

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Universita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



Role genu WT1 v normální hematopoeze a leukemogenese

**The Role of WT1 gene in normal hematopoiesis and
leukemogenesis**

Karolina Kramarzová

V Praze 2008

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Diplomová práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením Prof. MUDr. Jana Trky, PhD.

Karolina Kramarzová

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Janu Trkovi, PhD. za odborné vedení a přátelskou pomoc v průběhu mého studia.

RNDr. Markétě Kalinové a MUDr. Ludmile Boublíkové děkuji za pomoc při organizaci pokusů a cenné rady při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Janu Starému, DrSc. a MUDr. Lucii Šrámkové, PhD. za možnost nahlédnout do klinických aspektů léčby leukémie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům z pracovní skupiny CLIP za trpělivost, ochotu a přátelskou pomoc.

Diplomová práce byla vypracována v Laboratorním centru Kliniky dětské hematologie a onkologie 2.LF UK – CLIP v letech 2006 – 2008. Projekt byl součástí výzkumných záměrů č.:

MSM0021620813

MZO00064203

Abstract

The Wilms' tumor gene is highly expressed in a large proportion of human acute leukemias and other hematological malignancies. It is thought to play an important role in human hematopoiesis and leukemogenesis. Despite the large number of studies, *WT1* expression patterns and its clinical significance in acute myeloid leukemia remain still controversial. To investigate the prognostic relevance of initial *WT1* expression and its usefulness as a marker for minimal residual disease, we have analysed 66 bone marrow samples from newly diagnosed AML patients. RQ-RT-PCR for absolute quantification of total *WT1* was designed according to Europe Against Cancer Program. In 82 % of samples we detected a higher expression of *WT1* compared to normal healthy donors or patients with acute lymphoblastic leukemia ($p < 0.0001$). We did not find any correlation between initial *WT1* expression level and age or sex. Patients with FAB M3 subtype showed significantly higher *WT1* levels than other subtypes, especially M5 ($p < 0.001$). We found a strikingly high *WT1* expression in standard risk group patients compared to high risk group ($p < 0.0007$). Children with FAB/cytogenetical favorable prognostic factors have high *WT1* expression, while there was no relation between *WT1* levels at diagnosis and day 15 BM response. We did not find any differences between patients remaining in complete remission and those suffering relapse. Thus, we did not prove any prognostic significance of initial *WT1* expression level in childhood AML patients. However, *WT1* expression pattern seems to be determined by the biologic and genetic origin of the cases.

Wilms' tumor 1 gene, paediatric acute myeloid leukemia, minimal residual disease, RQ-PCR, prognostic significance

Gen WT1, dětské akutní myeloidní leukémie, minimální residuální nemoc, RQ-PCR, prognostický význam

OBSAH

1	ÚVOD	13
2	PŘEHLED LITERATURY	15
2.1	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ V DĚTSKÉM VĚKU	15
2.1.1	AKUTNÍ LEUKÉMIE	15
2.1.1.1	Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)	17
2.1.1.2	Akutní myeloidní leukémie (AML)	18
2.2	GEN <i>WT1</i>	21
2.2.1	STRUKTURA GENU <i>WT1</i>	21
2.2.1.1	Vznik isoform <i>WT1</i>	22
2.2.1.2	Protein <i>WT1</i> a jeho isoformy	24
2.2.1.3	Role jednotlivých isoform	25
2.2.2	ROLE GENU <i>WT1</i> V HEMATOPOEZE	27
2.2.3	ROLE GENU <i>WT1</i> V LEUKEMOGENESE	29
2.2.4	VYUŽITÍ GENU <i>WT1</i> V OBLASTI STRATIFIKACE A LÉČBY	30
2.2.4.1	Prognostický význam hladiny exprese <i>WT1</i>	30
2.2.4.2	Využití <i>WT1</i> v léčbě leukemií	31
2.3	MINIMÁLNÍ RESIDUÁLNÍ NEMOC	33
2.3.1	DETEKCE MINIMÁLNÍ RESIDUÁLNÍ NEMOCI	34
2.3.1.1	Metody molekulární cytogenetiky	34
2.3.1.2	Imunologické metody	35
2.3.1.3	Molekulárně genetické metody	35
2.3.1.4	Detekce MRN pomocí <i>WT1</i>	37
2.3.1.5	Real-time PCR	38
3	MATERIÁL A METODY	43

3.1	ANALYSOVANÝ MATERIÁL.....	43
3.1.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ	43
3.1.2	LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POUŽITÝ SOFTWARE	48
3.1.3	POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE	48
3.1.4	POUŽITÉ METODY	51
3.1.4.1	Isolace mononukleárních buněk osmotickou lysou	51
3.1.4.2	Isolace mononukleárních buněk pomocí hustotního gradientu - Ficoll paque.....	51
3.1.4.3	Isolace RNA dle Chomczynski a Sacchi	52
3.1.4.4	Kontrola kvality RNA kapilární elektroforesou - Agilent- RNA 6000 Nano Essay kit.....	53
3.1.4.5	Reversní transkripce RNA do cDNA	55
3.1.4.6	Kvalitativní detekce <i>WT1</i> pomocí metody real-time PCR.....	56
3.1.4.7	Pěstování buněčných kultur.....	57
3.1.4.8	Statistické zpracování výsledků	58
4	VÝSLEDKY	60
4.1	OPTIMALISACE METODY RQ-PCR	60
4.2	STABILITA TRANSKRIPTU <i>WT1</i>.....	61
4.3	EXPRESE <i>WT1</i> U PACIENTŮ S AML	62
4.3.1	Exprese <i>WT1</i> u AML vs ALL a kontrolní KD	62
4.3.2	Exprese <i>WT1</i> vs pohlaví a věk.....	63
4.3.3	Exprese <i>WT1</i> a FAB klasifikace	64
4.3.4	Exprese <i>WT1</i> a genetické abnormality.....	65
4.3.5	Exprese <i>WT1</i> a rizikové skupiny	67
4.3.6	Exprese <i>WT1</i> a výsledek léčby pacientů.....	69
4.3.7	Exprese <i>WT1</i> a EFS, RFS	71
5	DISKUSE.....	73

6	SOUHRN	79
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	80

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A...adenin

ABL...Abelson gene

AF4...AF4/FMR2 family, member 1

ALL...akutní lymfoblastická leukémie

AML...akutní myeloidní leukémie

AML1...acute myeloid leukemia 1

ATRA...all-trans-retinová kyselina

B2M... beta-2-microglobulin

B-ALL...akutní lymfoblastická leukémie se znaky B-řady

BCL-2...B-cell CLL/lymphoma 2

BCP-ALL...akutní lymfoblastická leukémie odvozená od prekursoru B-lymfocytů

BCR...breakpoint cluster region

BM...bone marrow

C...cytosin

CEBPA... CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha

CD...cluster of differentiation

C-KIT... v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

C-MYC...cellular myelocytomatosis oncogene

CSF-1... colony stimulating factor 1

C_T...treshold cycle

d15...15. den intenzivní chemoterapie v rámci léčebného protokolu

Da...Dalton

del...delece

DNA...deoxyribonukleotidová kyselina

dNTP...deoxyribonukleotid

dsDNA...double strand DNA

EAC...Europe Against Cancer

EFS...event free survival

EGR1...early growth response 1

EGR2...early growth response 2

ETO...eight twenty one protein
FAB...French-American-British (FAB) cooperative group
FBS...bovinní sérum
FISH...fluorescence in-situ hybridization
FLT3...fms related tyrosine kinase 3
Fwd...forward
G...guanin
GATA-1... GATA binding protein 1
Ig...imunoglobulin
IGF-2... insulin-like growth factor 2
inv...inverse
ITD...internal tandem duplication
K...lysin
K562...leukemická buněčná linie K562
KASUMI-1...leukemická buněčná linie KASUMI-1
KD...kostní dřev
LAIP...leukaemia-associated imunophenotypes
Lys...lysin
MDS...myelodysplastický syndrom
MIS...Mullerian inhibiting substance
MLL...mixed-lineage leukemia
M-MLV RTasa...murine leukemia virus reverse transcriptase
MRN...minimální residuální nemoc
mRNA...messenger RNA
MSLN- mesothelin
MYH11... myosin, heavy chain 11
NCN...normalised copy number
NPM1...nucleophosmin
OS...overall survival
PAX-2... paired box gene 2
PCR ...polymerace chain reaction
PDGF-A...platelet derived growth factor A-chain
PML...promyelocytic leukemia
PRAME...preferentially expressed antigen in melanoma

PU.1... spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1
q...dlouhé raménko chromosomu
RARA...retinoic acid receptor alpha
RAS...RAS protein
REH...leukemická buněčná linie REH
RFS...relapse free survival
RNA...ribonukleotidová kyselina
RQ-PCR...real-time quantitative PCR
RT-PCR...reverse transcription polymerase chain reaction
rRNA... ribosomální RNA
Rvs...reverse
S...serin
Ser...serin
siRNA... small interfering RNA
SRX...sex-determining region Y
ST18...supression of tumorigenicity
t...translokace
T...thymin
T...threonin
T-ALL...akutní lymfoblastická leukémie se znaky T-řady
Taq...*Thermus aquaticus*
TCR...T-cell receptor, receptor T-lymfocytů
TEL...TEL 1 oncogene
TGF-β...transforming growth factor-β
Thr...threonin
U...uracil
UTR...untranslated region
WAGR...Wilms' tumor, aniridia, genitourinary malformations, mental retardation
WBC...white blood cell count
WHO...World health organization
WNT-4...wingless-type MMTV integration site family, member 4
WT1...Wilms' tumor gene 1

1 ÚVOD

Hematopoesa je komplexní proces, ve kterém vznikají specifické krevní buňky, zajišťující nejrůznější životně důležité funkce v organismu. Správné načasování a koordinace mnoha dílčích mechanismů v tomto procesu jsou naprosto nezbytné pro maturaci jednotlivých krevních elementů. Maligní transformací hematopoetických progenitorů během leukemogenesy dochází k poruchám kontroly těchto dílčích mechanismů, což vede ke vzniku choroby zvané leukémie.

Leukémie je nejčastější nádorové onemocnění v dětském věku. Jedná se o velmi závažnou chorobu, jejíž léčba patří mezi nejnáročnější onkologické postupy. Za posledních 30 let došlo k nesmírnému pokroku v léčbě leukémií a pomocí nejmodernějších metod jako chemoterapie, ozařování či transplantace kostní dřeně, lze v současné době vyléčit až 80% dětí s nově diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií a 50 % dětí s akutní myeloidní leukémií (PUI *et al.* 2004). Přesto však existuje určité procento pacientů, u nichž dojde k znovuoživení nemoci, tzv. relapsu, jenž významně snižuje naději na jejich dlouhodobé přežití. Leukémie se tak stává nemocí, jež vyžaduje několik let trvající léčbu, která je pro pacienta a jeho okolí fyzicky i psychicky velice náročná (STARÝ *et al.* 2002).

Současné léčebné protokoly využívají kombinaci cytostatik vybraných na základě mnoha rozsáhlých klinických studií. Chemoterapie je případně kombinována s radioterapií či transplantací hematopoetických kmenových buněk. Součástí těchto protokolů je i tzv. podpůrná léčba, jež snižuje velmi závažné negativní dopady intenzivní chemoterapie a radioterapie. Přesto však nelze zabránit náhlým a neočekávaným úmrtím na komplikace této léčby, které znemožňují využití intenzivnější terapie (SLATS *et al.* 2005). Někteří vědci se proto domnívají, že již nelze těmito léčebnými protokoly výrazně zvýšit podíl dlouhodobě přežívajících pacientů (KASPERS a ZWAAN 2007). Cílem hematologů se tedy v současnosti stává spíše detailní poznání celého procesu leukemogenesy, jenž by mohlo být využito pro lepší klasifikaci leukémií a také pro výzkum nových terapií specifických pro konkrétní subtypy této choroby (ROSS *et al.* 2004).

Leukemogenesa je obecně považována za vícekový proces, ve kterém synergistické efekty několika genetických mutací vedou k leukemické transformaci. V rámci pochopení biologie hematopoetických malignit je tedy nutné zaměřit se na studium genů, jejichž alterace by mohly hrát roli v tomto procesu, a na jejich vzájemné souvislosti a kooperace. Jedním z těchto genů, ke kterému se v poslední době upíná velká pozornost, je gen *WT1*.

Naším cílem bylo zavedení a optimalisace metody real-time PCR pro detekci *WT1* a stanovení prognostického významu iničiální hladiny exprese tohoto genu u dětských akutních myeloidních leukémií. Současně jsme zkoumali také možnost využití *WT1* k detekci minimální residuální nemoci u pacientů s tímto onemocněním.

V literárním přehledu diplomové práce se pokusím nastínit nejdůležitější výsledky, které byly o genu *WT1*, jeho roli a jeho významu publikovány.

První kapitola je věnována akutním leukémiím s důrazem na akutní myeloidní leukémie, neboť praktická část diplomové práce je zaměřena na pacienty s tímto subtypem onemocnění.

Druhá kapitola je zaměřena na strukturu *WT1* a již zmíněné důležité poznatky o tomto genu, zejména v oblasti leukemogenesy a potenciálního využití *WT1* v diagnostice, stratifikaci či léčbě pacientů.

S využitím *WT1* v diagnostice leukémií je úzce spjat pojem minimální residuální nemoci, jemuž je věnována třetí kapitola. V této části se pokusím stručně vysvětlit tento fenomén včetně současných možností detekce MRN. Kapitola také obsahuje detailnější popis techniky real-time PCR, neboť pro detekci hladiny exprese *WT1* v leukemických buňkách používáme právě metodu kvantitativní PCR.

Čtvrtá kapitola je věnována metodám, analysovanému materiálu, laboratorním přístrojům a softwaru, které jsem během své diplomové práce použila. V této části také charakterisují soubor pacientů.

Následující kapitoly obsahují výsledky práce v kontextu s publikovanými daty na téma genu *WT1* a možné příčiny neshod s některými publikacemi. Uvádím zde také budoucí směřování výzkumu genu *WT1* v rámci tohoto projektu.

Závěrem krátce shrnuji naplnění stanovených cílů práce a její nejvýznamnější výsledky.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ V DĚTSKÉM VĚKU

Nádorová onemocnění u dětských pacientů patří mezi velmi vzácná onemocnění. Ve vyspělých zemích představuje pouze 0,5 % veškerých diagnostikovaných malignit a vyskytuje se s věkově standardizovanou incidencí 70 – 160 případů na 1 milion dětí ve věku 1-14 let. Oproti dospělým pacientům, u nichž patří k nejčastějším nádorům karcinomy, jsou dětské malignity z histologického hlediska velmi rozmanité. Nejčastěji se vyskytují akutní leukémie, dále např. nádory mozku, míchy, kostí, měkkých tkání či retinoblastomy (STILLER 2004).

2.1.1 AKUTNÍ LEUKÉMIE

V České republice onemocní akutní leukémií ročně zhruba 80 – 90 dětí a adolescentů (ZDRAHALOVA a STARY 2007). Nejvíce pacientů je zastoupeno ve věkové skupině (1-5 let) a, naopak nejméně mezi dětmi ve věku (6-9 let) a u kojenců (STARÝ *et al.* 2002).

Akutní leukémie dělíme na dvě základní skupiny. Zhruba 80% všech případů dětské leukémie tvoří akutní lymfoblastická leukémie (ALL), jejichž leukemickou populaci tvoří maligní buňky se znaky lymfoidní linie. Zbýlých 15-20 % představují akutní myeloidní leukémie (AML), jež odpovídají myeloidní linii (STILLER 2004).

V obou případech se jedná o onemocnění s charakteristickým prudkým a agresivním nástupem a to velmi často u osob bez jakékoli hematologické anamnesy. První příznaky se objevují zpravidla jen několik týdnů před zjištěním definitivní diagnózy. Obvykle se jedná o nespecifické projevy související s poklesem jednotlivých elementů v krvi, např. únava, zvýšená teplota, anemie, slabost a krvácivé či infekční projevy (STARÝ *et al.* 2002).

Diagnosa tohoto onemocnění je stanovena na základě morfologického vyšetření vzorku kostní dřeně a periferní krve. Pro přesné určení konkrétního

subtypu leukémie je prováděna cytochemická, imunologická, cytogenetická a molekulárně genetická analýza maligních buněk (STARÝ *et al.* 2002).

Chemoterapeutická léčba leukémií se liší jednak podle imunofenotypu maligních buněk a jednak podle tzv. rizikové skupiny. Zařazení pacientů do rizikových skupin je velmi důležité, neboť intenzita průběhu choroby a riziko vzniku relapsu se u jednotlivých případů výrazně liší. Tato stratifikace tak umožňuje podat intenzivnější léčbu v případě agresivnější formy nemoci a méně intenzivní a tudíž pro pacienta méně náročnou léčbu pro formu s mírnějším průběhem. Rozdělení pacientů do skupin s nízkým, středním či vysokým rizikem probíhá na základě přítomnosti tzv. prognosticky příznivých či nepříznivých znaků (viz níže) (KASPERS a ZWAAN 2007; PUI *et al.* 2004).

Vznik leukémií je obecně charakterisován jako proces, během něhož dochází k nahromadění nejrůznějších mutací v genomu hematopoetických progenitorů, což vede k poruše kontroly jejich normální diferenciaci a proliferaci. Změny v genomu mohou být jemné, např. bodové mutace, až po změny v počtu chromosomů (JOHANSSON *et al.* 2004; STARÝ *et al.* 2002). Tyto mutace vznikají u převážné většiny pacientů v somatických buňkách – buňkách hematopoese, a jen výjimečně mají dědičný základ.

U některých konstitučních a chromosomálních chorob je přesto patrný častější výskyt leukémií. Jedná se např. o Downův syndrom (FONG a BRODEUR 1987), Shwachmanův-Diamondův syndrom (SMITH *et al.* 1996), ataxii-teleangiectazii (TAYLOR *et al.* 1996), či těžkou vrozenou agranulocytosu. Zvýšenou incidenci nacházíme také u některých vzácných genetických onemocnění, které se vyznačují chromosomální nestabilitou jako např. Fanconiho anemie (AUERBACH 1992) či Bloomův syndrom (POPPE *et al.* 2001). Leukemogenesa těchto pacientů je z hlediska biologie vzniku této choroby naprosto unikátní, neboť je ovlivněna mutací v zárodečných buňkách.

V odborné literatuře existuje mnoho publikací zabývajících se výzkumem leukemogenesy. Výsledky těchto studií sice poskytly detailnější informace o dílčích událostech tohoto děje, jejich konkrétní interakce a posloupnost v tomto mnohastupňovém procesu však stále nebyly vyjasněny.

2.1.1.1 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

U tohoto typu leukémie je maligní klon odvozen od progenitorů lymfoidní linie. Z hlediska imunofenotypu lze ALL rozdělit na tzv. ALL B-řady (BCP-ALL a zralé B-ALL) a ALL T-řady. Téměř 80% těchto pacientů má leukémii odvozenou od prekursorů B-řady tzv. BCP-ALL, 1-2% případů fenotypově odpovídá zralým B-lymfocytům a zhruba 15 % případů představují ALL T-řady (STARÝ *et al.* 2002).

Šance na vyléčení dětských ALL dosáhla v poslední době téměř 80%. Vysokého procenta dlouhodobě přežívajících pacientů bylo dosaženo jednak efektivnější kombinací chemoterapeutik a podpůrné léčby, ale zejména volbou adekvátně intenzivní antileukemické léčby v rámci risikových skupin (PUI *et al.* 2003; SILVERMAN *et al.* 2001).

Jak již bylo zmíněno, stratifikace do těchto risikových skupin probíhá na základě přítomnosti určitých prognosticky významných charakteristik. V případě ALL se jedná o kombinace cytogenetických charakteristik, iniciálních klinických vlastností a časné odpovědi na léčbu. Význam klinických vlastností pacientů v této stratifikaci se liší u ALL B řady a T řady, neboť pacienti s T-ALL jsou spíše řazeni do 2 risikovějších skupin (PUI *et al.* 2001). Mezi prognosticky příznivé znaky řadíme nízký věk (1-6 let), nízký iniciální počet leukocytů (WBC < 20 000/ μ l) a dobrou časnou odpověď. Naopak přítomnost translokací t(9;22) či t(4;11) a špatná odpověď na iniciální fázi léčby je považována za nepříznivý znak a řadí pacienty do nejrisikovější skupiny (SCHRAPPE *et al.* 2002). Časnou odpověď pacienta na léčbu lze morfologicky hodnotit podle zastoupení leukemických blastů v kostní dřeni v průběhu iniciální fáze terapie. V současné době se však stále více zohledňuje i kritérium minimální residuální nemoci (FLOHR *et al.* 2008; FRONKOVA *et al.* 2008).

Významnou charakteristikou maligních buněk vycházejících z lymfoidní linie je fakt, že tyto buňky nesou identickou klonální přestavbu imunoglobulinových a T-buněčných receptorů (Ig/TCR), která vznikla při maturaci preleukemické hematopoetické buňky. Po transformaci a následné proliferaci této buňky je stejná klonální přestavba přítomna ve všech leukemických blastech a je tedy jednoznačnou charakteristikou maligních buněk využitelnou k jejich detekci (PONGERS-WILLEMSE *et al.* 1999).

2.1.1.2 Akutní myeloidní leukémie (AML)

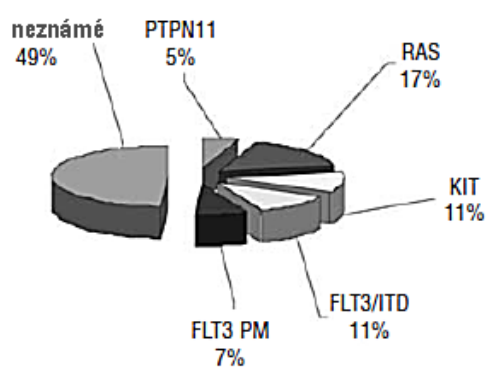
Myeloidní leukémie je z morfologického hlediska heterogenní onemocnění postihující granulocytární, monocytární, erytroidní či megakaryocytární hematopoetickou řadu. V rámci AML proto rozlišujeme několik subtypů. Světová zdravotnická organizace (WHO) navrhla v roce 2002 rozdělení podskupin AML na základě morfologických a hlavně cytogenetických charakteristik (ROSS *et al.* 2004; VARDIMAN *et al.* 2002). Přesto je však v praxi stále používané rozdělení z roku 1976, které navrhla francouzsko-americko-britská pracovní skupina („French – American – British (FAB) cooperative group“) vycházející z morfologických a cytochemických znaků (BENNETT *et al.* 1976). Podle této FAB klasifikace rozdělujeme AML na subtypy, jejichž zastoupení u dětí (viz tabulka 1) je podobné jako u dospělých, s výjimkou vyššího výskytu subtypu AML M5, typického pro kojence:

FAB Subtyp	Charakteristika	Zastoupení
AML M0	akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciace (tzv. časná myeloidní leukémie)	3 %
AML M1	akutní myeloidní leukémie bez vyzrávání	15 – 20 %
AML M2	akutní myeloidní leukémie s vyzráváním	25 – 30 %
AML M3	akutní promyelocytární leukémie (APL), do této skupiny patří také podskupina AML M3v – variantní mikrogranulární leukémie	5 – 10 %
AML M4	akutní myelomonocytární leukémie, subtypem této skupiny je varianta AML M4eo s eozinofilii	25 – 30 %
AML M5	akutní monocytární leukémie	6 %
AML M6	Erytroleukémie	3 – 5 %
AML M7	akutní megakaryoblastická leukémie	3 %

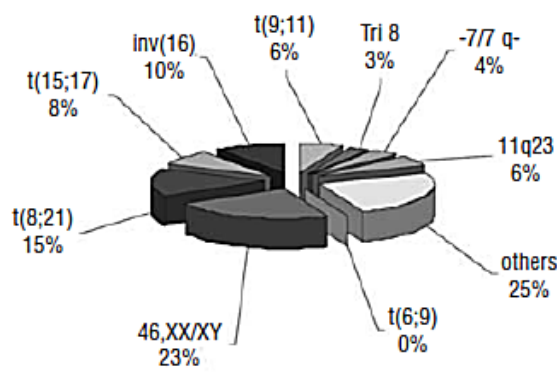
tabulka 1. Charakteristika a zastoupení jednotlivých subtypů AML (STARÝ *et al.* 2002)

Více než dvě třetiny AML pacientů mají abnormality karyotypu v genomu leukemických blastů. Typická je pseudodiploidie nebo hypodiploidie. Zastoupení konkrétních mutací u dětských AML se liší oproti dospělým pacientům, což poukazuje na možné rozdíly v jejich leukemogeneze (KASPERS a ZWAAN 2007). Mezi nejčastější abnormality patří t(8;21), která se často nachází u M2 subtypu, dále t(15;17), charakteristická pro M3 subtyp, t(9;11) jež se nachází u AML M5, inv16 společná M4eo leukémiím, monosomie 7, trisomie 8 a další (RAIMONDI *et al.* 1999; ROSS *et al.* 2004).

Tyto genetické abnormality lze obecně rozdělit do dvou základních skupin (viz obr. 1). První skupina se označuje jako abnormality typu 1 a zahrnuje mutace v receptorových tyrosin-kinásách, tyrosin-fosfatásách a v některých onkogenech (např. RAS), které poskytují leukemickým buňkám proliferační výhodu. Druhou skupinou jsou tzv. mutace typu 2. Jedná se převážně o translokace zahrnující úseky genů pro transkripční faktory (např. t(8;21) či t(15;17)), které tak pozměňují jejich normální funkci (KASPERS a ZWAAN 2007).



Genetické abnormality - Typ 1



Genetické abnormality - Typ 2

obr. 1. Zastoupení genetických abnormalit typu 1 a 2 u dětských AML (KASPERS a ZWAAN 2007)

Prognosa pacientů s AML je v porovnání s ALL mnohem horší. Současnými léčebnými protokoly lze dosáhnout dlouhodobého přežití přibližně u 65% případů (KASPERS a CREUTZIG 2005; SMITH *et al.* 2005). Podobně jako u akutní lymfoblastické leukémie i v případě AML je velmi důležité zařazení pacientů do rizikových skupin. Stratifikace v tomto případě probíhá na základě přítomnosti cytogenetických charakteristik a časně odpovědi na léčbu. Iniciální klinické vlastnosti se v tomto případě příliš neuplatňují (CREUTZIG *et al.* 2005; KASPERS a ZWAAN 2007).

Mezi prognosticky příznivé znaky řadíme např. t(8;21), inv16, t(15;17), mutace v genu *CEBPA* či v genu *NPM1 (nucleophosmin)* a dobrá odpověď na iniciální léčbu. Negativními prognostickými znaky jsou monosomie 7 či del(7q), *FLT3* mutace/ITD, mutace v genu *C-KIT*, -5, 5q-, t(9;22), t(16;21), t(6;9), komplexní karyotyp, 11q23 aberace kromě t(9;11) a špatná odpověď na počáteční fázi léčby (CREUTZIG *et al.* 2005; KASPERS a ZWAAN 2007).

Časná odpověď na antileukemickou léčbu AML se ve většině případů posuzuje morfologicky podle relativního množství leukemických blastů v kostní dřeni během iniciální fáze terapie (KASPERS a ZWAAN 2007). Minimální residuální nemoc jako ukazatel této odpovědi zatím nebyla do léčebných protokolů standardně zavedena, přestože v léčbě ALL je již delší dobu úspěšně využívána (VAN DONGEN *et al.* 1998). Hlavní příčinou je absence universálního markeru pro sledování MRN, neboť u AML nelze využít klonální přestavby *Ig/TCR* k jednoznačnému určení leukemické buňky (YIN a GRIMWADE 2002). K detekci maligních myeloidních blastů mohou být využity nenáhodné chromosomální aberace, ty se však vyskytují jen u zhruba 50 % pacientů (CILLONI a SAGLIO 2004). Hledání universálního markeru aplikovatelného na většinu pacientů je proto jednou z hlavních oblastí výzkumu myeloidních leukémií (STEINBACH *et al.* 2006).

Gen *WT1* byl navržen jako jeden z možných kandidátů pro detekci MRN (INOUE *et al.* 1997). Názory na jeho potenciální využití k tomuto účelu se však v publikovaných studiích výrazně liší (viz kapitola 2.3.1.4) (BOUBLIKOVA *et al.* 2006; TRKA *et al.* 2002).

2.2 GEN *WT1*

„Wilms' tumor gene 1“ byl izolován roku 1990 jako tumor-supresorový gen, odpovědný za vznik Wilmsova tumoru ledviny (CALL *et al.* 1990).

Fysiologicky je tento gen exprimován během embryogenese a také v některých tkáních dospělého organismu. Je esenciální pro normální vývoj urogenitálního systému, neboť hraje důležitou roli v regulaci proliferace a diferenciaci nefroblastů a gonadální tkáně (KREIDBERG *et al.* 1993). V prenatálním vývoji lze jeho expresi detekovat také ve slezině, hematopoetických buňkách, některých oblastech mozku, míše, bránici, epikardu, či subepikardiálním mesenchymu (ARMSTRONG *et al.* 1993; MOORE *et al.* 1999; MOORE *et al.* 1998). V průběhu života je pak exprimován např. v glomerulárních podocytech, děloze, testes či hematopoetických progenitorech (BUCKLER *et al.* 1991; WAGNER *et al.* 2003).

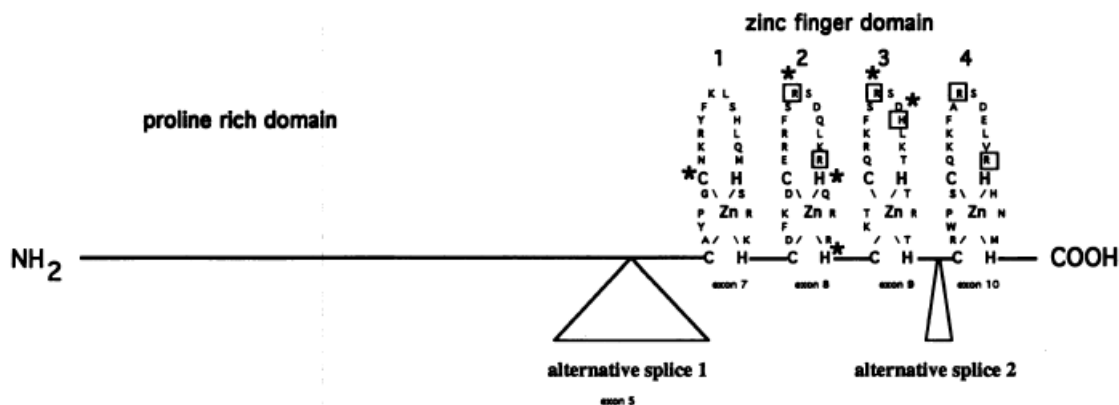
Mutace v genu *WT1* jsou asociovány s některými syndromy a vývojovými abnormalitami. Jedná se např. o Denys-Drashův syndrom (PELLETIER *et al.* 1991), Frasierův syndrom (BARBAUX *et al.* 1997) či tzv. WAGR syndrom (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary malformations, mental retardation) (GESSLER *et al.* 1990). Výskyt mutací v tomto genu byl prokázán také u některých malignit, např. u leukémií (INOUE *et al.* 1994), nádorů prsu (SILBERSTEIN *et al.* 1997), či retinoblastomu (WAGNER *et al.* 2002).

V kancerogeneze hraje pravděpodobně roli také deregulace exprese *WT1*. Konkrétní role této deregulace je však stále nejasná. Zvýšená exprese byla nalezena např. u leukémií (MIWA *et al.* 1992), karcinomů plic, tlustého střeva, pankreatu (OJI *et al.* 2002; OJI *et al.* 2004) a nádorů vaječníku či prsu (SILBERSTEIN *et al.* 1997; VIEL *et al.* 1994).

2.2.1 STRUKTURA GENU *WT1*

Na chromosomu č. 11 se nachází přibližně 50 kpb dlouhý gen skládající se z 10 exonů. První exon kóduje doménu bohatou na prolin a glutamin a poslední 4 exony kódují 4 Cys₂His₂ zinkové prsty (viz obr. 2). Každý zinkový prst je tedy kódován 1 exonem a je oddělen krátkou intronovou sekvencí

(HABER *et al.* 1991). Otevřený čtecí rámec výsledné mRNA má 1725 nukleotidů (SHARMA *et al.* 1994).



obr. 2. Struktura genu *WT1* (COPPES *et al.* 1993)

2.2.1.1 Vznik isoformem *WT1*

Z jediné DNA sekvence genu *WT1* vzniká až 36 variant výsledného proteinu. Tyto isoformy mohou vznikat v důsledku alternativního začátku transkripce či translace, editací RNA nebo alternativním sestřihem primárního transkriptu.

1. Alternativní iniciace transkripce

Podobně jako mnoho dalších genů účastnících se regulace růstu i mRNA genu *WT1* má AUG iniciovaný otevřený čtecí rámec, jemuž předchází dlouhá GC bohatá, nepřekládaná oblast (5' UTR). Alternativní místa iniciace transkripce v promotoru genu *WT1* vedou ke vzniku isoformem mRNA s 375, 700, či 720 bp dlouhou 5'UTR nepřekládanou oblastí (BRUENING a PELLETIER 1996).

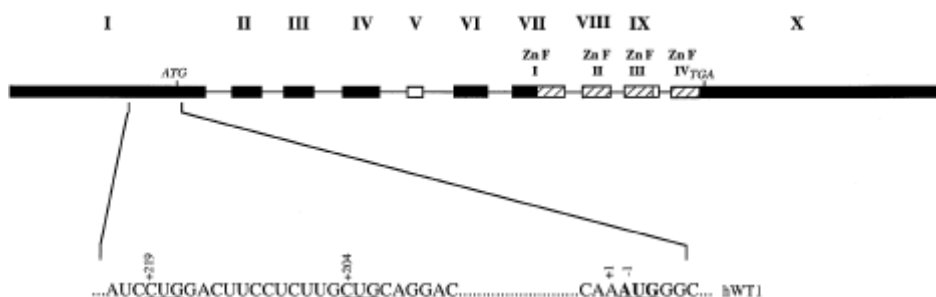
V nedávné době byla popsána také tzv. *AWT1* isoforma. Tato varianta má s *WT1* shodnou strukturu v rozsahu exonu 2-10, obsahuje však odlišný

exon 1, který je lokalizován v oblasti prvního intronu (DALLOSSO *et al.* 2004; HOSSAIN *et al.* 2006).

Dalším příkladem je tzv. „truncated transcript“ – *trWT1*, kterému chybí prvních 5 exonů. Vzniká pravděpodobně expresí z kryptického promotoru v intronu 5. Obě tyto zkrácené formy však byly detekovány pouze v maligních buňkách některých solidních nádorů a leukemických blastech (DECHSUKHUM *et al.* 2000).

2. Alternativní iniciace translace

Translace mRNA tohoto genu je iniciována nejen pomocí klasického start kodónu AUG, ale také pomocí 2 CUG kodonů, jež se nacházejí 204 respektive 219 nukleotidů před tímto AUG (viz obr. 3). Translací z těchto CUG vznikají delší isoformy o molekulové hmotnosti 54-56 kDa (BRUENING a PELLETIER 1996).



obr. 3. 2 CUG iniciační kodony v 5'UTR transkriptu *WT1* (BRUENING a PELLETIER 1996)

3. RNA editace

Mezi modifikace primárního transkriptu *WT1* patří také RNA editace, která vede k záměně T za C respektive CTC kodonu (leucin 280) za CCC kodon (prolin 280) (SHARMA *et al.* 1994).

4. Alternativní sestřih

Nejdůležitější posttranskripční úpravou je však alternativní sestřih, díky němuž vznikají 4 hlavní isoformy, lišící se přítomností či absencí dvou insertů DNA (viz obr. ___) (HABER *et al.* 1991):

- [-exon5/-KTS] isoforma *WT1* – postrádá oba inserty
- [+exon5/-KTS] isoforma *WT1* – obsahuje pouze první insert
- [-exon5/+KTS] isoforma *WT1* – obsahuje pouze druhý insert
- [+exon5/+KTS] isoforma *WT1* – obsahuje oba inserty

První insert („exon 5“) je dlouhý 51 bp, je tvořen celým exonem 5 a kóduje úsek 17 aminokyselin. Druhý insert („KTS“) obsahuje pouze 9 nukleotidů, kóduje 3 AK (Lys, Thr, Ser) a nachází se mezi exonem 9 a 10, kde přerušuje vysoce konzervovaný spoj mezi zinkovými prsty 3 a 4 (HABER *et al.* 1991).

Relativní poměr těchto 4 isoform ([-/-],[Exon5/-],[-/KTS],[Exon5/KTS]) ve vyvíjející se ledvině je 1 : 2,5 : 3,8 : 8,3 a je stabilní během embryonálního vývoje ve všech tkáních exprimujících *WT1*. Zaměříme-li se pouze na exon5, varianty obsahující tento insert jsou zastoupeny v poměru 2:1. Pro KTS insert je tento poměr 5:1 ve prospěch +KTS isoform. Nejčastější sestřihovou variantou je tedy protein, který obsahuje oba sestřihové úseky, a nejméně častou variantou je protein, u něhož oba úseky chybí (HABER *et al.* 1991).

Molekulární mechanismy, jejichž výsledkem je alternativní sestřih, ještě nejsou úplně prozkoumány, ale předpokládá se, že zde budou hrát roli jak informace kódovaná v nukleotidové sekvenci v sestřihovém místě, tak i regulační faktory specifické pro určitý buněčný typ (RAUSCHER *et al.* 1990).

2.2.1.2 Protein WT1 a jeho isoformy

Translací takto modifikovaných mRNA vznikají proteiny o velikosti 45-56 kDa. Jedná se o transkripční faktory obsahující 2 charakteristické, funkčně odlišné domény. C-koncová vazebná doména je složena ze 4 zinkových prstů, jež mají vysoký stupeň homologie se „zincfinger“ doménami transkripčního

faktoru „early growth response“ 1 a 2 (EGR1 a EGR2) (HAMILTON *et al.* 1995). Amino konec proteinu WT1 sestává ze záporně nabitě regulační domény bohaté na AK prolin a glutamin (MITCHELL a TJIAN 1989).

Vysoký stupeň homologie s EGR1 a EGR2 ve struktuře vazebné domény se projevuje vazbou proteinu WT1 ke stejným sekvencím, obsahujícím GC bohatý motiv (5'-GCGGGGGCG-3') (RAUSCHER *et al.* 1990). Existuje velké množství cílových genů, k jejichž promotorům se WT1 váže. Nejčastěji působí jako represor jejich transkripce, pouze výjimečně jako aktivátor (např. gen *SRY*). Většina těchto genů se účastní regulace růstu, buněčné diferenciaci, buněčného cyklu či určení pohlaví v embryonálním vývoji. Jedná se např. o *IGF-2* (insulin-like growth factor 2) (DRUMMOND *et al.* 1992), *PDGF-A* (platelet derived growth factor A-chain) (GASHLER *et al.* 1992), *TGF-B* (transforming growth factor-β) (DEY *et al.* 1994), *PAX-2* (paired box gene 2) (RYAN *et al.* 1995), *CSF-1* (colony stimulating factor 1) (HARRINGTON *et al.* 1993), *SRY* (HOSSAIN a SAUNDERS 2001), *BCL-2* a *C-MYC* (HEWITT *et al.* 1995). Kromě těchto genů se WT1 váže také ke svému promotoru, který reprimuje a má tedy také autoregulační funkci (HEWITT *et al.* 1996).

WT1 může pomocí N-terminální domény interagovat také s proteiny. Jedná se např. o komponenty sestřihového aparátu, což naznačuje možnou účast tohoto genu v sestřihu RNA (LARSSON *et al.* 1995), či různé transkripční faktory, jež mohou modulovat jeho funkci (SCHARNHORST *et al.* 2001).

Kromě DNA a proteinů se WT1 může vázat pomocí zinkových prstů i k RNA. Pravděpodobně se tímto mechanismem účastní kromě sestřihu i dalších post-transkripčních úprav cílových mRNA. Přesný mechanismus a účinek této vazby však ještě nebyl vyjasněn (LARSSON *et al.* 1995).

2.2.1.3 Role jednotlivých isoform

Výše uvedené obecné funkce nejsou zastávány všemi proteiny WT1, ale jsou spíše rozděleny mezi jednotlivé isoformy. Stabilní poměr těchto isoform je naprosto nezbytný pro správnou funkci proteinu WT1. Změny těchto poměrů jsou způsobeny deregulací exprese jednotlivých variant a byly nalezeny u

některých nádorů a vývojových vad (např. leukémií (HOSSAIN *et al.* 2006) či Frasierova syndromu (BARBAUX *et al.* 1997)).

V současné době již existuje mnoho publikací zaměřených na základní 4 isoformy. Vzhledem k širokému spektru buněk a tkání exprimujících *WT1* však nelze vyvodit z těchto studií ucelené závěry ohledně obecných funkcí jednotlivých isoform. Publikované výsledky si navíc v některých případech protirečí, což vnáší do celé problematiky týkající se genu *WT1* další nejasnosti. Obecně lze tedy shrnout pouze fakt, že relativní poměry jednotlivých isoform jsou nejspíše mnohem důležitější než celkové množství proteinu *WT1*.

- **(+Exon5) varianty**

Exon 5 představuje významnou funkční doménu, účastní se protein-proteinových interakcí (WANG *et al.* 1995). Isoformy obsahující tento insert jsou podle některých autorů zodpovědné za anitapoptotickou funkci (MAYO *et al.* 1999). Jiné studie však poukazují na schopnost stejné isoformy odlišnými mechanismy apoptosu indukovat (MENKE *et al.* 1997). Dále bylo zjištěno, že mutace postihující doménu Exon 5 mohou přispívat ke vzniku Wilmsova tumoru (GUAN *et al.* 1998).

- **(-Exon5) varianty**

O specifické funkci těchto variant se zatím mnoho neví.

- **(-KTS) varianty**

Varianty bez přítomnosti KTS insertu se chovají spíše jako transkripční regulátory. Mohou reprimovat či aktivovat expresi v závislosti na struktuře promotoru cílového genu (WAGNER *et al.* 2003). Jsou mimo jiné odpovědné za transkripční aktivaci genů *SRY*, *MIS* a *WNT-4* účastnících se v určení pohlaví embrya (HOSSAIN a SAUNDERS 2001).

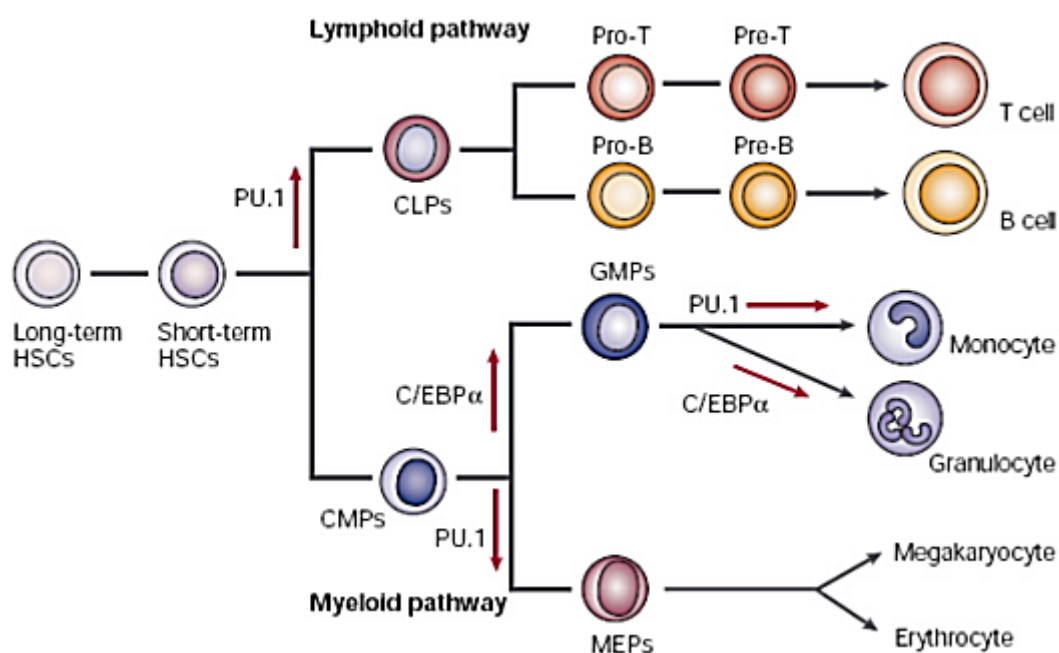
- **(+ KTS) varianty**

Inserce 3 aminokyselin mezi 2 motivy zinkového prstu významně ovlivňují strukturu vazebné domény a pozměňují tím i vazebnou specifitu (WANG *et al.* 1995). Tyto isoformy mají také vyšší afinitu k RNA (CARICASOLE *et al.* 1996), asociují se sestřihovým aparátem (DAVIES *et al.* 1998) a kromě

regulace transkripce hrají tedy pravděpodobně roli i v post-transkripčních úpravách RNA (WAGNER *et al.* 2003).

2.2.2 ROLE GENU *WT1* V HEMATOPOESE

Vývoj hematopoetických buněk je komplexní proces, jehož výsledkem je produkce mnoha typů buněk, zajišťujících nejrůznější funkce v organismu. Celý tento proces vychází z pluripotentních CD34+ kmenových buněk, jejichž dělením vznikají jednak další pluripotentní buňky a jednak multipotentní tzv. „lineage-committed“ prekursorů. Diferenciací těchto prekursorů vznikají zralé, nedělící se krevní buňky (OGAWA 1993) (viz obr. 4).



obr. 4. Hematopoesa a její významné transkripční faktory (TENEN 2003)

Regulace hematopoetického vývoje je zajišťována faktory stimulujícími tvorbu kolonií (CSF), růstovými faktory a specifickými transkripčními faktory, jejichž exprese je v průběhu hematopoesy místně i časově specifická a striktně

regulována. Deregulace jejich exprese je považována za nutný předpoklad pro maligní transformaci hematopoetických buněk (TENEN 2003). Příkladem těchto transkripčních faktorů jsou PU.1 (KLEMSZ *et al.* 1990), GATA-1 (TSAI *et al.* 1989), C/EBP α (LANDSCHULZ *et al.* 1988) a také gen *WT1*, respektive jeho isoformy.

V současné době stále nelze definovat konkrétní úlohu *WT1* během hematopoese, neboť publikace zaměřené na toto téma opět obsahují kontroverzní a často naprosto odlišné výsledky. Tyto studie se navíc ve většině případů týkaly celkového *WT1*, což vzhledem k specifickým účinkům jednotlivých isoform, neposkytuje detailní pohled na roli *WT1* v hematopoese.

V následujícím textu zmíním některé významné poznatky ohledně *WT1* a hematopoese, včetně již zmíněných diskrepancí.

Vysoká hladina exprese *WT1* byla detekována u zdravých hematopoetických prekursorů, zejména u primitivních CD34+ kmenových buněk (HOSEN *et al.* 2002). Konkrétní účinek této exprese na hematopoetické buňky však stále není vyjasněn. Mnozí autoři poukazují na prodiferenční účinek *WT1* (INOUE *et al.* 1998), jiní naopak popisují protidiferenční účinek (SMITH *et al.* 1998). Nejspíše má však *WT1* obě tyto funkce a to v závislosti na stádiu buňky, ve které je exprimován. Podle teorie tzv. bifasické exprese navozuje klidový stav buňky u primitivních CD34+/CD38- kmenových buněk, zatímco u zralejších „lineage-committed“ prekursorů navozuje buněčnou diferenciaci (ELLISEN *et al.* 2001). V průběhu další diferenciaci je pak hladina exprese *WT1* snížena a tento pokles je významným požadavkem pro maturaci hematopoetických buněk. Naopak vysoká hladina *WT1* v těchto stádiích nejspíše diferenciaci a tudíž maturaci brání (PHELAN *et al.* 1994).

Možné vysvětlení teorie bifasické exprese publikoval Loeb *et al.*, podle něž existují dvě populace CD34+ buněk lišících se přítomností exprese (+KTS) a (-KTS) variant *WT1*. Subpopulace exprimující (+KTS) isoformy podle této studie ještě není „lineage committed“ a subpopulace exprimující (-KTS) isoformy již podstupuje granulocytární diferenciaci. (LOEB *et al.* 2003)

In vitro studiemi byla prokázána kooperativní role těchto isoform během maturace hematopoetických prekursorů. (+KTS) varianta má sice sama o sobě nepatrný vliv na tento proces, dokáže však zvýšit diferenciaci indukovanou

jinými diferenciačními agens (ELLISEN *et al.* 2001). Přesný mechanismus kooperace těchto dvou isoformů však stále zůstává nejasný.

Z výše uvedených výsledků je tedy zřejmé, že se WT1 významným způsobem účastní regulace hematopoese. Kontrola proliferace a diferenciace hematopoetických buněk pomocí WT1 je realizována odlišnými molekulárními mechanismy (KEILHOLZ *et al.* 2005), což opět poukazuje na možnou účast jednotlivých variant proteinu WT1. Deregulace jejich exprese může porušit rovnováhu těchto procesů a poskytnout tak buňkám proliferační výhodu, která může vést k jejich maligní transformaci (NISHIDA *et al.* 2006).

2.2.3 ROLE GENU WT1 V LEUKEMOGENESE

V prvotních studiích zabývajících se tímto genem byl WT1 považován za tumor-supresorový gen, neboť konstituční delece v jeho sekvenci byly nalezeny u některých pacientů s Wilmsovým tumorem (HIROSE 1999). V současné době je znám i onkogenní účinek WT1 např. u leukémií a některých solidních nádorů (OJI *et al.* 1999). Tyto zcela odlišné role by mohly být zajišťovány různými isoformami WT1. Komplexní studie, které by tuto teorii potvrdily, však stále chybí.

Detekovatelná až velmi vysoká exprese WT1 byla nalezena téměř u všech pacientů s akutními leukémiemi (MENSSEN *et al.* 1995). Nejvyšší hladina exprese je detekována při diagnóze a poté dochází k jejímu snížení v souvislosti s navozením hematologické remise. MRN-negativní vzorky regenerující kostní dřeň vykazují téměř identickou expresi během léčby leukémie jako normální kostní dřeň zdravého jedince (BOUBLIKOVA *et al.* 2006).

Stejně jako u Wilmsova tumoru pouze 10 – 15 % všech pacientů s leukémiemi má mutaci v genu WT1, zatímco většina exprimuje vysokou hladinu „wild-type“ transkriptu (KING-UNDERWOOD *et al.* 1996; MENSSEN *et al.* 1995; MIYAGAWA *et al.* 1999). Nejčastějšími mutacemi jsou malé inserce v exonu 1 a 7, nonsense mutace v exonu 9 a jejich výsledkem je ve všech případech zkrácený protein, jenž vykazuje defekt v doméně zinkového prstu. Nález těchto mutací znamená pro pacienty vždy nepříznivou prognosu.

V poslední době byly popsány další mutace v genu *WT1*, postihující všechny exony s výjimkou exonu 5 (VIRAPPANE *et al.* 2008). Některé z těchto mutací opět představují negativní prognostický faktor (GAIDZIK a DOHNER 2008; PASCHKA *et al.* 2008).

Jak již bylo zmíněno, exprese *WT1*, či spíše jeho jednotlivých isoform je v průběhu krvetvorby striktně regulována. Narušení této regulace může podle některých autorů vést k expansi hematopoetických progenitorů, což je učiní citlivé k dalším genetickým změnám, jež mohou vést ke vzniku leukémie.

Jiné teorie předpokládají přímou účast proteinu *WT1* na leukemogenese v kooperaci s dalšími faktory, např. s produktem fusního genu *AML1/ETO* (NISHIDA *et al.* 2006). V této studii byl vnesen retrovirový vektor s fusním genem *AML1/ETO* do transgenní myši, která ve svých hematopoetických buňkách hyperexprimovala gen *WT1*. Kooperace *WT1* a *AML1/ETO* vedla ke vzniku AML.

Konkrétní rolí *WT1* v leukemogenese se již zabývalo mnoho autorů. Z publikovaných dat lze opět vyzorovat velké neshody v názorech a výsledcích jednotlivých pracovišť. Možné příčiny těchto neshod zmiňují v kapitole věnované diskusi.

2.2.4 VYUŽITÍ GENU *WT1* V OBLASTI STRATIFIKACE A LÉČBY

2.2.4.1 Prognostický význam hladiny exprese *WT1*

Využití hladiny exprese *WT1* v době diagnózy jako nezávislého prognostického faktoru při stratifikaci pacientů patří mezi další sporná témata. Někteří autoři poukazují na korelaci této hladiny s nepříznivou prognosou (INOUE *et al.* 1996; INOUE *et al.* 1994; TRKA *et al.* 2002), jiní však tuto souvislost nepotvrdili (BERGMANN *et al.* 1997; BOUBLIKOVA *et al.* 2006; GAIGER *et al.* 1999; SCHMID *et al.* 1997; WEISSER *et al.* 2005). Další studie se zabývaly významem exprese *WT1* v průběhu léčby a jeho možným využitím jako markeru MRN. Výsledky těchto publikací se opět výrazně liší (CILLONI *et al.* 2002; CILLONI a SAGLIO 2004; KREUZER *et al.* 2001; SUGIYAMA 2002).

V současné době lze tedy shrnout následující poznatky. Hladina exprese *WT1* obecně koreluje více s průběhem léčby pacientů s AML. V případě ALL pravděpodobně nelze využít *WT1* k stratifikaci pacientů, neboť nepříznivá prognosa byla nalezena i u pacientů s velmi nízkou expresí (BOUBLIKOVA *et al.* 2006).

2.2.4.2 Využití *WT1* v léčbě leukémií

V posledních letech se některé pracovní skupiny zaměřily na využití *WT1* v antileukemické terapii (ELISSEEVA *et al.* 2002; OKA *et al.* 2004; ROSENFELD *et al.* 2003; SCHEIBENBOGEN *et al.* 2002; WU *et al.* 2005). Snahou těchto vědců byla jednak indukce imunitní odpovědi proti leukemickým blastům hyperexprimujícím *WT1* a jednak cílené snížení exprese *WT1* v těchto buňkách.

Leukemické blasty jsou obecně velmi citlivé k účinku cytotoxických T-lymfocytů. *In vitro* i *in vivo* studiemi byla prokázána aktivace těchto cytotoxických T-lymfocytů krátkými polypeptidy odvozenými z proteinu *WT1*. Tyto lymfocyty jsou schopny indukovat apoptosu v leukemických buňkách bez negativního vedlejšího účinku na zdravé hematopoetické prekursory exprimující *WT1* (OKA *et al.* 2000; OKA *et al.* 2004).

Wu *et al.* dále popsali existenci humorální odpovědi Th1 lymfocytů proti *WT1*, neboť u pacientů s leukémií a myelodysplastickým syndromem (MDS) prokázali přítomnost protilátek proti *WT1* (WU *et al.* 2005).

Na základě těchto poznatků se v současné době některé pracovní skupiny zaměřily na vývoj antileukemické vakcíny založené na stimulaci imunitního systému pacienta pomocí *WT1*. Pilotní studie již účinek těchto vakcín prokázaly, ve většině případů se však jednalo pouze o omezený počet pacientů (OKA *et al.* 2004). Potenciál *WT1* v stimulaci imunitní odpovědi u pacientů tedy stále zůstává nejasný.

Jiný mechanismus jak docílit redukce leukemické populace je založen na cíleném snížení exprese *WT1*. Za předpokladu onkogenní role tohoto genu, lze totiž snížením jeho exprese docílit inhibice proliferace maligních buněk.

Poklesu hladiny exprese *WT1* lze dosáhnout několika způsoby. Yamagami *et al.* prokázal snížení hladiny *WT1* v leukemických buňkách

použitím antisense oligonukleotidů (YAMAGAMI *et al.* 1996). Nevýhodou však byl požadavek vysoké koncentrace těchto oligonukleotidů v cílových buňkách. *In vitro* bylo prokázáno také snížení exprese v K562 leukemických liniích pomocí „hammerhead“ ribozymu, který štěpil mRNA *WT1* (HUBINGER *et al.* 2001).

V tomto ohledu nejslibnější metodou je využití siRNA k tomuto účelu. Schopnost molekul siRNA štěpit mRNA *WT1* v buňkách hyperexprimujících tento gen již byla prokázána několika studii (DAVIES *et al.* 2004; ELMAAGACLI *et al.* 2005; GLIENKE *et al.* 2007). Výhodou této metody je mimo jiné fakt, že RNA interference sprostředkovaná siRNA molekulami je omezena na maligní buňky, kdežto zdravé hematologické prekursory téměř neovlivňuje.

Mnoho vědců považuje *WT1* za slibný prostředek k léčbě leukémií, v současné době však zatím nelze vyvodit žádné pozitivní závěry. Prokázání tohoto potenciálu *WT1* bude tedy vyžadovat pravděpodobně ještě další výzkum.

2.3 MINIMÁLNÍ RESIDUÁLNÍ NEMOC

Pacient, jemuž byla diagnostikována leukémie, může mít v době diagnózy kolem 10^{12} maligních buněk (RYAN a VAN DONGEN 1988). Pokud během léčby množství morfologicky detekovatelných blastů klesne pod 5 %, nachází se pacient v tzv. kompletní hematologické remisi. Přestože přibližně 82 % pacientů s AML (KASPERS a CREUTZIG 2005) a téměř 98 % pacientů (STARÝ *et al.* 2002) s ALL dosáhne této remise, nedojde k úplné eradikaci maligního klonu a v jejich kostní dřeni se tak může nacházet až 10^{10} persistujících leukemických buněk, které různými mechanismy unikly antileukemické léčbě (CAMPANA a PUI 1995). Tato zbytková populace se nazývá minimální residuální nemoc (MRN).

Většina pacientů s ALL či AML, kteří dosáhnou hematologické remise, v této kompletní remisi také zůstává. U 30 – 40 % AML (KASPERS a CREUTZIG 2005) a přibližně 10 % ALL (STARÝ *et al.* 2002) však dochází ve variabilním časovém intervalu od dosažení remise k expansi zbytkového leukemického klonu a tedy k tzv. relapsu leukémie. Možnost monitorování persistujícího klonu v průběhu nemoci umožňuje sledovat kinetiku růstu nádorové masy a určit, zda se pacient stále nachází v kompletní remisi, nebo již směřuje k relapsu (CAMPANA a PUI 1995).

Kromě včasného odhalení blížícího se relapsu lze MRN využít také k stratifikaci pacientů do odlišných rizikových skupin a vybrat tak pro ně adekvátně intenzivní léčbu (CAZZANIGA a BIONDI 2005; SZCZEPANSKI 2007). Hladina residuální nemoci zejména v indukční fázi léčby je u ALL považována za nejrelevantnější prognostický faktor ve srovnání s doposud používanými charakteristikami (SZCZEPANSKI 2007). V současné době již několik světových pracovních skupin včetně České republiky využívá MRN pro stratifikaci pacientů s ALL. Přestože výsledky těchto léčebných protokolů nejsou dosud kompletně k dispozici, je zřejmé, že sledování MRN bude v budoucnu důležitým klinickým fenoménem. U AML je problematika MRN dosud méně prozkoumána, zejména chybějí velké prospektivní studie. Menší publikované soubory pacientů však naznačují, že i u AML bude odpověď na léčbu sledovaná pomocí monitorace MRN významným prognostickým faktorem.

Detekce MRN má prognostický význam i u dalších hematologických malignit jako např. chronické leukémie, non-Hodgkinův lymfom či mnohočetný myelom (DAVIES *et al.* 2002; GRIBBEN 2002).

2.3.1 DETEKCE MINIMÁLNÍ RESIDUÁLNÍ NEMOCI

Leukemické buňky mohou být rozpoznány od normálních hematopoetických progenitorů na základě morfologických a cytochemických vlastností, karyotypových a genových abnormalit, přestaveb genů pro antigenové receptory, na základě *in vitro* růstových vlastností a imunofenotypu. Některé z těchto charakteristik mohou být využity k detekci i velmi malého množství nádorových buněk mezi normálními buňkami (CAMPANA a PUI 1995).

Tyto specifické charakteristiky mohou být detekovány buď kvalitativně nebo kvantitativně. Kvalitativní stanovení poskytuje pouze omezenou informaci o přítomnosti maligního klonu a z hlediska sledování množství MRN je tedy mnohem významnější kvantitativní detekce (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).

Spolehlivá metoda detekce MRN by měla splňovat následující obecná kritéria. Základním požadavkem je jednoduchost a snadná standardisace metody. Nutná je také vysoká sensitivita - alespoň 10^{-3} (detekce 1 leukemické buňky mezi 1000 normálními) a vysoká specifita (schopnost jednoznačně identifikovat maligní buňku mezi zdravými buňkami). Metoda splňující všechny tyto požadavky musí být aplikovatelná na většinu pacientů.

Nejčastěji používané techniky lze rozdělit na metody molekulární cytogenetiky, imunologické analýsy a molekulárně genetické analýsy.

2.3.1.1 Metody molekulární cytogenetiky

Výhodou metod detekujících buňky s abnormalitami karyotypu je možnost přesné identifikace leukemické buňky. Vymizení buněk nesoucích tuto mutaci během léčby je obecně známo jako jev, doprovázející nástup klinické morfologické remise. Identická mutace, která byla detekována v době diagnózy,

je v drtivé většině případů přítomna i během relapsu, což podporuje teorii vzniku relapsu expanzí persistujícího leukemického klonu (FREIREICH *et al.* 1992).

Do této skupiny patří i tzv. FISH (fluorescence in situ hybridization), jenž je založena na detekci nádorových buněk pomocí sekvenčně specifických sond, schopných detekovat numerické a strukturální chromosomální abnormality (GRAY *et al.* 1990).

Výhodou této metody je fakt, že umožňuje sledovat buňky v interfasi, tedy i buňky s nízkou schopností proliferace (CAMPANA a PUI 1995). Její nevýhodou je omezená citlivost, náročnost a vyšší cena.

2.3.1.2 Imunologické metody

Průtoková cytometrie je hlavní metodou této skupiny. Je používána k určení diagnosy a monitorování MRN u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií a může být využita až u 95 % těchto pacientů (SZCZEPANSKI 2007).

Detekce je založená na mnohobarevné průtokové cytometrii. Slouží k identifikaci tzv. LAIP (leukaemia-associated immunophenotypes), tedy kombinaci antigenů, které jsou přítomny na leukemických buňkách, ale nejsou současně exprimovány na normálních buňkách kostní dřeně a periferní krve. Protilátky reagující specificky s těmito LAIP umožňují studium MRN a umožňují tak detekovat 1 leukemickou buňku mezi až 10^4 normálních krevních buněk (CAMPANA a COUSTAN-SMITH 1999). Detekční limit těchto metod je tedy ve srovnání s molekulárně genetickými metodami řádově nižší. Nevýhodou těchto metod je také její potenciální selhání v případech, kdy dochází k imunofenotypickým změnám mezi primární diagnosou a relapsem, čemuž lze částečně zabránit použitím alespoň dvou nezávislých LAIPs (SZCZEPANSKI 2007).

2.3.1.3 Molekulárně genetické metody

Metody kvantitativní polymerasové řetězové reakce (Q-PCR) jsou dalším způsobem detekce MRN. Podle fáse reakce, ve které je detekováno množství produktu, se tyto metody rozdělují na tzv. end-point Q-PCR a real-time PCR.

V prvním případě je toto množství vyhodnocováno po ukončení reakce, kdežto při real-time PCR je prováděno kinetické sledování nárůstu množství PCR produktu během celé reakce (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).

Citlivost této metody je velmi vysoká, schopná detekovat 1 leukemickou buňku mezi 10^5 - 10^6 buněk, je však náchylná na kontaminaci (SZCZEPANSKI 2007).

Jelikož pro sledování exprese *WT1* u AML pacientů používáme v naší laboratoři real-time PCR, budu se této metodě podrobněji věnovat v kapitole 2.3.1.5.

Existuje mnoho PCR cílů pro sledování MRN, které umožňují detekci residuální nemoci u většiny pacientů. Lze je rozdělit do 3 skupin: fusní geny, přestavby imunoglobulinových genů a genů pro receptory T buněk (*Ig/TCR*) a poslední skupinou jsou aberantně exprimované geny. Většina těchto cílů je vysoce specifická a s minimálním, nebo žádným tzv. pozadím v normálních buňkách.

2.3.1.3.1 Detekce fusních genů

Podle velikosti fusních genů je pro tuto techniku použita buď genomová DNA, nebo cDNA (CAMPANA a PUI 1995). Mezi nejčastěji používané fusní geny u ALL patří *TEL/AML1* – t(12;21), *MLL/AF4* – t(4;11) či *BCR/ABL* – t(9;22), v případě AML se jedná např. o *AML1/ETO* – t(8;21), *PML/RAR α* – t(15;17) či *CBF β -MYH 11* – (inv16) (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).

Fusní geny na DNA úrovni jsou velmi výhodným cílem PCR pro studium MRN. Na rozdíl od přestaveb *Ig/TCR* tyto geny přímo souvisí s procesem leukemogeneze a jsou stabilní v průběhu nemoci. Oproti transkriptům fusních genů jsou navíc stabilnější během detekce (VAN DER VELDEN *et al.* 2003). Detekce transkriptů je naopak technicky jednodušší, neboť obchází problém různých zlomových/fusních míst v intronech genů.

2.3.1.3.2 Detekce přestaveb *Ig/TCR*

Během maturace lymfocytů dochází k tvorbě unikátní nukleotidové sekvence v imunoglobulinových a *TCR* genech, která může být v následujících stádiích léčby využita k detekci přímo leukemických buněk pacienta (PUI 1999)

Metody využívající přestavby *Ig/TCR* jsou dnes daleko nejrozšířenějším postupem využívaným v klinických aplikacích u ALL.

2.3.1.3.3 Detekce aberantních či aberantně exprimovaných genů

Aberantním genem použitelným pro sledování MRN je např. *FLT3*. U některých pacientů dochází v tomto genu k duplikaci určitého úseku, popřípadě k inserci náhodných nukleotidů, čímž vzniká sekvence, specifická pro určitého pacienta, a využitelná pro stanovení hladiny MRN (NAKAO *et al.* 1996; VAN DER VELDEN *et al.* 2003). Dalším příkladem je gen *NPM1* (nucleophosmin). Mutace v tomto genu mohou být opět využity k identifikaci leukemických buněk (GORELLO *et al.* 2006).

K detekci residuální nemoci lze použít také geny, jejichž exprese je za fyziologického stavu místně i časově specifická a striktně regulovaná. V leukemických buňkách je tato regulace porušena a dochází zde k abnormální expresi těchto genů, čehož lze využít k MRN-PCR detekci. Mezi aberantně exprimované geny u AML patří např. *PRAME* (Preferentially expressed antigen in melanoma), *MSLN* (Mesothelin), *ST18* (Suppression of tumorigenicity 18) či gen *WT1* (STEINBACH *et al.* 2006).

2.3.1.4 Detekce MRN pomocí *WT1*

Kromě výše zmíněných molekulárních cílů PCR jsou i nadále hledány další potenciální markery pro studium MRN. Důvodem je fakt, že více než 50 % všech AML (a malá část ALL) nemůže být pomocí klasických metod detekce MRN monitorována (CILLONI a SAGLIO 2004). Pokud chceme zahrnout co nejvíce AML pacientů do studia MRN, je nutné identifikovat takový molekulární cíl, aplikovatelný na většinu případů. Gen *WT1* byl navržen jako jeden z těchto možných cílů (CILLONI a SAGLIO 2004), neboť bylo zjištěno, že u více než 90

% případů s AML a u 70 – 90 % ALL je jeho exprese výrazně zvýšena (BOUBLIKOVA *et al.* 2006).

Využití *WT1* jako universalního markeru pro studium MRN u akutních leukémií je nicméně spjata s určitými kontroverzními výsledky (BOUBLIKOVA *et al.* 2006); (CILLONI *et al.* 2002); (TRKA *et al.* 2002); (OGAWA *et al.* 2003); (KREUZER *et al.* 2001). Zatímco někteří poukazují na významnou korelaci mezi průběhem léčby pacientů s AML a hladinou *WT1* ((TRKA *et al.* 2002); (INOUE *et al.* 1996); (WEISSER *et al.* 2005)), jiní autoři žádnou souvislost nepotvrdili (SCHMID *et al.* 1997). V případě ALL je hladina exprese *WT1* obecně považována za mnohem méně vypovídající než u AML a *WT1* tedy pro tento typ leukémie nejspíše není vhodným markerem pro sledování MRN (BOUBLIKOVA *et al.* 2006; CILLONI *et al.* 2002). Práce naší laboratoře navíc dokazuje, že exprese *WT1* u velké části dětských pacientů s ALL je tak nízká, že neposkytuje dostatečný prostor pro sledování dynamiky MRN (BOUBLIKOVA *et al.* 2006).

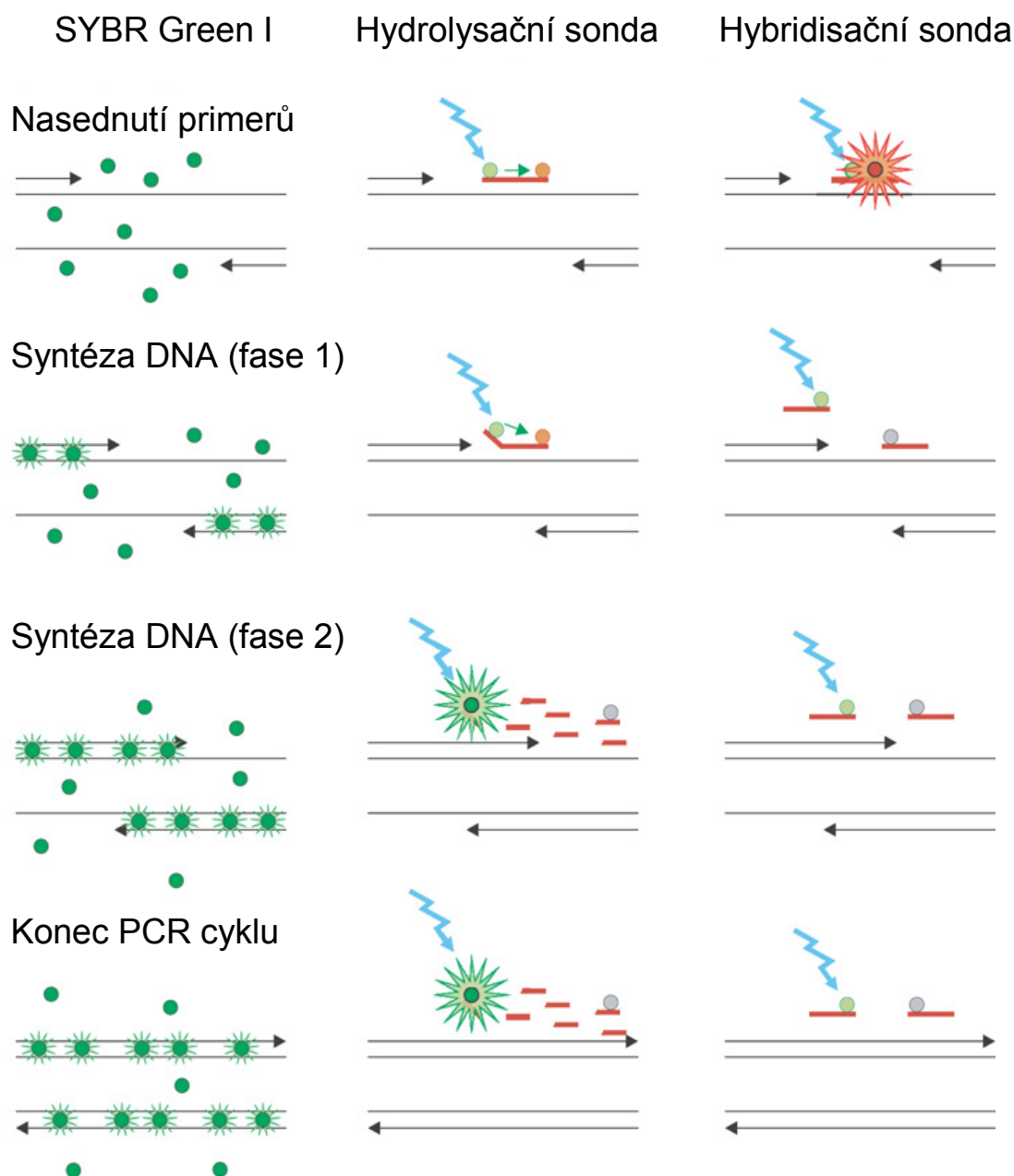
2.3.1.5 Real-time PCR

Pomocí RQ-PCR lze získat kvantitativní MRN data analýsou klonálních přestaveb *Ig/TCR*, fuzních zlomových míst chromosomových aberací, transkriptů fuzních genů, aberantních genů, nebo aberantně exprimovaných genů. Výběr těchto molekulárních cílů záleží na typu daného onemocnění (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).

Tato metoda dovoluje přesnou kvantifikaci PCR produktu, neboť k detekci fluorescence, emitované fluorescenčně značenou sondou, dochází v exponenciální fázi reakce, kdy jsou ještě všechny reakční komponenty v nadbytku (KALINOVA 2002). Vzhledem k tomu, že může probíhat detekce fluorescenčního signálu po každém PCR cyklu, mohou být vyhodnoceny i signály za krátký časový úsek a nejsou nutné žádné post-PCR manipulace s materiálem, díky čemuž došlo k výraznému snížení pravděpodobnosti kontaminace.

Sensitivita této metody je nejméně 10^{-3} , ale spíše 10^{-4} – 10^{-6} . V dnešní době jsou nejpoužívanější 3 hlavní techniky k detekci fluorescenčního signálu:

metoda využívající SYBR Green I, metoda využívající hydrolyzační sondy a třetí princip je založen na hybridizačních sondách (viz obr. 5) (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).



obr. 5. Detekční systémy Real-time PCR (VAN DER VELDEN *et al.* 2003)

Nejjednodušší technikou je první metoda, založená na detekci produktu PCR pomocí barvy SYBR green I, která se interkaluje do dsDNA, což výrazně zvýší fluorescenci této molekuly. Následujícími PCR cykly se množství dsDNA exponenciálně zvyšuje a tudíž množství SYBR green I signálu také exponenciálně roste. Intenzita tohoto signálu je nejvyšší na konci syntetické fáze a nejnižší (nebo žádná) na konci denaturační fáze. Nevýhodou metody je fakt, že se tato barva váže k DNA nespecificky a tudíž mohou být detekovány i nespecificky amplifikované sekvence a dimery primerů.

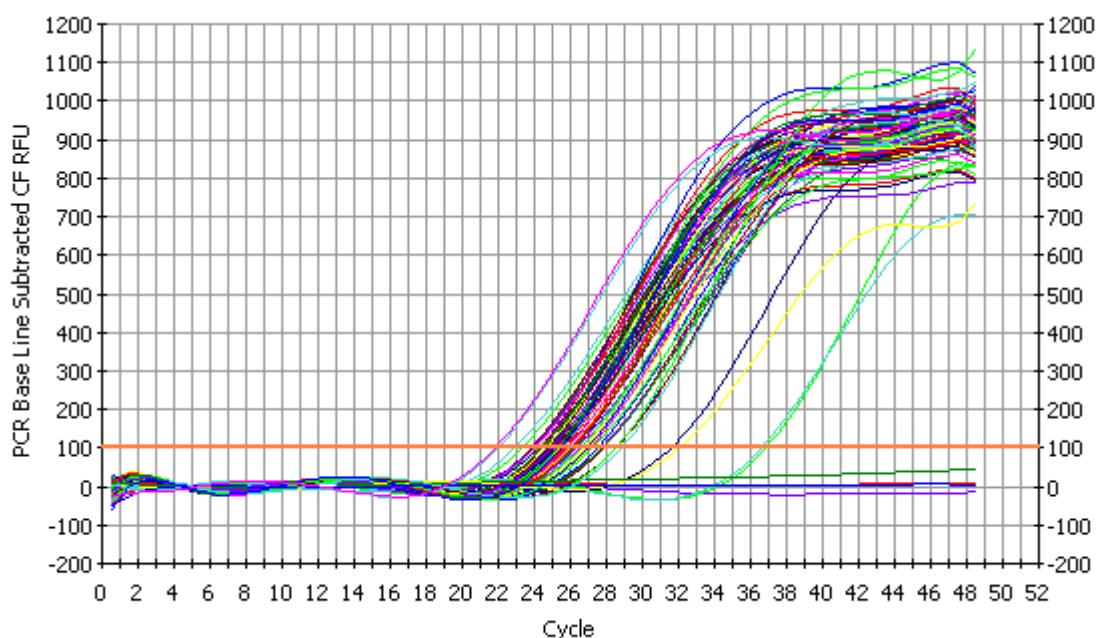
Druhá metoda využívá 5' → 3' exonukleasovou aktivitu Taq polymerasy ke specifické detekci a kvantifikaci PCR produktu. Hydrolyzační „TaqMan“ sonda je spojena s reporterským fluorochromem a také se zhášecem. Pokud jsou zhášec a fluorochrom v těsné blízkosti, sonda je neaktivní, protože světlo emitované fluorochromem je pohlcováno zhášecem. Během amplifikační fáze je však navázaná sonda z cílové sekvence hydrolysována, tím dojde k oddálení fluorochromu a zhášече a fluorochrom emituje detekovatelné záření. Fluorescence se tedy měří na konci fáze syntesy DNA a výhodou této metody je detekce pouze specifických produktů (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).

Metoda hybridizačních sond využívá dvou sousedících sekvencně specifických sond. Jedna sonda je značena donorovým fluorochromem na 3' konci, druhá akceptorovým fluorochromem na 5' konci. Obě sondy hybridizují k blízkce sousedícím cílovým sekvencím amplifikované DNA, čímž dochází k přiblížení fluorochromů a emisi záření o delší vlnové délce donorovým fluorochromem. To má za následek excitaci akceptorového fluorochromu a emisi jeho záření, které je detekováno během fáze nasedání primerů (VAN DER VELDEN *et al.* 2003).

Ve všech zmíněných způsobech RQ-PCR analýsy se množství signálu exponenciálně zvyšuje v exponenciální fázi PCR reakce. Na základě vyhodnocení nárůstu fluorescence software RQ-PCR analýsy sestavuje amplifikační křivky jednotlivých reakcí. V části amplifikačních křivek (viz obr. 6), kdy intenzita záření odpovídá pouze basalní fluorescenci, je prokládána přímka, která se nazývá „threshold“. Číslo cyklu, odpovídající průsečíku přímky threshold a amplifikační křivky, ukazuje hodnotu C_T (threshold cycle). Tato hodnota odpovídá počtu cyklů, ve kterém došlo k signifikantně významnému nárůstu fluorescence v dané reakci a má zásadní význam pro výpočet kvantity.

Při kvantifikaci jsou amplifikované testované vzorky porovnávány se standardní křivkou sestavenou na základě amplifikace DNA o známém počtu kopií sledovaného genu. Z této křivky pak můžeme odečíst podle CT hodnoty jednotlivých vzorků původní počet kopií amplifikované sekvence (viz obr. 7) (VAN DER VELDEN *et al.* 2003; VAN DONGEN *et al.* 1998)

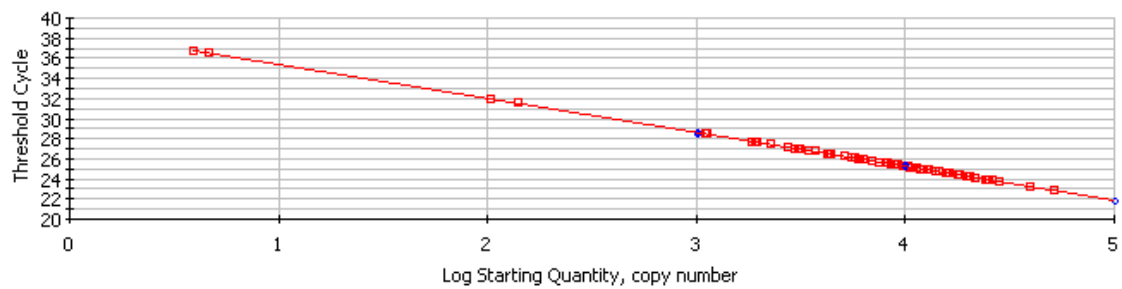
Expresi specifického molekulárního markeru nádorových buněk je normalisována k expresi kontrolního genu (housekeeping gene), která umožňuje porovnání jednotlivých odběrů v průběhu léčby mezi sebou. Normalisace minimalisuje variabilitu, způsobenou rozdílnou kvalitou a kvantitou biologického materiálu, isolačními metodami, stupněm degradace nukleových kyselin, případně rozdílnou účinností transkripce a odhaluje přítomnost inhibitorů polymerasy. Genů, které byly navrženy do posice kontrolního genu, je celá řada. Při sledování vývoje leukémií pomocí RQ-PCR jsou doporučovány jako referenční geny *ABL* (Abelson gene), *B2M* (beta-2-microglobulin) nebo *GUS* (beta-glucuronidase) (BEILLARD *et al.* 2003).



obr. 6. Amplifikační křivky real-time PCR (Měření hladiny exprese genu *WT1* ve vzorcích KD AML pacientů)

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.380 Intercept: 38.811 $Y = -3.380 X + 38.811$
PCR Efficiency: 97.7 %

□ Unknowns
○ Standards



obr. 7. Standardní křivka real-time PCR (Měření hladiny exprese genu *WT1* ve vzorcích KD AML pacientů)

3 MATERIÁL A METODY

3.1 ANALYZOVANÝ MATERIÁL

Součástí diagnostického vyšetření pacienta je odběr vzorku kostní dřeně (tzv. aspirace KD). Aspirát je odebírán buď z lopaty kosti kyčelní, nebo z hrudní kosti (tzv. sternální punkce). Dřeňová krev je poté co nejdříve dopravena do laboratoře, kde je dále zpracována.

Do své diplomové práce jsem zahrnula 66 takto odebraných diagnostických vzorků kostních dření pacientů s AML.

Dalším analyzovaným materiálem byly vzorky periferní krve 5 dárců, které byly v 5 různých časových bodech zpracovány pro ověření stability *WT1* transkriptu během časového úseku mezi odběrem krve a jejím zpracováním.

Kromě patientských vzorků jsem pracovala také se dvěma buněčnými leukemickými liniemi a to konkrétně REH a KASUM-1. REH je buněčná linie odvozená od leukemického klonu pacienta s *TEL/AML1* pozitivní BCP-ALL. KASUMI-1 je buněčná linie odvozená od leukemické populace pacienta s *AML1/ETO* pozitivní AML M2 subtypu.

3.1.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ

Celkově jsme analyzovali vzorky 66 dětských pacientů s nově diagnostikovanou AML. Osmnáct těchto pacientů (27,3 %) bylo léčeno současným léčebným protokolem AML-BFM 2004, 43 dětí (65,2 %) protokolem AML-BFM 98, 4 pacienti (6,1 %) absolvovali léčbu podle AML-BFM 93 a 1 dítě (1,5 %) zemřelo před zahájením léčby.

34 děvčat (51,5 %) a 32 chlapců (48,5 %) s mediánem věku v době diagnózy 12,4 let (0,6 – 18,8 let) bylo podle stratifikačních kritérií rozděleno do 2 rizikových skupin. Stratifikační kritéria jsou shrnuta v tabulce 2. Třicet dvě děti (48,5 %) splnily kritéria pro skupinu se standardním rizikem a 34 pacientů (51,5 %) bylo zařazeno do vysokého rizika. Zastoupení obou pohlaví v jednotlivých rizikových skupinách bylo téměř vyrovnané.

Výskyt jednotlivých FAB subtypů v celém souboru včetně jejich procentuálního zastoupení je uvedeno v tabulce 3.

Molekulárně genetickým vyšetřením byly těmto pacientům detekovány specifické fusní geny, konkrétně *AML1/ETO* (9), *PML/RARa* (13), *CBF/MYH11* (5) a fuse zahrnující gen *MLL* (12). Negativní výsledek měly 24 dětí, u 3 pacientů nebyly tyto údaje k dispozici.

Průběh léčby analysovaných pacientů byl následující. 58 dětí dosáhlo hematologické remise (87,9%). Ze zbylých 8 dětí, 6 (9,1 %) zemřelo v indukci na komplikace léčby, 1 pacientka (1,5 %) zemřela před zahájením terapie a 1 chlapec (1,5 %) nedosáhl remise nikdy a po 7 měsících zemřel na progresi leukémie.

Medián doby sledování celého souboru byl 4,7 let (0,6 – 9,2 let). Během této doby 21 dětí (36,2 %) prodělalo relaps. 16 těchto relapsů bylo dřevných, 2 kombinované a u 2 pacientů se objevila sekundární malignita (ALL, MDS). Šest dětí následně zrelabovalo podruhé, ve všech případech se jednalo o dřevné relapsy.

Z 66 diagnostikovaných pacientů 22 dětí zemřelo (33,3 %). Ve 3 případech se jednalo o smrt v remisi, 6 dětí zemřelo v indukci, 1 před léčbou a 12 pacientů zemřelo následkem progresu leukémie.

Souhrnná charakteristika celého souboru je uvedena v tabulce 4.

Rizikové skupiny	Kriteria
SR	FAB M1, M2 + Auerovy tyče FAB M4eo + ≤ 5 % blastů ve dřeni d15 AML + Downův syndrom ¹ FAB M3 t(8;21), t(15;17), inv(16) ^{1,2}
HR	ostatní + SR s ≥ 5 % blastů ve dřeni d15

¹AML-BFM 2004, ²AML-BFM 98

tabulka 2. Stratifikační kritéria léčebných protokolů AML (CREUTZIG 1996; KASPERS a ZWAAN 2007)

FAB	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
počet	2	10	18	13	14	7	0	2
%	3,0	15,2	27,3	19,7	21,2	10,6	0,0	3,0

tabulka 3. Zastoupení AML subtypů v souboru analysovaných pacientů

Č.	P	věk (roky)	FAB	dřeň d15	Molekulární genetik	RS	Relaps	Úmrtí	Doba sledování (měs.)
1	M	2,8	M1	no data	negat.	HR	+	+	109,6
2	M	8,1	M5	no data	MLL/AF9	HR		+	108,3
3	Ž	9,6	M0	< 5%	AML1/ETO	SR			112,1
4	Ž	14,5	M0	no data	no data	HR	+	+	111,0
5	Ž	1,8	M1	< 5%	negat.	HR	+		99,4
6	M	3,0	M2	> 5%	negat.	HR			98,9
7	Ž	2,9	M2	< 5%	negat.	HR	+	+	98,8
8	M	1,7	M4	no data	MLL/AF9	HR			96,5
9	M	0,9	M7	> 5%	negat.	SR			80,2
10	M	12,4	M5	> 5%	MLL/AF9	HR			89,0
11	Ž	14,2	M4	< 5%	negat.	HR			89,0
12	M	15,4	M2	< 5%	negat.	HR	+	+	88,5
13	Ž	11,8	M4	< 5%	CBFb/MYH11	SR			87,6
14	M	9,0	M2	< 5%	no data	HR	+	+	86,9
15	M	16,6	M2	< 5%	negat.	HR	+		84,1
16	Ž	17,4	M3	smrt před d15	PML/RARa	SR		+	83,7
17	Ž	13,7	M1	> 5%	negat.	HR	+	+	83,5
18	M	1,5	M5	< 5%	MLL/AF9	HR			82,3
19	M	14,2	M4	smrt před d15	negat.	HR		+	81,9
20	Ž	15,5	M4	< 5%	MLL/AF6	HR		+	81,5
21	Ž	17,2	M2	< 5%	negat.	HR			81,3
22	M	12,4	M4	> 5%	MLL/AF10	HR	+	+	77,8
23	M	1,7	M2	> 5%	negat.	HR		+	74,7
24	Ž	1,5	M1	< 5%	negat.	HR		+	74,1
25	M	3,9	M5	< 5%	MLL/AF9	HR	+		71,3
26	Ž	12,9	M4	< 5%	CBFb/MYH11	SR			69,8
27	Ž	7,0	M3	< 5%	PML/RARa	SR			67,3
28	Ž	16,8	M1	> 5%	negat.	HR	+	+	66,6
29	Ž	11,9	M3	> 5%	PML/RARa	SR	+		63,3
30	Ž	1,1	M1	< 5%	negat.	HR	+	+	61,7
31	Ž	13,7	M3	< 5%	PML/RARa	SR			60,2
32	M	8,7	M3	< 5%	PML/RARa	SR			59,0
33	Ž	14,5	M4	< 5%	negat.	SR			58,7
34	M	15,0	M2	< 5%	CBFb/MYH11	SR	+		56,8
35	Ž	16,5	M1	< 5%	negat.	HR		+	56,4
36	M	14,6	M2	< 5%	AML1/ETO	SR			50,6
37	Ž	15,1	M3	< 5%	PML/RARa	SR	+		48,6
38	Ž	14,0	M2	< 5%	AML1/ETO	SR	+		47,2
39	M	8,1	M1	> 5%	MLL/AF6	HR	+		46,3
40	M	5,4	M4	> 5%	CBFb/MYH11	HR			46,3
41	Ž	11,2	M4	< 5%	MLL/ELL	HR			45,2
42	Ž	16,8	M1	< 5%	AML1/ETO	SR			43,7
43	M	10,6	M2	< 5%	AML1/ETO	SR			41,2
44	M	7,3	M3	< 5%	PML/RARa	SR		+	39,7
45	Ž	14,2	M2	< 5%	AML1/ETO	SR	+	+	39,4
46	M	12,2	M3	smrt před d15	PML/RARa	SR		+	39,1
47	M	15,7	M2	< 5%	AML1/ETO	SR			37,2

Č.	P	věk (roky)	FAB	dřeň d15	Molekulární genetika	RS	Relaps	Úmrtí	Doba sledování (měs.)
49	M	9,8	M5	smrt před d15	MLL/UGP2/AF10	HR		+	33,4
50	M	13,0	M1	> 5%	negat.	HR			32,2
51	Ž	1,7	M5	< 5%	MLL/AF9	HR			31,6
52	M	18,5	M2	< 5%	negat.	SR	+		30,7
53	Ž	9,4	M3	smrt před d15	PML/RARa	SR		+	30,3
54	M	18,4	M2	< 5%	negat.	SR			28,9
55	Ž	7,0	M2	< 5%	AML1/ETO	SR	+		25,3
56	M	16,9	M3	> 5%	PML/RARa	SR			24,6
57	M	0,6	M7	< 5%	negat.	HR			23,9
58	Ž	14,8	M4	< 5%	negat.	HR			21,5
59	Ž	14,8	M3	< 5%	PML/RARa	SR			20,6
60	Ž	17,3	M4	< 5%	CBFb/MYH11	SR			20,1
61	Ž	18,8	M2	< 5%	negat.	SR			14,5
62	M	5,3	M3	< 5%	PML/RARa	SR			14,3
63	Ž	17,7	M3	> 5%	PML/RARa	SR			11,8
64	Ž	14,1	M2	< 5%	AML1/ETO	SR			11,5
65	Ž	1,4	M5	< 5%	MLL/AF9	HR	+	+	10,2
66	M	13,1	M4	< 5%	no data	SR			7,2

tabulka 4. Charakteristika analysovaných pacientů

RS – Risiková skupina

P – pohlaví

Č – číslo pacienta

M – muž

Ž – žena

SR – standardní riziko

HR – vysoké riziko

3.1.2 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POUŽITÝ SOFTWARE

Ke zpracování vzorků a stanovení hladiny exprese genu *WT1* byly použity tyto přístroje a software:

Centrifugy:

Heraeus Multifuge 3 S-R (DJB Labcare, Velká Británie)
Hettich Universal 16 R (Global Medical Instrumentation, USA)

Minicentrifugy:

Labnet-Spectrafuge Mini (Sigma-Aldrich, USA)
Eppendorf Mini Spin (Eppendorf, Německo)

Vortex:

Yellow line TTS 2 (IKA, Německo)

Termobloky:

Labnet – AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc., Velká Británie)

Kultivační CO₂ box:

HERAcell 150 CO₂ (Heraeus, Velká Británie)

Bürkerova komůrka (Meopta, ČR)

IqCycler (Bio-rad, USA)

IqCycler software (Bio-rad, USA)

Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA)

Prism 4 (GraphPad Software, USA)

SPSS 12.0.1 (SPSS, USA)

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)

2100 expert software (Agilent Technologies, USA)

3.1.3 POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE

Isolace mononukleárních buněk:

PBS pufr (lékárna FN Motol, ČR):

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 12H₂O

FICOLL- Plaque™ plus (Amersham Bio-sciences AB, Velká Británie)

10x Lysační roztok (lékárna FN Motol, ČR):

1,55 M NH₄Cl, 0,1 M NH₄HCO₃, 1mM Na₂EDTA pH 8.0 (před
použitím 10x naředit)

Trypanová modř 0,4% (Sigma-Aldrich, USA)

Isolace RNA:

ITG – guanidium isothiocyanát (Serva, Německo)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

2M Acetát sodný, pH 4.0 (Lékárna FN Motol)

Phenol 99+% (Sigma-Aldrich, USA)

Phenol solution (Sigma-Aldrich, USA)

Chloroform-isoamylalkohol (98 % chloroformu + 2% isoamylalkoholu)
(Merck, ČR)

Isopropanol (Merck, ČR)

75% ethanol (Merck, ČR)

Reversní transkripce:

5x buffer (Gibco, USA)

0,1 Dithiotreitol DTT (Gibco, USA)

250 µM Hexamery (Roche, Švýcarsko)

10 mM dNTPs (Promega, USA)

200 U/µl M-MLV reversní transkriptasa (Gibco, USA)

Reversní transkripce pomocí iScript™ cDNA synthesis Kit (Bio-Rad):

5x iScript reaction mix (Bio-Rad, USA)

iScript reverse transcriptase (Bio-Rad, USA)

Nuclease free water (Bio-Rad, USA)

Kontrola kvality RNA kapilární elektroforesou- Agilent- RNA 6000 Nano Essay kit:

RNA 6000 nano gel matrix (Agilent Technologies, USA)

RNA 6000 nano dye koncentrát (Agilent Technologies, USA)

RNA 6000 nano marker (Agilent Technologies, USA)

Kvantitativní real-time PCR:

Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)

ABL FusionQuant Standards (Ipsogen, USA)

WT1 FusionQuant Standards (Ipsogen, USA)

Sekvence primerů a sondy:

Název:	Sekvence:
WT1-Fwd (EX6)	TACACACGCACGGTGTCTTCA(21b) (TIB MOLBIOL, Německo)
WT1-Rvs (EX7)	CTCAGATGCCGACCGTACAAG(21b) (TIB MOLBIOL, Německo)
WT1-sonda (EX6/7)	6FAM-AGGCATTCAGGATGTGCGACGTGTG-TAMRA (25b) (TIB MOLBIOL, Německo)
ABL-Fwd ENF1003	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT(31b) (TIB MOLBIOL, Německo)
ABL-Rvs ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA (21b) (TIB MOLBIOL, Německo)
ABL-Probe ENPr1043	6FAM-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT- TAMRA (28b) (TIB MOLBIOL, Německo)

Pěstování leukemických linií

PBS

RPML 1640 médium (Gibco, USA)

Bovinní sérum (Merck, ČR)

3.1.4 POUŽITÉ METODY

Zpracování vzorků kostních dření či alikvot buněk dané leukemické linie zahrnuje tyto metody:

3.1.4.1 Isolace mononukleárních buněk osmotickou lysou

- 1) Vzorek 5x naředíme vychlazeným 1x konc. lysačním roztokem.
- 2) Necháme vzorky lysovat v ledové lázni 30-40 minut za občasného protřepání až do „vyčeření“ vzorku – tj. do změny barvy na světle červenou
- 3) Centrifugujeme 20 min - 2200 ot./min (800 g), 4° C a slijeme supernatant do výlevky.
- 4) Resuspendujeme v 5 ml 1x konc. lysačního roztoku.
- 5) Centrifugujeme 10 min – 2200 ot/min (800 g), 4 °C, opět slijeme supernatant stejným způsobem.
- 6) Resuspendujeme v 5 ml sterilního PBS.
- 7) Centrifugujeme 10 min – 2200 ot/min (800 g), 4 °C, opět slijeme supernatant
- 8) Resuspendujeme v 2 ml PBS. Počítáme v Bürkerově komůrce (ředění 10 μ l buněčné suspence + 190 μ l Trypanové modře) alespoň 10 čtverců. Průměrný počet buněk v jednom čverci x 10 = množství buněk (v milionech) v oněch 2 ml PBS.
- 9) Do sterilních mikrozkuavek (1,5 ml) oddělíme aliquoty buněčné suspence po 10 milionech buněk.
- 10) Mikrozkuavky s buněčnou suspensí centrifugujeme 10 min – 2200 ot/min (800 g), 4 °C, a slijeme supernatant. Osušíme do sterilních filtračních papírků.
- 11) Pelety buněk skladujeme v -80 °C.

3.1.4.2 Isolace mononukleárních buněk pomocí hustotního gradientu - Ficoll paque

- 1) Centrifugu předchladíme na 4 °C.

- 2) Do PBS pufru naředíme krev/kostní dřeň v poměru 1:1 v 50 ml zkumavce.
- 3) Připravíme si i 14 ml zkumavky, do kterých převrstvíme 4ml Ficollu 4 ml krve (poměr 1:1). Převrstvujeme pomalu špičkou s filtrem po 1 ml tak abychom krev s ficollem nesmíchali.
- 4) Zkumavky dáme točit na 30-40 minut při 4 °C a 2200 ot/min (800g)
- 5) Po stočení došlo k rozdělení na frakci krvinek (erytrocyty + granulocyty), dále Ficoll, pak prstenec mononukleárních buněk a nakonec máme plasmu.
- 6) Odebereme prstenec buněk, který se nám vytvořil po centrifugaci do 5 ml pufru PBS. Pokud budou buňky s příměsí erytrocytů resuspendujeme buňky v 5 ml 1x lysačního roztoku.
- 7) Stočíme 10 minut při 4 °C a 2200 ot/min (800 g).
- 8) Po stočení slijeme PBS a resuspendujeme buňky ve 2 ml PBS. Počítáme v Bürkerově komůrce (ředění 10 µl buněčné suspence + 190 µl Türkova roztoku) alespoň 10 čtverců. Průměrný počet buněk v jednom čverci x 10 = množství buněk (v milionech) v oněch 2 ml PBS.
- 9) Buňky rozdělíme do 10 milionových aliquot a skladujeme v -80 °C.

3.1.4.3 Isolace RNA dle Chomczynski a Sacchi

- 1) Centrifugu vychladíme na 4 °C. Připravíme uložené buňky v -80 °C a přemístíme je do -20 °C. Buňky nesmí rozmrznout.
- 2) K zmrzlé peletě buněk přidáme 500 µl ITG+Mercaptoethanol, dostatečně zvortexujeme. (1 ml ITG + 7,2 µl Mercaptoethanolu).
- 3) Necháme inkubovat 10 minut na ledové lázni.
- 4) Přidáme 50 µl acetátu sodného – pH 4. Pokud je buněk méně než 1 milion, přidáme pouze 10 µl acetátu sodného.
- 5) Přidáme 455 µl phenolu rozehřátého v lázni (65 °C) nebo 455 µl Phenol solution a 130 µl chloroformisoamylalkoholu. Vortexujeme do mléčného zakalení. Pokud je buněk méně než 1 milion přidáme pouze 100 µl phenolu a 20 µl chloroformisoamylalkoholu.
- 6) Necháme inkubovat 2-3 minuty na ledové lázni.
- 7) Centrifugujeme 15 minut při 17000 – 20000 g a teplotě 4 °C.

- 8) Odebereme po 100 μ l opatrně vodnou fázi do sterilních mikrozkušavek a přidáme stejný díl, ideálně 500 μ l isopropanolu.
- 9) Inkubujeme 10 minut na ledové lázni.
- 10) Centrifugujeme 10 minut při 17000 – 20000 g a teplotě 4 °C.
- 11) Slijeme opatrně supernatant a osušíme zkumavky o sterilní filtrační papír.
- 12) Přidáme 1 ml 75% ethanolu a obrácením zkumavky odlepíme peletu od dna.
- 13) Stočíme 5 minut při 15000-17000 g a teplotě 4 °C.
- 14) Slijeme, osušíme o sterilní filtrační papír, stočíme na stolní centrifuze a odtáhneme zbytek alkoholu. Postupujeme opatrně, abychom si neodsáli peletku. Zkumavky necháme otevřené 10 – 15 minut, aby se odpařil zbytek alkoholu.
- 15) Rozpustíme peletu přidáním sterilní H₂O následujícím způsobem:
 - 10 M buněk – 50 μ l H₂O
 - 5-2 M buněk – 25 μ l H₂O
 - Méně než 2 M buněk – 12 μ l H₂O
- 16) Jemně promícháme a necháme rozpouštět 5 minut při 55 °C v suchém termobloku.
- 17) Vyisolovanou RNA skladujeme v -40 °C.

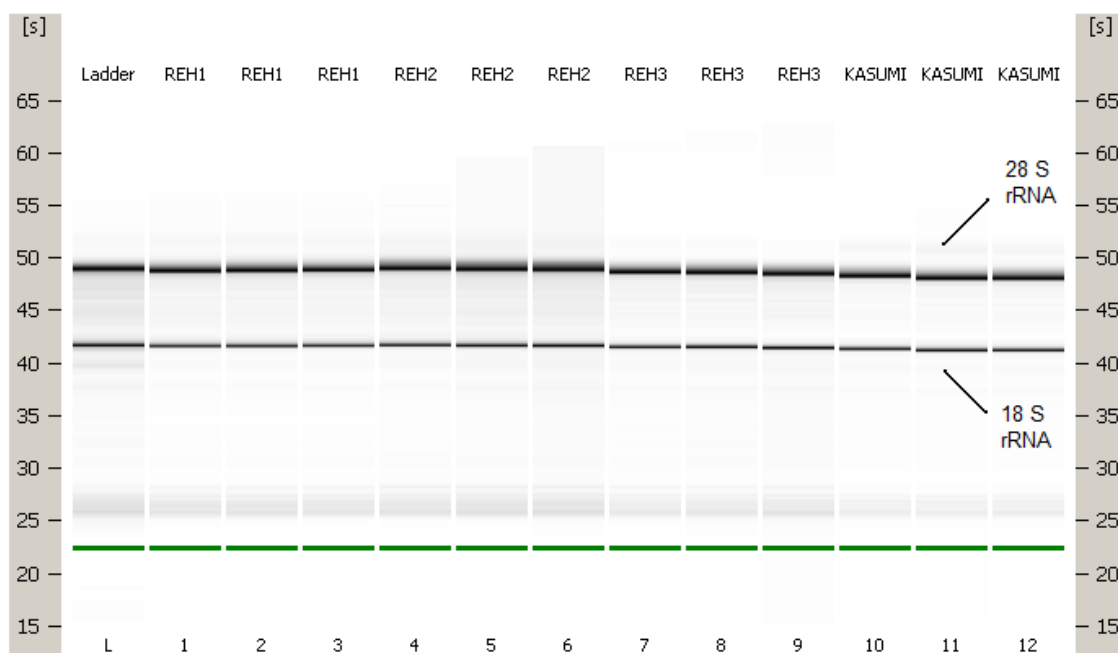
3.1.4.4 Kontrola kvality RNA kapilární elektroforezou - Agilent- RNA 6000 Nano Essay kit

- 1) Příprava gelu:
 - a) 6000 nano gel matrix a kolonu z kitu necháme vytemperovat cca 30 minut.
 - b) Dáme 550 μ l 6000 nano gel matrix na kolonku.
 - c) Stočíme 10 minut při 1500 g.
 - d) Vyhodíme filtr a gel rozalikvotujeme po 65 μ l do sterilních mikrozkušavek.

- 2) Příprava Gel-Dye mixu:
 - a) RNA 6000 nano koncentrát, RNA 6000 nano marker a 65 μ l aliquotu filtrovaného gelu necháme vytemperovat na pokojovou teplotu (cca 30 minut).
 - b) Zvortexujeme RNA 6000 Nano dye koncentrát 10 sekund a stočíme.
 - c) Přidáme 1 μ l RNA 6000 Nano dye koncentrátu do 65 aliquoty filtrovaného gelu.
 - d) Promícháme a zkontrolujeme, zda se barva promíchala.
 - e) Stočíme 10 minut při 13 000.

- 3) Příprava čipu:
 - a) Na priming station (součást kitu) našroubujeme 1 ml stříkačku, vložíme čistý čip a zkontrolujeme jeho těsnost.
 - b) Napipetujeme 9 μ l gel-dye mixu do pozice G.
 - c) Natáhneme stříkačku na 1 ml a zavřeme priming station. Pomalu stlačujeme stříkačku až pod stříbrný zobáček, který nám zafixuje píst stříkačky. Takto zajištěné necháme 30 sekund.
 - d) Uvolníme píst, který necháme vystoupat nahoru. Otevřeme priming station a napipetujeme 9 μ l gel-dye mixu do dvou pozic G.
 - e) Napipetujeme 5 μ l RNA Nano markeru do pozice žebříčku a do všech vzorkových pozic.
 - f) Napipetujeme 1 μ l žebříčku do pozice ladder. Před pipetováním žebříček zdenaturujeme 2 minuty při 70 °C.
 - g) Napipetujeme po 1 μ l vzorků do pozic 1 – 12.
 - h) Napipetovaný čip vložíme do vortexu a necháme třepat 1 minutu.
 - i) Spustíme 2100 expert a vybereme příslušný program. Čip vložíme do Agilentu, zavřeme víko, spustíme běh a nadefinujeme vzorky.

Po doběhnutí kapilární elektroforesy dostaneme výsledný obrázek, na kterém lze vidět u dobře vyisolované kvalitní RNA 2 výrazné pruhy odpovídající 28S a 18S RNA (viz obr. 8).



obr. 8. Kapilární elektroforesa RNA - Agilent

3.1.4.5 Reversní transkripce RNA do cDNA

1) Reversní transkripce pomocí M-MLV reversní transkriptasy:

- a) Vzorke vložíme do suchého bloku předehřátého na 70 °C a necháme 5 minut rozpouštět.
- b) Připravíme si mix na reversní transkripci:

Na jeden vzorek:

5x buffer	4,2 µl
DTT	2,1 µl
Hexamery	1,05 µl
dNTP	1.05 µl
M-MLV RTasa	1.05 µl

- c) K 9 µl mixu přidáme 11 µl zdenaturované a jemně zvortexované RNA. Vložíme do předehřátého termobloku na 37 °C a necháme třepat 1 hodinu při 300 ot./min.

2) Reversní transkripce pomocí kitu iScript:

- a) 5x iScript reaction Mix a „Nuclease free water“ necháme vytemperovat na pokojovou teplotu cca 30 minut.
- b) připravíme si mix pro reversní transkripci:

Na jeden vzorek:

5x iScript reaction Mix 4 μ l

iScript reverse Transcriptase 1 μ l

Nuclease free water 4 μ l

- c) K 9 μ l mixu přidáme 11 μ l RNA a poté inkubujeme:

5 minut při 25 °C

30 minut při 42 °C

5 minut při 85 °C

chladíme na 4 °C

3.1.4.6 Kvalitativní detekce *WT1* pomocí metody real-time PCR

K detekci celkové hladiny exprese genu *WT1* jsem použila metodu real-time PCR. Detailnějšímu popisu této techniky je věnována část teoretického úvodu.

RQ-RT-PCR detekce genu *WT1* podle protokolů EAC (Europe Against Cancer):

U všech vzorků jsme stanovovali expresi *WT1* v triplikátu a expresi kontrolního genu v duplikátu. Jako negativní kontrolu jsme v obou případech použili H₂O (v obou případech v triplikátu). Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí *WT1* a ABL standardů o níže uvedených koncentracích:

ABL:	C1-C3	10 ³ - 10 ⁵ kopií
WT1:	C1- C6	10 ¹ - 10 ⁶ kopií

Reakční směs:

cDNA	5 µl
Fwd-primer (15 µM; 15 pmol/µl)	0,5 µl (300 nM)
Rvs-primer (15 µM; 15 pmol/µl)	0,5 µl (300 nM)
Sonda (5 µM; 5 pmol/µl)	1 µl (200 nM)
2X TaqMan Universal Master Mix	12,5 µl
sdH ₂ O	5,5 µl
<hr/>	
Celkem	25 µl

Reakční režim:

1 cyklus:	95 °C	10 min
35 cyklů:		
	94 °C	30 sec
	65 °C	1 min
	72 °C	1 min
	16 °C	∞

3.1.4.7 Pěstování buněčných kultur

Zmíněné buněčné linie KASUMI-1 a REH byly pěstovány za těchto podmínek:

KASUMI-1:

Médium: 80% RPMI 1640 + 20% FBS

37 °C, 5% CO₂

Tyto buňky rostou v charakteristických chomáčcích, kulturu pasážujeme zhruba po 3 dnech (nové médium + sérum) a udržujeme optimální hustotu ($0,5 \times 10^6$ buněk/ml).

REH:

Médium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS

37 °C, 5% CO₂

Pěstování těchto buněk je obtížnější, proto kulturu udržujeme ve vysoké hustotě ($> 2 \times 10^6$ buněk/ml). Podle kvality media a hustotě buněk opět kulturu po určitém čase pasážujeme (nové médium + sérum).

Pokud chceme sklídit buňky a připravit si alikvoty na izolaci nukleových kyselin, musíme s buněčnou kulturou pracovat opatrně a zkumavky s jejich suspenzí centrifugovat při nízké rychlosti. Po stočení buňky nesuspendujeme v malém množství media a rozdělíme do příslušných aliqot, které pak následně zpracujeme stejně jako vzorky mononukleárních buněk pacientů. (viz kapitola 3.1.4.3)

3.1.4.8 Statistické zpracování výsledků

Standardní křivka real-time PCR byla sestavena na základě C_t komerčně dostupných kalibrátorů s definovanými počty kopií genu *WT1* respektive kontrolního genu *ABL*. Pomocí této standardní křivky a C_t hodnot jednotlivých vzorků byl spočítán počet kopií genu *WT1* a *ABL*:

Rovnice standardní křivky real-time PCR:

$$y = mx + b$$

kde

y – průměrná C_t hodnota konkrétního vzorku

m – hodnota vyjadřující směrnici st. křivky – tzv. „slope“

b – posun průsečíku křivky vzhledem k ose y

x – log počtu kopií genu

Z hodnoty x jsme následně spočítali skutečný počet kopií genu *WT1* (10^x) a tento počet byl poté normalisován vydělením hodnotou vyjadřující počet kopií kontrolního genu *ABL*. Tyto tzv. NCN hodnoty („normalised copy numer“) jsou následně pro lepší interpretaci násobeny 10^4 .

Hladiny exprese *WT1* v jednotlivých skupinách byly porovnány pomocí „Mann-Whitney non-parametric U test“ a „Kruskall-Willis non-parametric test“ softwaru Prism 4.

Důležitým pojmem, který se používá pro vyjádření úspěšnosti léčby, je tzv. Overall Survival (OS) a Event Free Survival (EFS) či relapse free survival (RFS) souhrnně označované jako křivky přežití (life tables). OS je definován jako podíl (v %) všech žijících pacientů v daném časovém období od diagnózy, EFS jako také podíl (%) žijících pacientů, ale pouze těch, kteří setrvávají v kompletní remisi. RFS je analogické event free survival, z celkového počtu pacientů však eliminuje úmrtí v remisi. EFS a OS a RFS byly vytvořeny pomocí Kaplan-Maierových křivek přežití softwaru SPSS.

4 VÝSLEDKY

4.1 OPTIMALISACE METODY RQ-PCR

Vyvinuli jsme a optimalisovali metodu real-time PCR pro absolutní kvantifikaci množství celkového *WT1*. Detekční systém založený na principu hydrolysační sondy byl navržen podle protokolu EAC (Europe Against Cancer). Primery asociovaly s templátovou DNA v oblasti exonu 6 respektive 7, 6FAM a TAMRA značená fluorescenční sonda detekovala exon-exonový přechod (6/7). Primery a fluorescenční sonda detekující kontrolní gen *ABL* byly navrženy také podle protokolu EAC (GABERT *et al.* 2003).

Teplotní schéma a časové intervaly jednotlivých kroků každého cyklu jsou uvedeny v kapitole 3.1.4.6.

Prahová přímka protínající výsledné amplifikační křivky v exponenciální fazi reakce byla ve všech případech ustavena na hodnotu 100. Cykly PCR, ve kterých software přístroje měří basální fluorescenci, byly stanoveny na rozmezí 5. – 15. cyklu reakce.

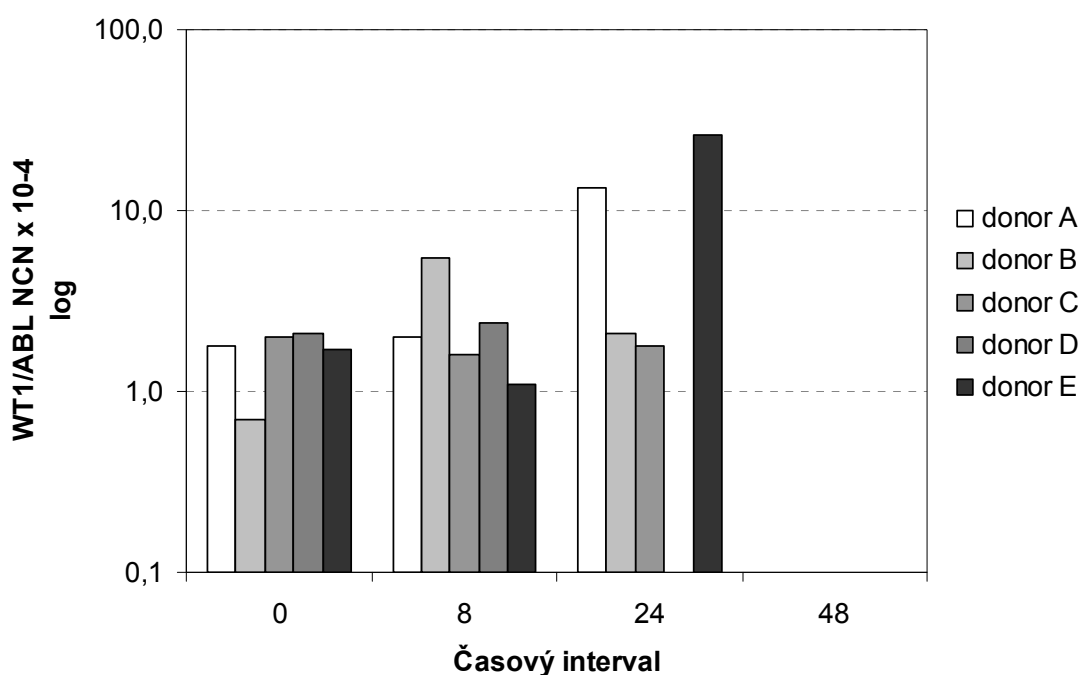
Standardní křivka RQ-PCR reakce byla sestavena na základě hodnot C_T komerčně dostupných kalibrátorů s definovaným počtem kopií genu *ABL* respektive *WT1*. Směrnice standardní křivky se pohybovala v rozmezí (-3,601) – (-3,291). Korelační koeficient dosahoval hodnot 0,989 – 0,999.

Specifita RQ-PCR byla stanovena pomocí triplikátu negativních kontrol H_2O v každé reakci PCR.

Optimalisaci tohoto systému jsme provedli na vzorcích cDNA leukemických buněčných linií Kasumi-1 a REH, které exprimují vysokou hladinu *WT1*.

4.2 STABILITA TRANSKRIPTU *WT1*

Stabilita transkriptu *WT1* byla ověřena analýsou kontrolních vzorků periferní krve zdravých dárců. Ve většině případů jsme byli schopni detekovat expresi *WT1* v těchto vzorcích až do časového intervalu 24 hodin od odběru krve (viz obr. 9).



obr. 9. Stabilita transkriptu *WT1* během časového intervalu mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním

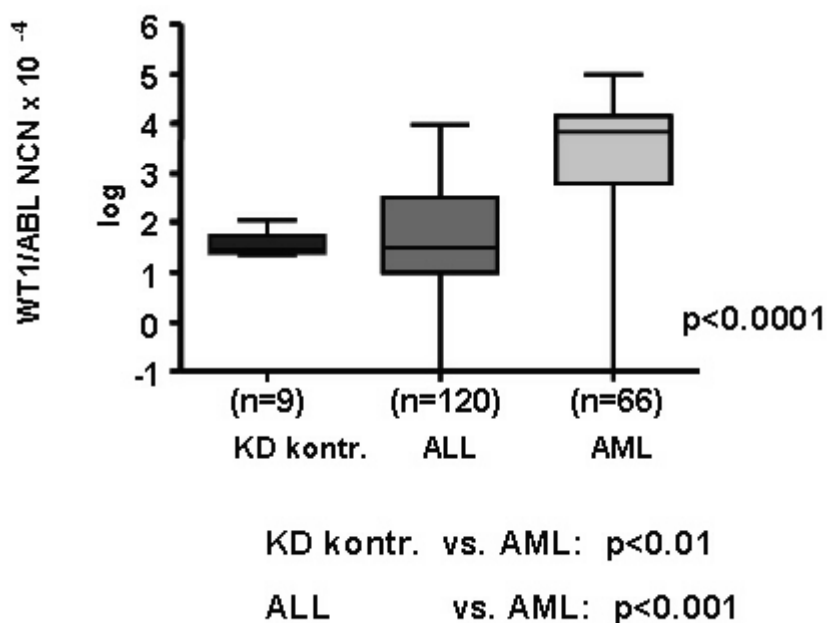
4.3 EXPRESE WT1 U PACIENTŮ S AML

4.3.1 Exprese WT1 u AML vs ALL a kontrolní KD

Celkem jsme analysovali 66 pacientů s primární diagnosou AML. Exprese byla detekována v 64 vzorcích (97%). Medián celého souboru pacientů byl $6638 \text{ NCN} \times 10^{-4}$ a naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí 6 řádů ($0 - 100428 \text{ NCN} \times 10^{-4}$).

Medián AML pacientů byl signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolními vzorky zdravých dárců (median $29 \text{ NCN} \times 10^{-4}$, $22-115 \text{ NCN} \times 10^{-4}$) a také v porovnání se vzorky pacientů s ALL (viz obr. 10).

Výsledky detekce exprese WT1 u zdravých kontrolních dřeví a pacientů s ALL byly použity se souhlasem MUDr. Ludmily Boublíkové (BOUBLIKOVA *et al.* 2006). Exprese byla detekována stejným systémem primerů a sondy pro real-time PCR (viz kapitola 3.1.4.6).

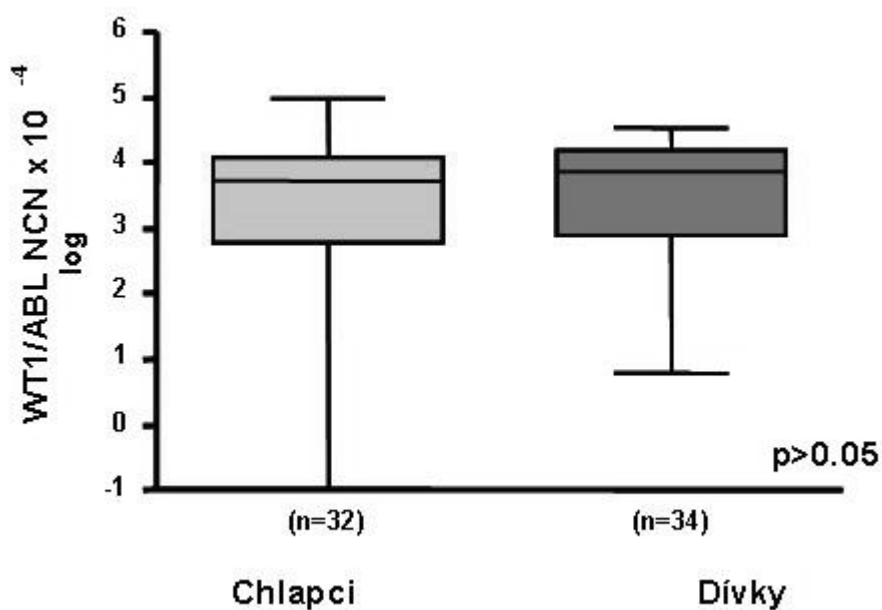


obr. 10. Srovnání hladin exprese WT1 u celkového souboru AML, ALL a kontrolních vzorků KD zdravých dárců

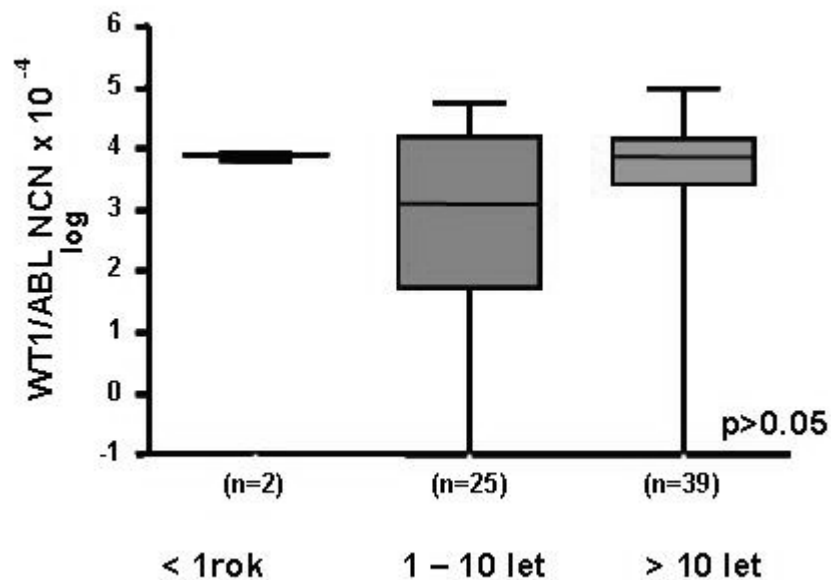
4.3.2 Exprese *WT1* vs pohlaví a věk

Hladiny *WT1* naměřené u AML pacientů nevykazovaly statisticky významné rozdíly mezi chlapci a děvčaty. Mediány obou těchto souborů byly téměř shodné ($6638 \text{ NCN} \times 10^{-4}$ – chlapci a $6825 \text{ NCN} \times 10^{-4}$ děvčata) (viz obr. 11).

Rozdělením pacientů do věkových kategorií „< 1 rok“, „1 – 10 let“ a „> 10 let“ jsme zjišťovali souvislost hladiny exprese *WT1* s věkem v době diagnózy. Statisticky významné rozdíly mezi těmito skupinami jsme neprokázali (viz obr. 12).



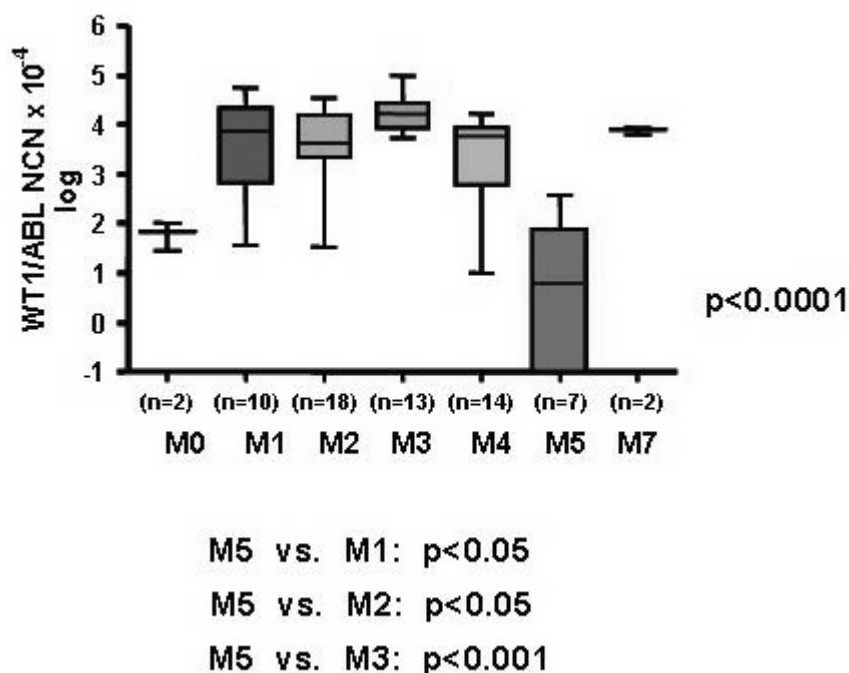
obr. 11. Srovnání hladin exprese *WT1* u chlapců a děvčat



obr. 12. Expresie *WT1* ve věkových skupinách

4.3.3 Expresie *WT1* a FAB klasifikace

Nejvyšší hladinu exprese *WT1* jsme našli u FAB M3 subtypu (medián 16457 NCN x 10⁻⁴, 5435 – 100428 NCN x 10⁻⁴), jenž byl z hlediska rozptylu naměřených hodnot nejhomogennější skupinou. Nejnižší expresi jsme našli u AML M5 (medián 6 NCN x 10⁻⁴, 0 – 368 NCN x 10⁻⁴). Tato skupina se signifikantně lišila jednak od M3, ale také od M2 a M1 subtypu (viz obr. 13).



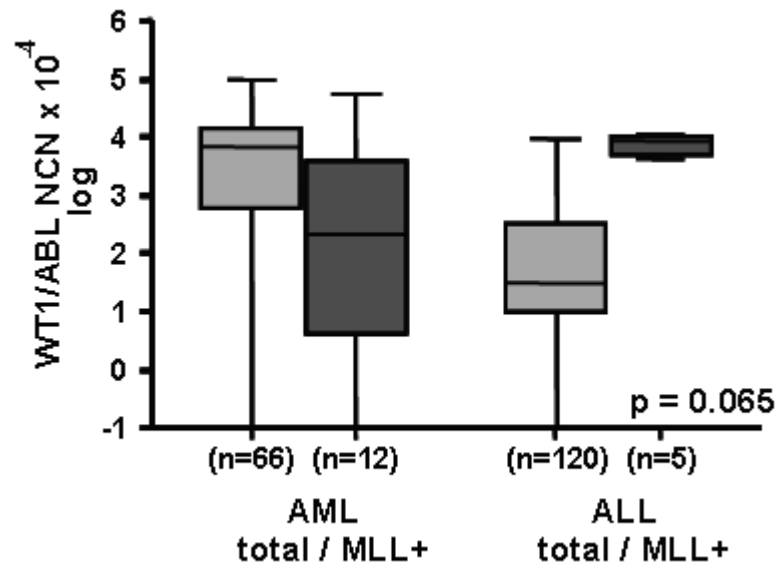
Obr. 13. Srovnání hladin exprese *WT1* u jednotlivých FAB subtypů

4.3.4 Exprese *WT1* a genetické abnormality

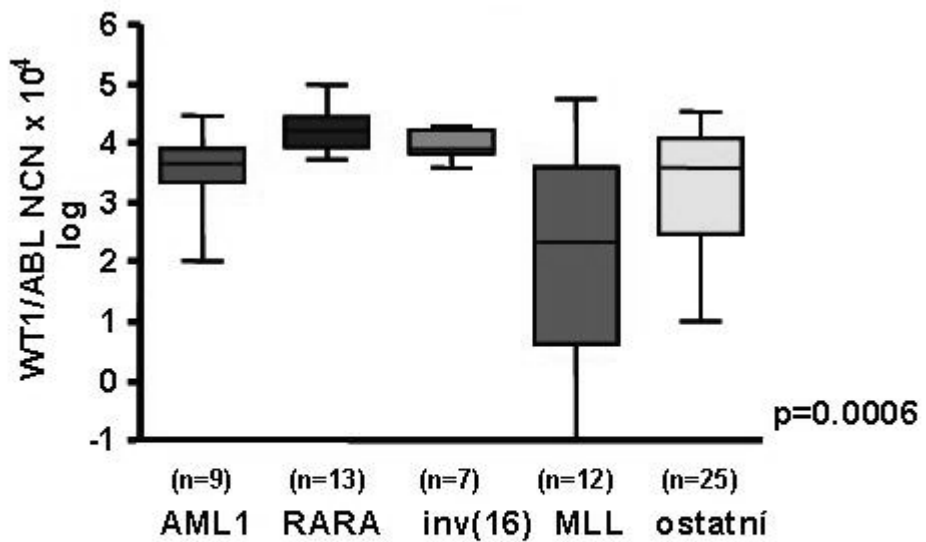
Nejvyšší hladina *WT1* byla nalezena u pacientů, kterým byl detekován fusní gen *PML/RARα* (medián $NCN \times 10^{-4}$, 5435 – 100428 $NCN \times 10^{-4}$). Tato hodnota se signifikantně lišila od všech ostatních skupin. Nejnižší hladiny jsme naměřili u pacientů, v jejichž leukemických blastech byly nalezeny translokace postihující gen *MLL*. V této skupině je také patrný výrazný rozptyl detekovaných hladin.

Obr. 14 ukazuje srovnání exprese *WT1* u pacientů s *MLL* translokacemi v souvislosti se subtypem akutní leukémie. Pacienti s AML, kterým byla detekována tato translokace, vykazují trend k nižší hladině *WT1*. Pacienti, kteří mají *MLL+* translokace v kombinaci s ALL však vykazují trend k vyšším hodnotám.

Srovnání všech skupin definovaných na základě přítomnosti specifické genetické aberace je znázorněno na obr. 15.



obr. 14. Hladiny transkriptu *WT1* u *MLL+* pacientů podle subtypu akutní leukémie

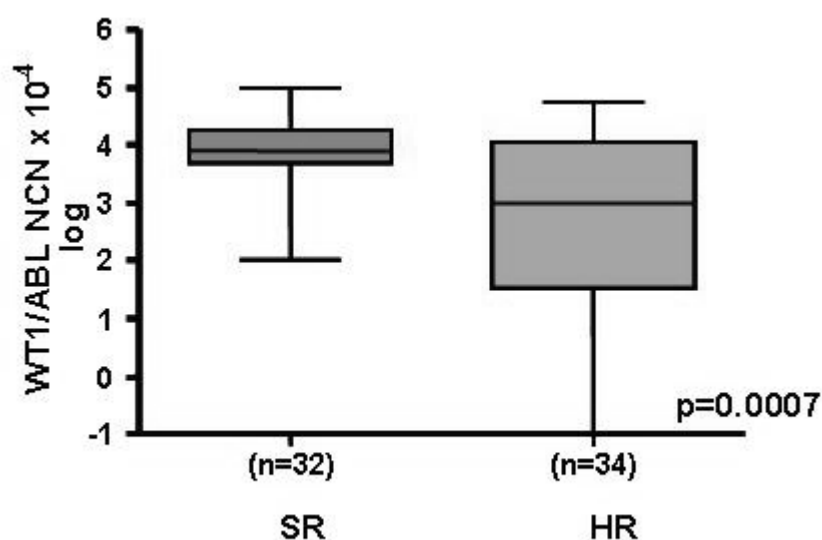


RARA vs. MLL: $p < 0.001$
 RARA vs. ostatní: $p < 0.05$

obr. 15. Srovnání hladin exprese *WT1* u pacientů s přítomností specifických genetických abnormalit

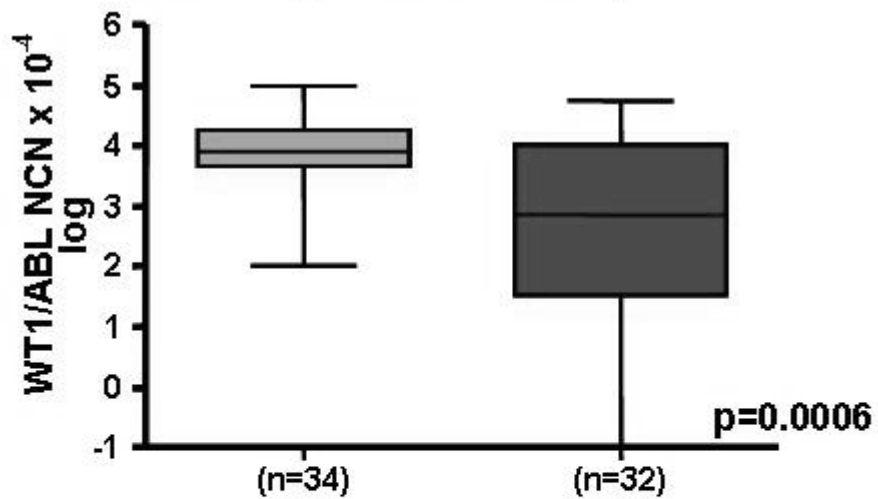
4.3.5 Exprese *WT1* a rizikové skupiny

Pro určení prognostického významu iniciační hladiny transkriptu *WT1* bylo velmi důležité zjistit korelaci této hladiny s rizikovými skupinami. 32 pacientů, kteří splňovali kritéria pro standardní riziko mělo signifikantně vyšší hladiny exprese *WT1* (medián $8364 \text{ NCN} \times 10^{-4}$, 106 – 100428 $\text{NCN} \times 10^{-4}$) než pacienti vysokého rizika (medián $975 \text{ NCN} \times 10^{-4}$, 0 – 57065 $\text{NCN} \times 10^{-4}$) (viz obr. 16).



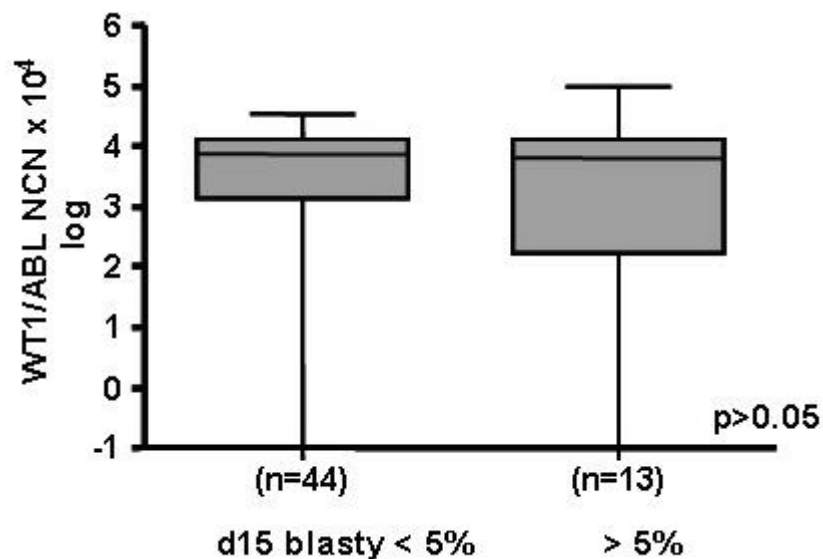
obr. 16. Exprese *WT1* u rizikových skupin

Rizikové skupiny léčebných protokolů jsou definovány přítomností prognosticky příznivých znaků. Pokud tyto prognostické faktory rozdělíme na iniciační morfologické a cytogenetické charakteristiky (1) a časnou odpověď pacientů na léčbu (2), zjistíme, že nález příznivých znaků první skupiny koreluje s vysokou hladinou *WT1* (medián $6638 \text{ NCN} \times 10^{-4}$, 106 – 100428 $\text{NCN} \times 10^{-4}$) (viz obr. 17). Souvislost hladiny exprese *WT1* a časné odpovědi na léčbu hodnocené morfologicky podle zastoupení blastů v kostní dřeni v d15 jsme neprokázali (viz obr. 18).



**Prognosticky příznivé znaky.: M1/2 + A, M3, M4eo
M. Down
t(8;21) AML1-ETO
inv(16) CBFB-MYH11**

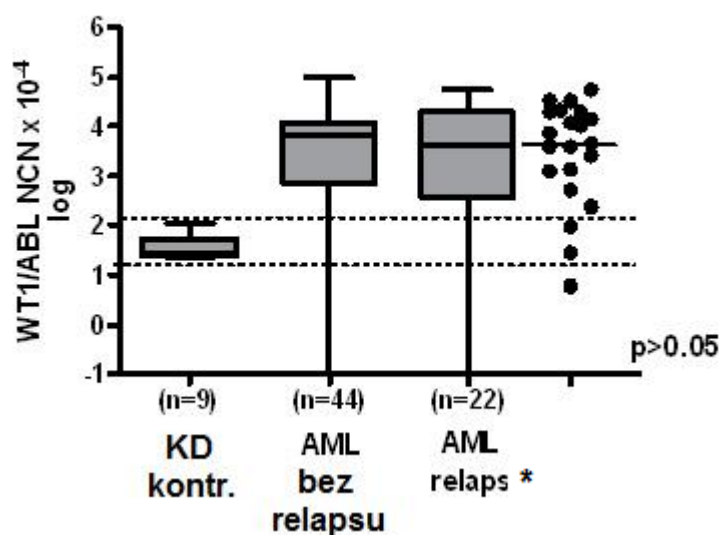
obr. 17. Korelace hladiny *WT1* a přítomnosti prognosticky příznivých znaků



obr.18. Souvislost hladiny exprese *WT1* a časně odpovědi na léčbu

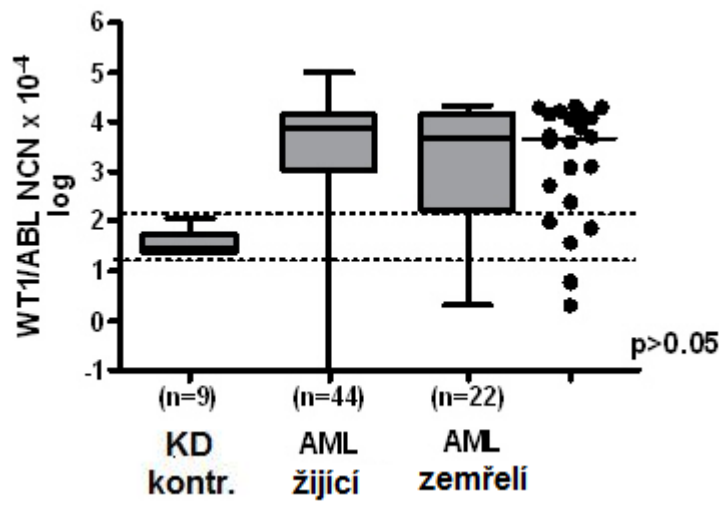
4.3.6 Exprese *WT1* a výsledek léčby pacientů

Pacienti, kteří prodělali relaps, neměli signifikantně vyšší hladiny exprese *WT1* než pacienti, u nichž k progresi leukémie nedošlo (viz obr. 19). Signifikanční rozdíly jsme neprokázali ani mezi pacienty žijícími a zemřelými (viz obr. 20).



obr. 19. Hladiny exprese *WT1* u pacientů s relapsem vs bez relapsu

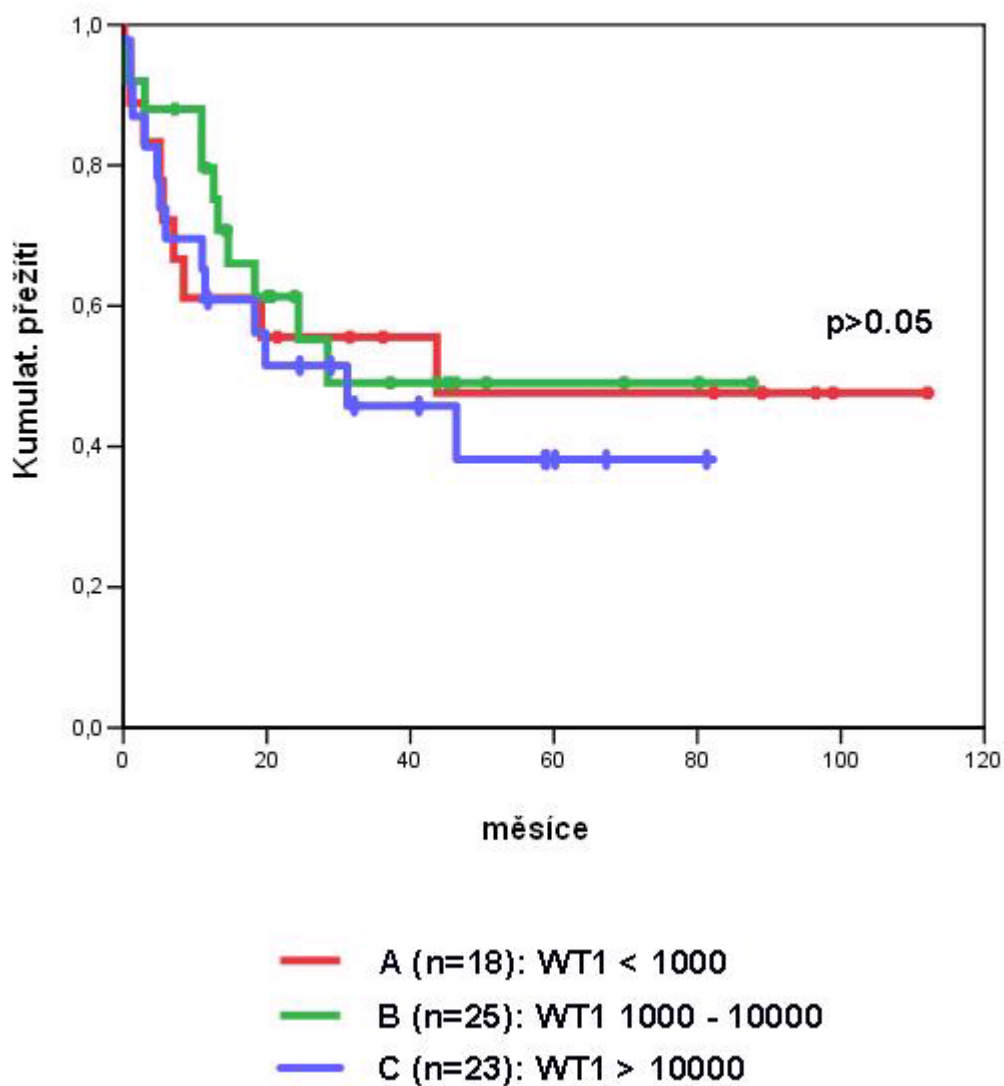
* do této skupiny byl zařazen i 1 pacient, jenž nedosáhl remise nikdy a zemřel na progresi leukémie



obr. 20. Expresse *WT1* u žijících a zemřelých pacientů

4.3.7 Exprese *WT1* a EFS, RFS

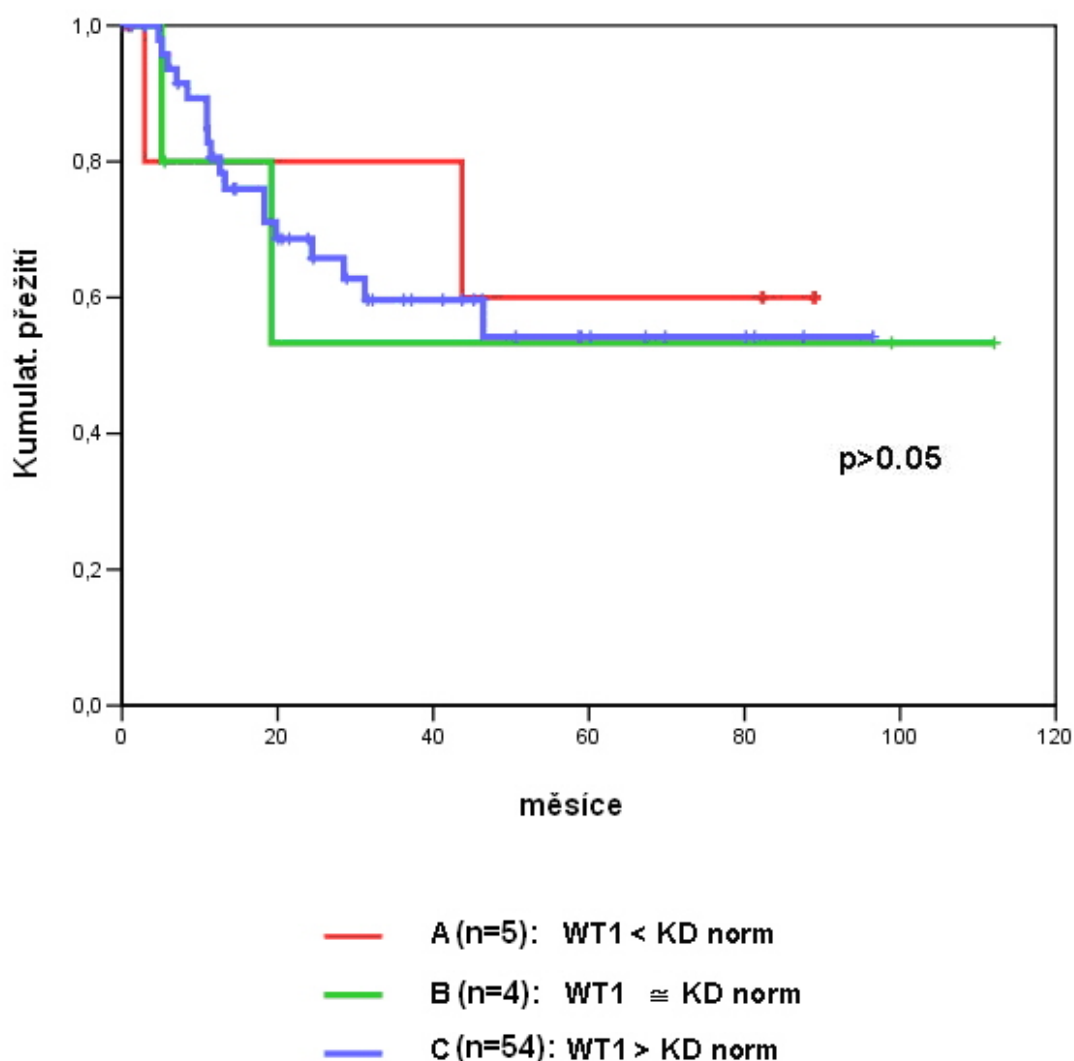
Korelace iniciální hladiny exprese *WT1* a výsledků léčby pacientů je zobrazena na obr. 21. Pacienty jsme rozdělili do tří skupin podle této hladiny, přičemž hraničními hodnotami jsme zvolili 1000 a 10 000 NCN x 10⁻⁴. Mezi těmito skupinami jsme nenašli žádné statisticky významné rozdíly.



obr. 21. EFS pacientů podle iniciální hladiny exprese *WT1*

Kromě výše zvoleného rozdělení pacientů do skupin podle absolutní $NCN \times 10^{-4}$ hodnoty je zajímavé také rozdělení podle relativní hladiny exprese *WT1*. V tomto případě jsou hodnoty pacientů vztaženy k hladinám naměřeným v kontrolních KD. Hodnoty nižší než 75% minimální detekované hladiny zdravých KD, byly zařazeny do skupiny „< KD norm“ a hodnoty vyšší než 125% maxima kontrolních KD byly zařazeny do skupiny „> KD norm“.

Na obr. 22 je znázorněno porovnání RFS mezi takto definovanými skupinami. Ani v tomto případě jsme však nenalezli statisticky významné rozdíly.



obr. 22. RFS AML pacientů podle iniciální hladiny *WT1* vztažené k hodnotám kontrolních KD

5 DISKUSE

Hledání universálního cíle pro detekci MRN u pacientů s AML je v současné době velmi aktuální téma. V léčbě akutních leukémií byl mnoha klinickými studii prokázán také význam stratifikace pacientů do rizikových skupin, která umožňuje diversifikaci intenzity léčby. Jedním z cílů hematologů je tedy nalezení nejvhodnějších prognostických faktorů, jež by mohly sloužit k této stratifikaci.

Mnoho autorů studovalo vlastnosti genu *WT1* v souvislosti s jeho potenciálním využitím k detekci MRN a stratifikaci pacientů, většina doposud publikovaných studií však poskytla velmi kontroverzní výsledky. Možné příčiny neshod mezi jednotlivými pracovními skupinami zmiňuji v následující kapitole, jednoznačné vysvětlení těchto diskrepancí však zatím neexistuje.

Jedno z možných vysvětlení souvisí se způsobem terapie pacientů. Léčebná schémata pro AML jednotlivých pracovních skupin se totiž mezi sebou výrazně liší a to i v rámci Evropy (což je situace odlišná od léčby ALL). Srovnání léčebných výsledků v takto odlišných skupinách pacientů je tedy velmi zrádné. Ozvláště při sledování MRN lze proto výsledky aplikovat pouze na konkrétní léčebný protokol.

Další možnou příčinou je nízký počet analyzovaných pacientů. Vzhledem k faktu, že AML tvoří pouze 10 -15 % všech akutních leukémií, je velmi obtížné získat větší počet pacientů, léčených podle stejného schématu. Nízký počet dětí v těchto studiích tedy výsledky do jisté míry zkresluje a negativně ovlivňuje jejich statistickou významnost. V některých případech také dochází k pozitivní či negativní selekci jednotlivých subtypů s různou odpovědí na léčbu (např. M3 – viz dále), což opět ovlivňuje dosažené výsledky a jejich interpretaci.

Problém může nastat také při interpretaci dat získaných různými detekčními systémy. Tyto systémy využívají primery navržené v odlišných oblastech genu *WT1*, což může být problém s ohledem na existenci různých isoform. V poslední době byly navíc objeveny nové mutace v oblasti exonu 6 a 7, kde asociuje většina doposud navržených systémů. Toto zjištění tak také částečně zpochybňuje výsledky dosažené PCR systémy detekující transkript v této oblasti. Mnoho starších studií bylo navíc založeno pouze na kvalitativní

detekci genu *WT1*, která neposkytuje detailní informace o jeho množství v buňce. Srovnání výsledků získaných odlišnými metodami detekce genu *WT1* je tedy opět sporné.

K neshodám ve výsledcích může přispívat i použití odlišného kontrolního genu. Beillard et. Al. zkoumal některé kontrolní geny z hlediska jejich využitelnosti k tomuto účelu. Jednoznačně nejlepší výsledky byly získány u kontrolního genu *ABL* (BEILLARD *et al.* 2003), neboť jako jediný nevykazoval signifikantní rozdíly mezi vzorky zdravých dárců a pacientů s leukémiemi. Pro normalisaci exprese *WT1* v naší laboratoři standardně používáme gen *ABL*.

V neposlední řadě je nutné zmínit problém, který může nastat již při odběru analyzovaného vzorku, a který souvisí se stabilitou transkriptu *WT1*. Rozpad mRNA *WT1* v průběhu časového intervalu mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním by mohl výrazně snižovat detekovanou hladinu exprese tohoto genu. Součástí našich experimentů proto bylo stanovení stability transkriptu *WT1* ve vzorcích periferní krve zdravých dárců. Zjistili jsme, že do 24 hodin od odběru vzorku lze v hematopoetických buňkách detekovat hladinu exprese tohoto genu. Vzhledem k faktu, že naprostá většina vzorků z celé České republiky je do naší laboratoře doručena a poté zpracována do 24 hodin, nejsou naše výsledky nijak ovlivněny touto časovou prodlevou.

Optimalisace a rutinní zavedení universální metody, kterou by využívalo více pracovních skupin, by mohlo odstranit některé z těchto nesrovnalostí. Naše laboratoř ve spolupráci s předními evropskými hematologickými centry (Frankfurt, Jena, Monza) pracuje na vývoji a optimalisaci takovéto universální RQ-PCR metody pro detekci *WT1*.

V rámci našeho projektu jsme vyvinuli a optimalisovali RQ-PCR metodu pro absolutní kvantifikaci celkového transkriptu *WT1*. Detekční systémy pro *WT1* a *ABL* byly navrženy podle protokolu EAC pro analýsu fuzních transkriptů (BEILLARD *et al.* 2003; GABERT *et al.* 2003). Tato metoda umožňuje detekovat expresi *WT1* až u 97 % pacientů s AML. Dopad výše zmíněného potenciálního problému s mutacemi v exonech 6 a 7, který vyvstal v průběhu řešení projektu, nelze přesně odhadnout. Protože se však ve většině případů jedná o monoalelické mutace, celková hladina exprese by měla být ovlivněna jen minimálně.

V souboru 66 dětských pacientů s AML jsme v 82 % případů detekovali iniciální hladinu exprese *WT1* vyšší než u vzorků zdravých dárců. Není tedy pravda, že by hyperexprese *WT1* mohla být „panleukemickým“ markerem. Oproti kontrolním KD, kde se naměřené hodnoty pohybovaly v rozmezí 1 řádu, představují AML heterogenní skupinu s rozptylem hodnot 6 řádů.

Expres *WT1* detekovaná u AML pacientů je signifikantně vyšší i ve srovnání s ALL (BOUBLIKOVA *et al.* 2006), což souhlasí s naprostou většinou doposud publikovaných prací.

Hladiny exprese *WT1* mezi chlapci a děvčaty byly velmi podobné. Stejně tak rozdělení pacientů do věkových skupin „< 1 rok, „1 – 10 let“ a „> 10 let“ neprokázalo žádné signifikantní rozdíly. Nejmladší kategorie však oproti dvěma starším skupinám obsahovala pouze 2 pacienty a tyto výsledky tedy nelze považovat za statisticky významné.

Zajímavější výsledky jsme dostali při srovnání hladin exprese *WT1* u jednotlivých FAB subtypů. Signifikantně vyšší hladinu *WT1* jsme prokázali u pacientů se subtypem M3 a nízkou hladinu u subtypu M5. Celkové rozložení mediánů exprese *WT1* u jednotlivých FAB subtypů nejspíše souvisí se stádiem vyžívání blastů, ve kterém došlo k jejich maligní transformaci. U leukémií bez známek diferenciaci nacházíme nejnižší hodnoty, u zralejších subtypů dochází k nárůstu exprese *WT1* a nejvyšší hladiny detekujeme u M3 subtypu. V případě leukémií M4 a M5 (tedy s blasty ve stádiu postupující monocytární diferenciaci) pak dochází opět ke snížení hladiny *WT1*. Tyto výsledky korelují s některými dalšími pediatrickými studiemi (KREUZER *et al.* 2001; LAPILLONNE *et al.* 2006; RODRIGUES *et al.* 2007; TRKA *et al.* 2002).

Srovnáním hladiny exprese *WT1* s přítomností genetických abnormalit jsme prokázali signifikantně vyšší hladinu u pacientů s fusním genem PML/RARa (tedy subtypu M3). Přítomnost translokací postihujících gen *MLL* naopak korelovala s nízkou hladinou *WT1*. Tyto výsledky jsou zajímavé zejména pokud porovnáme pacienty s *MLL*+ translokacemi a odlišnými typy akutních leukémií. U AML pacientů s těmito abnormalitami vidíme trend k nižší hladině *WT1*. Pacienti, kteří mají *MLL*+ translokace v kombinaci s ALL naopak vykazují trend k vyšší hladině exprese *WT1* (BOUBLIKOVA *et al.* 2006). Leukemogenní proces je tedy u těchto pacientů ovlivněn odlišným buněčným prostředím lymfoidních a myeloidních blastů.

Prognostický význam iniciální hladiny exprese *WT1* u pacientů s AML byl a stále je středem zájmu mnoha pracovních skupin. Jak již bylo řečeno, někteří autoři význam této hladiny prokázali, jiní však žádnou souvislost nenalezli. Drtivá většina publikací potvrzujících význam iniciální exprese *WT1* prokázala korelaci vysoké hladiny *WT1* s přítomností nepříznivých prognostických znaků a tedy se zařazením pacientů do skupiny vysokého rizika. Naše výsledky však ukazují přesný opak. Signifikantně vyšší hladinu jsme detekovali u pacientů standardního rizika. Při interpretaci těchto výsledků však musíme být opatrní. Ve skupině standardního rizika totiž bylo 13 dětí (41 %) se subtypem AML M3, jejichž léčba se od ostatních pacientů výrazně liší t(15;17), která je pro tyto pacienty charakteristická, postihuje gen pro receptor retinové kyseliny, jenž reguluje myeloidní diferenciaci. Vzniká tak aberantní receptor, který není schopen reagovat na fyziologické koncentrace této kyseliny. Objevem léčebného efektu extrémně vysokých dávek all-trans-retinoové kyseliny (ATRA), které dovedou aktivovat i defektní receptor, došlo k výraznému zlepšení prognosy těchto pacientů. Ve skutečnosti se tedy tento subtyp vymyká možností a úspěšností cílené léčby a vysokou expresí *WT1* v tomto případě nelze korelovat s dobrou odpovědí na standardní chemoterapii.

Risikové skupiny jsou definovány jednak morfoloogickými a cytogenetickými charakteristikami, ale také přímo odpovědí pacienta na iniciální fázi léčby. Tato časná odpověď na léčbu je u AML hodnocena zastoupením blastů v kostní dřeni v den 15 terapie. Nízký počet těchto blastů (< 5 %) je obecně považován za prognosticky příznivý faktor. Naše výsledky poukazují na korelaci vysoké exprese *WT1* s přítomností prognosticky příznivých faktorů. Mohli bychom tedy předpokládat, že nalezneme tuto korelaci i s nízkým počtem blastů v kostní dřeni d15 signalisujícím dobrou odpověď na léčbu. Tuto souvislost jsme však neprokázali. Možné vysvětlení souvisí opět se subtypem AML M3. Pro tuto skupinu pacientů je charakteristický pomalý pokles leukemických buněk během terapie, což neodpovídá obecnému zařazení do standardního rizika. Spolu s tím, co už bylo řečeno o charakteru léčby, je zřejmé, že by pacienti se subtypem M3 neměli být hodnoceni společně s ostatními pacienty. Vzhledem k nízkému počtu pacientů to však ve většině studií (včetně naší) není možné.

Korelaci iniciální hladiny exprese *WT1* s výsledkem léčby pacientů jsme hodnotili pomocí křivek přežití EFS a RFS. Podle našich výsledků nelze využít absolutní iniciální hodnotu exprese *WT1* k odlišení pacientů s vysokým rizikem relapsu. K tomuto účelu pravděpodobně nelze využít ani relativní hladinu exprese *WT1* vztaženou k hodnotám naměřeným u zdravých dárců, která lépe charakterizuje pacienty z hlediska odchylek od fyziologických hodnot. Na našem souboru tedy neprokazujeme prognostický význam výšky exprese genu *WT1*. Tyto výsledky jsou v rozporu s naší publikovanou pilotní studií (TRKA *et al.* 2002) a právě tento rozpor dokumentuje řadu výše zmíněných možných příčin. Původní studie zahrnovala jen 47 pacientů, a pouze 3 z nich patřili do subtypu M3 s t(15;17). Pacienti byli léčeni podle předchozí verze léčebného protokolu s celkově významně horšími výsledky. Časná odpověď na léčbu nemohla být - vzhledem k absenci tohoto údaje – zařazena do analýsy. K detekci kvantity transkriptu byla použita metodika využívající SYBR Green, která je považována za obecně méně přesnou; a jiná sada primerů. Jiný byl i kontrolní gen.

Cílem této práce bylo stanovení prognostického významu hladiny exprese *WT1* v době diagnózy AML a zhodnocení potenciálního využití *WT1* k detekci MRN. Podle našich výsledků *WT1* není nezávislým prognostickým faktorem a nejspíše jej tedy nelze využít k stratifikaci pacientů do rizikových skupin. Vysokou hladinu *WT1* jsme našli u více než 80 % pacientů, proto se domníváme, že u části pacientů bychom mohli využít expresi *WT1* k sledování MRN. V tom se naše studie současná shoduje s prací z roku 2002.

Výsledky publikované v poslední době poukazují na odlišné role jednotlivých isoform tohoto genu. Stabilní poměr variant proteinu WT1 ve fyziologických tkáních a aberantní exprese některých isoform v maligních buňkách poukazuje na možný význam jejich relativního množství spíše než celkového WT1. Na základě těchto poznatků bychom v budoucnu rádi zavedli a optimalisovali metodu RQ-RT-PCR pro detekci jednotlivých isoform *WT1* u AML, ALL a MDS. Rádi bychom se zaměřili na expresní vzorce těchto variant u konkrétních hematologických malignit v prospektivní a retrospektivní studii, což by nám umožnilo stanovit možný fyziologický a prognostický význam poměru sestřihových variant *WT1*. Dále bychom se chtěli věnovat nově nalezeným

mutacím v genu *WT1* a stanovit tak korelaci mutačního stavu pacientů s hladinou exprese *WT1* a jejich klinickými parametry.

6 SOUHRN

Z dosavadních studií zaměřených na biologické příčiny leukémií lze vysledovat velký zájem o problematiku genu *WT1*. Přestože konkrétní role tohoto genu v hematopoeze a leukemogeneze stále nebyla objasněna, je velmi pravděpodobné, že v obou těchto procesech hraje klíčovou úlohu.

V současné době je *WT1* intensivně zkoumán zejména v souvislosti s AML. Léčba tohoto typu leukémií je bohužel stále méně úspěšná než v případě ALL. Nalezení universálního markeru pro sledování MRN stejně jako nezávislého prognostického markeru by mohlo významně přispět ke zlepšení léčebných výsledků těchto pacientů. Jedním z navržených kandidátů vhodných k tomuto účelu je gen *WT1*.

Cílem diplomové práce bylo stanovení prognostického významu exprese *WT1* v době diagnózy dětské AML a zhodnocení možného využití tohoto genu k sledování minimální residuální nemoci.

Zavedli jsme a optimalisovali metodu kvantitativní real-time PCR pro detekci *WT1*. Tímto detekčním systémem jsme prokázali expresi *WT1* u 97 % pacientů. U více než 80 % dětí jsme detekovali hyperexpresi tohoto genu. Pro určitou část pacientů by tedy *WT1* mohl sloužit ke sledování minimální residuální nemoci.

Naše výsledky neprokázaly korelaci hladiny exprese tohoto genu s dosud používanými prognostickými faktory. Neprokázali jsme ani korelaci této hladiny s výsledkem léčby analysovaných pacientů. *WT1* tedy podle těchto výsledků není nezávislým prognostickým markerem využitelným ke stratifikaci pacientů s AML.

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB (1993): The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 40, 85-97.

Auerbach AD (1992): Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. *Leukemia* 6 Suppl 1, 1-4.

Barboux S, Niaudet P, *et al.* (1997): Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17, 467-70.

Beillard E, Pallisgaard N, *et al.* (2003): Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474-86.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-8.

Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D (1997): High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 90, 1217-25.

Boublikova L, Kalinova M, *et al.* (2006): Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 20, 254-63.

Bruening W, Pelletier J (1996): A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 271, 8646-54.

Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE (1991): Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol Cell Biol* 11, 1707-12.

Call KM, Glaser T, *et al.* (1990): Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-20.

Campana D, Coustan-Smith E (1999): Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38, 139-52.

Campana D, Pui CH (1995): Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85, 1416-34.

Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, Hastie ND, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A (1996): RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7562-6.

Cazzaniga G, Biondi A (2005): Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica* 90, 382-90.

Cilloni D, Gottardi E, *et al.* (2002): Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 16, 2115-21.

Cilloni D, Saglio G (2004): WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 112, 79-84.

Coppes MJ, Campbell CE, Williams BR (1993): The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *Faseb J* 7, 886-95.

Creutzig U (1996): Diagnosis and treatment of acute myelogenous leukemia in childhood. *Crit Rev Oncol Hematol* 22, 183-96.

Creutzig U, Zimmermann M, *et al.* (2005): Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 19, 2030-42.

Dalosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K (2004): Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet* 13, 405-15.

Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ (2002): Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 15, 197-222.

Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N (2004): Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* 13, 235-46.

Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND (1998): WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 12, 3217-25.

Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS, Garrett CT (2000): Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. *Mol Diagn* 5, 117-28.

Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJ, 3rd, Kim SJ (1994): Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol* 8, 595-602.

Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ, 3rd (1992): Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 257, 674-8.

Elisseeva OA, Oka Y, *et al.* (2002): Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood* 99, 3272-9.

Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA (2001): The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Embo J* 20, 1897-909.

Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R, Klein-Hitpass L, Ottinger H, Beelen DW, Opalka B (2005): WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica* 90, 326-34.

Flohr T, Schrauder A, *et al.* (2008): Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22, 771-82.

Fong CT, Brodeur GM (1987): Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 28, 55-76.

Freireich EJ, Cork A, Stass SA, McCredie KB, Keating MJ, Estey EH, Kantarjian HM, Trujillo JM (1992): Cytogenetics for detection of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 6, 500-6.

Fronkova E, Mejstrikova E, *et al.* (2008): Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* 22, 989-97.

Gabert J, Beillard E, *et al.* (2003): Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17, 2318-57.

Gaidzik V, Dohner K (2008): Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol* 35, 346-55.

Gaiger A, Linnerth B, Mann G, Schmid D, Heinze G, Tisljar K, Haas OA, Gadner H, Lion T (1999): Wilms' tumour gene (*wt1*) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* 63, 86-93.

Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Collins T, Sukhatme VP (1992): Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor *WT1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10984-8.

Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA (1990): Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774-8.

Glienke W, Maute L, Koehl U, Esser R, Milz E, Bergmann L (2007): Effective treatment of leukemic cell lines with *wt1* siRNA. *Leukemia* 21, 2164-70.

Gorello P, Cazzaniga G, *et al.* (2006): Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (*NPM1*) gene mutations. *Leukemia* 20, 1103-8.

Gray JW, Kuo WL, Liang J, Pinkel D, van den Engh G, Trask B, Tkachuk D, Waldman F, Westbrook C (1990): Analytical approaches to detection and characterization of disease-linked chromosome aberrations. *Bone Marrow Transplant* 6 Suppl 1, 14-9.

Gribben JG (2002): Monitoring disease in lymphoma and CLL patients using molecular techniques. *Best Pract Res Clin Haematol* 15, 179-95.

Guan LS, Liu JJ, Xu YH, Wang ZY (1998): A point mutation within exon 5 of the WT1 gene of a sporadic unilateral Wilms' tumor alters gene function. *Cancer Res* 58, 4180-4.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE (1991): Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9618-22.

Hamilton TB, Barilla KC, Romaniuk PJ (1995): High affinity binding sites for the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Nucleic Acids Res* 23, 277-84.

Harrington MA, Konicek B, Song A, Xia XL, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd (1993): Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J Biol Chem* 268, 21271-5.

Hewitt SM, Fraizer GC, Wu YJ, Rauscher FJ, 3rd, Saunders GF (1996): Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 271, 8588-92.

Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ, 3rd, Saunders GF (1995): Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 55, 5386-9.

Hirose M (1999): The role of Wilms' tumor genes. *J Med Invest* 46, 130-40.

Hosen N, Sonoda Y, *et al.* (2002): Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol* 116, 409-20.

Hossain A, Nixon M, Kuo MT, Saunders GF (2006): N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *J Biol Chem* 281, 28122-30.

Hossain A, Saunders GF (2001): The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 276, 16817-23.

Hubinger G, Schmid M, Linortner S, Manegold A, Bergmann L, Maurer U (2001): Ribozyme-mediated cleavage of wt1 transcripts suppresses growth of leukemia cells. *Exp Hematol* 29, 1226-35.

Inoue K, Ogawa H, *et al.* (1997): Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89, 1405-12.

Inoue K, Ogawa H, *et al.* (1996): Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 88, 2267-78.

Inoue K, Sugiyama H, *et al.* (1994): WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84, 3071-9.

Inoue K, Tamaki H, *et al.* (1998): Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91, 2969-76.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F (2004): Clinical and biological importance of cytogenetic abnormalities in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Ann Med* 36, 492-503.

Kalinova M (2002) Kvantitativní detekce exprese genu WT1 u dětských akutních myeloidních leukémií: prognostický význam a sledování reziduální nemoci. Diplomová práce thesis, Charles University.

Kaspers GJ, Creutzig U (2005): Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 19, 2025-9.

Kaspers GJ, Zwaan CM (2007): Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* 92, 1519-32.

Keilholz U, Menssen HD, *et al.* (2005): Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 19, 1318-23.

King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K (1996): Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 87, 2171-9.

Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA (1990): The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61, 113-24.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993): WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679-91.

Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, Appelt C, Na IK, le Coutre P, Schmidt CA (2001): Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol* 114, 313-8.

Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL (1988): Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* 2, 786-800.

Lapillonne H, Renneville A, *et al.* (2006): High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 24, 1507-15.

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND (1995): Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81, 391-401.

Loeb DM, Summers JL, Burwell EA, Korz D, Friedman AD, Sukumar S (2003): An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia* 17, 965-71.

Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS (1999): WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *Embo J* 18, 3990-4003.

Menke AL, Shvarts A, Riteco N, van Ham RC, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1997): Wilms' tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res* 57, 1353-63.

Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U, Maurer J, Notter M, Schwartz S, Reinhardt R, Thiel E (1995): Presence of Wilms' tumor gene (*wt1*) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 9, 1060-7.

Mitchell PJ, Tjian R (1989): Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-8.

Miwa H, Beran M, Saunders GF (1992): Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 6, 405-9.

Miyagawa K, Hayashi Y, Fukuda T, Mitani K, Hirai H, Kamiya K (1999): Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 176-83.

Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A (1999): YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126, 1845-57.

Moore AW, Schedl A, McInnes L, Doyle M, Hecksher-Sorensen J, Hastie ND (1998): YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev* 79, 169-84.

Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S (1996): Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-8.

Nishida S, Hosen N, *et al.* (2006): AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* 107, 3303-12.

Ogawa H, Tamaki H, *et al.* (2003): The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 101, 1698-704.

Ogawa M (1993): Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-53.

Oji Y, Miyoshi S, *et al.* (2002): Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 100, 297-303.

Oji Y, Nakamori S, *et al.* (2004): Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 95, 583-7.

Oji Y, Ogawa H, *et al.* (1999): Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 90, 194-204.

Oka Y, Elisseeva OA, *et al.* (2000): Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product. *Immunogenetics* 51, 99-107.

Oka Y, Tsuboi A, *et al.* (2004): Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13885-90.

Paschka P, Marcucci G, *et al.* (2008): Wilms Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.*

Pelletier J, Bruening W, *et al.* (1991): Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67, 437-47.

Phelan SA, Lindberg C, Call KM (1994): Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ* 5, 677-86.

Pongers-Willems MJ, Seriu T, *et al.* (1999): Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13, 110-8.

Poppe B, Van Limbergen H, Van Roy N, Vandecruys E, De Paepe A, Benoit Y, Speleman F (2001): Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 128, 39-42.

Pui CH (1999) 'Childhood Leukemias.' (Cambridge University Press)

Pui CH, Campana D, Evans WE (2001): Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2, 597-607.

Pui CH, Sandlund JT, *et al.* (2003): Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *Jama* 290, 2001-7.

Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM (2004): Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 118-45.

Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein HJ, Carroll AJ (1999): Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood* 94, 3707-16.

Rauscher FJ, 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T (1990): Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 250, 1259-62.

Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, Matsuda EI, Nowill AE, Brandalise SR, Yunes JA (2007): Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 49, 133-8.

Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A (2003): WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia* 17, 1301-12.

Ross ME, Mahfouz R, *et al.* (2004): Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 104, 3679-87.

Ryan DH, van Dongen JJ (1988): Detection of residual disease in acute leukemia using immunological markers. *Cancer Treat Res* 38, 173-207.

Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Dressler GR (1995): Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 121, 867-75.

Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Sukumar S (1994): RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev* 8, 720-31.

Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG (2001): WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 273, 141-61.

Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, Schmittel A, Mailaender V, Baerwolf S, Nagorsen D, Keilholz U (2002): CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 100, 2132-7.

Schmid D, Heinze G, *et al.* (1997): Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11, 639-43.

Schrapppe, Stary, Kowalczyk (2002) 'ALL IC-BFM 2002 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia.'

Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT, Jr., Daniel CW (1997): Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8132-7.

Silverman LB, Gelber RD, *et al.* (2001): Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 97, 1211-8.

Slats AM, Egeler RM, van der Does-van den Berg A, Korbijn C, Hahlen K, Kamps WA, Veerman AJ, Zwaan CM (2005): Causes of death--other than progressive leukemia--in childhood acute lymphoblastic (ALL) and myeloid leukemia (AML): the Dutch Childhood Oncology Group experience. *Leukemia* 19, 537-44.

Smith FO, Alonzo TA, Gerbing RB, Woods WG, Arceci RJ (2005): Long-term results of children with acute myeloid leukemia: a report of three consecutive Phase III trials by the Children's Cancer Group: CCG 251, CCG 213 and CCG 2891. *Leukemia* 19, 2054-62.

Smith OP, Hann IM, Chessells JM, Reeves BR, Milla P (1996): Haematological abnormalities in Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 94, 279-84.

Smith SI, Weil D, Johnson GR, Boyd AW, Li CL (1998): Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood* 91, 764-73.

Starý J, Myer J, kolektiv (2002) 'Leukémie.' (Grada publishing)

Steinbach D, Schramm A, *et al.* (2006): Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 12, 2434-41.

Stiller CA (2004): Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 23, 6429-44.

Sugiyama H (2002): Wilms tumor gene WT1 as a tumor marker for leukemic blast cells and its role in leukemogenesis. *Methods Mol Med* 68, 223-37.

Szczepanski T (2007): Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 21, 622-6.

Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF (1996): Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 87, 423-38.

Tenen DG (2003): Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3, 89-101.

Trka J, Kalinova M, *et al.* (2002): Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 16, 1381-9.

Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH (1989): Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339, 446-51.

van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ (2003): Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013-34.

van Dongen JJ, Seriu T, *et al.* (1998): Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352, 1731-8.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002): The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292-302.

Viel A, Giannini F, Capozzi E, Canzonieri V, Scarabelli C, Gloghini A, Boiocchi M (1994): Molecular mechanisms possibly affecting WT1 function in human ovarian tumors. *Int J Cancer* 57, 515-21.

Virappane P, Gale R, *et al.* (2008): Mutation of the Wilms' Tumor 1 Gene Is a Poor Prognostic Factor Associated With Chemotherapy Resistance in Normal

Karyotype Acute Myeloid Leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*.

Wagner KD, Wagner N, Schedl A (2003): The complex life of WT1. *J Cell Sci* 116, 1653-8.

Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A, Englert C, Scholz H (2002): The Wilms' tumor gene *Wt1* is required for normal development of the retina. *Embo J* 21, 1398-405.

Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF (1995): Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, *wt1*, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 10, 415-22.

Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S (2005): Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19, 1416-23.

Wu F, Oka Y, *et al.* (2005): Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia* 19, 268-74.

Yamagami T, Sugiyama H, *et al.* (1996): Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 87, 2878-84.

Yin JA, Grimwade D (2002): Minimal residual disease evaluation in acute myeloid leukaemia. *Lancet* 360, 160-2.

Zdrahalova K, Stary J (2007): Leukemie. *Sanquis* 51, 14.

