazně nižší než u RAJI.

Signál protilátky proti P-SFK, který jsme detekovali u RAJI, podle očekávání klesl na minimum u obou SFK-specifických inhibitorů (dasatinib s $p < 0,01$ a ponatinibu s $p < 0,05$; **Obr. 23**). To koresponduje s výsledky předchozích prací laboratoře na myeloidních buňkách, kdy 100nM dasatinib spolehlivě inhiboval jakoukoli aktivitu SFK (Obr et al., 2014). Přesto ani jeden z inhibitorů nedokázal významně snížit fosforylaci Lck/Fyn u ostatních linií detekovanou pomocí alternativní protilátky proti těmto kinázám (**Obr. 25**). Tento výsledek je poměrně překvapivý, ale z časových důvodů jsme bohužel nebyli schopni ověřit jej použitím protilátky proti P-Lck/Fyn, kterou jsme použili na REH a ARH-77, i na linii RAJI. Tím bychom zjistili, zda se jedná o nekorespondenci signálů protilátek (tedy o případ, kdy by P-SFK klesala, ale P-Lck/Fyn ne), nebo zda jsme našli první buňky, ve kterých 100nM dasatinib neinhibuje některé zástupce SFK. Tato nesrovnalost bude předmětem další práce.

Tyto rozdíly lze teoreticky vysvětlit tím, že u RAJI byl mnohem vyšší signál P-SFK, kdežto u REH a ARH-77 jsme jej nebyli schopni pomocí P-SFK protilátky detekovat. To naznačuje, že celkové množství P-SFK u RAJI je vyšší než u ostatních linií. V budoucnu je třeba ověřit pravdivost této hypotézy právě pomocí použití protilátek specifických proti jednotlivým kinázám (P-Lck/Fyn na RAJI a P-Lyn u všech linií).

Zatímco blinatumomab samotný neměl na fosforylaci zkoumaných kináz významný vliv, účinek dasatinibu a ponatinibu na fosforylaci kináz Erk (**Obr. 18 B, D**) i SFK (**Obr. 23 B**; **Obr. 25 B, D**) v jeho přítomnosti byl vyšší (relativní snížení fosforylace v přítomnosti blinatumomabu o 30 – 50 % vůči

efektu TKI bez blinatumomabu). Blinatumomab je vytvořen z klonu HD37 anti-CD19 protilátky, která má na CD19 inhibiční vliv. Jelikož CD19 při své aktivaci rekrutuje a stimuluje aktivitu SFK (hlavně kinázy Lyn a Fyn, Chalupny et al., 1995; Fujimoto et al., 1999; Poe et al., 2001), dá se předpokládat, že zablokování vnitřní aktivity CD19 blinatumomabem zvýší citlivost těchto kináz vůči inhibici pomocí TKI.

Obdobná situace platí i pro kinázy Erk, kdy je CD19 schopno tyto kinázy aktivovat (Hojer et al., 2014; Li and Carter, 1998), a zablokování vnitřní aktivity CD19 by tedy mohlo posunout rovnováhu směrem k vyšší citlivosti ERK k TKI. Nutno poznamenat, že účinek TKI na ERK je pravděpodobně zprostředkován SFK, ale vzhledem k širokospektré povaze dasatinibu a ponatinibu nelze vyloučit přímý efekt, či efekt zprostředkovaný jinou kinázou. Dále je nutné poznamenat, že aktivita CD19 je prozkoumána hlavně v situaci, kdy je B lymfocyt stimulován přes BCR (CD19 zde funguje jako koreceptor).

Vliv ponatinibu a dasatinibu se shodoval s jejich předpokládaným účinkem (tlumení fosforylace kináz), ale imatinib měl výsledný efekt opačný. Imatinib zesiloval fosforylaci kináz Erk (u RAJI statisticky významně, **Obr. 18**).

Imatinib je vysoce specifický inhibitor kináz c-Abl, c-Kit a PDGFR a pravděpodobně právě inhibice PDGFR, může paradoxně způsobit zvýšení aktivity Erk (Dong et al., 2011). Literatura se nicméně příliš neshoduje v názoru na vliv inhibice PDGFR k aktivitě Erk, neboť lze najít i publikace zmiňující opačný efekt, než který jsme pozorovali (Zou et al., 2022). Vysvětlením tohoto rozporu by mohlo být zapojení různých variant PDGFR.

Pro další potvrzení vlivu TKI a blinatumomabu na intracelulární signalizační kaskády, které jsou spojeny s přežíváním a proliferací buněk, jsme zvolili studium serin/threoninové kinázy Akt. Ta je důležitou součástí kanonické signalizační dráhy PI3K/Akt/mTOR, která má vliv na

životaschopnost a proliferaci buněk. Navíc je tato dráha spojena s CD62L, jehož přítomnost na buněčné membráně B-ALL buněk je zvýšena působením TKI (viz kapitola **2.9**, **Obr. 10**). V případě Akt kinázy se tedy jedná o další důležitý marker životaschopnosti a proliferace buněk, a zároveň slouží jako zástupný marker pro signalizaci CD62L/PI3K.

Fosforylace Akt na S473 (P-AKT) slouží jako zástupný marker její aktivity v buňce. Pomocí fosfo-specifické protilátky proti S473 Akt jsme tedy porovnali vliv TKI a blinatumomabu samotných a zároveň na kombinaci těchto efektorů. Fosforylovanou formu kinázy jsme byli schopni spolehlivě detekovat u všech tří B-ALL linií (RAJI, ARH-77 a REH).

Samotný blinatumomab měl napříč liniemi protichůdný efekt, u linií RAJI a ARH-77 (**Obr. 20 C, D**) došlo ke snížení fosforylace kinázy (RAJI statisticky významně). Naopak u linie REH byl pozorován mírný nárůst fosforylace (**Obr. 20 F**). Při porovnání s výsledky povrchové exprese CD62L (**Obr. 10**) lze konstatovat, že výsledný efekt blinatumomabu na signalizaci přes PI3K není nikterak významný, ale při využití Akt jako markeru jsou vidět regulační efekty na rozdíl od pozorování CD62L.

Velice rozporuplné výsledky ve srovnání právě s CD62L jsou vlivy samotných TKI na signalizační dráhu PI3K/Akt. Ponatinib a dasatinib jakožto multikinázové inhibitory měly silný inhibiční efekt na fosforylaci kinázy Akt, který byl pozorován hlavně u linií RAJI a ARH-77 (**Obr. 20 A, C**), kde byl rozdíl ve fosforylaci statisticky významný pro oba inhibitory. Tento efekt je přesně opačný s vlivem ponatinibu a dasatinibu na povrchovou expresi CD62L, kde oba efektoři měly stimulační vliv (**Obr. 10 A**). To může být dáno přímým zásahem dasatinibu a ponatinibu do signální dráhy PI3K/Akt, ale vzhledem k převažující povaze signalizace této dráhy přes S/T fosforylaci nepovažujeme přímý zásah inhibitoru tyrozinových kináz za pravděpodobný. Alternativním vysvětlením může být to, že buňka v reakci na zvýšenou přítomnost CD62L na svém povrchu kompenzuje tento jev ztlumením intracelulární signalizace *in vitro* prostředí. Této teorii by

nahrával i fakt, že největší vliv TKI na fosforylaci Akt jsme pozorovali u linie RAJI, u které TKI nejvíce zesilují expresi CD62L. Oproti tomu u linie REH, u které změny v CD62L nebyly statisticky významné, jsme nepozorovali ani významný vliv TKI na fosforylaci Akt.

Fosforylace kinázy Akt u buněk ošetřených kombinací TKI a blinatumomabu dosáhla úrovně velmi podobné efektu TKI samotných. U linií RAJI a ARH-77 byl pozorován mírný stimulační efekt oproti samotnému blinatumomabu, i když v celkovém porovnání s neošetřenou kontrolou byla fosforylace potlačena (**Obr. 20 B, D**). Silné potlačení fosforylace způsobil ponatinib i dasatinib (dasatinib u obou linií statisticky významně), zde se jedná o shodný efekt se samotnými TKI. U linie REH byl efekt kombinace blinatumomabu s ponatinibem případně dasatinibem mnohem méně efektivní v potlačení fosforylace kinázy než u zbývajících linií (**Obr. 20 F**), což lze opět dát do souvislosti se změnami v CD62L. Imatinib velice slabě snížil fosforylaci Akt u linie REH, což je opačný efekt oproti většině naměřených dat, jak v případě jeho kombinace s blinatumomabem u linií RAJI a ARH-77, tak u všech linií při kultivaci pouze s imatinibem.

Cytotoxický test slouží jako jednoduchá *in vitro* metoda ke stanovení cytotoxicity T lymfocytů vůči cílovým buňkám. Dosavadní výsledky jiných skupin (Leonard et al., 2021) ukázaly, že dasatinib brání aktivaci T-lymfocytů, tím i jejich cytotoxickému efektu, a to i přesto, že ke stimulaci buněk použili vyšší, než klinicky relevantní koncentraci blinatumomabu. To je zcela v rozporu s podstatou současného využívání dasatinibu s blinatumomabem v klinické praxi, neboť léčebný efekt blinatumomabu je na cytotoxické aktivitě T lymfocytů závislý. Naše cytotoxická analýza je oproti dosavadním výsledkům rozšířena o ostatní TKI používané v kombinaci s blinatumomabem (imatinib a ponatinib).

Jelikož cílem tohoto testu bylo ověřit robustnost mechanismu inhibice cytotoxicity pomocí TKI (potvrdit jeho aplikovatelnost na co nejvíce

klinických situací), rozhodli jsme se prezentovat souhrnná data získaná s využitím lymfocytů od 4 různých zdravých dárců. Tyto lymfocyty byly zároveň použity v různé fázi jejich expanze *in vitro* a v různých poměrech k cílovým buňkám (effector:target ratio, viz. **4.5**). Koncentrace použitých efektorů (blinatumomabu i TKI) vycházejí z klinicky dosažitelného rozmezí hodnot – zatímco blinatumomab je pacientům podáván jako kontinuální infuze (použita byla tedy jedna koncentrace), TKI jsou typicky podávány jednou denně a mají tedy různou koncentraci v plazmě pacienta v průběhu dne. Z dat na **Obr. 28** jasně vyplývá, že jediným TKI s potenciálem zastavovat cytotoxicitu T lymfocytů v klinicky relevantním uspořádání je dasatinib. Jelikož v praxi ale dosahuje vynikajících výsledků i kombinace blinatumomabu s inhibitory, které cytotoxicitě nebrání (imatinib a ponatinib; Leonard et al., 2021; Price et al., 2013), dá se předpokládat, že pozitivní efekt TKI na průběh B-ALL nesouvisí pouze s cytotoxickou účinností T lymfocytů.

Dasatinib může přispívat k účinnosti léčby blinatumomabem například tím, že během samotné imunologické léčby dochází k vyčerpání cytotoxických lymfocytů. Dasatinib (a potenciálně ostatní TKI) mohou svým účinkem na jejich aktivitu tomuto jevu předcházet, a přitom v konečném důsledku nebránit cytotoxickému efektu jako takovému (koncentrace TKI v plazmě pacientů fluktuuje, a nízké koncentrace TKI cytotoxickému účinku nebrání).

Na závěr je nutno poznamenat, že drtivá většina klinických studií se zabývá účinkem kombinace TKI s imunoterapií na Ph⁺ leukémie. Fúzní kináza Bcr-Abl je cílem TKI, a její inhibice způsobuje buněčnou smrt pozitivních buněk. Dá se tedy předpokládat, že podpůrný efekt TKI v imunoterapii u těchto druhů leukémie je z velké části modulován tímto jevem. Z našich výsledků ale vyplývá, že blinatumomab může sensitizovat i Ph⁻ buňky k TKI, které pak účinněji inhibují své cíle (viz kapitola **5.3**), a

použití TKI jako vyzkoušených a relativně bezpečných léčiv může mít potenciál i u Bcr-Abl negativních leukémií.

7 Závěr

Tato práce navazuje na předchozí výsledky laboratoře, které odhalily, že některé klinicky používané inhibitory tyrozinových kináz (TKI) významně ovlivňují přítomnost adhezního proteinu CD62L na povrchu B-ALL buněk. Výsledky této práce ukazují, že samotná přítomnost TKI nemá přímý vliv na proliferaci a viabilitu B-ALL buněk, což bylo neočekávané, vzhledem k teoretickým poznatkům o signalizaci SFK v B-lymfocytech.

Práce shrnuje vliv TKI na intracelulární signalizaci SFK a navazující kinázy Erk1/2, kde dasatinib a ponatinib způsobily výraznou redukci fosforylované formy kinázy Erk. Tyto výsledky poukazují na regulační roli kináz rodiny Src v signalizaci dráhy Ras/Raf/MEK/ERK a také ukázaly na potenciální citlivost kináz Erk a SFK vůči kombinaci TKI a blinatumomabu, což otevírá nové možnosti pro efektivní léčbu Ph+ i Ph- B-ALL buněk.

Důležitým poznatkem je inhibiční účinek dasatinibu a ponatinibu na signalizační dráhu PI3K/Akt, kde oba inhibitory silně snížily fosforylaci kinázy Akt. Tento efekt byl obzvláště výrazný u buněčných linií, u kterých zároveň došlo ke zvýšení povrchové exprese CD62L. Přestože blinatumomab sám o sobě neměl výrazný vliv na signalizaci Erk ani Akt, jeho kombinace s TKI vedla ke zvýšení citlivosti kináz na inhibici.

Výsledkem cytotoxických testů byl rozdílný vliv TKI v kombinaci s blinatumomabem kdy dasatinib, na rozdíl od imatinibu a ponatinibu, inhiboval cytotoxickou aktivitu T-lymfocytů vůči cílovým Ph- B-ALL buňkám.

V klinické praxi to však nemusí znamenat snížení účinnosti léčby, protože kolísající hladina dasatinibu u pacientů může prodlužovat efektivní životnost T-lymfocytů a tím zvyšovat terapeutický přínos.

Celkově tato práce přispívá k hlubšímu pochopení vlivu TKI na signalizaci a adhezní vlastnosti B-ALL buněk a výsledky mají potenciál podpořit další výzkum a vývoj léčebných strategií zaměřených na zlepšení účinnosti léčby Ph- B-ALL, zejména v oblasti kombinovaných terapií.

8 Literatura

- Abram, C.L., Lowell, C.A., 2008. The diverse functions of Src family kinases in macrophages. *Front. Biosci.-Landmark* 13, 4426–4450. <https://doi.org/10.2741/3015>
- Ahler, E., Register, A.C., Chakraborty, S., Fang, L., Dieter, E.M., Sitko, K.A., Vidadala, R.S.R., Trevillian, B.M., Golkowski, M., Gelman, H., Stephany, J.J., Rubin, A.F., Merritt, E.A., Fowler, D.M., Maly, D.J., 2019. A Combined Approach Reveals a Regulatory Mechanism Coupling Src's Kinase Activity, Localization, and Phosphotransferase-Independent Functions. *Mol. Cell* 74, 393-408.e20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.003>
- American Cancer Society, 2024. *Cancer Facts & Figures 2024*.
- Arai, F., Hirao, A., Hosokawa, K., Suda, T., 2004. Role of Cell Adhesion in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche. *Blood* 104, 669. <https://doi.org/10.1182/blood.V104.11.669.669>
- Arbesú, M., Maffei, M., Cordeiro, T.N., Teixeira, J.M.C., Pérez, Y., Bernadó, P., Roche, S., Pons, M., 2017. The Unique Domain Forms a Fuzzy Intramolecular Complex in Src Family Kinases. *Structure* 25, 630-640.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.02.011>
- Assi, R., Kantarjian, H., Short, N.J., Daver, N., Takahashi, K., Garcia-Manero, G., DiNardo, C., Burger, J., Cortes, J., Jain, N., Wierda, W., Chamoun, S., Konopleva, M., Jabbour, E., 2017. Safety and Efficacy of Blinatumomab in Combination With a Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Relapsed Philadelphia Chromosome-positive Leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 17, 897–901. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.08.101>
- Aureli, A., Marziani, B., Venditti, A., Sconocchia, T., Sconocchia, G., 2023. Acute Lymphoblastic Leukemia Immunotherapy Treatment: Now, Next, and Beyond. *Cancers* 15, 3346. <https://doi.org/10.3390/cancers15133346>
- Bai, R., Chen, N., Li, L., Du, N., Bai, L., Lv, Z., Tian, H., Cui, J., 2020. Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. *Front. Oncol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01290>
- Baillat, G., Siret, C., Delamarre, E., Luis, J., 2008. Early adhesion induces interaction of FAK and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1783, 2323–2331. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.08.008>
- Bassan, R., Hoelzer, D., 2011. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 29, 532–543. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1382>
- Bell, G.I., Dembo, M., Bongrand, P., 1984. Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.* 45, 1051–1064. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84252-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84252-6)
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Moore, Robert, Larue, L., 2004. A Portrait of AKT Kinases: Human Cancer and Animal Models Depict a Family with Strong Individualities. *Cancer Biol. Ther.* 3, 268–275. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.3.703>
- Brian, B.F., 4th, Freedman, T.S., 2021. The Src-family Kinase Lyn in Immunoreceptor Signaling. *Endocrinology* 162, bqab152. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab152>
- Brodie, E.J., Infantino, S., Low, M.S.Y., Tarlinton, D.M., 2018. Lyn, Lupus, and (B) Lymphocytes, a Lesson on the Critical Balance of Kinase Signaling in Immunity. *Front. Immunol.* 9, 401. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00401>
- Buckley, C.D., Rainger, G.E., Bradfield, P.F., Nash, G.B., Simmons, D.L., 1998. Cell adhesion: More than just glue (Review). *Mol. Membr. Biol.* 15, 167–176. <https://doi.org/10.3109/09687689709044318>

- Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., Samelson, L.E., 2001. Dynamic Actin Polymerization Drives T Cell Receptor-Induced Spreading: A Role for the Signal Transduction Adaptor LAT. *Immunity* 14, 315–329. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00112-1)
- Burgess, M., Gill, D., Singhania, R., Cheung, C., Chambers, L., Renyolds, B.A., Smith, L., Mollee, P., Saunders, N., McMillan, N.A., 2013. CD62L as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 5675–5685. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1037>
- Burnham, M.R., Bruce-Staskal, P.J., Harte, M.T., Weidow, C.L., Ma, A., Weed, S.A., Bouton, A.H., 2000. Regulation of c-SRC Activity and Function by the Adapter Protein CAS. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5865–5878. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.16.5865-5878.2000>
- Burt, R., Warcel, D., Fielding, A.K., 2019. Blinatumomab, a bispecific B-cell and T-cell engaging antibody, in the treatment of B-cell malignancies. *Hum. Vaccines Immunother.* 15, 594–602. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1540828>
- Chakraborty, A.K., Weiss, A., 2014. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* 15, 798–807. <https://doi.org/10.1038/ni.2940>
- Chalupny, N.J., Aruffo, A., Esselstyn, J.M., Chan, P.-Y., Bajorath, J., Blake, J., Gilliland, L.K., Ledbetter, J.A., Tepper, M.A., 1995. Specific binding of Fyn and phosphatidylinositol 3-kinase to the B cell surface glycoprotein CD19 through their src homology 2 domains. *Eur. J. Immunol.* 25, 2978–2984. <https://doi.org/10.1002/eji.1830251040>
- Chen, G., Huang, A.C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., Xia, H., Man, Q., Zhong, W., Antelo, L.F., Wu, B., Xiong, X., Liu, X., Guan, L., Li, T., Liu, S., Yang, R., Lu, Youtao, Dong, L., McGettigan, S., Somasundaram, R., Radhakrishnan, R., Mills, G., Lu, Yiling, Kim, J., Chen, Y.H., Dong, H., Zhao, Y., Karakousis, G.C., Mitchell, T.C., Schuchter, L.M., Herlyn, M., Wherry, E.J., Xu, X., Guo, W., 2018. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560, 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>
- Chen, Y., Liu, Q., Wu, M., Li, M., Ding, H., Shan, X., Liu, J., Tao, T., Ni, R., Chen, X., 2016. GAB2 promotes cell proliferation by activating the ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 37, 11763–11773. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5019-9>
- Cooper, J.A., Gould, K.L., Cartwright, C.A., Hunter, T., 1986. Tyr527 Is Phosphorylated in pp60c-src: Implications for Regulation. *Science* 231, 1431–1434. <https://doi.org/10.1126/science.2420005>
- Darnell, J.E., Kerr, Ian M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 264, 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- Demotz, S., Grey, H.M., Sette, A., 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249, 1028–1030. <https://doi.org/10.1126/science.2118680>
- Dieckmann, N.M.G., Frazer, G.L., Asano, Y., Stinchcombe, J.C., Griffiths, G.M., 2016. The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 2881–2886. <https://doi.org/10.1242/jcs.186205>
- Do, P., Perdue, L.A., Chyong, A., Hunter, R., Dougan, J., Henry, C.J., Porter, C.C., Dreaden, E.C., 2020. Rapid Assembly and Screening of Multivalent Immune Cell-Redirecting Therapies for Leukemia. *ACS Comb. Sci.* 22, 533–541. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.0c00081>
- Dokla, E.M.E., Abdel-Aziz, A.K., Milik, S.N., McPhillie, M.J., Minucci, S., Abouzid, K.A.M., 2022. Discovery of a benzimidazole-based dual FLT3/TrKA inhibitor targeting acute myeloid leukemia. *Bioorg. Med. Chem.* 56, 116596. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116596>

- Dong, Y., Jia, L., Wang, X., Tan, X., Xu, J., Deng, Z., Jiang, T., Rainov, N., G., Li, B., Ren, H., 2011. Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. *Int. J. Oncol.* 38, 555–569. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.861>
- Doubek, M., Mayer, J., 2020. Léčebné postupy v hematologii 2020 : doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Česká hematologická společnost ČLS JEP, CZ.
- Douville, E.M., Afar, D.E., Howell, B.W., Letwin, K., Tannock, L., Ben-David, Y., Pawson, T., Bell, J.C., 1992. Multiple cDNAs encoding the esk kinase predict transmembrane and intracellular enzyme isoforms. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2681–2689. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.6.2681-2689.1992>
- Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., Unanue, E.R., 1997. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3909–3913. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3909>
- Dustin, M.L., Colman, D.R., 2002. Neural and Immunological Synaptic Relations. *Science* 298, 785–789. <https://doi.org/10.1126/science.1076386>
- Dwyer, A.R., Mouchemore, K.A., Steer, J.H., Sunderland, A.J., Sampaio, N.G., Greenland, E.L., Joyce, D.A., Pixley, F.J., 2016. Src family kinase expression and subcellular localization in macrophages: implications for their role in CSF-1-induced macrophage migration. *J. Leukoc. Biol.* 100, 163–175. <https://doi.org/10.1189/jlb.2A0815-344RR>
- Faderl, S., Jeha, S., Kantarjian, H.M., 2003. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 98, 1337–1354. <https://doi.org/10.1002/cncr.11664>
- Fielding, A.K., Rowe, J.M., Richards, S.M., Buck, G., Moorman, A.V., Durrant, I.J., Marks, D.I., McMillan, A.K., Litzow, M.R., Lazarus, H.M., Foroni, L., Dewald, G., Franklin, I.M., Luger, S.M., Paietta, E., Wiernik, P.H., Tallman, M.S., Goldstone, A.H., 2009. Prospective outcome data on 267 unselected adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia confirms superiority of allogeneic transplantation over chemotherapy in the pre-imatinib era: results from the International ALL Trial MRC UKALLXII/ECOG2993. *Blood* 113, 4489–4496. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199380>
- Foà, R., Bassan, R., Vitale, A., Elia, L., Piciocchi, A., Puzzolo, M.-C., Canichella, M., Viero, P., Ferrara, F., Lunghi, M., Fabbiano, F., Bonifacio, M., Fracchiolla, N., Bartolomeo, P.D., Mancino, A., Propriis, M.-S.D., Vignetti, M., Guarini, A., Rambaldi, A., Chiaretti, S., 2020. Dasatinib–Blinatumomab for Ph-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *N. Engl. J. Med.* 383, 1613–1623. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2016272>
- Fujimoto, M., Poe, J.C., Jansen, P.J., Sato, S., Tedder, T.F., 1999. CD19 Amplifies B Lymphocyte Signal Transduction by Regulating Src-Family Protein Tyrosine Kinase Activation1. *J. Immunol.* 162, 7088–7094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.12.7088>
- Gao, J., Shi, L.Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., Chen, T., Roszik, J., Bernatchez, C., Woodman, S.E., Chen, P.-L., Hwu, P., Allison, J.P., Futreal, A., Wargo, J.A., Sharma, P., 2016. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell* 167, 397–404.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.069>
- Guarino, M., 2010. Src signaling in cancer invasion. *J. Cell. Physiol.* 223, 14–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.22011>
- Hantschel, O., Rix, U., Schmidt, U., Bürckstümmer, T., Kneidinger, M., Schütze, G., Colinge, J., Bennett, K.L., Ellmeier, W., Valent, P., Superti-Furga, G., 2007. The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13283–13288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702654104>

- Heath, J.L., Cohn, G.M., Zaidi, S.K., Stein, G.S., 2019. The role of cell adhesion in hematopoiesis and leukemogenesis. *J. Cell. Physiol.* 234, 19189–19198. <https://doi.org/10.1002/jcp.28636>
- Hibbs, M.L., Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitto, R., Stacker, S.A., Dunn, A.R., 1995. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83, 301–311. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90171-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90171-x)
- Hoelzer, D., Thiel, E., Löffler, H., Buchner, T., Ganser, A., Heil, G., Koch, P., Freund, M., Diedrich, H., Ruhl, H., 1988. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 71, 123–131. <https://doi.org/10.1182/blood.V71.1.123.123>
- Hojer, C., Frankenberger, S., Strobl, L.J., Feicht, S., Djermanovic, K., Jagdhuber, F., Hömig-Hölzel, C., Ferch, U., Ruland, J., Rajewsky, K., Zimmer-Strobl, U., 2014. B-cell Expansion and Lymphomagenesis Induced by Chronic CD40 Signaling Is Strictly Dependent on CD19. *Cancer Res.* 74, 4318–4328. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3274>
- Hu, X., Wu, X., Xu, J., Zhou, J., Han, X., Guo, J., 2009. Src kinase up-regulates the ERK cascade through inactivation of protein phosphatase 2A following cerebral ischemia. *BMC Neurosci.* 10, 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-74>
- Huveneers, S., Danen, E.H.J., 2009. Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059–1069. <https://doi.org/10.1242/jcs.039446>
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
- Ivetic, A., Hoskins Green, H.L., Hart, S.J., 2019. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01068>
- Kauer, J., Märklin, M., Pflügler, M., Hörner, S., Hinterleitner, C., Tandler, C., Jung, G., Salih, H.R., Heitmann, J.S., 2022. BCR::ABL1 tyrosine kinase inhibitors hamper the therapeutic efficacy of blinatumomab in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 148, 2759–2771. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04039-5>
- Kern, P.M., Keilholz, L., Forster, C., Stach, C., Beyer, T.D., Gaipl, U.S., Kalden, J.R., Hallmann, R., Herrmann, M., 2000. UVB-irradiated T-cells undergoing apoptosis lose L-selectin by metalloprotease-mediated shedding. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 1265–1271. <https://doi.org/10.1080/09553000050134492>
- Klemmensen, T., Peder, L., Geisler, C., 2003. The Immunological Synapse. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 51, 377–88.
- Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S.C., Courtneidge, S.A., Magee, A.I., 1994. Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem. J.* 303, 749–753. <https://doi.org/10.1042/bj3030749>
- Kulkarni, R., Kale, V., 2020. Physiological Cues Involved in the Regulation of Adhesion Mechanisms in Hematopoietic Stem Cell Fate Decision. *Front. Cell Dev. Biol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00611>
- Kurochkina, N., Guha, U., 2013. SH3 domains: modules of protein–protein interactions. *Biophys. Rev.* 5, 29–39. <https://doi.org/10.1007/s12551-012-0081-z>
- Lavoie, H., Gagnon, J., Therrien, M., 2020. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
- Leonard, J.T., Kosaka, Y., Malla, P., LaTocha, D., Lambie, A., Hayes-Lattin, B., Byrd, K., Druker, B.J., Tyner, J.W., Chang, B.H., Lind, E., 2021. Concomitant use of a dual Src/ABL kinase inhibitor eliminates the in vitro efficacy of blinatumomab against Ph+ ALL. *Blood* 137, 939–944. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005655>
- Li, X., Carter, R.H., 1998. Convergence of CD19 and B Cell Antigen Receptor Signals at MEK1 in the ERK2 Activation Cascade. *J. Immunol.* 161, 5901–5908. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.11.5901>

- Liang, W., Kujawski, M., Wu, J., Lu, J., Herrmann, A., Loera, S., Yen, Y., Lee, F., Yu, H., Wen, W., Jove, R., 2010. Antitumor Activity of Targeting Src Kinases in Endothelial and Myeloid Cell Compartments of the Tumor Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 16, 924–935. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1486>
- Lin, W., Tan, S., Zhou, S., Zheng, X., Wu, W., Zheng, K., 2017. Binding Mechanism and Molecular Design of Benzimidazole/Benzothiazole Derivatives as Potent Abl T315I Mutant Inhibitors. *Chin. J. Chem. Phys.* 30, 429–442. <https://doi.org/10.1063/1674-0068/30/cjcp1704066>
- Love, P.E., Hayes, S.M., 2010. ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002485. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002485>
- Luo, F.R., Yang, Z., Camuso, A., Smykla, R., McGlinchey, K., Fager, K., Flefleh, C., Castaneda, S., Inigo, I., Kan, D., Wen, M.-L., Kramer, R., Blackwood-Chirchir, A., Lee, F.Y., 2006. Dasatinib (BMS-354825) Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Biomarkers in Animal Models Predict Optimal Clinical Exposure. *Clin. Cancer Res.* 12, 7180–7186. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1112>
- Malouf, C., Ottersbach, K., 2017. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 417–446. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2620-z>
- Marvel, D., Gabrilovich, D.I., 2015. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J. Clin. Invest.* 125, 3356–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI80005>
- Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Fazekas de St Groth, B., Davis, M.M., 1991. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254, 1788–1791. <https://doi.org/10.1126/science.1763329>
- McLachlan, R.W., Kraemer, A., Helwani, F.M., Kovacs, E.M., Yap, A.S., 2007. E-Cadherin Adhesion Activates c-Src Signaling at Cell–Cell Contacts. *Mol. Biol. Cell* 18, 3214–3223. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1154>
- Mitra, S.K., Schlaepfer, D.D., 2006. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell-to-cell contact and extracellular matrix* 18, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.011>
- Nagorsen, D., Bargou, R., Rüttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A., Zugmaier, G., 2009. Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab. *Leuk. Lymphoma* 50, 886–891. <https://doi.org/10.1080/10428190902943077>
- Nepstad, I., Hatfield, K.J., Grønningsæter, I.S., Reikvam, H., 2020. The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2907. <https://doi.org/10.3390/ijms21082907>
- Niediek, V., Born, S., Hampe, N., Kirchgeßner, N., Merkel, R., Hoffmann, B., 2012. Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.10.003>
- Oak, E., Bartlett, N.L., 2015. Blinatumomab for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* 24, 715–724. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1021415>
- Obr, A., Plodík, M., Vaníková, Š., Myslivcová, D., 2023. Blinatumomab and tyrosine kinase inhibitors in B-ALL: friends, or enemies?, in: CICON 2023 Translating Science into Survival. Presented at the CICON 2023 - 7th International Cancer Immunotherapy Conference, Miláno, Itálie, p. 134.
- Obr, A., Röselová, P., Grebeňová, D., Kuželová, K., 2014. Real-Time Analysis of Imatinib and Dasatinib-Induced Effects on Chronic Myelogenous Leukemia Cell Interaction with Fibronectin. *PLOS ONE* 9, e107367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107367>

- Palacios, E.H., Weiss, A., 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23, 7990–8000. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208074>
- Parsons, S.J., Parsons, J.T., 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906–7909. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>
- Pezzutto, A., Dörken, B., Rabinovitch, P.S., Ledbetter, J.A., Moldenhauer, G., Clark, E.A., 1987. CD19 monoclonal antibody HD37 inhibits anti-immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 138, 2793–2799.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Regulation of Signaling and Cellular Fate through Modulation of Nuclear Protein Import* 1813, 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Poe, J.C., Hasegawa, M., Tedder, T.F., 2001. CD19, CD21, and CD22: Multifaceted Response Regulators of B Lymphocyte Signal Transduction. *Int. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.3109/08830180109045588>
- Price, K.E., Saleem, N., Lee, G., Steinberg, M., 2013. Potential of ponatinib to treat chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *OncoTargets Ther.* 6, 1111–1118. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36980>
- Ritter, A.T., Asano, Y., Stinchcombe, J.C., Dieckmann, N.M.G., Chen, B.-C., Gawden-Bone, C., van Engelenburg, S., Legant, W., Gao, L., Davidson, M.W., Betzig, E., Lippincott-Schwartz, J., Griffiths, G.M., 2015. Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse. *Immunity* 42, 864–876. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.013>
- Röselová, P., Obr, A., Holoubek, A., Grebeňová, D., Kuželová, K., 2018. Adhesion structures in leukemia cells and their regulation by Src family kinases. *Cell Adhes. Migr.* 12, 286–298. <https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1344796>
- Roskoski, R., 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66, 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Rusanescu, G., Qi, H., Thomas, S.M., Brugge, J.S., Halegoua, S., 1995. Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron* 15, 1415–1425. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90019-5)
- Saito, Y.D., Jensen, A.R., Salgia, R., Posadas, E.M., 2010. Fyn. *Cancer* 116, 1629–1637. <https://doi.org/10.1002/cncr.24879>
- Sánchez-Madrid, F., del Pozo, M.A., 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18, 501–511. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.501>
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., Kuriyan, J., 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938–1942. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1938>
- Shah, N.P., Tran, C., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., Sawyers, C.L., 2004. Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. *Science* 305, 399–401. <https://doi.org/10.1126/science.1099480>
- Sopper, S., Mustjoki, S., White, D., Hughes, T., Valent, P., Burchert, A., Gjertsen, B.T., Gastl, G., Baldauf, M., Trajanoski, Z., Giles, F., Hochhaus, A., Ernst, T., Schenk, T., Janssen, J.J.W.M., Ossenkoppele, G.J., Porkka, K., Wolf, D., 2017. Reduced CD62L Expression on T Cells and Increased Soluble CD62L Levels Predict Molecular Response to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Early Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 175–184. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.0893>
- Springer, T.A., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425–434. <https://doi.org/10.1038/346425a0>

- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M., 2001. The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity* 15, 751–761. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00234-5)
- Thomas, S.M., Brugge, J.S., 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513>
- Tice, D.A., Biscardi, J.S., Nickles, A.L., Parsons, S.J., 1999. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 1415–1420. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1415>
- Tominaga, Y., Kita, Y., Satoh, A., Asai, S., Kato, K., Ishikawa, K., Horiuchi, T., Takashi, T., 1998. Affinity and Kinetic Analysis of the Molecular Interaction of ICAM-1 and Leukocyte Function-Associated Antigen-1. *J. Immunol.* 161, 4016–4022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.8.4016>
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., Lanzavecchia, A., 1995. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* 181, 577–584. <https://doi.org/10.1084/jem.181.2.577>
- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., Giancotti, F.G., 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625–634. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81604-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81604-9)
- Westhoff, M.A., Serrels, B., Fincham, V.J., Frame, M.C., Carragher, N.O., 2004. Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8113–8133. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8113-8133.2004>
- Wurzer, H., Hoffmann, C., Al Absi, A., Thomas, C., 2019. Actin Cytoskeleton Straddling the Immunological Synapse between Cytotoxic Lymphocytes and Cancer Cells. *Cells* 8, 463. <https://doi.org/10.3390/cells8050463>
- Xu, H., Manivannan, A., Crane, I., Dawson, R., Liversidge, J., 2008. Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. *Blood* 112, 1166–1174. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-098327>
- Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T., Toyoshima, K., 1991. Association of B Cell Antigen Receptor with Protein Tyrosine Kinase Lyn. *Science* 251, 192–194. <https://doi.org/10.1126/science.1702903>
- Zheng, D., Wei, Z., Zhang, C., Liu, W., Gong, C., Wu, F., Guo, W., 2024. ZNF692 promotes osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion through TNK2-mediated activation of the MEK/ERK pathway. *Biol. Direct* 19, 28. <https://doi.org/10.1186/s13062-024-00472-3>
- Zhi, H., Dai, J., Liu, J., Zhu, J., Newman, D.K., Gao, C., Newman, P.J., 2015. Platelet Activation and Thrombus Formation over IgG Immune Complexes Requires Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and Lyn Kinase. *PLOS ONE* 10, e0135738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135738>
- Zinzani, P.L., Minotti, G., 2021. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 148, 177–190. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03833-x>
- Zou, X., Tang, X.-Y., Qu, Z.-Y., Sun, Z.-W., Ji, C.-F., Li, Y.-J., Guo, S.-D., 2022. Targeting the PDGF/PDGFR signaling pathway for cancer therapy: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 202, 539–557. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.113>