

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Alena Jelínková

**Studium dysregulace proteinu DLX1 v leukemických myeloidních buňkách v *in vitro*
a *in vivo* modelech**

Study of dysregulation of DLX1 protein in myeloid leukemia cells in *in vitro* and *in vivo*
models

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, dne 28.4. 2018

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala školitelce projektu RNDr. Júlíi Starkové Ph.D. za ochotu, trpělivost a mnoho cenných rad, které mi během vedení práce poskytla. Děkuji celému kolektivu laboratoří CLIP za příjemné a přátelské prostředí, zvláště Mgr. Kateřině Rejlové a oddělení průtokové cytometrie za pomoc při náročných experimentech. Poděkování také patří Meritxell Alberich Jorda Ph.D. a Mgr. Miroslavě Kardošové z Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. za spolupráci při *in vivo* pokusech.

Abstrakt

Heterogenní povaha akutní myeloidní leukémie (AML) zhoršuje výsledky pacientů léčených standardní terapií. Porozumění procesům leukemogeneze může přispět k lepší stratifikaci pacientů a tím i nastavení vhodnější personalizované léčby. Geny rodiny *DLX* (Distal-less homeobox), patřící do skupiny homeoboxových genů, jsou spojovány s maligními onemocněními krve i pevných tkání. Při analýze expresních dat byla nízká hladina genu *DLX1* spojena s horší prognózou pacientů s AML. V této práci jsme studovali fenotypové změny buněčných linií s rozdílnou expresí genu *DLX1*. Pomocí vlásenkové shRNA jsme umlčeli gen *DLX1* v buňkách AML linie (sh buňky) a srovnávali ji s parentální linií s vyšší expresí *DLX1* (NSC buňky). Analýzou buněčného cyklu a stanovením apoptózy v *in vitro* a *in vivo* podmínkách jsme popsali zástavu v G0 fázi a nižší počet apoptotických buněk sh linie. Při měření absolutního počtu buněk v čase byly pozorovány rozdíly, kdy v *in vitro* podmínkách bylo méně sh buněk, přičemž v *in vivo* prostředí bylo přihojených signifikantně více sh buněk ve srovnání s NSC buňkami. Další výsledky ukázali, že sh buňky mají nižší hladinu pro-apoptotických proteinů a vykazují vyšší hladinu TGF- β cílového genu *PAI-1*, který aktivuje replikativní senescenci. Z toho lze předpokládat, že buňky s nižší expresí *DLX1* perzistují déle v tkáních imunitního systému, čímž se zvyšuje jejich celkový počet, který může vést k agresivnějšímu typu leukémie.

Klíčová slova: myeloidní leukémie, homeoboxové geny, DLX1, genová exprese, buněčný cyklus, mezenchymální kmenové buňky, TGF- β

Abstract

The heterogeneous nature of acute myeloid leukemia (AML) worsens the results of patients treated with standard therapy. Understanding the processes of leukemogenesis can contribute to identification of more appropriate treatment. Family of *DLX* genes (Distal-less homeobox), belonging to the homeobox genes, are associated with haematological malignancies and solid tumors. In the analysis of expression data, the low level of the *DLX1* gene was associated with a worse prognosis of patients with AML. In this work we studied phenotypic changes of cell lines with different expression of the *DLX1* gene. We silenced the *DLX1* gene in AML cell line (sh cells) and compared it to the parental line with higher expression of *DLX1* (NSC cells). By cell cycle analysis and apoptosis assays *in vitro* and *in vivo*, we have observed the arrest of sh cells in the G0 phase and a lower number of apoptotic cells. Differences were found when measuring the absolute number of cells in time. In *in vitro* conditions there were less sh cells, in *in vivo* environment there was significantly higher number of sh cells engrafted in comparison to NSC cells. Further results have shown that sh cells have lower levels of pro-apoptotic proteins and exhibit a higher level of TGF- β targeting *PAI-1* gene that activates replicative senescence. We assume that sh cells persist longer in the tissues of the immune system thereby increase their total number, which may lead to more aggressive type of leukemia.

Key Words: myeloid leukemia, homeobox genes, DLX1, gene expression, cell cycle, mesenchymal stem cells, TGF- β

Seznam zkratek

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
AML	akutní myeloidní leukémie
ALL	akutní lymfoidní leukémie
Ara-C	cytosin arabinoside
ASXL1	additional sex combs like 1
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA1	breast cancer 1
BSA	bovinní sérum albumin
CART	chimeric antigen receptor-T cells
CAR-T	chimeric antigen receptor-T cells
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A
CDKIN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CDKIN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
cDNA	cirkulární DNA
CLL	chronická lymfoidní leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DLX geny	distal-less homeobox geny
DMSO	dimethylsulfoxid
Doxo	doxorubicin
E2F1	E2 transcription factor 1
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	epidermal growth factor receptor
Fas	first apoptosis signal receptor
FBS	fetal bovine serum
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FLT3	FMS like tyrozin kináza 3
FR-B	folate receptor family beta
GADD45B	growth arrest and DNA damage 45B
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GFP	green fluorescent protein/zelený fluorescenční protein
GO	gemtuzumab ozogamicin
HepG2	hepatoma G2
HOX geny	homeoboxové geny
HRP	horseradish peroxidase
HSP27	heat shock protein 27
hTERT	telomerase reverse transcriptase
i.p.	intraperitoneální
i.v.	intravenózní
IL-3	interleukin 3
ITD	internal tandem duplication
MAP	mitogen-activated protein

MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MES	kyselina 2-(N-morpholino) etansulfonová
MLL	mixed lineage leukemia
MM	multiple myeloma
MOPS	kyselina 3-(N-morpholino) propanesulfonová
MSCs	mesenchymal stem cells/mezenchymální kmenové buňky
nonT-siRNA	non-target siRNA/ necílená siRNA
NSC	non silencing control
PAI-1	plasminogen aktivator inhibitor 1
PBS	phosphate buffered saline
PHF6	plant homeodomain (PHD)-like finger 6
PI	propidium jodid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction/kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RPMI 1640 medium	Roswell Park Memorial Institut 1640 medium
RTK	receptor tyrosin kinase/receptor tyrosin kináza
SA-βGal	senescence associated β-galactosidase/β-galaktosidáza asociovaná se senescencí
shRNA	short harpin RNA/malá vlásenková RNA
siRNA	small interfering RNA/malá interferující RNA
STAT	signal transducers and activators of transcription
TALE	transcription activator-like effector
TBP	TATA binding protein
TET2	tet (ten-eleven translocation) methylcytosine dioxygenase 2
TGF-β	transforming growth factor β
TGF-βL	ligand dráhy TGF-β
TRAIL R/DR4	TNF (tumor necrosis factor)-related apoptosis-inducing ligand/death receptor 4
TRAIL R/DR5	TNF (tumor necrosis factor)-related apoptosis-inducing ligand/death receptor 5
TβRI	TGF-β receptor prvního typu
TβRII	TGF-β receptor druhého typu
UMG	Ústav molekulární genetiky
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization/Světová zdravotnická organizace

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíle práce	3
3	Přehled literatury	5
3.1	Akutní myeloidní leukémie.....	5
3.1.1	Genetické abnormality AML.....	6
3.2	Homeoboxové geny.....	7
3.2.1	HOX geny exprimované v AML buňkách	7
3.3	Genová rodina DLX	8
3.3.1	Abnormální exprese genů DLX u rakovinných onemocnění.....	8
3.4	FLT3 (FMS-like tyrosine kinase) kináza a AML.....	11
3.5	Dráha TGF- β (transforming growth factor β)	12
3.5.1	Vztah TGF- β a genů DLX	13
3.6	Mezenchymální kmenové buňky.....	14
3.7	Současná léčba AML	15
3.7.1	Standartní terapie.....	15
3.7.2	Nové terapeutické možnosti	15
4	Materiál a metody	17
4.1	Buněčné linie	17
4.1.1	Použité buněčné linie	17
4.1.2	Uchovávání buněčných linií.....	17
4.1.3	Kultivace buněčných linií	17
4.1.4	Pasážování buněčných linií.....	18
4.1.5	Počítání a měření životnosti buněk	18
4.1.6	Buněčné pelety	19
4.2	In vitro léčba	19
4.2.1	Cytosin arabinose (Ara-C).....	19
4.2.2	Doxorubicin (Doxo).....	19
4.3	Western blot.....	20
4.3.1	Izolace proteinu	20
4.3.2	Příprava proteinů.....	20
4.3.3	Elektroforéza	21
4.3.4	Přenos proteinů na membránu	21
4.3.5	Vazba protilátek na membránu	22
4.3.6	Opětovné užití membrány.....	23

4.4	Detekce proteinů spojených s apoptózou.....	23
4.5	Malá interferující RNA (siRNA)	24
4.6	qPCR	24
4.6.1	Izolace RNA.....	24
4.6.2	Reverzní transkripce	25
4.6.3	Protokol qPCR.....	25
4.7	Detekce senescence	26
4.8	Měření na průtokovém cytometru.....	27
4.8.1	Měření absolutních počtů buněk	27
4.8.2	Měření buněčného cyklu.....	27
4.8.3	Měření Ki-67	28
4.8.4	Měření apoptických buněk.....	28
4.9	In vivo experimenty	29
4.9.1	Ozařování myší	29
4.9.2	Injekce leukemických buněk myším	29
4.9.3	Injekce cytostatik myším	29
4.9.4	Sběr buněčných vzorků	30
4.10	Statistická analýza	32
5	Výsledky.....	33
5.1	Potvrzení snížené exprese genu DLX1	33
5.2	Detekce senescentních buněk.....	34
5.3	Apoptická array	36
5.4	Ko-kultivace leukemických buněk s MSCs.....	38
5.4.1	Kumulativní počítání buněk.....	38
5.4.2	Měření buněčného cyklu.....	41
5.4.3	Měření proliferujících buněk	44
5.4.4	Měření apoptických buněk.....	46
5.5	Podání cytostatika in vitro.....	47
5.6	In vivo experimenty	48
5.7	Studium signální dráhy TGF- β	53
6	Diskuze.....	59
6.1	Snížená exprese genu DLX1	59
6.2	Rozdíly in vitro a in vivo.....	59
6.2.1	Identifikace senescentních buněk	59
6.2.2	Apoptická array	59
6.2.3	Ko-ultivace s MSCs.....	60

6.2.4	Podání cytostatika in vitro.....	60
6.2.5	Léčba in vivo	61
6.3	Studium TGF-B dráhy.....	62
7	Souhrn	63
8	Reference	64

Studium dysregulace proteinu DLX1 v leukemických myeloidních buňkách v in vitro a in vivo modelech

1 Úvod

Leukémie je maligní onemocnění krvetvorby, které se podle původu maligních krevních buněk dělí na lymfoidní a myeloidní typ. Dále se rozděluje na základě rychlosti progresu na akutní a chronickou formu. Akutní forma leukémie je charakteristická rychlým dělením nezralých leukemických buněk, takzvaných leukemických blastů. Při chronické formě není dělení leukemických buněk tak rapidní a zároveň se jedná zejména o vyvrálejší stádium buněk. Leukémie je klasifikována do 4 tříd, a to akutní myeloidní leukémie (AML), chronická myeloidní leukémie (CML), akutní lymfoidní leukémie (ALL) a chronická lymfoidní leukémie (CLL).

Leukemické buňky dříve nebo později převládou nad zdravými krevními buňkami, což způsobí zvýšenou krvácivost, nedostatečné prokrvení tkání nebo vysokou citlivost k infekcím.

Akutní myeloidní leukémie (AML) je způsobená maligní transformací myeloidní linie krevních buněk. Jedná se o nejčastější akutní formu leukémie u dospělých jedinců a relativně časté nádorové onemocnění u dětí. Pouze 35-40 % pacientů AML s věkem nižším než 60 let je plně vyléčeno, u pacientů starších 60 let je to dokonce jenom 5-15 % (Döhner, Weisdorf, a Bloomfield 2015).

První klasifikace AML vznikla již v roce 1976, kdy bylo určeno 8 subtypů (M0-M7) na základě morfologie, cytologických a chemických vlastností buněk. V roce 2001 Světová zdravotní organizace WHO (World Health Organization) zveřejnila nový systém klasifikace, do kterého jsou zahrnuty recentní poznatky získané s rozvojem technologií. Poslední revize tohoto systému proběhla v roce 2016 (Arber *et al.* 2016). V této publikaci je AML rozdělena do skupin podle častých mutací, chromozomálních přestaveb a fúzí, změn spojených s myelodysplázií, neoplázií spojených s terapií a také dále nespecifikovaných abnormalit (Arber *et al.* 2016).

Jak je již naznačeno v předchozím odstavci, v posledních letech došlo k významnému pokroku ve studiu molekulární genetiky a epigentiky. Nové poznatky ovlivnily také výzkum v oblasti leukémií, který je zaměřen především na identifikaci molekulárně genetických změn podílejících se na procesu leukemogeneze. Detailní porozumění tohoto komplikovaného procesu je nezbytné pro identifikaci nových prognostických znaků, diagnostických směrů a následnou cílenou léčbu podtypů AML (Mayer, Starý 2002; Ding *et al.* 2012; Döhner, Weisdorf, a Bloomfield 2015).

Již před více než 15 lety byla popsána abnormální exprese homeoboxových (*HOX*) genů u závažně klasifikované akutní myeloidní leukémie (Drabkin *et al.* 2002). *HOXA9* byl jedním

z genů, který signifikantně koreloval s celkovým přežíváním pacientů s AML (Golub *et al.* 1999; Tholouli *et al.* 2012). *HOX* geny se podílejí na ontogenetickém vývoji živočichů a jsou evolučně velmi konzervované. Do skupiny *HOX* genů patří také rodina genů *DLX* (Distal-less homeobox). Geny *DLX* mají značný vliv na progresi řady tumorů jako gliomy, melanomy, nádory plic, prsu, prostaty, tlustého střeva nebo vaječníků a také leukémií (Yilmaz *et al.* 2011; Hara *et al.* 2007; Ferrari *et al.* 2003; S. Y. Lee *et al.* 2011; Starkova *et al.* 2011).

Analýza dat expresního profilování AML pacientů převzatých z databáze TCGA (The Cancer Genome Atlas) ukázala asociaci mezi expresí genu pro protein DLX1 a celkovým přežíváním pacientů s AML. U 197 analyzovaných pacientů nízká hladina exprese genu *DLX1* signifikantně korelovala s kratší dobou života pacientů. Tento vztah byl potvrzen také u pacientů s FLT3 (FMS like tyrosin kinase 3) mutací (n=46). Na základě těchto dat byla vytvořena modelová buněčná linie se sníženou expresí genu *DLX1* v monocytární leukemické linii MV4;11, které fenotyp jsme srovnávali s původní parentální linií s vysokou expresí DLX1 (Starkova *et al.*, nepublikovaná data).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je pokračovat v několikaletém výzkumu vedoucí projektu, RNDr. Júlie Starkové, PhD., která původně popsala regulaci transkripce genu *DLX1* protein kinázou FLT3. Tento protein je mutován u 30 % pacientů s AML a je asociován s horší prognózou. Naším cílem je studovat základní fenotypové projevy leukemických buněk pod vlivem rozdílné exprese genu *DLX1*, která byla pozorována u AML pacientů. Všechny experimenty byly provedeny na geneticky modifikovaných AML buněčných liniích, u kterých byla pomocí lentivirální transdukce vložena specifická vlásenková RNA (shRNA, short harpin RNA) a permanentně umlčen gen *DLX1* (dva klony - sh1 a sh2). Dále byla vytvořena kontrolní linie NSC (non silencing control; s lentivirálně vnesenou shRNA proti sekvenci nekomentární k lidské RNA). U sh1 a sh2 modelů byly pozorovány abnormality v buněčném cyklu a proliferaci v porovnání s kontrolní linií NSC a rozdíly v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Cílem této práce bylo:

- Objasnit rozdíly mezi buněčnými liniemi v *in vitro* podmínkách
 - Potvrzení správnosti modelu identifikací hladiny mRNA a proteinu DLX1 buněčných linií pomocí kvantitativní PCR (qPCR) a western blotu
 - Analýza buněčného cyklu značením barvami Pyronin Y a Hoechst 33342 a měřením na průtokovém cytometru
 - Určení množství proliferujících buněk značením Ki-67 a měřením na průtokovém cytometru
 - Zjistit vliv míry exprese genu *DLX1* na signální dráhu TGF- β pomocí western blotu, RNA interference a qPCR
 - Identifikace senescentních buněk na základě přítomnosti β -galaktozidázy asociované se senescencí (SA- β Gal)
 - *In vitro* kultivace buněčných linií a porovnání účinku cytostatika analýzou na průtokovém cytometru
- Studium vlivu rozdílné exprese genu *DLX1* v *in vivo* myším modelu
 - Detekce přihojení a počtu lidských leukemických buněk izolovaných z myší tkáně pomocí průtokového cytometru
 - Léčba myší po přihojení lidských leukemických buněk a porovnání její účinnosti u studovaných modelů
- Objasnění pozorovaných rozdílů v chování buněk v *in vitro* a *in vivo* podmínkách pomocí ko-kultivace leukemických buněčných linií společně s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSCs)
 - Stanovení počtu a životnosti leukemických buněk pěstovaných společně s MSCs v porovnání s buňkami kultivovanými ve stejných podmínkách bez MSCs
 - Analýza buněčného cyklu a porovnání rozdílu mezi leukemickými buňkami ko-kultivovanými s MSCs a buňkami kultivovanými ve stejných podmínkách bez MSCs pomocí průtokové cytometrie

- Určení počtu proliferujících a apoptotických leukemických buněk ko-kultivovaných s MSCs v porovnání s leukemickými buňkami kultivovanými ve stejných podmínkách bez MSCs pomocí průtokové cytometrie

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE

Akutní myeloidní leukémie je molekulárně i klinicky heterogenní onemocnění, které se může manifestovat do různých subtypů na základě cytogenetiky a morfologie (Ferrara a Schiffer 2013). Pacienti s AML se odlišují prognózou, která je ovlivněna několika prognostickými faktory (především karyotyp a věk pacienta) (Mayer, Starý 2002).

Během vzniku AML dochází k rapidní proliferaci progenitorových buněk myeloidní linie, u kterých došlo k inhibici diferenciaci v různých stádiích vývoje. Tyto leukemické buňky potlačují normální polyklonální hematopoézu a postupně vytlačí buňky zdravé. Následkem toho mohou pacienti trpět anémií (nedostatek červených krvinek), neutropenií (nedostatek bílých krvinek) nebo trombocytopenií (nedostatek krevních destiček) (Ferrara a Schiffer 2013).

Vývoj AML buňky je několikastupňový. Buňka během tohoto procesu získá řadu genetických aberací, které způsobují zástavu diferenciaci, ovlivňují epigenetickou kontrolu nebo indukují proliferaci regulací signálních drah a transkripčních faktorů (Döhner, Weisdorf, a Bloomfield 2015; Marcucci, Haferlach, a Döhner 2011). Recentní studie ukázaly, že k mutacím nedochází nezávisle na sobě, ale kooperativně během progresu onemocnění (Shih *et al.* 2015).

Léčbu AML značně ztěžuje mimo jiné také klonální heterogenita leukemických buněk. Obtížností účinné terapie se zabývá hned několik studií (Ding *et al.* 2012; Walter *et al.* 2012). Ding *et al.* popisují klonální evoluci buněk AML. Během rozvoje onemocnění se ustálí jeden dominantní klon, který produkuje další subklony s adičními mutacemi. Alespoň jeden ze subklonů nebo sám zakládající klon s dalšími výhodnými mutacemi překoná indukční terapii. Poté dochází k hromadění dalších mutací, ustanovení nového dominantního klonu a relapsu onemocnění (Ding *et al.* 2012). Relaps onemocnění souvisí právě s hromaděním nových mutací a klonální evolucí buněk. Jejich DNA je poškozeno cytotoxickými látkami během chemoterapie, které mohou zvyšovat mutační rychlost buněk (Ding *et al.* 2012).

Podle studie publikované skupinou Eppert *et al.* (2011) má pouze velmi malé množství leukemických buněk potenciál založit kolonie klonů *in vitro* a rozvinout leukémii v imunodeficientních myších. Buňky s tímto potenciálem sdílí řadu vlastností s kmenovými buňkami a také jsou výrazně více rezistentní k cytotoxické léčbě. Takové buňky bývají označovány jako leukemické kmenové buňky (Eppert *et al.* 2011).

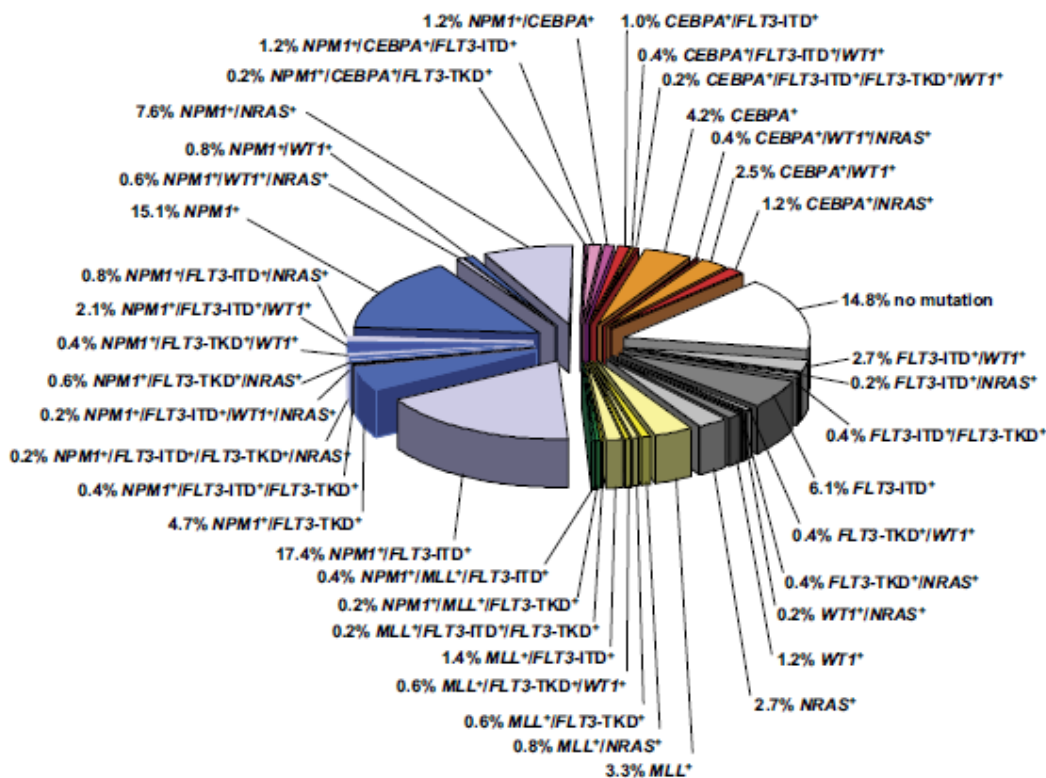
3.1.1 Genetické abnormality AML

Klonální cytogenetické abnormality jsou přítomny v buňkách více než poloviny pacientů s AML, jak opakovaně ukázaly studie (Saini *et al.* 2018; Grimwade *et al.* 2010; Patel *et al.* 2012; Walter *et al.* 2012). Některé z aberací jsou identifikovány u většiny pacientů, mohou být důležitým prediktivním faktorem a přispět k určení vhodné léčby pacienta.

Mutační analýzy pacientů a jejich následné rozdělení do skupin podle předpokládané závažnosti onemocnění a jeho průběhu jsou velmi užitečné při navrhování náležité terapie. Pokud jsou u pacienta nalezeny abnormality spojené se špatnou prognózou a nedostatečnou reakcí na běžnou terapii, může být takový pacient vhodným kandidátem pro allogenní transplantaci kmenových buněk nebo pro účast na klinických studiích (Patel *et al.* 2012)

Grimwalde *et. al.* (2010) se zaměřili na cytogenetické abnormality mladých dospělých s AML. Vypracovali cytogenetickou analýzu 5876 pacientů ve věku 16 až 59 let a zjistili, že 41 % procent z nich mělo běžný karyotyp bez abnormalit. Také zaznamenali významné rozdíly karyotypových abnormalit vzhledem k věku pacienta. Pro mladší pacienty byly typické balancované přestavby a pro starší pacienty naopak nebalancované abnormality včetně monozomií a trizomií (Grimwade *et al.* 2010).

Alespoň jedna chromozomální abnormalita byla identifikována u 97,3 % pacientů mladších 60 let ve vzorku 398 pacientů při analýze 18 genů. Mezi nejčastější z nich patřily tandemové duplikace genu pro FLT3 kinázu, částečné tandemové duplikace genu *MLL* (*mixed lineage leukemia*) nebo mutace genů *ASXL1* (*additional sex combs like 1*) a *PHF6* (*plant*



Obrázek 1 Graf znázorňující genetické abnormality spojené především s genem FLT3 u cytogeneticky normální AML; Převzato z Döhner *et al.* 2010

homeodomain (PHD)-like finger 6). Tyto aberace byly při analýze spojené s horší prognózou a kratším přežitím pacientů (Patel *et al.* 2012).

3.2 HOMEBOXOVÉ GENY

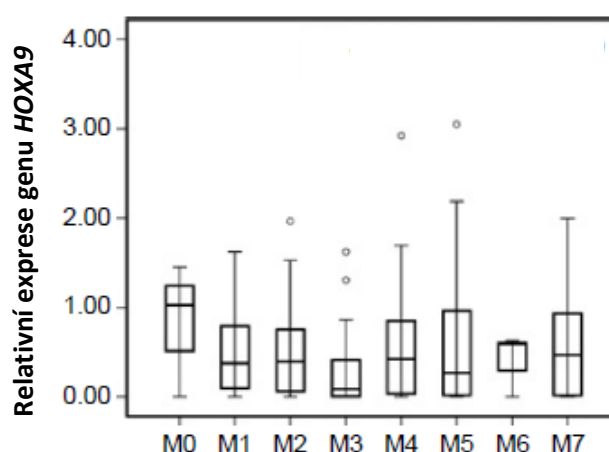
Homeoboxové geny kódují klíčové transkripční faktory, podílející se na vývoji, diferenciaci a proliferaci buněk. *HOX* geny savců jsou rozděleny do dvou tříd, 1. třída popisuje klastrované *HOX* geny, umístěné v genomu pohromadě. U člověka se nachází 39 klastrovaných *HOX* genů umístěných na chromozomech 7p15 (*HOXA*), 17q21 (*HOXB*), 12q13 (*HOXC*) a 2q31 (*HOXD*). Paralogy (*HOXA9*, *B9*, *C9*, *D9*) jsou příbuzně bližší, než geny umístěné blízko sebe na stejném klastru (Scott 1992).

2.třída zahrnuje *HOX* geny rozptýlené po genomu, jedná se o geny neklastrované (Scott 1992). Produkty obou tříd *HOX* genů ovlivňují jak embryonální vývoj, tak vývoj všech tkání včetně krevních buněk. Jejich správná funkce při regulaci buněčného vývoje je nezbytná pro normální vývoj jedince. Aberantní exprese *HOX* genů byla detekována u některých solidních nádorů i leukemických onemocnění (Argiropoulos a Humphries 2007).

3.2.1 *HOX* geny exprimované v AML buňkách

Pro potvrzení abnormální exprese *HOX* genů u AML byla použita qPCR pro určení míry exprese genů rodin *HOX* a *TALE* (*transcription activator-like effector*) u 34 pacientů s AML. Pro svou studii zvolili pacienti s karyotypem spojeným se špatnou prognózou (Wheatley *et al.* 1999) a s běžným karyotypem bez chromozomálních abnormalit. Zjistili, že pacienti s horší prognózou, určenou na základě chromozomálních aberací, exprimují *HOX* geny ve zvýšené míře v porovnání s pacienty s běžným karyotypem, především geny *HOXA9* a *HOXA10*. Naopak u pacientů s dobrou prognózou pozorovali velmi nízkou nebo vůbec žádnou expresi *HOX* genů (Drabkin *et al.* 2002).

Korelace mezi vysokou mírou exprese *HOX* genů a špatnou prognózou AML byla potvrzena i recentními studii (Tholouli *et al.* 2012; Gao *et al.* 2016). Abnormálně vysoká exprese genu *HOXA9* u případů nesoucích chromozomální aberace, spojené se špatnou prognózou ve srovnání s případy s normálním karyotypem, byla také popsána studií z roku 2016 (Gao *et al.* 2016).



Obrázek 2 Relativní exprese genu *HOXA9* u typů AML M0-M7 podle The French-American-British klasifikace; Převzato a upraveno z Gao *et al.* 2016

3.3 GENOVÁ RODINA *DLX*

Geny rodiny *DLX* (Distal-less homeobox) vykazují sekvenční homologii s *Drosophila* distal-less (*Dll*) geny (Ruddle 1994 podle Stock *et al.* 1996). *Dll* geny *Drosophily melanogaster* jsou nezbytné během časných stádií larválního vývoje, kde zajišťují správnou proximo-distální orientaci těla (Cohen a Jürgens 1989). *DLX* geny u savců sdílí velmi konzervovanou vazebnou doménu s *Dll* geny a jejich produkty jsou transkripční faktory (J. K. Liu *et al.* 1997; H. Zhang *et al.* 1997), které se podílí na vývoji kraniofaciálních struktur, mozku, smyslových orgánů, končetin, kostí a krve (Qiu *et al.* 1995; Anderson *et al.* 1997; Acampora *et al.* 1999; Shimamoto *et al.* 1997). V různých stádiích vývoje těla se hladina jejich exprese mění. Aberantní exprese těchto genů je spojována s různými typy tumorů (Hara *et al.* 2007; Yilmaz *et al.* 2011; Ferrari *et al.* 2003; S. Y. Lee *et al.* 2011; Starkova *et al.* 2011).

U člověka nalezneme 6 *DLX* genů v klastrech po párech *DLX1/DLX2*, *DLX3/DLX4* a *DLX5/DLX6* (Stock *et al.* 1996). Geny *DLX* jsou mimo jiné exprimovány v hematopoetických buňkách a mají důležitou funkci v kontrole správného průběhu krvetvorby (Chiba *et al.* 2003). Expresi genu *DLX4* (někdy také označován jako *DLX7*) v buňkách kostní dřeně popsal Shimamoto *et al.* (1997), zejména vysoká exprese tohoto genu byla zaznamenána v buňkách erytroidní linie (Shimamoto *et al.* 1997). Později byl gen *DLX1* identifikován jako negativní regulátor erythropoézy (Chiba *et al.* 2003).

3.3.1 Abnormální exprese genů *DLX* u rakovinných onemocnění

3.3.1.1 Gen *DLX4*

Hara *et al.* (2007) popsali aberantní expresi genu *DLX4* u rakoviny vaječníků a spojení s agresivnějším průběhem nemoci. Pomocí imunohistochemické analýzy klinických vzorků tkáně zaznamenali zvýšenou expresi genu *DLX4* v buňkách tumorů, ne však v tkáni zdravých vaječníků. Tento objev byl následně potvrzen q-PCR. Podle studie *DLX4* podporuje pro-angiogenní vlastnosti tumoru. Jeho abnormálně vysoká exprese indukovala zvýšení hladiny proteinu několika izoform proteinů FGF-2 (fibroblast growth factor-2) a VEGF (vascular endothelial growth factor), což může podporovat progresi nádorů (Hara *et al.* 2007).

V roce 2012 byla odhalena pozitivní korelace mezi transkripcí genu *DLX4* a invazivitou tumorů rakoviny prsu. *In vitro* buněčné linie rakoviny prsu se zvýšenou hladinou exprese genu *DLX4* vykazovali významně vyšší migrační aktivitu v porovnání s buňkami s normální expesí toho genu. Abnormálně vysoká exprese genu *DLX4* tím pádem přispívá k migrační a invazivní aktivitě nádorových buněk rakoviny prsu (L. Zhang *et al.* 2012).

Jedna z izoform proteinu *DLX4*, *BP1*, pravděpodobně přímo váže a reprimuje expresi genu *BRCA1* (breast cancer 1) u nedědičných forem rakovin prsu (Kluk *et al.* 2010).

3.3.1.2 Geny *DLX5/6*

Zvýšená exprese genu *DLX5* byla popsána u případů rakovin plic (Kato *et al.* 2008; Xu a Testa 2009). Kato *et al.* v roce 2008 identifikovali přítomnost proteinu *DLX5* u většiny případů

rakoviny plic (369 pacientů, non-small cell lung cancer) pomocí northern blotu a imunohistochemické analýzy. Rovněž popsali pozitivní korelaci mezi rozsahem detekce tohoto proteinu a velikostí tumoru. Toto pozorování se jim podařilo potvrdit i na *in vitro* modelu, kdy snížili expresi genu *DLX5* pomocí shRNA vpravené do buněčných linií SBC-5 a NCIH1781 pomocí plazmidového vektoru. Tyto buňky rakoviny plic se sníženou expresí genu *DLX5* v kultuře rostly znatelně méně. Protein DLX5 skupina identifikovala především v jaderné proteinové frakci, což by mohlo znamenat, že sám aktivuje nebo se alespoň podílí na aktivaci genů typických pro rozvoj rakoviny plic (Kato *et al.* 2008).

V další studii (Xu a Testa 2009) byla popsána pozitivní korelace mezi zvýšenou expresí genu *DLX5* a vyšší hladinou mRNA a proteinu Myc v buněčné linii Jurkat. Buňky linie Jurkat úspěšně transfekovali plazmidem se zvýšenou expresí genu *DLX5*, což mělo za následek zvýšení transkriptu i proteinu onkogenu Myc. Skupina předpokládá, že se protein DLX5 může přímo vázat na promotor genu Myc. Jejich výsledky společně s daty z dřívější studie (Kato *et al.* 2008) naznačují, že protein DLX5 reguluje buněčnou proliferaci částečně regulací exprese genu *Myc* (Xu a Testa 2009).

Morini *et al.* spojuje gen *DLX5*, společně s genem *DLX6*, se sekundárními tumory a schopností tumorů metastázovat (Morini *et al.* 2010). Autoři publikace se zaměřili na stanovení míry exprese genů *DLX5/6* a *DLX2* v buněčné linii rakoviny prsu MDA-MB-231. Během experimentů *in vitro* sledovali hladinu exprese těchto genů a zaznamenali zvýšené množství transkriptu genu *DLX2*, ovšem ne genů *DLX5/6*. Toto pozorování potvrdili *in vivo* v primárním tumoru u myši (nude mice), kterým byly transplantovány MDA-MB-231 buňky. V metastázách kostí a plic těchto myši pomocí PCR zaznamenali naopak mRNA genů *DLX5/6* a nikoliv genu *DLX2* (Morini *et al.* 2010).

Podobný fenomén skupina pozorovala i u buněk rakoviny prsu získaných z tkáně pacientů s tímto onemocněním s tím rozdílem, že metastázy vykazovali zvýšenou expresi pouze genu *DLX5* (Morini *et al.* 2010).

Morini *et al.* ze svých dat vyvodili, že jsou geny *DLX2* a *DLX5* důležitými regulátory rozvoje rakoviny prsu a pro přechod těchto buněk do metastatického stádia je nutné částečné umlčení exprese genu *DLX2* a zvýšení exprese genu *DLX5*. Kombinace exprese těchto genů, jak je popsána výše, je spojená s horší prognózou onemocnění a považována za prognostický marker (Morini *et al.* 2010).

3.3.1.3 Gen *DLX2*

Gen *DLX2* pravděpodobně hraje důležitou roli při diferenciaci a proliferaci buněk a obdobně reguluje neuronální specifikaci. Působí v dráze EGFR (epidermal growth factor receptor), a i když není jasné jak přesně, mohl by tímto způsobem ovlivňovat proliferaci a homeostázu buněk (Suh *et al.* 2009).

V roce 2011 byla provedena analýza hladiny exprese genu *DLX2* u tkáně různých typů solidních tumorů (S. Y. Lee *et al.* 2011). Hladina mRNA byla vyšší u tumorů prsu a vaječníků v porovnání se vzorky zdravé tkáně. (S. Y. Lee *et al.* 2011).

Kromě toho skupina provedla *in vitro* testy, kdy transfekovali buněčnou linii MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) vektorem nesoucím gen *DLX2*. To způsobilo morfologické změny buněk, které poukazují na to, že zvýšená exprese tohoto genu hrát roli při vzniku metastází tumorů (S. Y. Lee *et al.* 2011).

Aberantní exprese genu *DLX2* byla identifikována také u adenokarcinomů žaludku (Tang 2013). Jeho exprese byla detekována u 52,7 % pacientů s touto chorobou a pouze u 23,3 % kontrolních vzorků. Významně zvýšená exprese genu *DLX2* byla zaznamenána u 37,2 % vzorků adenokarcinomu žaludku a žádného z kontrolních vzorků. Mimo to Tang *et al.* našli souvislost mezi vysokou hladinou exprese *DLX2* a kratší dobou přežití pacientů (Tang *et al.* 2013)

U linie jaterních buněk HepG2 (Hepatoma G2) byla zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou exprese genu *DLX2* a zvýšenou proliferací buněk pomocí průtokové cytometrie a western blot analýzy. Zároveň byla u pacientů s hepatokarcinomem s kratší dobou života po propuknutí onemocnění popsána signifikantně zvýšená exprese genu *DLX2* (J. Liu *et al.* 2016). Autoři studie předpokládají, že se jedná o regulátor buněčné proliferace a buněčného cyklu (J. Liu *et al.* 2016).

3.3.1.4 Gen *DLX1*

Analýzou dat z Cancer genome database byla zjištěna souvislost mezi horší prognózou pacientů s AML a zvýšenou expresí genů *DLX1/2*, potvrzena jak na úrovni transkriptu, tak na úrovni proteinu. Zvýšená exprese genů *DLX1/2* může být následkem konstitutivní aktivity kinázy FLT3 způsobené mutací, která se nachází u zhruba 30 % případů AML pacientů. Vzájemná korelace mezi těmito dvěma faktory byla potvrzena i na AML buněčných liniích MV4;11 a RS4;11 (Starkova *et al.* 2011 a nepublikovaná data). Signální dráha kinázy FLT3 v leukemických buňkách by mohla pomocí zvýšené exprese genů *DLX1/2* obcházet inhibiční účinky TGF- β signální dráhy a podporovat růst nádorových buněk.

Mutace genu pro FLT3 kinázu, která způsobí její nadměrnou aktivitu, vede ke zvýšení množství transkriptu genů *DLX1/2* a stejně tak ke zvýšení hladiny proteinů *DLX1/2* u buněčných linií. Stejný jev byl potvrzen na mRNA úrovni patientských vzorků s AML. Mimo to Starková *et al.* ukázali, že proteiny *DLX1/2* ovlivňují cílové geny dráhy TGF- β a následně i buněčný růst a proliferaci (Starkova *et al.* 2011, nepublikovaná data).

In vitro experimenty na COS7, NIH 3T3, HepG2 a C2C12 buněčných liniích popisují, že gen *DLX1* je exprimován v lidských krevních buňkách a jeho produkt, protein *DLX1*, je lokalizován především v buněčném jádře, kde snižuje aktivitu několika cílových elementů TGF- β dráhy (Chiba *et al.* 2003). *In vivo* i *in vitro* tumorogenní eseje naznačují, že gen *DLX1* pozitivně reguluje buněčný růst, migraci a invazivní charakter buněk rakoviny vaječníků v pokročilém stádiu (Chan *et al.* 2017). Podle této studie produkt genu, protein *DLX1*, ovlivňuje kanonickou dráhu TGF- β (Chan *et al.* 2017).

3.4 FLT3 (FMS-LIKE TYROSINE KINASE) KINÁZA A AML

Gen pro FMS-like tyrosin kinázu (FLT3) kóduje receptor tyrosin kinázu, která je lokalizovaná v membráně a hraje zásadní roli v krvevorbě.

FLT3 gen je exprimován v placentě, mozku a nezralých krevních buňkách (deLapeyriere 1995 podle Gilliland 2002). Ve zdravé kostní dřeni je tento gen exprimován pouze v časných progenitorových buňkách (Rosnet 1996 podle Gilliland 2002). Většina immortalizovaných buněčných linií hematopoetických buněk exprimuje gen *FLT3* (Brasel 1995 podle Stirewalt a Radich 2003). Kináza FLT3 je aktivovaná ligandem FLT3 a v *in vitro* podmínkách podporuje buněčný růst.

První popsal mutace kinázy FLT3 při poruchách krvevorbě v roce 1996 Nakao *et al.* (podle Stirewalt a Radich 2003). FLT3-ITD (internal tandem duplication) mutace způsobí konstitutivní aktivaci receptor tyrosin kinázy (RTK) a návazné signální dráhy, což má za následek aberantní regulaci buněčné proliferace (Hayakawa *et al.* 2000). Právě tento typ mutace způsobuje dimerizaci tyrosin kinázové domény bez nutnosti interakce s ligandem. Buněčný růst tedy probíhá bez stimulace ligandem (Stirewalt a Radich 2003).

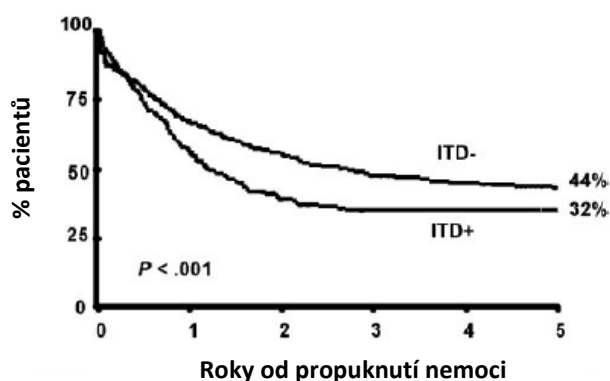
Mutace genu FLT3 kinázy byly popsány u ALL (1-3 %), myelodisplázie (5-10 %) a AML (15-35 %) (Stirewalt a Radich 2003). Kottaridis *et al.* (2002) popsali, že 27 % zkoumaných AML pacientů (ze vzorku 854 pacientů) neslo FLT3-ITD.

Při srovnání vzorků AML a zdravými vyšlo najevo, že mutace genu *TET2* (Tet (ten-eleven translocation) methylcytosine dioxygenase 2) mohou být nezbytné pro vznik pre-leukemické buňky a následnému rozvoji onemocnění (Genovese *et al.* 2014; Shih *et al.* 2015).

Mutace *TET2* genu právě spolu s FLT3-ITD dají společně vznik AML buňkám s unikátními epigenetickými a transkripčními aberacemi. *In vivo* studie na myším modelu, kde byla abnormálně zvýšena exprese obou genů, potvrdila očekávání autorů studie – u myší se během života rozvinuly poruchu krvevorbě (Shih *et al.* 2015).

Pacienti s AML mající FLT3-ITD mutace sdílí několik klinických charakteristik, jako je zvýšený počet bílých krvinek a také vyšší množství leukemických myeloblastů v kostí dřeni a krvi (Frohling *et al.* 2002; Thiede *et al.* 2002). FLT3-ITD mutace kinázy se objevují u pacientů jak s normálními karyotypy, tak u karyotypů s chromozomálními translokacemi, a také jsou spojované s horší prognózou pacientů (Frohling *et al.* 2002, Thiede *et al.* 2002).

Hayakawa *et. al* v roce 2000 porovnávali linie buněk s mutovanou (ITD) a nemutovanou FLT3 kinázou u dvou IL-3 (interleukin 3) dependentních linií buněk – 32D a BA/F3, aby



Obrázek 3 Kaplan Meierova křivka pacientů s FLT3-ITD a bez; převzato a upraveno z Kottaridis *et al.* 2002

dokázali konstitutivní aktivaci dráhy při mutaci genu pro kinázu (konkrétně pro její receptorovou doménu). Dále také sledovali MAP (mitogen-activated protein) kinázovou dráhu a STAT (signal transducers and activators of transcription) dráhu. V obou liniích s mutací došlo k autonomnímu růstu buněk a aktivaci MAP kinázové dráhy a proteinu STAT5. U buněk s nemutovanou kinázou byla pozorována pouze aktivace MAP kinázové dráhy po stimulaci FLT3 ligandem a buněčný růst byl minimální. Mimo to tyto buněčné linie s mutovanou kinázou proliferovali a byly z 90 % viabilní i v nepřítomnosti IL-3. Zatímco nemutované linie snížili svoji proliferaci zhruba na třetinu a jejich viabilita se snížila až o 70 %. Navíc byla tato konstitutivní aktivace dvou výše zmíněných drah detekována i u všech leukemických myeloblastů pacientů s AML se zjištěnou mutací FLT3-ITD (Hayakawa *et al.* 2000).

Analýza zaměřená na rozdíl vlivu mutací FLT3 kinázy na různé typy karyotypů u 481 pacientů s AML byla provedena v roce 2011 (Santos *et al.* 2011). Autoři této publikace našli korelaci mezi mutací FLT3-ITD a kratší dobou přežití po propuknutí onemocnění pacientů s normálním karyotypem. Pacienti s normálním karyotypem a mutací v FLT3-ITD také měli více bílých krvinek a více leukemických myeloblastů v porovnání s pacienty s nemutovanou FLT3 kinázou (Santos *et al.* 2011).

3.5 DRÁHA TGF- β (TRANSFORMING GROWTH FACTOR β)

TGF- β je považován za pleiotropní faktor. Hraje roli v mnoha regulačních procesech, především reguluje obnovu tkáně a vývoj somatických buněk (Sporn 1991 podle Fortunel *et al.* 2000). Ligand dráhy TGF- β , TGF- β L, aktivuje dva typy receptorů. Nejprve se váže na TGF- β receptor druhého typu (T β RII), což je konstitutivně aktivní serin/threonin kináza. TGF- β receptor prvního typu (T β RI) je následně rozpoznán a přiveden ke komplexu receptoru II a TGF- β L, kde dochází k jeho fosforylaci pomocí T β RII. Fosforylovaný T β RI dále předá signál dalším elementům signální dráhy uvnitř buňky, a to proteinům SMAD2/3. Po aktivaci SMAD2/3 proteiny tvoří komplex s proteinem SMAD4 a putují do jádra, kde fungují jako transkripční faktory (Fortunel *et al.* 2000; Wrana *et al.* 1992).

TGF- β udržuje homeostázu tím, že zastavuje buněčný růst a způsobuje apoptózu (Massagué 2008). Duální povaha funkce tohoto faktoru ale významně ovlivňuje také iniciaci a progresi tumorů. Tumor supresivní funkce TGF- β signální dráhy spočívá ve SMAD dependentní kanonické dráze. Nádorové buňky mohou překonat tumor supresorové účinky TGF- β dráhy inaktivací transkripčních faktorů a následným umlčením exprese cílových genů nebo zablokováním vstupních komponent dráhy, TGF- β receptorů.

Mutace v T β RII a T β RI bývají časté u nádorů. Častá disfunkce některého z komponentů TGF- β dráhy u různých typů nádorů vypovídá o důležitosti tumor supresorové funkce této dráhy (Massagué 2008).

3.5.1 Vztah TGF- β a genů *DLX*

Protein DLX2 byl identifikován jako transkripční represor genu pro T β RII (Yilmaz *et al.*, 2011). Množství proteinu T β RII bylo sníženo v buňkách se zvýšenou expresí genu *DLX2*.

Po vystavení buněk B16 melanomu TGF- β L byla detekována vysoká hladina transkriptu i proteinu DLX2. Zvýšená exprese genu *DLX2* byla detekována především v jádře. V buňkách s vyřazeným genem pro SMAD4 ke zvýšení exprese genu nedošlo (Yilmaz *et al.* 2011). Na základě těchto pozorování lze vyvodit, že protein DLX2 reguluje kanonickou SMAD dependentní signální cestu TGF- β dráhy. Zároveň snižuje expresi inhibitoru buněčného cyklu p21CIP1 a zvyšuje expresi mitogenního transkripčního faktoru c-Myc. Tato data podle autorů publikace naznačují, že má DLX2 kritickou roli v potlačení tumor supresorové funkce TGF- β dráhy a rozvoji její role v progresi tumorů (Yilmaz *et al.* 2011).

Chiba *et al.* v roce 2003 popsali tezi, že protein DLX1 přímo váže protein SMAD4 a blokuje řadu výstupních signálů dráhy TGF- β . Během experimentů prováděných na buněčných liniích COS7, NIH 3T3, HepG2 a C2C12 zjistili, že protein DLX1 s největší pravděpodobností přímo váže jak SMAD4, tak SMAD2/3 a blokuje aktivitu dráhy TGF- β . Také předpokládají, že je tento protein lokalizován především v jádře buněk (Chiba *et al.* 2003).

V jádrech buněk rakoviny vaječníků byla popsána interakce proteinů DLX1 a SMAD4 za stimulace TGF- β dráhy (Chan *et al.* 2017). Následně se studie zaměřila na to, jak tato interakce ovlivňuje další regulátory buněčného cyklu (např. p15Ink4B, p18Ink4c a p27Kip1). Změny byly pozorovány u dvou z nich. Hladiny p21 WAP1/Cip1 a p15Ink4B byly sníženy. Výsledky studie naznačují, že DLX1 podporuje rakovinné bujení u rakoviny vaječníků supresí TGF- β dráhy a jí indukovaného p21 WAP1/Cip1 a také částečnou inhibicí p15Ink4B (Chan *et al.* 2017).

Na druhou stranu, exprese genu *PAI-1* (plasminogen aktivator inhibitor 1), byla signifikantně zvýšená v buňkách se zvýšenou expresí genu *DLX1* v porovnání s kontrolními buňkami. Tento gen je jedním z cílů dráhy TGF- β a je spojován s migrací a invazí nádorových buněk. Tento fakt by mohl znamenat, že gen *PAI-1* je přímým cílem proteinu DLX1 a jeho transkripce může být aktivována proteinem DLX1 v interakci s proteinem SMAD4 (Chan *et al.* 2017).

V roce 2016 byla publikována další studie zaměřená na dráhu TGF- β a člena genové rodiny DLX. Chan *et al.* sledovali roli genu *DLX2* v TGF- β dráze po radiaci buněk. Skupina použila buňky linií A549 a MDA-MB-231, ve kterých po ozáření sledovala nárůst exprese genu *DLX2*. Následkem této zvýšené exprese došlo k radiorezistenci, indukci invaze a migraci buněk.

Pomocí klonogenní eseje skupina pozorovala významně snížené přežívání ozářených buněk při snížení exprese genu *DLX2*. Také byla zaznamenána zvýšená fosforylace proteinu SMAD2/3 u buněk pro ozáření. Po umlčení SMAD2/3 pomocí siRNA došlo k přerušení zvýšené exprese genu *DLX2* po ozáření buněk, což naznačuje, že je takto vysoká exprese indukovaná ozářením závislá na SMAD2/3 signalizaci a gen *DLX2* je cílovým genem fosforylovaných SMAD2/3 (Choi *et al.* 2016).

3.6 MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

Zásadní roli při progresu onemocnění a odpovědi na terapii hraje také mikroprostředí leukemických buněk a jejich vzájemné působení s okolními buňkami. Některé studie popsali interakci leukemických buněk AML a mezenchymálních kmenových buněk (MSCs – mesenchymal stem cells), nicméně tato problematika není zcela objasněna.

Panayiotidis *et al.* již v roce 1996 publikovali studii zaměřenou na interakci MSCs s buňkami chronické lymfoidní leukémie. MSCs podle nich podporují přežívání CLL buněk *in vitro*, chrání je před apoptózou a mění jejich citlivost na chemikálie. Právě takováto regulace může mít významný vliv na heterogenní odpověď pacientů na terapii (Panayiotidis *et al.* 1996).

Tent fenomén byl popsán i u HL-60 linie buněk AML během *in vitro* studie (Konopleva *et al.* 2002), kdy byly buňky pěstované společně s myšími MSCs (MS-5 buněčná linie). Skupina měřila množství apoptických buněk na průtokovém cytometru. Při porovnání leukemických buněk pěstovaných společně s MSCs a bez MSCs zjistili, že množství apoptických buněk se lišilo až o 33 % ve prospěch buněk pěstovaných s MSCs. Podobně se lišilo množství apoptických buněk i při přidání cytarabinu pro indukci apoptózy. Zároveň ale pozorovali snížený růst a množství proliferujících leukemických buněk v G1/MS fázi buněčného cyklu v přítomnosti MSCs v porovnání s buňkami pěstovanými bez MSCs (Konopleva *et al.* 2002).

Zajímavá může být i druhá strana této interakce, a to jaký vliv mají leukemické buňky na mezenchymální kmenové buňky. Dle skupiny Frisch *et al.* (2012) buňky AML ovlivňují funkci osteoblastů, narušují homeostázu mikroprostředí kostní dřene a krvetvorbu v *in vivo* myším modelu (Frisch *et al.* 2012). Později byly publikovány další studie potvrzující vliv AML buněk na MSCs u lidí. Sorokina *et al.* (2016) izolovali MSCs pacientů s AML, ALL a CML a srovnávali je s kontrolními buňkami ze zdravých jedinců. Pacienti s AML a ALL vykazovali sníženou produkci MSCs a abnormálně sníženou expresi některých genů (*FGF2*, *VEGF*, *SX9*), zatímco u pacientů s CML tyto abnormality nebyly pozorovány (Sorokina *et al.* 2016). Podle Boyd *et al.* (2017) buňky AML ovlivňují funkce a diferenciaci MSCs v kostní dřeni a narušují normální krvetvorbu (Boyd *et al.* 2017). Snížená proliferace MSCs pěstovaných společně s AML buňkami byla popsána znovu, zároveň s metylačními změnami v promotorech genů *HOXA5* a *HOXA3* a zvýšenou expresí těchto dvou genů (Geyh *et al.* 2016).

Tato data vypovídají o důležitosti interakce leukemických buněk s okolním mikroprostředím a jejich vlivu na alterace krvetvorby, mimo jiné, i AML.

3.7 SOUČASNÁ LÉČBA AML

3.7.1 Standartní terapie

Pacienti s AML nejprve podstoupí indukční terapii, dokud není nedosaženo kompletní remise, úplného vymizení leukemických krevních buněk a známek nemoci. Bohužel je běžné, že ke kompletnímu vyléčení nedojde a při přerušení léčby se onemocnění vrátí (relaps onemocnění). Z toho důvodu úspěšná indukční terapie pokračuje konsolidační terapií (Kayser a Levis 2014).

Standardní indukční terapie se skládá z 3denního podávání idarubicinu (12 mg/m² denně) nebo daunorubicinu (60 mg/m² denně) a následným 7denním podáváním cytarabinu. Standartní dávka cytarabinu je 100–200 mg/m² denně. Většinou je tato terapie nabídnuta pacientům s lepší prognózou (Estey 2014).

Optimální terapie pro starší pacienty nebyla dosud ustanovena. Pacienti nad 65 let jsou častěji řazeni do skupiny karyotypu s horší prognózou a s větší pravděpodobností u nich nebude běžná terapie účinná. Mimo to jsou citlivější na cytotoxicitu způsobenou chemoterapií (Kayser a Levis 2014).

3.7.2 Nové terapeutické možnosti

Recentně jsou testovány nové terapeutické přístupy, jako například inhibitory RTK, nukleosidové analogy, monoklonální protilátky nebo CART (chimeric antigen receptor-T cells) terapie (Kayser a Levis 2014).

Inhibitory RTK jsou vhodné pro terapii pacientů s FLT3-ITD. Mezi tyto inhibitory patří Sorafenib, jehož použití vede k signifikantní redukci počtu leukemických buněk v periferní krvi i kostní dřeni u AML pacientů. Borthakur *et al.* (2011) popisují snížení leukemických myeloblastů v krvi a kostní dřeni u 34 % pacientů a úplné vymizení maligních buněk u 10 % pacientů s FLT3-ITD mutací (Borthakur *et al.* 2011). Nicméně má tento lék vedlejší účinky a dochází k relapsu onemocnění.

V úvahu připadá i kombinace Sorafenibu s některým běžně používaným cytostatikem. Zlepšení průběhu terapie u starších pacientů s touto kombinací léčiv popsala další studie (Uy *et al.* 2017), opět zaměřená na pacienty s mutací FLT3-ITD. Pacientům ve studii bylo podáváno 400 mg Sofarenibu každých 12 hodin v kombinaci se standartní dávkou Daunorubicinu nebo Cytarabinu po dobu 7 dní s následnou konsolidační terapií (Uy *et al.* 2017). Mezi další inhibitory FLT3 kinázy patří např. Midostaurin nebo Quizartinib.

Další možností jsou inhibitory STAT3, malé molekuly, jako například látka OPB-31121. Pod vlivem této látky byla fosforylace STAT3 *in vitro* výrazně snížena a také byl inhibován růst několika typů maligních krevních buněk (Hayakawa *et al.* 2013). Jiná studie (D. Lee *et al.* 2016) našla pozitivní korelaci mezi nízkou expresí genu pro další inhibitor STAT3, UT2, a dobou přežití pacientů s mnohočetným myelomem (MM - multiple myeloma, maligní onemocnění krve tvorby) (D. Lee *et al.* 2016).

Clofarabine je analog purinového nukleosidu, je to léčivo druhé generace a je schválen v léčbě relapsu onemocnění dětských ALL (Kayser a Levis 2014). V roce 2012 byla provedená studie porovnávající účinky cytarabinu a kombinace cytarabinu s clofarabinem (40 mg/m^2) u pacientů starších 55 let s relapsem AML. Skupina, u které byla použita kombinace léků byla zvýšena doba přežití (Faderl *et al.* 2012). I novější studie (Jabbour *et al.* 2017) předpokládá možné zlepšení výsledků terapie použitím (indukčně i konsolidačně) nukleotidových analogů clofarabinu nebo fludarabinu (15 mg/m^2 a 30 mg/m^2 denně, 5 dní) v kombinaci s cytarabinem a idarubicinem (1 g/m^2 a 10 mg/m^2 denně, 5 a 3 dny), především u mladších pacientů (Jabbour *et al.* 2017).

Monoklonální protilátky cílené na povrchové proteiny maligních buněk jsou konjugovány s cytotoxickými agens, např. calicheamicinem, který láme DNA. S touto látkou je konjugován Gemtuzumab Ozogamicin (GO), humanizovaná protilátka cílená na receptor CD33, vyskytující se na povrchu buněk myeloidní linie. Podle některých studií byl tento lék shledán příliš toxickým bez zlepšení účinnosti terapie (Petersdorf *et al.* 2013). Amadori *et al.* (2016) popsali zlepšení u starších pacientů (61 let a více), kteří nejsou vhodnými kandidáty pro intenzivní terapii běžně používanými cytostatiky (Amadori *et al.* 2016).

CAR-T (chimeric antigen receptor-T cells) terapie je založená na syntetických receptorech T-buněk, bohužel ale ničí jak maligní, tak zdravé buňky, což způsobuje značné komplikace. Terapie se tedy pokouší zaměřit na specifické markery maligních krevních buněk, jako například FR-B (folate receptor family beta) (Ross *et al.* 1999). *In vitro* studie (Lynn *et al.* 2015) potvrdila lytickou aktivitu FR-B specifického CAR-T proti AML buňkám a zároveň nebyla pozorována toxicita na lidské kmenové buňky (Lynn *et al.* 2015).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 BUNĚČNÉ LINIE

4.1.1 Použité buněčné linie

MV4;11, pocházející z buněk akutní myeloidní leukémie. Linie pochází z desetiletého pacienta s akutní myeloidní leukémií (typ AML M5). Tyto buňky nesou translokaci t(4;11) a FLT3-ITD.

Do lentivirálního vektoru byl zaklonován plazmid pGhU6 s reportérovým genem pro GFP (green fluorescent protein) a pomocí tohoto vektoru nesoucího shRNA byl v linii MV4;11 umlčen gen *DLX1*, s nejvyšší účinností u dvou linií – sh1 a sh2. Tyto dvě linie, společně s kontrolní linií NSC, byly použity při dále popsanych metodách.

MSCs (mesenchymal stem cells), imortalizované lidské mezenchymální kmenové buňky kostní dřene hTERT (abm®), byly vytvořeny infekcí primárních mezenchymálních buněk retrovirem nesoucím geny pro hTERT (telomerase reverse transcriptase) a GFP (abm®).

4.1.2 Uchovávání buněčných linií

Během zamrazování buněk byla nejprve vytvořena peleta s 5-10 miliony (M) buněk centrifugací (5 min, 200xg), která byla následně resuspendována v 1 ml média s 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Life Technologies™) a 10% DMSO (dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich®) a přenesena do zamrazovací zkumavky (NUNC™ CryoTube™ Vials, Thermo Scientific). Zkumavky byly vloženy do nádoby Mr. Frosty™ (Thermo Scientific™) a na nejméně 24 hodin uloženy do mrazáku s teplotou -80 °C. Poté byly zkumavky s buňkami přeneseny do nádob s tekutým dusíkem, kde jsou dlouhodobě skladovány všechny buněčné linie.

Rozmrazování buněk probíhalo v 37 °C vodní lázni. Při manipulaci bylo nutné dbát na zachování sterility a snížení rizika kontaminace. Po rozmrznutí suspenze byly zkumavky rychle přeneseny do sterilního prostředí laminárního boxu. Do předem připravených falkon s médiem byla pipetou překapána suspenze buněk a následně centrifugována (5 min, 200xg). Po odlití supernatantu byla peleta resuspendována v 1 ml média a buňky nasazeny do odpovídajícího množství média při koncentraci přibližně 0,5 M/ml (závislé na konkrétní buněčné linii). Po 24 hodinách byly buňky zkontrolovány a dle potřeby upravena jejich koncentrace v médiu.

4.1.3 Kultivace buněčných linií

Všechny buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru v 37 °C a 5 % CO₂, běžně pěstované v 15 ml média v 75cm² kultivačních lahvích (Techno Plastic Products™).

Linie NSC, sh1 a sh2 byly pěstovány v RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640 médiu (GlutaMAX™ Life Technologies™) s 10% FBS a 1% antibiotiky (Antibiotic-Antimycotic, 100x koncentrované, Life Technologies™). MSCs byly pěstovány v PriGrow IV mediu (abm®) s 10% FBS a 1% antibiotiky.

4.1.3.1 *Ko-kultivace leukemických linií a MSCs*

Společná kultivace leukemických linií a MSCs byla prováděna ve speciálních 24jamkových destičkách s inzerty (Transwell® permeable supports, Costar™). MSCs byly připravovány několik dní předem, aby byl dostatek času pro přisednutí na povrch inzertu, kam byly nasazeny v koncentraci 30 tis/100 µl. Do jamky samotné byly nasazeny leukemické linie v koncentraci 200 tis/700 µl a do jamky byl následně vložen předpřipravený inzert s MSCs ve 100 µl média. Obě buněčné linie byly v tomto případě pěstovány v médiu RPMI 1640.

4.1.4 *Pasážování buněčných linií*

Prvním krokem bylo odebrání suspenze buněk z kultivačních lahví a její přenesení do 50 ml falkony v laminárním boxu. Následně byla suspenze centrifugována (5 min, 200xg) a přenesena zpět do boxu, kde byl odlit supernatant a ponechána pouze peleta. Ta byla resuspendována v 1 ml média a potřebné množství buněk bylo nasazeno do čerstvého média.

4.1.4.1 *Leukemické linie*

Linie NSC, sh1 a sh2 byly pasážovány dvakrát týdně ve sterilním prostředí laminárního boxu a nasazovány v koncentraci 0,5 M/ml.

4.1.4.2 *Mezenchymální kmenové buňky*

MSCs byly pasážovány jednou týdně. Nejprve bylo odebráno médium, poté byla kultivační lahev promyta v PBS (Phosphate Buffered Saline) a nakonec byl přidán trypsin (0,5% Trypsin-EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 10× koncentrovaná, Life Technologies™) pro oddělení buněk od povrchu (3 ml, max. 5 min v inkubátoru). Poté bylo přidáno 10 ml média a buňky centrifugovány (5 min, 200xg). Vždy byla použita nová kultivační lahev předem pokrytá kolagenem (nejméně 20 min v inkubátoru, Coating Matrix Kit Protein, Life Technologies™) a buňky byly nasazeny v koncentraci 0,3 M/ml.

4.1.5 *Počítání a měření životnosti buněk*

Buňky byly počítány po každé centrifugaci na automatickém přístroji Countess™ (Countess™ automated cell counter, Invitrogen™) a také na novém přístroji NucleoCounter® NC-3000™ (ChemoMetec™).

Přístroj Countess: Po centrifugaci a resuspendování buněk v 1 ml média bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze do 96jamkové destičky, v případě nutnosti byly buňky naředěny (přidáno 90 µl média, z naředěné suspenze odebráno 10 µl), přidáno 10 µl trypanové modři (Invitrogen™) a promícháno pipetou. Z destičky bylo odebráno 10 µl mixu buněk a barvy, který byl následně přenesen do dvoukomorového sklíčka (Invitrogen Countess™). Sklíčko bylo vloženo do přístroje, který vypočítal množství buněk/ml a stanovil procento živých buněk.

Přístroj NucleoCounter® NC-3000™: Po resuspendování buněk v 1 ml média bylo odebráno 10 µl suspenze do 96jamkové destičky a buňky byly naředěny (přidáno 90 µl média), z naředěné suspenze odebráno 19 µl a přidán 1 µl komerčního roztoku od stejné firmy

(obsahující DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), dle protokolu mix buněk s roztokem v poměru 19:1). Z připraveného mixu bylo přeneseno zhruba 10 μ l do osmikomorového sklíčka od stejné firmy, které bylo následně vloženo do přístroje. Ten stanovil množství buněk/ml a procento živých buněk.

4.1.6 Buněčné pelety

Požadované množství buněk bylo centrifugováno (5 min, 400xg). Poté byl odlit supernatant a přidáno přibližně 1,5 ml PBS, ve kterém byly buňky resuspendovány a pipetou přeneseny do mikrozkušavek (EPPENDORF®, 1,5 ml). Mikrozkušavky s buněčnou suspenzí byly centrifugovány v mikrocentrifuze (5 min, 400xg), poté byl pipetou opatrně odebrán supernatant a peleta byla znovu promyta PBS stejným způsobem. Nakonec byla peleta zbavena veškerého supernatantu a skladována v mrazáku (-80 °C) do použití.

4.2 *IN VITRO* LÉČBA

Buněčné linie byly vystaveny cytostatikům Ara-C (cytosin arabinoside, Cytarabin) a Doxo (Doxorubicin) ve dvou různých koncentracích a porovnány s kontrolou. Práce s buňkami byla provedena sterilně v laminárním boxu.

4.2.1 Cytosin arabinose (Ara-C)

Všechny buněčné linie byly nasazeny v triplikátu pro každou koncentraci cytarabinu, kontrolu a časový bod do 24jamkové destičky v koncentraci 50 tis/ml. Po 24 h od nasazení byly buňky vystaveny cytarabinu o koncentraci 0,25 μ M nebo 0,5 μ M. Kontrolní vzorky buněk byly ponechány bez léčiva. Byly určeny 3 časové body po přidání cytostatika, a to 24 h, 48 h a 72 h. V těchto časech byla buněčná suspenze odebrána, přesunuta do cytometrických zkušavek a na průtokovém cytometru LSRII byly měřeny absolutní počty živých buněk po ošetření v porovnání s kontrolními vzorky.

4.2.2 Doxorubicin (Doxo)

Jednotlivé buněčné linie byly nasazeny v duplikátu do 24jamkové destičky pro každou z koncentrací doxorubicinu, kontrolu a časový bod v koncentraci 200 tis/ml (koncentrace 50 tis/ml z předchozího experimentu nebyla pro měření na cytometru LSRII optimální). Jeden den po nasazení do destičky byly buňky vystaveny doxorubicinu v koncentraci 0,03 μ M nebo 0,3 μ M. Kontrolní vzorky buněk byly ponechány bez léčiva. Ve dvou časových bodech, 24 h a 48 h po ošetření, byly buňky odebrány a přesunuty do cytometrických zkušavek. Na průtokovém cytometru LSRII byly měřeny absolutní počty buněk vystavených cytostatiku v porovnání s kontrolou.

4.3 WESTERN BLOT

4.3.1 Izolace proteinu

Pro izolaci proteinu byl použit kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fischer™). Během procesu byla odděleně izolována cytoplazmatická a jaderná proteinová frakce. První kroky způsobily rozrušení buněčné membrány a uvolnění obsahu cytoplazmy. Centrifugací byla oddělena neporušená jaderná frakce ve formě pelety, ze které byly pomocí dalšího činidla extrahovány jaderné proteiny.

1. Nejprve byla izolována peleta 3-10 M buněk a k ní do mikrozkušavky přidáno 200 µl prvního vychlazeného činidla pro extrakci cytoplazmatických proteinů, směs po dobu 15 s míchána na vortexu a následně přenesena na led na 10 min
2. Poté byl přidán druhý vychlazený roztok pro extrakci cytoplazmatických proteinů v objemu 11 µl, směs míchána na vortexu po dobu 5 s a inkubována na ledu 1 min
3. Následovalo další míchání na vortexu po dobu 5 s a centrifugace (5 min, 14100xg)
4. Supernatant byl okamžitě přenesen do předem vychlazené mikrozkušavky, která byla umístěna na ledu
5. Ke vzniklé peletě bylo přidáno 100 µl vychlazeného činidla pro izolaci jaderných proteinů, směs míchána na vortexu po dobu 15 s následně přenesena na led na 10 min celkem čtyřikrát po dobu 40 min.
6. Nakonec byla směs centrifugována (10 min, 14100xg) a supernatant okamžitě přenesen do předem vychlazené zkumavky.
7. Izolované proteinové frakce byly skladované v mrazáku (-80 °C)

4.3.2 Příprava proteinů

Mikrozkušavky s izolovanými cytoplazmatickými a jadernými proteiny byly po celou dobu práce drženy na ledu.

4.3.2.1 Proteinová esej

Koncentrace jednotlivých proteinových vzorků byla stanovena na základě spektrofotometrického měření za použití modifikované Lowryho metody. Tato metoda je založena na reakci proteinů s ionty mědi v alkalickém prostředí (Lowry *et al.* 1951). Po přidání Folinova činidla dojde k redukci a změně barvy směsi ze žluté na modrou. Koncentrace proteinů je následně analyzována na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm.

Proteinová esej byla připravována do 96jamkové destičky. Jako první byla smíchána činidla obsahující měď a povrchově aktivní látky (DC™, Bio-Rad) v poměru 48:1 do mikrozkušavky. Poté je do jamek přidáno 5 µl předpřipravené ředící řady různých koncentrací proteinů v duplikátu (BSA, bovinní sérum albumin, Tabulka 1) pro kalibraci. Dalším krokem bylo přidání celkového objemu 5 µl vlastních vzorků v triplikátu (cytoplazma ředěná 5x s injekční vodou, jádro ředěné 2x s injekční vodou). Ke všem vzorkům proteinů včetně ředící řady byla následně přidána směs činidel s mědí a povrchově aktivními látkami a Folinovo

čínidlo v poměru 1:8. Destička byla poté ponechána 15 min na třepačce. Po uplynutí doby byla koncentrace proteinů analyzována na spektrofotometrickém přístroji.

standard	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
c (mg/ml)	0	0,125	0,25	0,75	1	1,125	1,25	1,5	2	2,8

Tabulka 1 Ředící řada proteinů

4.3.2.2 Výpočet koncentrace

Pro srovnání množství proteinů mezi testovanými vzorky na western blotu je nutné použít vzorky o stejné koncentraci proteinů. Z údajů získaných při proteinové eseji byl vypočítán objem vzorků, nutný pro požadovanou koncentraci proteinů*. Tento objem byl smíchán s činidly Red a LDS od firmy Bolt™ (Sample reducing agent (10x ředěný) a LDS Sample buffer (4x ředěný), NOVEX®) v poměru 1:2,5 a vodou do mikrozkušavky, tak aby bylo docíleno výsledného objemu roztoku 50 µl. Mix byl nakonec vložen do suchého tepelného bloku na 10 min a 70 °C. Takto připravené vzorky byly skladovány v mrazáku (-20 °C).

$$*V_p = \frac{V_r \cdot c}{c_p}$$

V_p = objem vzorku proteinu

V_r = výsledný objem roztoku

c = požadovaná koncentrace výsledného roztoku

c_p = koncentrace proteinu získaná proteinovou esejí

4.3.3 Elektroforéza

Pro elektroforézu byly použity komerčně vyrobené polyakrylamidové gely (NuPAGE™ Bis-Tris gels, 4-12%) a MOPS (kyselina 3-[N-morpholino] propanesulfonová) /MES (kyselina 2-[N-morpholino] etansulfonová) pufr (SDS running buffer BOLT™ NOVEX®, Life Technologies™). Gely byly vyndány z obalů, opláchnuty MOPS/MES pufrém a vloženy do aparatury (Mini Gel Tank, Life Technologies™). Aparatura byla z části naplněna pufrém a jako první bylo přidáno 5 µl žebříčku (PAGEruler plus™, Prestained protein ladder, Thermo Fischer™). Následovalo přidání 1-2 µg/µl jednotlivých vzorků, poté bylo dolito potřebné množství pufru a aparatura byla uzavřena. Aparatura byla připojena ke zdroji napětí (Bio-Rad™) po dobu zhruba 60 min a napětí 100 V.

Po uplynutí doby byla aparatura odpojena od zdroje napětí. Gel byl vyjmut z aparatury a byl odstraněn plastový nosič gelu.

4.3.4 Přenos proteinů na membránu

Proteiny z gelu byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Bio-Rad™, 0,45 µm nitrocelulóзовá membrána). Nejprve byl sestaven blottingový sendvič ve vaničce s pufrém (transferový pufr; 1M TRIS [pH 8,8] 2,5 % [v/v], metanol 20 % [v/v], glycin 1,1 % [w/v], destilovaná voda) z plastové kazety, hrubého papíru, jemného papíru, gelu a membrány, v tomto pořadí. Hotový sendvič byl vložen do aparatury (Mini Protean® tetra cell, Bio-Rad™)

společně s odpovídajícím množstvím pufru a držákem s ledem. Aparatura byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí o 70 V po dobu 60 min.

Po uplynutí doby byla membrána pinzetou vyjmuta ze sendviče a umístěna do vaničky s promývacím pufrem (10 % PBS [v/v], 1 % Tween [v/v; polyoxyethylen sorbiton monolaurat, 10%; Bio-Rad™]), destilovaná voda) a promývána 3x 10 min. Před promytím byla přítomnost proteinů ověřena Ponceau S (Serva; 0,5% v 10% kyselině octové [P-Lab a.s.]).

4.3.5 Vazba protilátek na membránu

Protein	Typ protilátky	Vytvořeno v	Výrobce	velikost (kDa)	pufr	ředění	skladování
Smad2	Monoklonální	Myš IgG1	Cell Signalling	60	5% mléko bez tuku	1:1000	mrazák - 20 °C
Phospho-Smad2	Polyklonální	Králík	Cell Signalling	60	5% mléko bez tuku	1:1000	mrazák - 20 °C
DLX1	Polyklonální	Myš	Gene Tex	27	5% mléko bez tuku	1:200	mrazák - 20 °C
GAPDH	Monoklonální	Myš	Invitrogen	37	5% mléko bez tuku	1:10000	mrazák - 20 °C
TPB	Polyklonální	Králík	abcam	38	5% mléko bez tuku	1:1000	mrazák - 20 °C

Tabulka 2 Použité primární protilátky

Před vazbou primární protilátky na membránu byla membrána blokována pomocí mléka bez tuku. Práškové mléko (non-fat dry milk, Blotting Grade Blocker, Bio-Rad™) bylo rozpuštěno v promývacím pufru. Membrána byla inkubována v 10 ml 5% mléka ve vaničce na třepačce 1 h.

Následně byla přidána primární protilátka cílená na protein zájmu (Tabulka 2). Primární protilátka byla naředěná v 5% mléce v promývacím roztoku a příslušné koncentraci. Membrána byla v 10 ml protilátky inkubována přes noc, umístěna v lednici na rotátoru.

Po uplynutí doby inkubace v primární protilátce byla membrána přesunuta do vaničky a 3x promyta v promývacím roztoku každých 10 min na třepačce. Poté byla přidána sekundární protilátka. Podle použité primární protilátky byla určena protilátka sekundární (Goat Anti-Mouse IgG [H+L]-HRP Conjugate, Bio-Rad™, ředění 1:3000; Goat Anti-Rabbit IgG [H+L]-HRP Conjugate, Bio-Rad™, ředění 1:4000). Membrána byla inkubována v 10 ml sekundární protilátky v 1% mléce v promývacím roztoku po dobu 1 h.

Následovalo promytí v promývacím roztoku každých 10 min celkem 3x na třepačce. Po promytí byla membrána vyjmuta z vaničky a přemístěna na desku vyvolávacího přístroje, kde byl vysušena buničinou. Na membránu bylo přidáno 1,4 ml směsi roztoků (1:1) Thermo

Scientific™ SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, případně byla přidána směs roztoků (1:1) SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (v koncentraci 10:1 Pico:Femto) pro zesílení signálu. Směs těchto roztoků umožní detekci antigenu pomocí oxidace luminolu v přítomnosti peroxidu a křenové peroxidázy. Deska byla přemístěna do vyvolávacího přístroje, který detekoval množství proteinu pomocí imunohistochemické analýzy.

4.3.6 Opětné užití membrány

Pro kontrolu shodné koncentrace proteinů nanesených vzorků a úspěšnost oddělení cytoplazmatické a jaderné frakce byly použity protilátky vážící se na proteiny specifické pro cytoplazmatickou a jadernou frakci. Jako znak cytoplazmatické frakce byl zvolen protein GAPDH (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza), jaderné pak TBP (TATA binding protein).

Membrána byla nejdříve zbavena použitých protilátek pomocí pufru (Restore™ Plus Western Blott Stripping Buffer, Thermo Scientific™, 7 min na třepačce). Následně byla opláchnuta promývacím roztokem a dále prošla stejným procesem jako předtím nepoužitá membrána (blokování, primární protilátka, promývání, sekundární protilátka, promývání). Nakonec bylo detekováno množství kontrolních proteinů.

4.4 DETEKCE PROTEINŮ SPOJENÝCH S APOPTÓZOU

Pro identifikaci apoptických proteinů byl použit Proteome Profiler™ Array Human Apoptosis Array Kit (R&D Systems, Inc.). Kit obsahoval nitocelulozové membrány s navázanými protilátkami 35 proteinů asociovaných s apoptózou a kontrolních proteinů.

1. Nejprve byla vytvořena peleta z 10 M buněk
2. K buněčné peletě bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru poskytnutého v kitu, v něm byla peleta resuspendována pipetou a následně byl roztok ponechán inkubovat 30 min v lednici (2-8 °C) na rotátoru
3. Do plastové nádoby byla vložena membrána s 2 ml blokačního pufru a ponechána 1 h na třepačce v pokojové teplotě
4. Žádané množství proteinového vzorku (vypočtené na základě proteinové eseje) bylo smícháno s blokačním pufrům do celkového objemu 1,5 ml/vzorek
5. Po uplynutí 1 hodiny blokace byl blokační pufr odlit a na membrány přidány jednotlivé proteinové vzorky
6. Membrány se vzorky byly inkubovány přes noc v lednici (2-8 °C) na třepačce
7. Po uplynutí doby inkubace byly membrány promyty v promývacím roztoku (poskytnutý v kitu) 3x po dobu 10 min
8. Následně byla membrána inkubována v 1,5 ml směsi detekčního koktejlu a array pufru (poskytnuté v kitu, poměr 1:100) 1 h na třepačce v pokojové teplotě
9. Dalším krokem bylo opětovné promytí po dobu 10 min celkem 3x
10. Poté byl přidán Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase; konjugovaný s křenovou peroxidázou) naředěný v poměru 1:2000 ve 2 ml array pufru k membráně a ta byla ponechána inkubovat 30 min na třepačce v pokojové teplotě
11. Následovalo promytí promývacím roztokem 3x po dobu 10 min

12. Nakonec byl přidán 1 ml Chemi Reagent mixu (1:1) pro detekci antigenu na každou membránu a membrána byla vyvolána pomocí vyvolávacího přístroje

4.5 MALÁ INTERFERUJÍCÍ RNA (siRNA)

Pro transfekci buněčných linií byla použita elektroporace, pomocí které byla do buněk vpravena siRNA s antisense sekvencí genu *PAI-1* (plasminogen activator 1) a kontrolní necílená siRNA (non-target siRNA) v koncentraci 20Mm (Dharmacon Inc.). Manipulace s buňkami a siRNA probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu.

Nejprve bylo odebráno množství buněk potřebné pro experimenty. Buňky byly následně přeneseny do kyvet (Gene Pulser® Cuvette, Bio-Rad™) v maximální koncentraci 5 M/ml a objemu 500 µl spolu s odpovídajícím množstvím siRNA a uzavřeny. Uzavřené kyvety byly přesunuty z laminárního boxu do elektroporačního přístroje. Elektroporace probíhala při 350 V po dobu 10 ms a poté byly kyvety přesunuty zpět do boxu. Po uplynutí 15 minut, kdy byly buňky ponechány v kyvetách, byla buněčná suspenze přesunuta do kultivačních lahví/destiček s předem připraveným kultivačním médiem o pokojové teplotě, v koncentraci 0,5 M/ml. Buňky byly kultivovány po dobu 24, 48, 72 a 96 hodin, kdy byla úspěšnost účinku siRNA ověřena pomocí qPCR a western blotu.

4.6 qPCR

qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) umožňuje kvantifikovat množství mRNA v reálném čase. K amplifikaci studovaného genu dochází pomocí specifických primerů a míra amplifikace genu je vyhodnocena na základě hladiny fluorescence. Fluorescenční činidlo, v tomto případě SYBR™Green (Thermo Fischer™), se interkaluje do dvouvláknové DNA ve třetím kroku procesu (elongace). Podle počtu cyklů, ve kterých došlo k exponenciálnímu růstu fluorescence studovaného genu v porovnání s kontrolním genem (např. GAPDH), je možné určit relativní míru exprese studovaného genu.

4.6.1 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl použit RNeasy® Mini Kit (Qiagen™). Peleta o maximálním počtu 10 M buněk je lyzovaná a nejprve je odstraněna DNA. RNA je poté navázána na kolonu s vazebnou kapacitou 100 µg RNA.

1. Jako první bylo přidáno 350 µl mixu lyzačního pufru s merkptoetanolem (v poměru 1:10) k peletě buněk.
2. Směs byla promíchána, přenesena do mikrosumavky s první kolonou s membránou pro vazbu DNA a centrifugována v mikrocentrifuze (60 s, 6700xg)
3. První kolona s navázanou DNA byla odstraněna a k lyzátu bylo přidáno 350 µl 70% ethanolu, směs promíchána pipetou pro precipitaci RNA, supernatant byl přenesen do 2 ml mikrosumavky s druhou kolonou s membránou pro vazbu RNA a centrifugována (15 s, 8000xg)

4. Na membránu bylo přidáno 700 μl promývacího pufru a směs centrifugována (15 s, 11000xg)
5. Poté bylo dvakrát přidáno 500 μl promývacího pufru na membránu a směs dvakrát centrifugována (15 s, 1000xg; 2 min 14100xg)
6. Po promytí membrány byla kolona s membránou vyjmuta z mikrozkuřavky, umístěna do nové a znovu centrifugována pro odstranění veřkeré tekutiny (1 min, 14100xg)
7. Následně byla membrána opět vyjmuta a vložena do konečné mikrozkuřavky, kdy bylo na membránu přidáno 30 μl vody bez RNáz za účelem eluce RNA z kolony
8. Mikrozkuřavky byla ponechána 1 minutu odstát a po uplynutí doby centrifugována (1 min, 11000xg)
9. Nakonec byla kolona s membránou vyjmuta a mikrozkuřavka s výsledným objemem 30 μl vody s RNA přenesena na led
10. Koncentrace RNA byla změřena na přístroji Nanodrop na základě vlnové délky (ND-1000 Spectrophotometer)

4.6.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána na cDNA (cirkulární DNA) pomocí kitu iScript cDNA synthesis (Bio-Rad™). Do reakce bylo přidáno 0,5-1 μg izolované RNA spolu s vodou, enzymem pro reverzní transkriptázu (iScript, Bio-Rad™) a roztoku iScript reaction mix (Tabulka 3). Směs byla namíchána do mikrozkuřavek, které byly následně umístěny do suchých tepelných bloků (Tabulka 4).

Roztok	Množství
5x iScript reakční mix	2 μl
iScript reverzní transkriptáza	0,5 μl
RNA	1 μg
dH ₂ O	5 μl

Tabulka 3 Směs pro reverzní transkripci (10 μl reakce)

teplota	čas
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min

Tabulka 4 Tepelná příprava vzorků

4.6.3 Protokol qPCR

PCR protokol byl připraven dle vzorové tabulky (Tabulka 6) pro potřebné množství reakcí.

Nejprve byly namíchány směsi forward a reverse primerů pro cílený gen a kontrolní gen, SYBR™green mixu (Power SYBR® Green PCR master mix, Thermo Scientific™) a vody do mikrozkuřavek. Následně bylo přeneseno 9 μl reakce do bílé 96jamkové destičky (LightCycler® 480 multiwell plate, Roche™) a nakonec byl přidán 1 μl cDNA (v technických duplikátech). Destička byla uzavřena fólií (MicroAmp™ optical adhesive film, AppliedBiosystems™), krátce centrifugována a vložena do přístroje LightCycler® 480 II (Roche™) s následujícím protokolem (Tabulka 5):

Iničiální denaturace	95 °C	10 min	1 cyklus
denaturace	95 °C	15 s	50 cyklů
Hybridizace primerů, elongace	60 °C	60 s	50 cyklů

Tabulka 5 Protokol qPCR

	V (μl)
Sybr green mix	5
primer fwd (10 μM)	0,1
primer rev (10 μM)	0,1
cDNA	1
dH2O	3,8

Tabulka 6 Vzor PCR protokolu

Výsledky byly analyzovány v programu Microsoft Excel, kde byla hodnota exprese cílového genu vztažena k hodnotě exprese kontrolního genu.

$$Ct_c - Ct_k = \Delta Ct$$

Ct_c = počet cyklů cílového genu

Ct_k = počet cyklů kontrolního genu

ΔCt = rozdíl počtu cyklů

Relativní exprese cílového genu byla vypočtena z průměru získaných hodnot.

$$2^{-\Delta Ct} \times 100$$

4.7 DETEKCE SENESCENCE

Pro detekci senescentních buněk byl použit kit Senescence cells histochemical staining (Sigma Aldrich™), kdy byla využita metoda založená na histochemické detekci specifického markeru senescentních buněk, β -galaktosidázy spojené se senescencí (SA- β Gal), při pH 6. Při tomto pH je SA- β Gal snadno detekovatelná u senescentních buněk, nikoliv však u buněk ve vratné G0 fázi (quiescent cells), immortalizovaných nebo rakovinných buněk.

1. Nejprve bylo nutné zahřát X-Gal roztok (poskytnutý v kitu firmou) nejméně po dobu 1 h v 37 °C a 10x naředit fixační roztok a PBS (poskytnuté v kitu firmou) ultračistou filtrovanou vodou.
2. Poté bylo odebráno požadované množství buněk (0,3 nebo 0,5 M) do mikrozkušavky. Toto množství buněk bylo rovnoměrně rozprostřeno pipetou na mikroskopické sklíčko a centrifugováno v aparatuře na cytospin
3. Sklíčko s buňkami na svém povrchu bylo 2x promyto 1 ml PBS
4. Následně bylo sklíčko vyjmuté z aparatury a na oblast buněk bylo přidáno 500 μl fixačního roztoku, který byl ponechán 6-7 min

5. Během doby fixace byl připraven barvicí roztok z činidel kitu
6. Po uplynutí doby fixace bylo sklíčko 3x opláchnuto PBS
7. Sklíčko bylo následně umístěno do plastové barvicí aparatury, kam byly přidány 3 ml připraveného barvicího mixu
8. Aparatura byla zafixována parafilmem (Parafilm M, P-LAB a.s.), aby nedošlo k odpaření barvicí směsi, a umístěna do inkubátoru s 37 °C bez CO₂ po dobu 2-17 hodin.
9. Po inkubaci bylo sklíčko s obarvenými buňkami opět opláchnuto PBS (2x-3x) a na oblast buněk byla nanesena kapička Glycergelu (Dako Mounting media, Aligent™) pro fixaci krycího sklíčka
10. Takto zafixované buňky byly pozorovány inverzním mikroskopem

4.8 MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Pro měření byl využit přístroj LSRII (software FACS Diva).

Průtoková cytometrie je metoda založena na detekci fluorescence, jejíž emise je vyvolána laserem, nebo rozptylem světla kolem detekovaných buněk. Používají se fluorescenčně značené protilátky, které se vážou se specifické povrchové proteiny buněk (např. CD33) nebo ligandy dalších buněčných molekul (např. DAPI).

4.8.1 Měření absolutních počtů buněk

Pro změření přesného počtu buněk bylo nutné přepočítat relativní počet zaznamenaných eventů na absolutní počet buněk měřeného vzorku. K buněčné suspenzi o konstantním objemu bylo přidáno 25 µl fluorescentních částic (SPHERO™ Accucount Fluorescent particles, Spherotech, 1M/ml) a 1 µl DAPI (50 µg/ml), které váže DNA a odlišuje živé a mrtvé buňky. Spolu s množstvím buněk detekovaných pomocí DAPI bylo softwarem spočítáno i množství kuliček ve vzorku. Na základě známe koncentrace těchto fluorescentních částic jsme snadno vypočetli absolutní množství buněk ve vzorku. Pro odlišení lidských buněk od myších při *in vivo* pokusech byla použita protilátka pro povrchový receptor myeloidních krevních buněk CD33, který je specifický pro člověka.

4.8.2 Měření buněčného cyklu

Buněčný cyklus byl měřen na základě značení barvami Pyronin Y (590-650 nm), který se integruje do RNA a DNA a Hoechst 33342 (430-470 nm), který se inkorporuje výlučně do DNA. Poměr DNA/RNA pak odliší jednotlivé fáze buněčného cyklu a zřetelně odliší G1 a G0 fázi. Výsledky získané měřením na průtokovém cytometru byly analyzovány v programu FlowJo™.

1. Nejprve bylo odebráno nejméně 0,5 M buněk do cytometrických zkumavek, centrifugací (5 min, 400xg) z nich byla vytvořena peleta
2. Ta byla následně promyta 2 ml PBS (centrifugace 5 min, 400xg)
3. Peleta byla resuspendována v 0,5 ml fosfát-citrát pufru (pH 7,2) a ponechána 20 min inkubovat ve tmě v pokojové teplotě

4. Po uplynutí doby byly buňky centrifugovány (5 min, 200xg) a promyty 2 ml PBS (5 min, 200xg)
5. Poté byla peleta resuspendována v 1 ml barvicího roztoku (1,5 μ g/ml Pyronin Y, 2 μ g/ml Hoechst 33342, 100x naředěná v PBS) a centrifugována (5 min, 200xg)
6. Nakonec byly buňky resuspendované ve 200 μ l barvicího roztoku a ponechány na ledu 10 min
7. Po 10 min byly buňky připraveny k měření na LSRII

4.8.3 Měření Ki-67

Znak Ki-67 (byl použit Ki-67 konjugovaný s PE, phycoerythrin) označí pouze dělící se buňky. Tato metoda byla použita společně s buněčným cyklem pro porovnání množství buněk v G0 fázi buněčného cyklu (tyto buňky jsou Ki-67 negativní). Tento znak se také používá na odlišení senescentních buněk. Výsledky získané měřením na průtokovém cytometru byly analyzovány v programu FlowJo™.

1. Bylo odebráno nejméně 0,5 M buněk do cytometrické zkumavky
2. Centrifugací byly buňky promyty 2 ml PBS (5 min, 400xg)
3. Supernatant byl odlit a buňky resuspendovány v 1 ml lyzačního roztoku (BIOFACS, 10x naředěný), suspenze byla promíchána na vortexu a ponechána 10 min ve tmě v pokojové teplotě
4. Po uplynutí doby byly buňky centrifugovány (5 min, 400xg)
5. Poté byl k peletě přidán 1 ml permeabilizačního roztoku (BIOFACS, 10x naředěný), směs byla promíchána na vortexu a ponechána 10 min ve tmě v pokojové teplotě
6. Následně byla zkumavka s buňkami centrifugována (5 min, 400xg)
7. Peleta byla promyta 1 ml roztoku PBS/BSA (5 min, 400xg)
8. K peletě bylo přidáno 5 μ l Ki-67-PE (EXBI antibodies™) a po dobu 30 min byly buňky inkubovány ve tmě v pokojové teplotě
9. Nakonec byla peleta opět promyta roztokem PBS/BSA (5 min, 400xg)
10. Buňky byly připraveny k měření na LSRII

4.8.4 Měření apoptických buněk

Pro měření apoptických a nekrotických buněk bylo použito značení Annexinem V a propidium jodidem (PI). Annexin V se váže na povrchový fosfatidylserin, jehož přítomnost na povrchu buněk je jedním z prvních znaků apoptózy. PI váže DNA pouze apoptických a nekrotických buněk, protože není schopen projít membránou živých buněk. Současné použití těchto dvou značení umožní odlišit časnou a pozdní apoptózu, nekrózu a vitální buňky.

1. Nejméně 0,5 M buněk bylo odebráno z buněčné suspenze do cytometrické zkumavky
2. Centrifugací byly buňky promyty s 2 ml PBS (5 min, 400xg)
3. Po odlití supernatantu bylo přidáno 50 μ l Annexin V pufru (Annexin V binding buffer, EXBI antibodies™), 5 μ l Annexinu V (EXBI antibodies™) a 2 μ l PI (100 μ g/ml, MACS™) a směs byla krátce promíchána na vortexu
4. Následovala 30 min inkubace na ledu
5. Po uplynutí doby byly buňky připraveny k měření na cytometru LSRII

4.9 *IN VIVO* EXPERIMENTY

Pro *in vivo* experimenty byl použit modelový organismus *Mus musculus*, imunodeficientní kmen myši NSG™ (NOD scid gamma). Tomuto kmenu chybí zralé lymfocyty, sérové imunoglobuliny a cytotoxicita NK buněk (natural killer) je velmi nízká. NSG myši jsou vhodné pro xenotransplantaci lidských krevních kmenových buněk (The Jackson Laboratory)

Veškerá práce s modelovým organismem byla provedena ve spolupráci s Ústavem molekulární genetiky (UMG), AV ČR v.v.i. v jejich prostorách. Většina manipulace s modelovým organismem byla provedena s kolegyní, která drží Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, za mé asistence.

Již v roce 2016 byla provedena optimalizace *in vivo* modelu s úspěšným přihojením buněk akutní myeloidní leukémie. Subletálně ozářeným NSG myším byl do ocasní cévy injikován 1 M buněk (NSC, sh1 a sh2). Po 14 až 21 dnech byly izolovány krevní buňky kostní dřeně, periferní krve a sleziny. Buňky izolované v laboratořích UMG byly převezeny do laboratoří CLIP, kde byly měřeny jejich absolutní počty a buněčný cyklus na průtokovém cytometru LSRII.

4.9.1 Ozařování myší

Myši byly ozářeny rentgenem (Precision X-Ray Inc.) subletální dávkou 1 Gy nebo 0,8 Gy zhruba 6 hodin před injekcí leukemických buněk.

4.9.2 Injekce leukemických buněk myším

V laboratořích CLIP byl vypočítán potřebný počet buněk každé linie. Buňky byly nasazeny do kultivačních lahví s odpovídajícím objemem média a převezeny do laboratoří UMG. Tam byly buňky znovu spočítány pro kontrolu, promyty v 1 ml PBS s 2% FBS a rozděleny do mikrozkrumavek umístěných na ledu. Během několika prvních *in vivo* experimentů byly použity všechny tři buněčné linie, NSC, sh1 a sh2. Pro další experimenty byly použity pouze linie NSC a sh2 vzhledem k náročnosti *in vivo* experimentů a počtu myší v jednom experimentu.

Pro každý experiment bylo připraveno několik skupin myší podle množství podmínek (leukemické linie, počet cytostatik, dávka cytostatika) (vzor *in vivo* experimentu Tabulka 7, přehled *in vivo* experimentů Tabulka 13).

Myši byly odebrány z chovné nádoby ve sterilním laminárním boxu, znovu zváženy a umístěny do fixační komůrky. Poté, co byla myš bezpečně znehybněna v komůrce, do ocasní cévy jí byl injikován 1 M buněk příslušné linie v 150 µl PBS s 2% FBS.

4.9.3 Injekce cytostatik myším

Byl vypočítán objem cytostatika v PBS s 2% FBS s žádanou koncentrací (Tabulka 13). Injekce cytostatika myším probíhala stejně jako výše popsaná injekce leukemických buněk

v případě *intravenózního* (*i.v.*) podání nebo *intraperitoneálně* (*i.p.*) injekcí do břišní dutiny (objemech od 100 μ l do 140 μ l).

4.9.4 Sběr buněčných vzorků

Myši byly zváženy a usmrceny přerušáním míchy kolegyní z UMG. Následně jim byla odebrána krev (100 μ l) z infraorbitálního plexu do mikrozkuřavky umístěné na ledu. Poté byla oddělena zadní končetina, stehenní a holenní kost byla očištěna a přenesena do 16jamkové destičky s PBS umístěné na ledu. Nakonec byla otevřena břišní dutina myši, izolována slezina a umístěna do 24jamkové destičky s PBS na ledu.

Jednotlivé sleziny byly zváženy a jejich váha byla zaznamenána.

Kód myši	pohlaví	ozáření	datum narození	stáří (týdny)	buněčná linie	léčba	váha myši(g)	váha sleziny(g)
20M-44690	f	0,8Gy	9.12.2017	8	NSC	PBS	22,4	0,04
20M-44691	f	0,8Gy	12.12.2017	8	NSC	PBS	22,3	0,035
20M-44692	f	0,8Gy	3.12.2017	9	NSC	ARA-C	21,3	0,037
20M-44693	f	0,8Gy	3.12.2017	9	NSC	ARA-C	22,3	0,033
20M-44694	f	0,8Gy	12.12.2017	8	NSC	1D11	24,6	0,049
20M-44695	f	0,8Gy	12.12.2017	8	NSC	1D11	25,5	0,061
20M-44696	f	0,8Gy	9.12.2017	8	NSC	ARA-C + 1D11	22,2	0,046
20M-44697	f	0,8Gy	9.12.2017	8	NSC	ARA-C + 1D11	22,2	0,047
20M-44698	f	0,8Gy	23.11.2017	11	Sh2	PBS	25,9	0,102
20M-44699	f	0,8Gy	23.11.2017	11	Sh2	PBS	24,7	0,103
20M-44700	f	0,8Gy	19.11.2017	11	Sh2	ARA-C	23,7	0,061
20M-44701	f	0,8Gy	19.11.2017	11	Sh2	ARA-C	22,9	0,06
20M-44702	f	0,8Gy	5.12.2017	9	Sh2	1D11	23,2	0,056
20M-44703	f	0,8Gy	5.12.2017	9	Sh2	1D11	21,9	0,056
20M-44704	f	0,8Gy	19.11.2017	11	Sh2	ARA-C + 1D11	20,6	0,062
20M-44705	f	0,8Gy	19.11.2017	11	Sh2	ARA-C + 1D11	20,4	0,041

Tabulka 7 Vzorová tabulka in vivo experimentu

Odebraná krev v objemu 80 μ l byla přesunuta to 15 ml falkony. Následně byly buňky lyzovány ACK (Ammonium-Chloride-Potassium; Erythrocytes lysing buffer; 1,5 M NH₄Cl; 100 mM KHCO₃; 1 mM EDTA-2Na; pH 7,2 [docíleno přidáním NaOH]) po dobu 5 min v pokojové teplotě. Po uplynutí doby bylo přidáno 10 ml PBS s 2% FBS a buňky centrifugovány (5 min, 400xg). Následovalo druhé kolo lýzy, tentokrát v 1 ml ACK a po 5 min byly znovu centrifugovány (5 min, 400xg). Poté byly buňky promyty v 1 ml PBS s 2% FBS (centrifugace 5 min, 400xg) a nakonec byly resuspendovány ve 200 μ l.

Kostem byly nůžkami odstraněny klouby a injekcí s PBS (5 ml na 1 končetinu) byla z kosti vypláchnuta kostní dřevina do 15 ml zkumavky. Suspenze byla následně centrifugována (5 min, 400xg). Dalším krokem byla lýza pomocí 1 ml ACK, které působilo 5 min. Během této doby byla buněčná suspenze získaná z tkáně přefiltrována přes filtr do nové 15 ml falkony a po uplynutí 5 min bylo přidáno 10 ml PBS s 2% FBS. Filtrát byl centrifugován a jednou promyt v 1 ml PBS s 2% FBS (centrifugace 5 min, 400xg).

Slezina byla nejdříve mechanicky homogenizována a následně lyzována 2 ml ACK po dobu 5 min. Během této doby byla směs přefiltrována do 15 ml zkumavky. Poté bylo ke směsi přidáno 10 ml PBS s 2% FBS a zkumavka byla centrifugována (5 min, 400xg). Následovalo promytí v 1 ml PBS s 2% FBS (centrifugace 5 min, 400xg). Nakonec byla peleta resuspendována v 1 ml PBS s 2% FBS.

Takto připravené vzorky byly přepraveny na ledu do laboratoří CLIP, kde byly označeny protilátkou povrchového proteinu lidských buněk CD33 (inkubace 30 min) a analyzovány na průtokovém cytometru LSRII.

4.10 STATISTICKÁ ANALÝZA

Pro statistickou analýzu byl použit neparametrický Mann-Whitney *U* test v programu GraphPad Prism. Pomocí tohoto testu byla určena signifikance rozdílů jednotlivých měření (např. srovnání skupin léčených a neléčených myší při *in vivo* experimentu).

V grafech je hodnota *P*, vypočtená programem, vyjádřena následujícím způsobem:

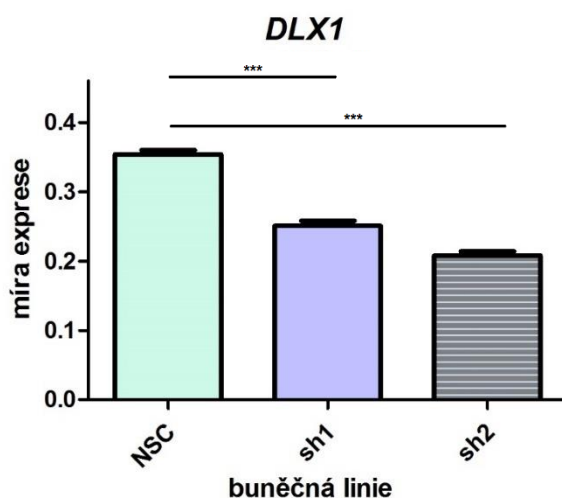
ns	$P > 0,05$
*	$P \leq 0,05$
**	$P \leq 0,01$
***	$P \leq 0,001$

5 VÝSLEDKY

5.1 POTVRZENÍ SNÍŽENÉ EXPRESE GENU *DLX1*

Jak je již zmíněno v úvodu, buněčným liniím sh1 a sh2 byla trvale snížena hladina exprese genu *DLX1* pomocí lentivirálního vektoru.

Pro potvrzení snížené exprese genu *DLX1* u linií sh1 a sh2 byla provedena qPCR. Hladina exprese tohoto genu byla měřena také u kontrolní linie NSC a porovnána s liniemi sh1 a sh2 (Obr. 4). Míra exprese je relativní a vztažená ke kontrolnímu genu *GAPDH*.



Obrázek 4 Graf relativní míry exprese genu *DLX1*

buněčná linie	míra exprese genu <i>DLX1</i>	SEM	Poměr k NSC
NSC	0,354	0,024196	1
sh1	0,251	0,040824	0,709
sh2	0,208	0,04354	0,587

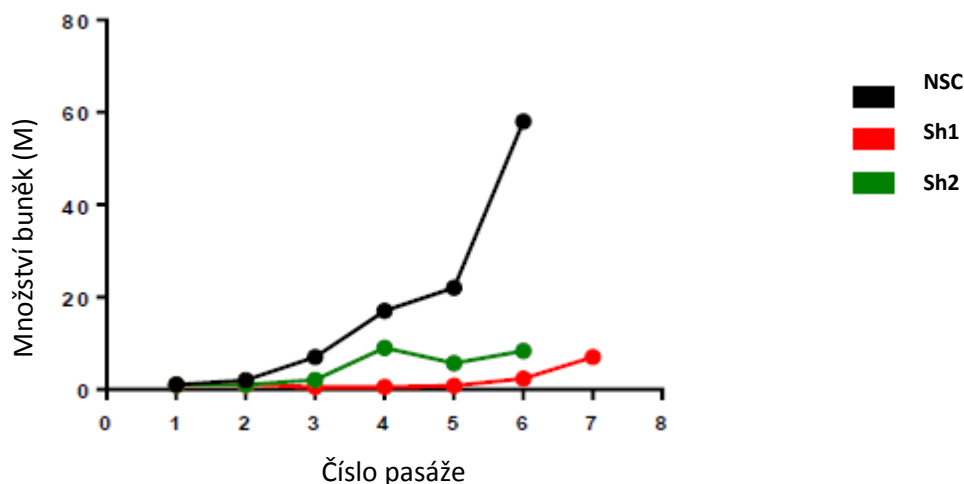
Tabulka 8 Porovnání relativní míry exprese genu *DLX1* mezi jednotlivými liniemi

Snížená exprese genu *DLX1* byla potvrzena také na proteinové úrovni pomocí metody wester blot. Dle bioinformatických zdrojů (ncbi.nlm.nih.gov) se protein *DLX1* nachází ve dvou izoformách. Zdá se, že u linie NSC jsou v jádře detekovány obě dvě varianty proteinu *DLX1* a v cytoplazmě převládá kratší izoforma (Obr. 5).



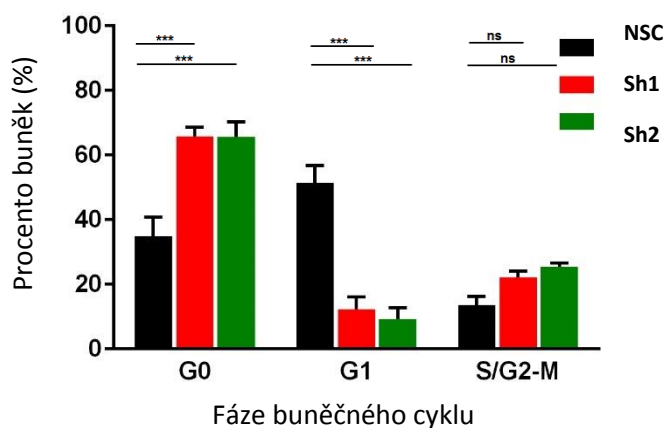
Obrázek 5 Detekce proteinu *DLX1* (v rámečku); Pro kontrolu byly použity proteiny *TBP* a *GAPDH*

Při pěstování těchto linií společně s kontrolní linií NSC s nezměněnou hladinou exprese genu *DLX1 in vitro* byl pozorován snížený buněčný růst sh1 a sh2 linie v porovnání s NSC linií (Obr. 6).



Obrázek 6 Graf *in vitro* růstu buněčných linií (vytvořila dr. Starková)

V *in vitro* prostředí byly také identifikovány rozdíly v buněčném cyklu mezi jednotlivými liniemi. U linií sh bylo pozorována vyšší procento buněk v G0 fázi buněčného cyklu (Obr. 7).

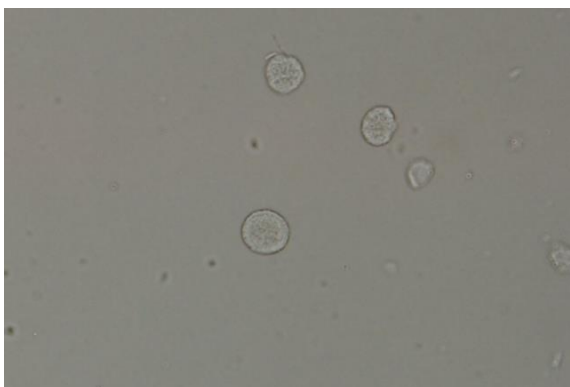


Obrázek 7 Graf buněčného cyklu *in vitro* (vytvořila dr. Starková)

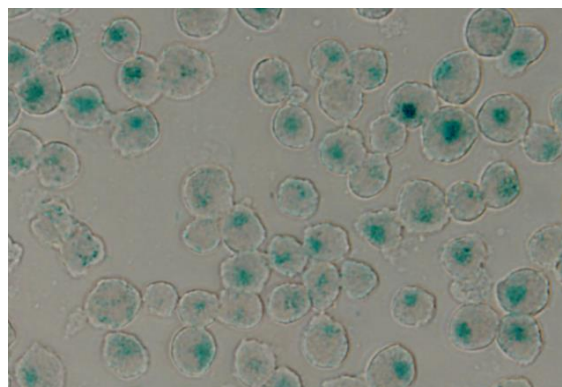
5.2 DETEKCE SENESCENTNÍCH BUNĚK

Tato metoda byla provedena za účelem objasnit rozdílnou míru proliferace buněčných linií se sníženou expresí genu *DLX1* (sh1 a sh2) v porovnání s kontrolní linií (NSC) v *in vitro* podmínkách a lépe popsat fenotyp buněk v G0 fázi. Předpokladem byla identifikace většího množství senescentních buněk u linií sh1 a sh2. Tato metoda byla opakována celkem 6x.

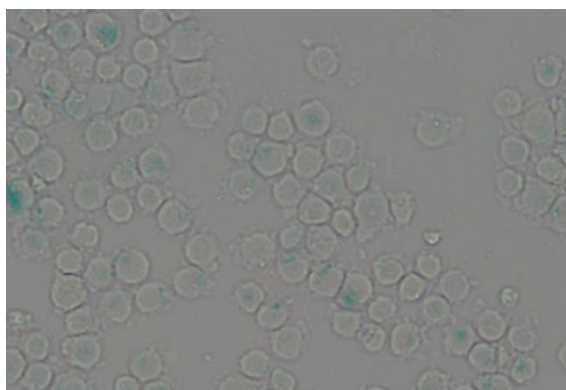
Po obarvení sklíčka s buňkami měly být senescentní buňky detekovány díky modrému zbarvení (Obr. 8 nebarvené buňky, Obr. 9-11 obarvené buňky NSC, sh1 a sh2).



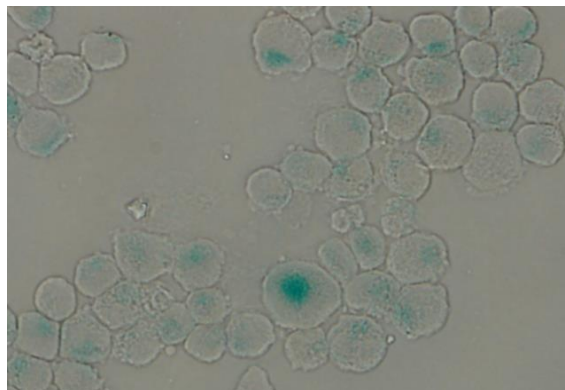
Obrázek 8 nebarvené buňky (NSC, zvětšení 40x)



Obrázek 9 buňky barvené přes noc (NSC, zvětšení 40x)



Obrázek 10 buňky barvené přes noc (sh1, zvětšení 10x)

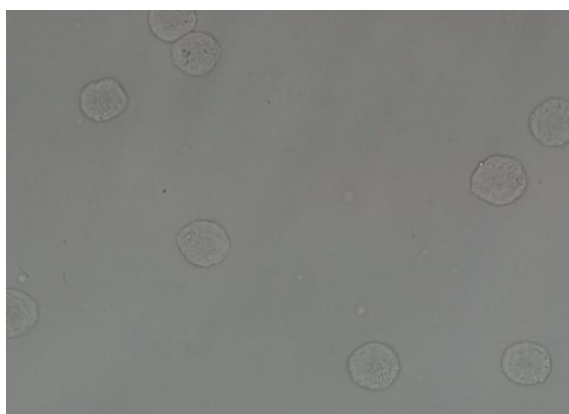


Obrázek 11 buňky barvené přes noc (sh2, zvětšení 40x)

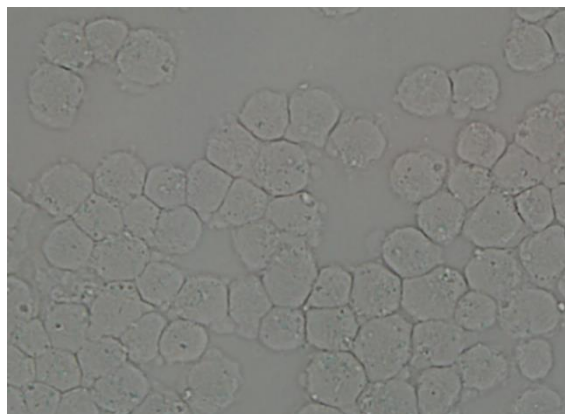
Množství pozitivních buněk ovšem dosahovalo téměř 80 % u všech testovaných linií a jednotlivé linie se od sebe lišily pouze 0,5 % (např. NSC 76,12 % vs. sh2 76,65 %).

S velkou pravděpodobností se jednalo o falešnou pozitivitu, proto byla další série pokusu provedena v různých časových bodech (2 h, 6 h, přes noc) barvení pro optimalizaci.

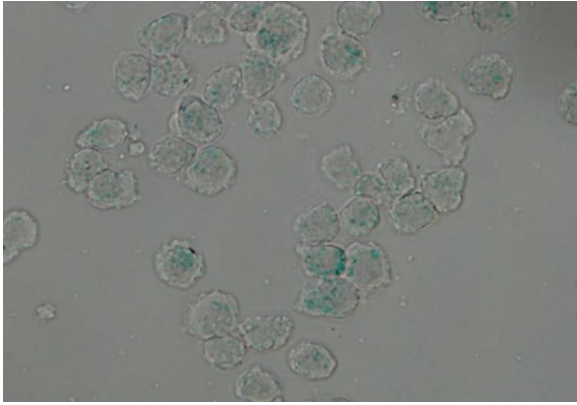
Intenzita barvení byla v časových bodech 2 h a 6 h výrazně snížena, nicméně po důkladném prohlédnutí obrázků bylo patrné velmi slabé barvení většiny buněk (Obr. 12-14).



Obrázek 12 buňky barvené 2 h (NSC, zvětšení 40x)



Obrázek 13 buňky barvené 6 h (NSC, zvětšení 40x)

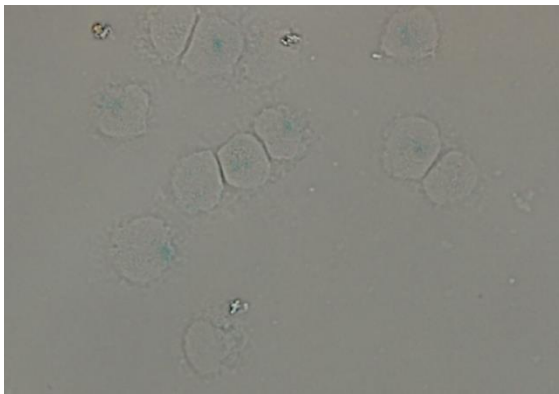


Obrázek 14 buňky barvené přes noc (MOLM13, zvětšení 40x)

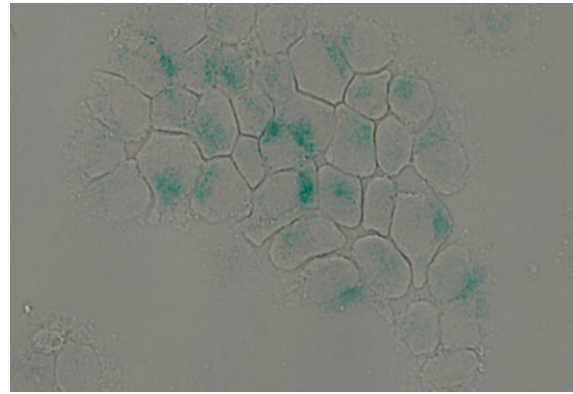
Dalším krokem bylo rozmražení nových buněčných linií NSC a sh2 s nižším počtem provedených pasáží a jejich porovnání s dalšími leukemickými liniemi, a to MOLM13 a MV4;11, opět ve 3 časových bodech (2 h, 6 h, přes noc).

Mezi jednotlivými liniemi nebyly pozorovány rozdíly, opět byla detekována falešná pozitivita velkého množství buněk s nižší intenzitou v časových bodech 2 h a 6 h (Obr. 14 buněčná linie MOLM13).

V posledním kroku ve snaze odstranit falešnou pozitivitu senescentních buněk byly NSC buňky vystaveny inhibitoru lyzozomu (Bafilomycin). Cílem tohoto kroku bylo zamezit změně pH činností buněčných lyzozomů, která mohla ovlivnit výsledky pokusu závislého na pH (Obr. 15 a 16).



Obrázek 15 bez bafilomycinu (NSC, zvětšení 40x)



Obrázek 16 + bafilomycin (NSC, zvětšení 40x)

Bohužel ani tento pokus nebyl úspěšný. Metoda byla opuštěna jako pro naše buňky nevhodná a nebyly z ní získány žádné validní výsledky.

5.3 APOPTICKÁ ARRAY

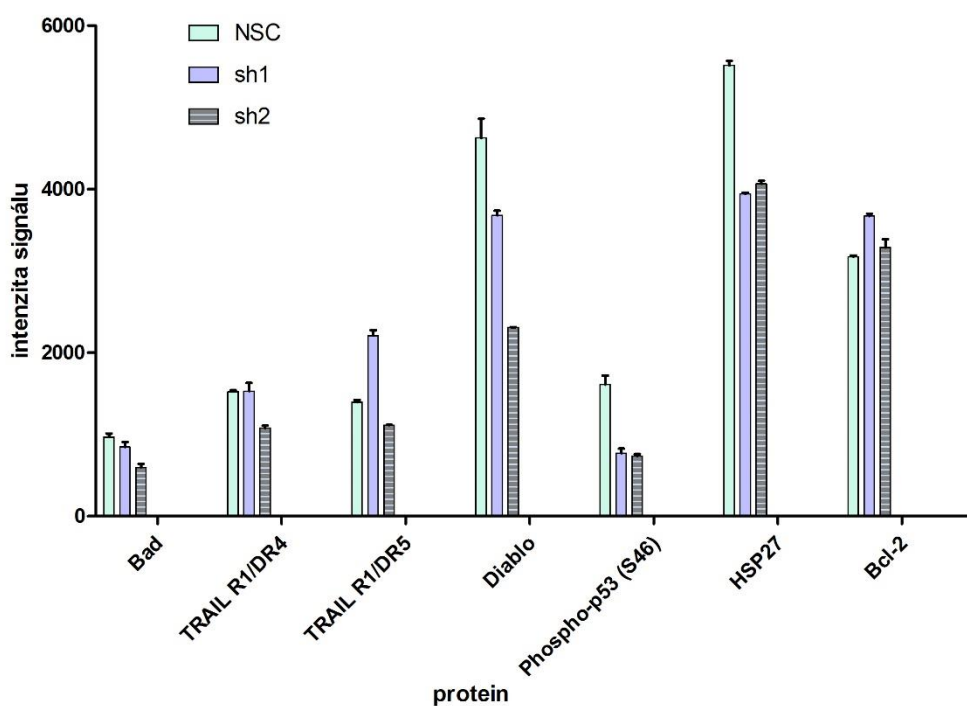
V návaznosti na měření apoptických buněk pomocí Annexinu V byla provedena detekce apoptických proteinů u linií NSC, sh1 a sh2. Byly použity buňky pěstované běžným způsobem, ne buňky ko-kultivované s MSCs.

Po normalizaci výsledků na základě detekce signálu referenčních proteinů u každé buněčné linie bylo detekováno větší množství několika pro-apoptických proteinů u linie NSC.

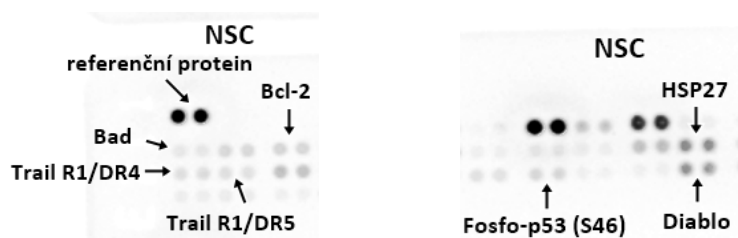
Několik proteinů, u kterých byl detekován největší rozdíl v síle signálu mezi linií NSC a liniemi sh, především linie sh2, je zobrazeno v Tabulce 9 a na Obrázcích 17-23.

Detekovaný protein	Typ proteinu	Poměr sh1/NSC	Poměr sh2/NSC
Bad	pro-apoptický	0,87	0,62
TRAIL R1/DR4	pro-apoptický	1,00	0,71
TRAIL R1/DR5	pro-apoptický	1,58	0,80
Diablo	pro-apoptický	0,80	0,50
Phospho-p53 (S46)	pro-apoptický	0,48	0,46
HSP27	anti-apoptický	0,72	0,74
Bcl-2	anti-apoptický	1,16	1,04

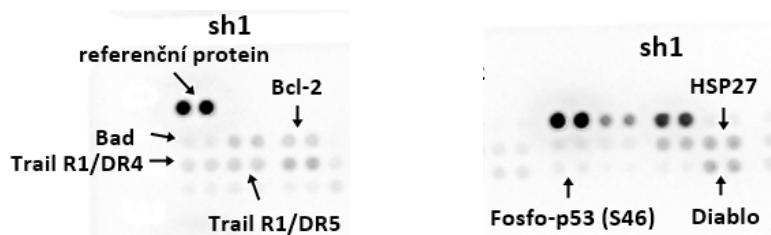
Tabulka 9 Seznam proteinů spojených s apoptózou detekovaných u buněčných linií



Obrázek 17 Graf znázorňující intenzitu signálu detekovaných proteinů u buněčných linií



Obrázky 18 a 19 Membrána s detekovanými proteiny linie NSC



Obrázky 20 a 21 Membrána s detekovanými proteiny linie sh1



Obrázky 22 a 23 Membrána s detekovanými proteiny linie sh2

5.4 KO-KULTIVACE LEUKEMICKÝCH BUNĚK S MSCS

Ve snaze vysvětlit rozdíly mezi buněčnými liniemi v *in vivo* a *in vitro* podmínkách byly buňky pěstovány společně s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSCs), kdy byly leukemické buňky 2x týdně během pasážování počítány. Jejich množství bylo zaznamenáváno a na jeho základě byl vypočten kumulativní počet buněk během několika týdenního experimentu. Tento pokus byl opakován 3x. V pravidelných intervalech byly odebrány buňky a měřen buněčný cyklus (zaměřen především na G0 fázi), buněčná proliferace a při posledním z experimentů také apoptóza.

5.4.1 Kumulativní počítání buněk

linie	celkem (M)	mrtvé buňky (M) *	životnost (%)	objem (μl) nasazen do 0,8ml **	živých buněk ml (M)	živých buněk na 0,8ml (M)	kumulativně (M) ***	průměr (M)
NSC 1	1,606	0,016	99	125	1,59	1,272	7,538	8,19E+00
NSC 2	1,82	0,02	98,9	111	1,8	1,44	8,93	
NSC 3	1,888	0,028	98,5	107	1,86	1,488	8,098	

Tabulka 10 Vzorová tabulka zaznamenávání počtů buněk při počítacím experimentu

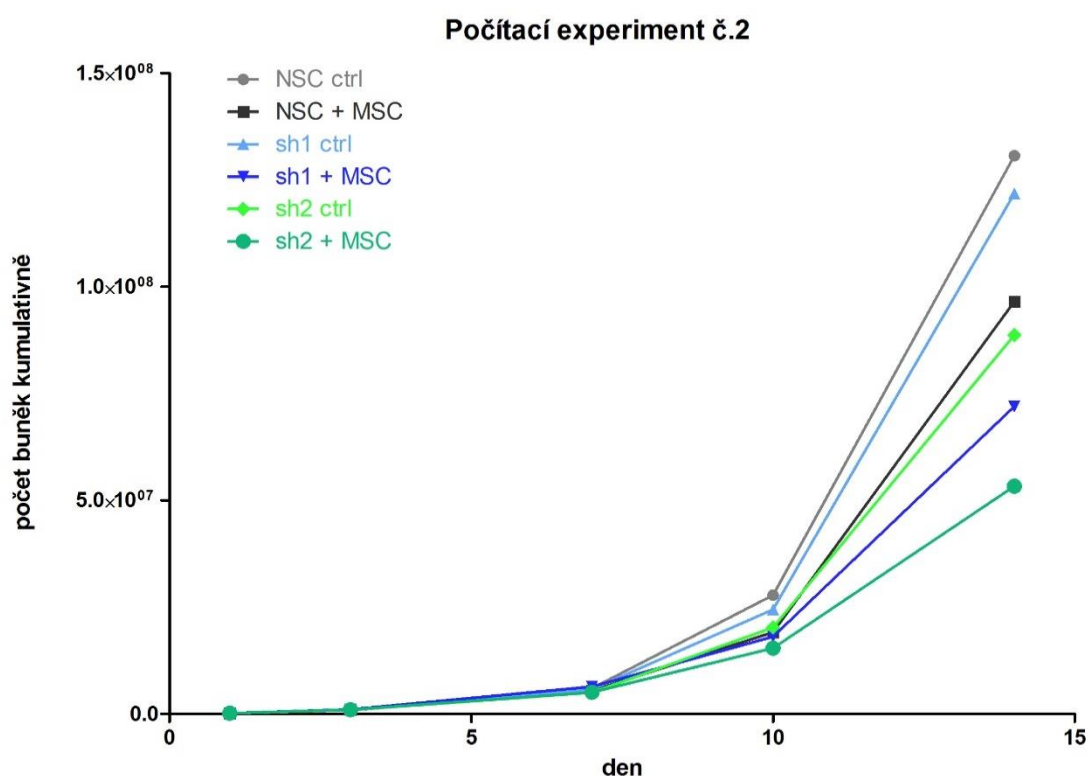
*vypočítány na základě životnosti buněk

**objem (μl) suspenze buněk nasazen do nového média (do celkové objemu 0,8ml)

***kumulativní počet buněk: $\left(\frac{800\mu l}{V(\mu l) \text{ nasazen do } 800\mu l \text{ při minulém počítání}} \right) \times \text{živé buňky v } 800\mu l \text{ při současném počítání}$

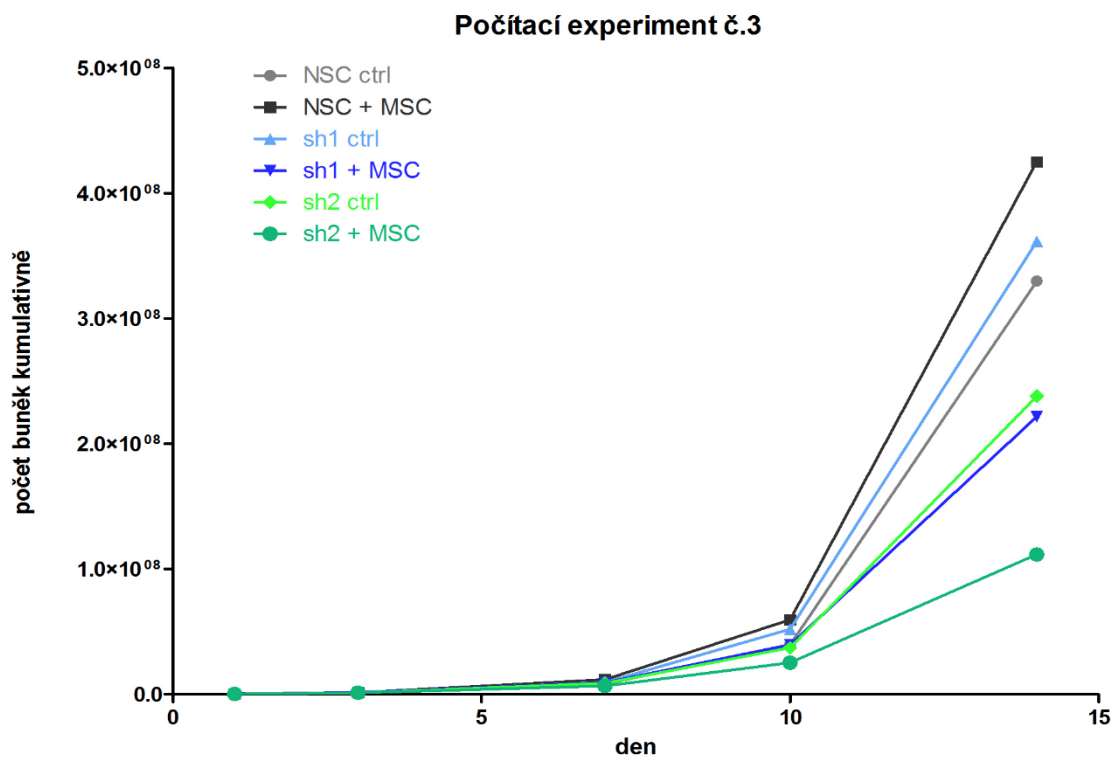
Během prvního pokusu se zdálo, že leukemické buňky pěstované spolu s MSCs proliferují více než leukemické buňky pěstované samotné. Tento výsledek se nám nepodařilo zopakovat a mohl být způsoben stářím pěstovaných buněk. Během dalších dvou pokusů leukemické linie sh1 a sh2 ko-kultivované s MSCs proliferovaly výrazně méně, zatímco proliferace linie NSC byla ko-kultivací ovlivněna v daleko menší míře (Obrázky 24, 25 a 26).

Druhé opakování počítacího experimentu trvalo 14 dní a buněčné linie pěstované spolu s MSCs proliferovaly méně než stejná (kontrolní) linie pěstované bez MSCs již od prvních dnů (Obrázek 24).

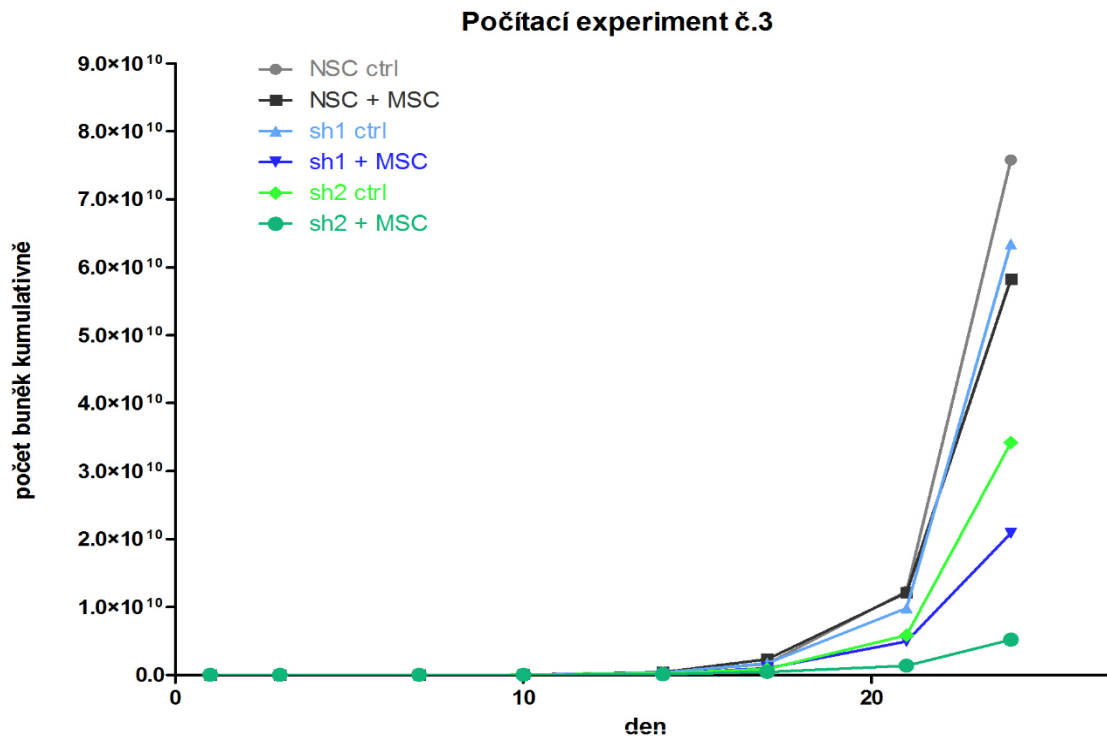


Obrázek 24 Graf kumulativního počtu buněk při počítací experimentu č. 2

Poslední opakování počítacího experimentu (číslo 3) trvalo 24 dní. Během zhruba prvních dvou týdnů experimentu č. 3 NSC buněčná linie pěstovaná společně s MSCs proliferovala více než buňky pěstovány samotné (Obr. 25). Následně se jejich počty vyrovnaly, a nakonec kontrolní vzorky NSC buněk vykazovaly signifikantně vyšší proliferaci než NSC buňky ko-kultivované s MSCs (Obr. 26). Linie sh1 a sh2 ko-kultivované s MSCs proliferovaly méně než kontrolní buňky stejné linie pěstované bez MSCs již od začátku experimentu. Tento výsledek byl pozorován v obou dvou opakováních experimentu. Při tomto pokusu byly pozorovány významné rozdíly mezi liniemi se sníženou expresí genu *DLX1* a kontrolní linií.



Obrázek 25 Graf kumulativního počtu buněk při počítací experimentu č. 3 (dny 0-15)

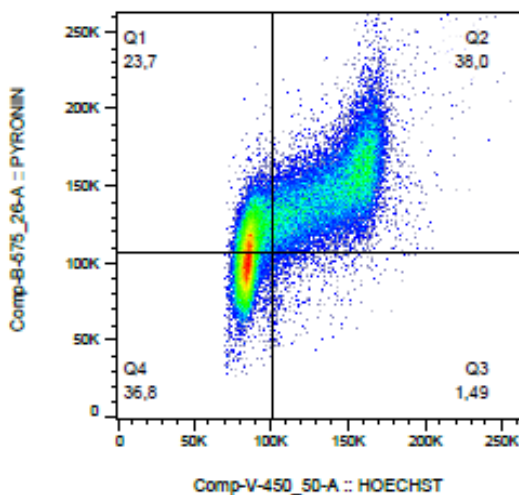


Obrázek 26 Graf kumulativního počtu buněk při počítací experimentu č. 3 (dny 0-24)

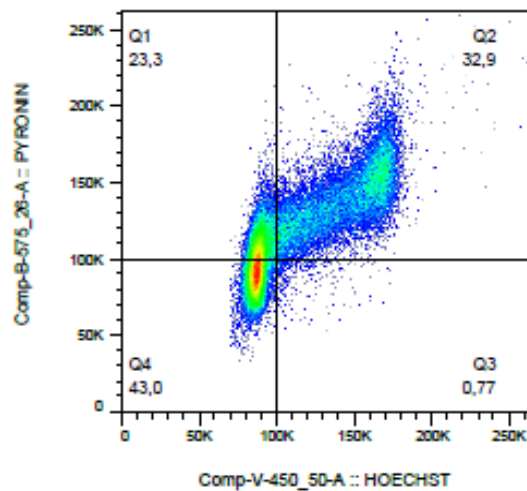
5.4.2 Měření buněčného cyklu

Výsledky měření buněčného cyklu se u jednotlivých opakování pokusu shodovaly. U leukemických linií sh1 a sh2 bylo vždy vyšší množství buněk v G0 fázi, tedy neproliferujících, u buněk pěstovaných spolu s MSCs, především po delší době ko-kultivace.

Na obrázcích 27 a 28 vidíte vzorové znázornění buněčného cyklu (linie NSC a sh2 pěstované bez MSCs [kontrola], třetí opakování pokusu), získané barvením Pyroninem Y a Hoechstem 44432 a zpracované v programu FlowJo™. Každý kvadrant reprezentuje jinou fázi buněčného cyklu – Q1 = G1 fáze, Q2 = S/M fáze, Q3 = G0 fáze

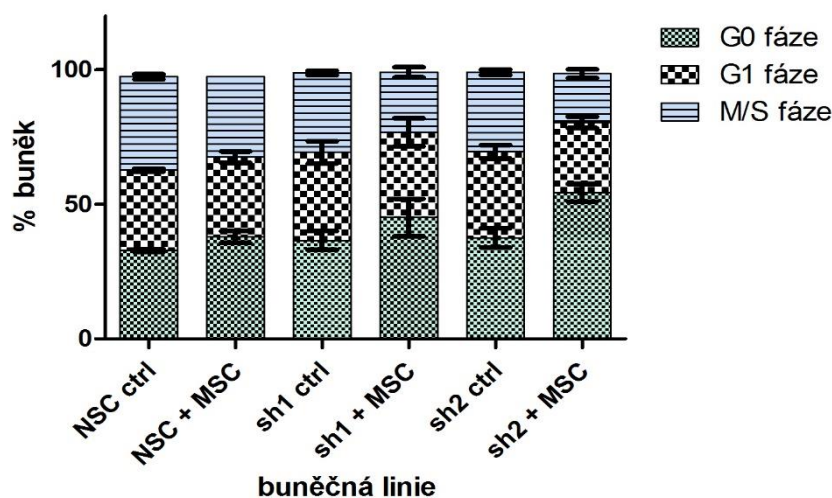


Obrázek 27 Buněčný cyklus linie NSC (kontrola)



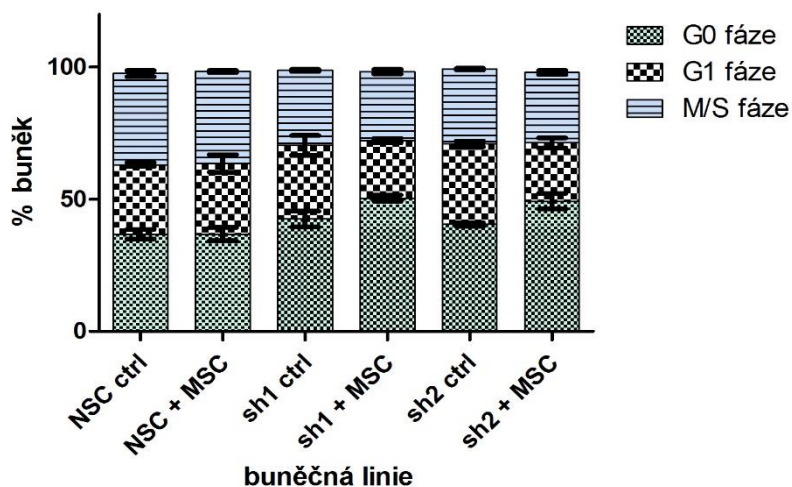
Obrázek 28 Buněčný cyklus linie sh2 (kontrola)

Při druhém opakování pokusu bylo při prvním měření (7. den experimentu) zaznamenáno nejvíce buněk v G0 fázi u linie sh2 pěstovaných spolu s MSCs (54,4 %). Naopak nejmenší rozdíl byl pozorován mezi kontrolními buňkami (bez MSCs) a buňkami ko-kultivovanými s MSCs u linie NSC (32,8 % vs. 37,9 %) (Obr. 29).



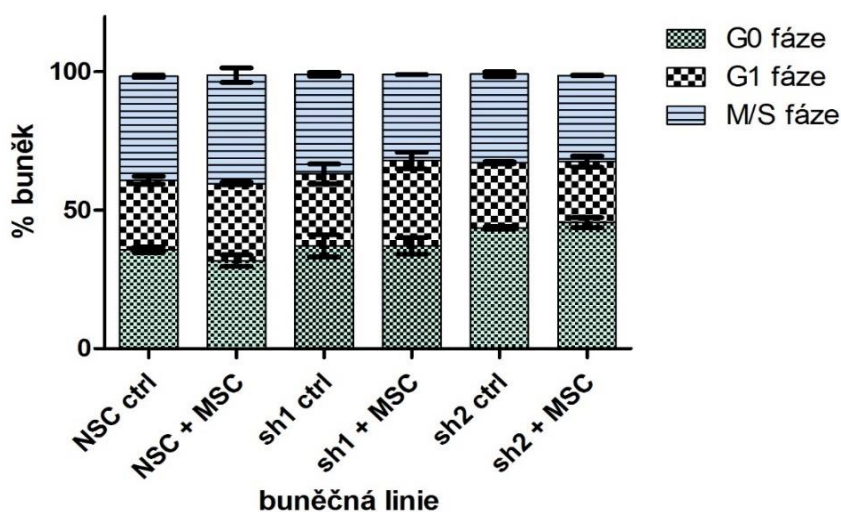
Obrázek 29 Graf procentuálního zastoupení buněk ve fázích buněčného cyklu (druhé opakování, den 7)

Měření v den 14 ukázalo celkový nepatrný nárůst buněk v G0 fázi u všech buněčných linií. Rozdíly v rámci linie (kontrola vs. +MSC) NSC jsou nejmenší (Obr. 30).



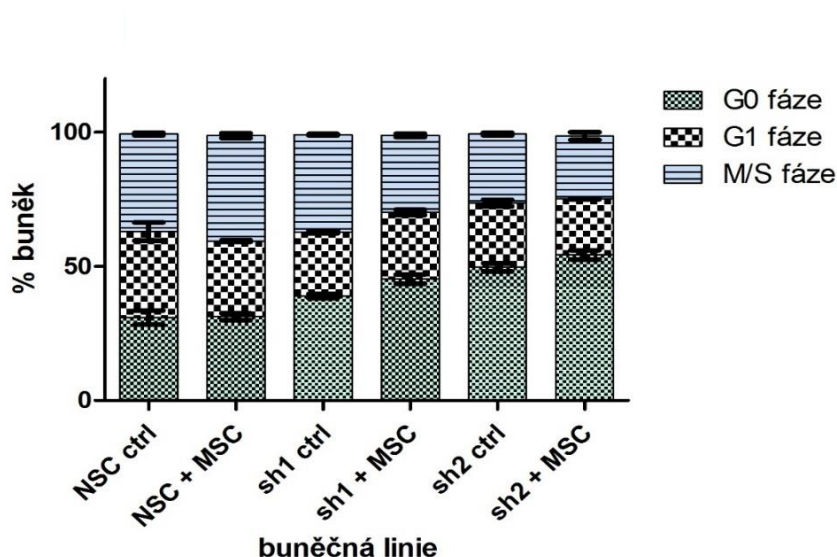
Obrázek 30 Graf procentuálního zastoupení buněk ve fázích buněčného cyklu (druhé opakování, den 14)

Při třetím opakování experimentu v první den měření (den 10 experimentu) byly rozdíly G0 fáze v rámci jednotlivých linií (kontrola vs. +MSC) malé. Kontrolní skupina linie NSC dle výsledků zahrnovala více neproliferujících buněk než NSC buňky pěstované s MSCs (35,7 % vs. 31,8 % buněk). Množství buněk v G0 fázi v rámci linií sh1 a sh2 byl vyrovnaný (37,01 % vs. 37,05 % a 45,55 % vs. 43,6 %) (Obr. 31).



Obrázek 31 Graf procentuálního zastoupení buněk ve fázích buněčného cyklu (třetí opakování, den 10)

24. den třetího experimentu byly rozdíly mezi jednotlivými liniemi nejvýraznější. Linie sh2 v procentu buněk v G0 fázi převýšila zbylé dvě linie (49,7 % [kontrola] a 54,35 % [+MSC]). Procento buněk v G0 fázi u linie NSC se vyrovnalo (30,9 % [kontrola] a 31,2 % [+MSC]) a rozdíl v rámci linie sh1 se také prohloubil (38,9 % [kontrola] a 45,2 % [+MSC]) (Obr. 32).



Obrázek 32 Graf procentuálního zastoupení buněk ve fázích buněčného cyklu (třetí opakování, den 24)

Z grafů je zřejmé, že se množství neproliferujících buněk v G0 fázi zvyšovalo v čase, což odpovídá výsledkům kumulativního počítání buněk. Pro doplnění jsou zde uvedeny tabulky 11 a 12 s poměry buněk v dny měření.

buněčná linie	poměr (ctrl/+MSC)	
	den 7	den 14
NSC	1,452	1,352
sh2	1,350	1,694
sh7	1,313	1,661

Tabulka 11 Pokus č. 2 Poměr počtu buněk kontrolní linií vs. pěstovaných s MSCs v datech měření buněčného cyklu

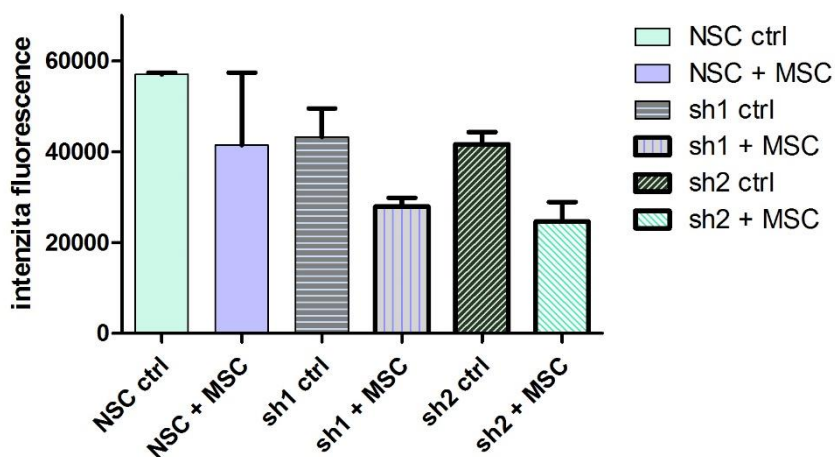
buněčná linie	Poměr buněk (ctrl/+MSC)		
	den 10	den 17	den 24
NSC	0,67	0,70	1,30
sh1	1,31	1,72	3,05
sh2	1,47	1,87	6,57

Tabulka 12 Pokus č. 3 Poměr počtu buněk kontrolní linií vs. pěstovaných s MSCs v datech měření buněčného cyklu (druhé měření v 17. den experimentu zde není graficky vyjádřeno)

5.4.3 Měření proliferujících buněk

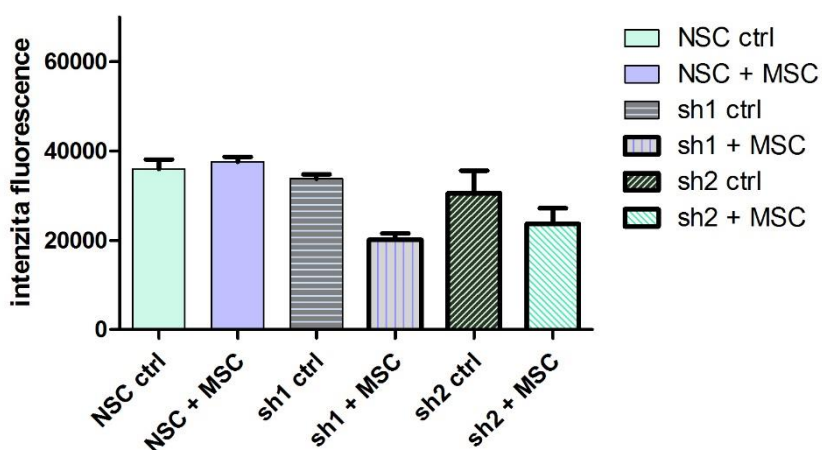
Ve dnech měření buněčného cyklu byla zároveň měřena míra proliferujících buněk pomocí Ki-67-PE během obou dvou opakování pokusu. Data zpracována v programu FlowJo™ a grafy vytvořeny na základě míry fluorescence zaznamenané cytometrem.

Výsledky měření buněčné proliferace ze dne 7 během druhého opakování pokusu se shodovaly s daty získanými z měření buněčného cyklu ve stejném časovém bodě. Rozdíly v množství proliferujících buněk byly v rámci linie malé (kontrola vs. +MSC) (Obr. 33).



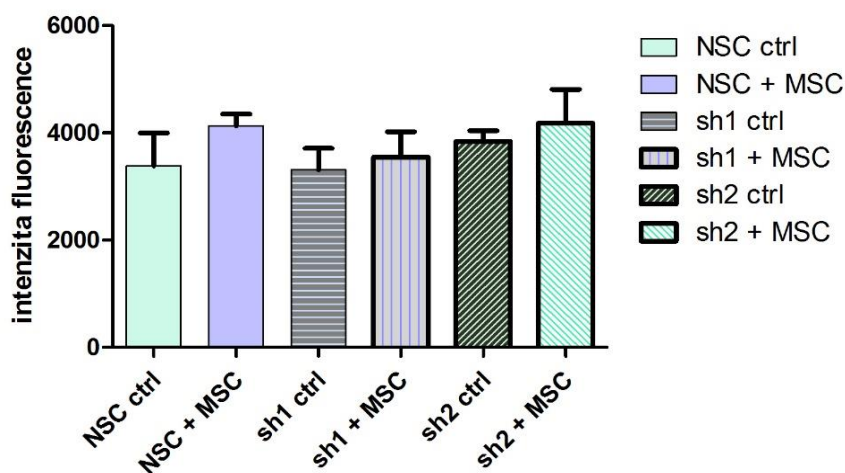
Obrázek 33 Graf množství proliferujících buněk určených na základě fluorescence (druhé opakování, den 7)

Podle dat ze 14. dne (druhý počítačový pokus) míra fluorescence Ki-67 klesla u všech buněčných linií (Obr. 34).



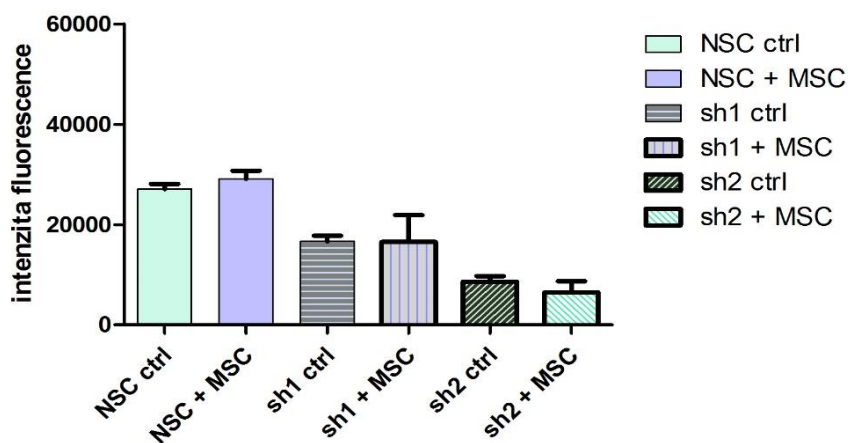
Obrázek 34 Graf množství proliferujících buněk určených na základě fluorescence (druhé opakování, den 14)

Výsledky z měření 10. den třetího počítacího pokusu ukazují výrazně nižší intenzitu fluorescence, proto není toto měření srovnatelné s ostatními. Srovnání jednotlivých linií při tomto měření ukazuje mírně vyšší počet proliferujících buněk pěstovaných společně s MSCs ve srovnání s kontrolními buňkami (Obr. 35)



Obrázek 35 Graf množství proliferujících buněk určených na základě fluorescence (třetí opakování, den 10)

V den 24 měření (třetí počítací pokus) buněčná proliferace všech buněčných linií klesla, i zde byly pozorovány pouze malé rozdíly (Obr. 36).

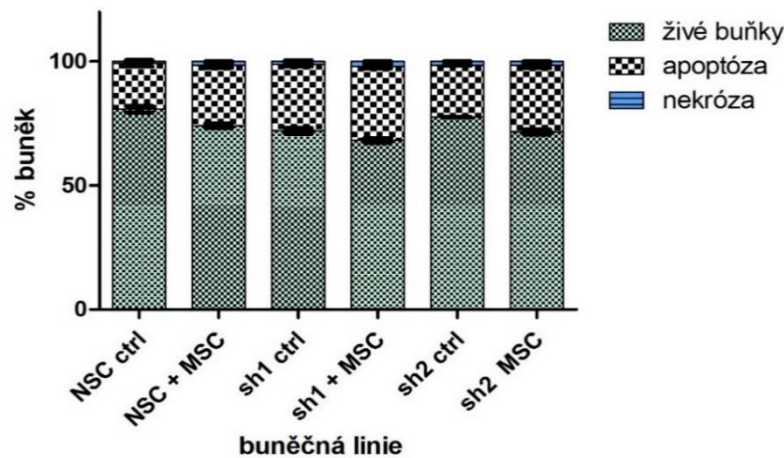


Obrázek 36 Graf množství proliferujících buněk určených na základě fluorescence (třetí měření, den 24)

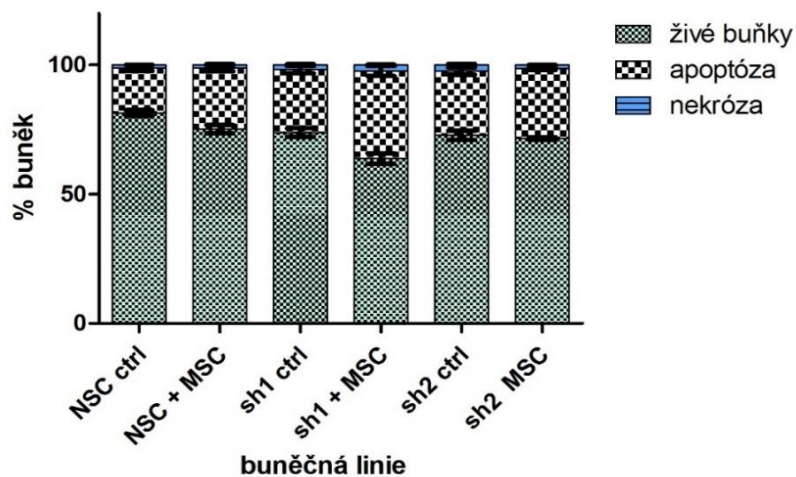
5.4.4 Měření apoptických buněk

Při posledním (třetím) opakování tohoto pokusu bylo přidáno měření apoptických buněk s tezí, že leukemické linie sh1 a sh2 ko-kultivované s MSCs sice mohou proliferovat méně, ale zároveň ve větším množství zůstávají v G0 fázi a méně apoptizují.

V obou dnech měření procentuálního zastoupení apoptických buněk bylo detekováno více buněk v apoptóze u buněk pěstovaných spolu s MSCs všech tří linií (den 21, NSC 18,5 % vs. 22,3 %, sh1 26,8 % vs. 29,9 %, sh1 20,7 % vs. 26,7 %) (Obr. 37 a 38). Největší množství apoptických buněk bylo pozorováno u linie sh1 ko-kultivované s MSCs během druhého měření (33 %).



Obrázek 37 Graf procentuálního zastoupení živých, apoptických a nekrotických buněk (den 21)



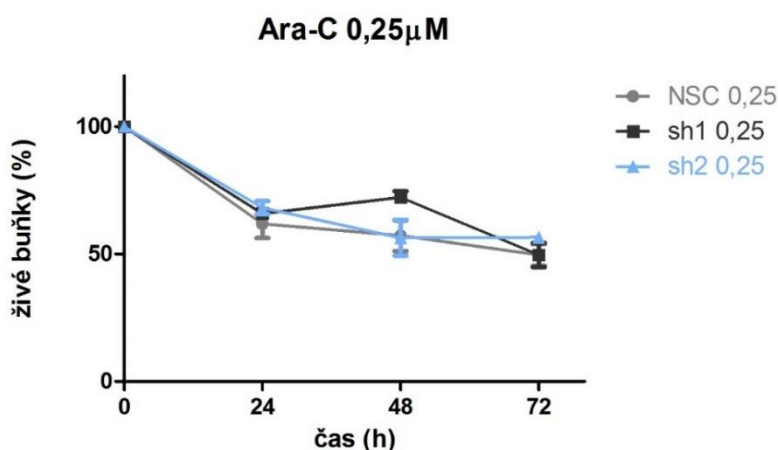
Obrázek 38 Graf procentuálního zastoupení živých, apoptických a nekrotických buněk (den 28, 4 dny po skončení počítacího experimentu)

5.5 PODÁNÍ CYTOSTATIKA *IN VITRO*

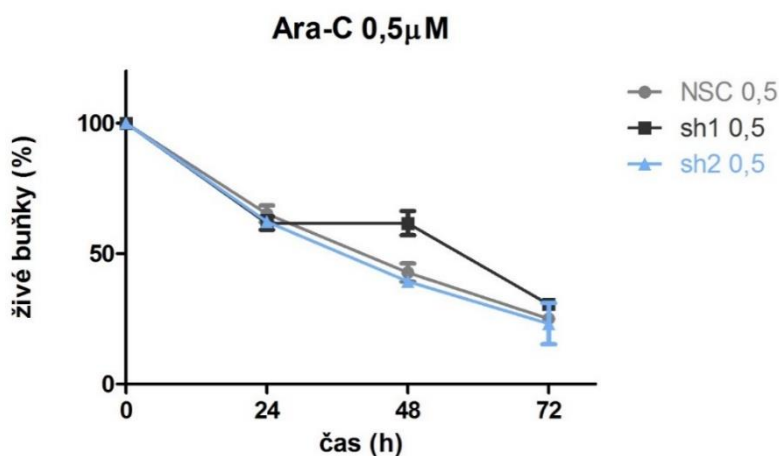
Buněčné linie NSC, sh1 a sh2 byly vystaveny cytostatikům v *in vitro* podmínkách pro porovnání účinku léčby mezi liniemi a srovnání s výsledky z *in vivo* prostředí. Pokusy s jednotlivými cytostatiky byly provedeny pouze v jednom opakování. Koncentrace byly určeny na základě publikací (Yee 2004; Möllgård *et al.* 2008; Kim, Min, a Choi 2001; Nygren a Larsson 1991).

Během prvního pokusu s Ara-C byly buňky nasazeny v příliš nízké koncentraci (50 tis/ml) pro měření na cytometru LSRII a výrazně to zpomalilo práci. Proto bylo v následujícím pokusu s Doxo nasazeno větší množství buněk (200 tis/ml).

Při podání nižší koncentrace cytostatika Ara-C klesl počet všech buněčných linií v 72 h zhruba na 50 %. Při vyšší koncentraci v 72 h od podání přežilo méně než 20 % buněk všech linií s velmi malými rozdíly mezi liniemi NSC a sh2. U linie sh1 ve 48 h od podání cytostatika se dokonce zvýšil počet buněk, a to při podání obou koncentrací (Obr. 39 a 40).

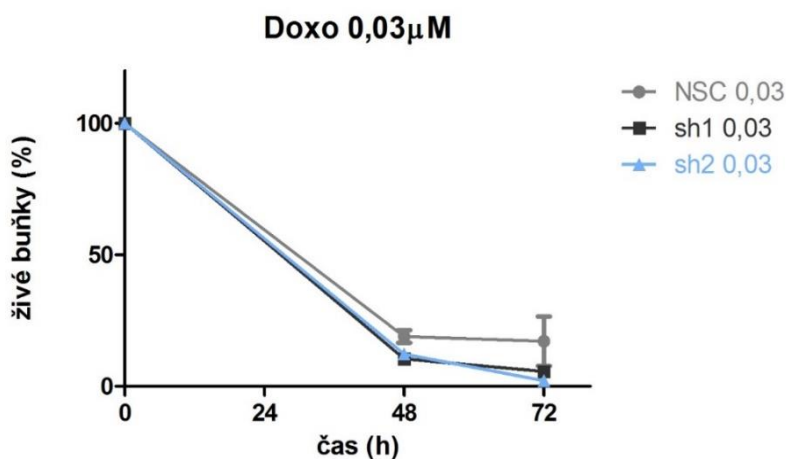


Obrázek 39 Graf životnosti buněk při podání Ara-C (koncentrace 0,25 μ M)

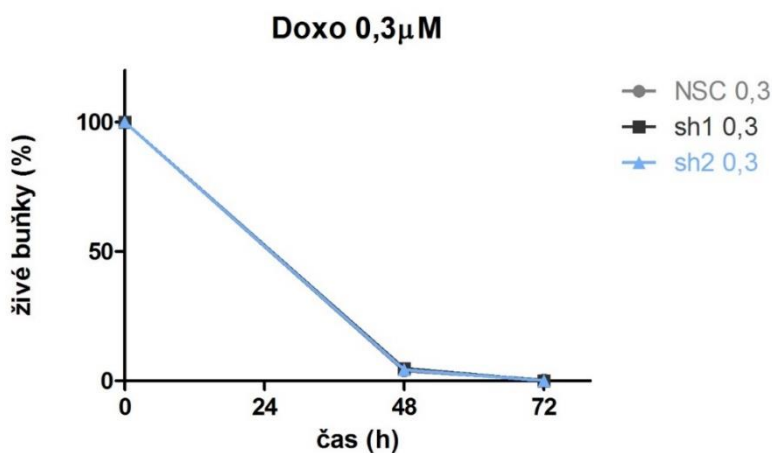


Obrázek 40 Graf životnosti buněk při podání Ara-C (koncentrace 0,5 μ M)

Doxorubicin (Doxo) působil na použité buněčné linie příliš drasticky, a i při podání nižší koncentrace se snížil počet buněk na méně než 20 % už ve 48 h. Při vyšší koncentraci cytostatika klesl počet živých buněk téměř na nulu. Rozdíly mezi jednotlivými liniemi nebyly významné (Obr. 41 a 42).



Obrázek 41 Graf životnosti buněk při podání Doxo (koncentrace 0,03 μ M)



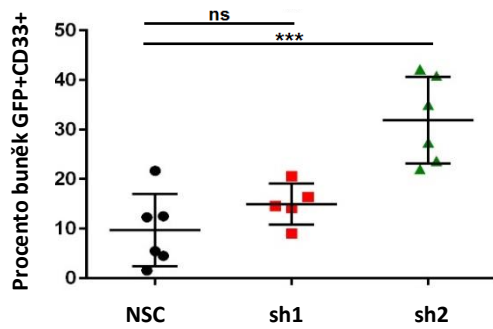
Obrázek 42 Graf životnosti buněk při podání Doxo (koncentrace 0,3 μ M)

5.6 IN VIVO EXPERIMENTS

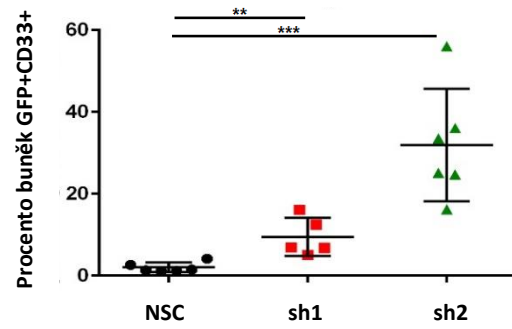
Celkem bylo provedeno 6 *in vivo* experimentů, kterých jsem se účastnila spolu s Miroslavou Kardošovou, Julií Starkovou a Kateřinou Rejlovou. Jejich přehled je uveden v Tabulce 13.

Před začátkem diplomové práce bylo provedeno úspěšné přihojení leukemických buněk linií NSC, sh1 a sh2 NSG myším a optimalizace experimentu.

Po 14 dnech byly izolovány buňky kostní dřeně a sleziny a na průtokovém cytometru měřeny jejich počty. Buněčné linie sh1 a sh2 byly v myších tkáních přítomny ve vyšším množství (Obr. 43 a 44).



Obrázek 43 Graf procentuálního zastoupení přihojených lidských buněk v kostní dřeni myši

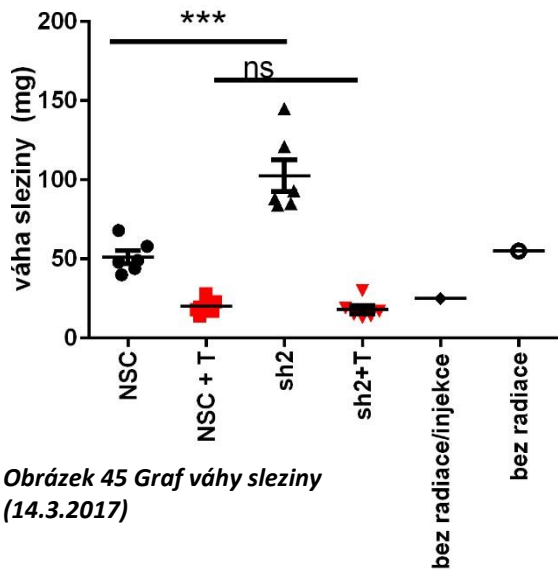


Obrázek 44 Graf procentuálního zastoupení přihojených lidských buněk ve slezině myši

datum experimentu	počet dní experimentu	radiace	injikované buňky	léčba		počet myši na skupinu
7.10.2016	18	1Gy	NSC, sh2	Ara-C 25 mg/kg 5 dní	Doxo 0,75 mg/kg 3 dny	n=4/ ctrl n=1
17.2.2017	15	0,8Gy nebo 1Gy	NSC, sh1, sh2	/	/	n=6/ ctrl n=1
14.3.2017	16	0.8Gy	NSC, sh2	Ara-C 25 mg/kg 5 dní	Doxo 0,75 mg/kg 3 dny	n=6/ ctrl n=1
11.7.2017	14	0.8Gy	NSC, sh2	Ara-C 25 mg/kg 2 dny	Ara-C 50 mg/kg 2 dny	n=4/ ctrl n=1
8.8.2017	14	0.8Gy	NSC, sh2	Ara-C 25 mg/kg 4 dny	Ara-C 50 mg/kg 4 dny	n=4/ ctrl n=1
8.2.2018	14	0.8Gy	NSC, sh2	Ara-C 50 mg/kg 4 dny	1D11 Ab 0.5 mg/kg 6 dní	n=4/ ctrl n=1

Tabulka 13 Přehled *in vivo* experimentů provedených během diplomové práce

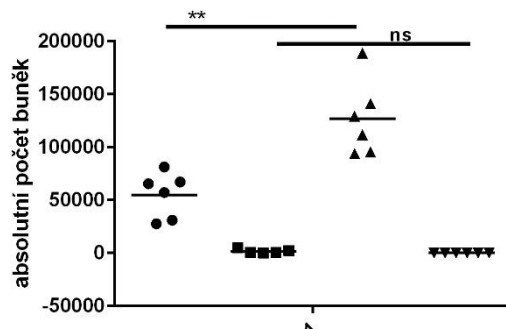
Během prvních *in vivo* pokusů (7.10.2016; 14.3.2017), byla myším *i.v.* a *i.p.* injikována kombinace cytostatik Ara-C a Doxo a *i.p.* jim byl injikován samotný Ara-C. Experiment provedený mezi těmito dvěma daty sloužil k optimalizaci dávky záření po výměně radiačního stroje.



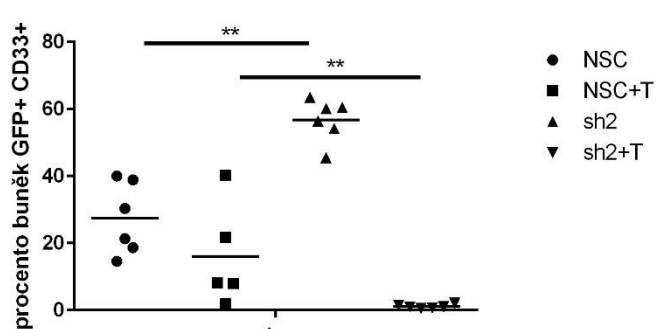
Obrázek 45 Graf váhy sleziny (14.3.2017)

Při pokusu s datem 14.3. 2017 byla slezina myši injikovaných buněčnou linií sh2 zvětšená v porovnání s linií NSC (Obr. 45).

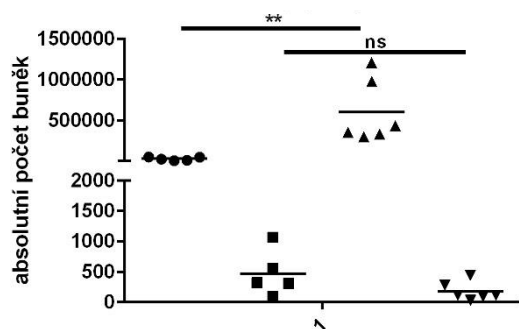
Kombinace obou cytostatik snížila hmotnost sleziny i množství leukemických buněk v myších tkáních (Obr. 46-49). Pro myši byla ovšem příliš drastická a snížila zároveň i celkové množství myších buněk v izolovaných tkáních. Terapie kombinací Ara-C a Doxo byla proto shledána nevhodnou.



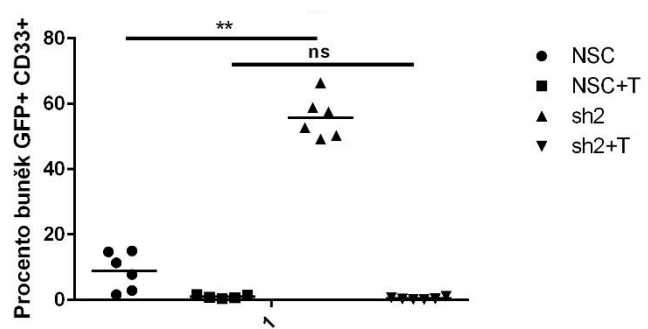
Obrázek 46 Graf absolutního počtu buněk v kostní dřeni (14.3.2017)



Obrázek 47 Graf procenta buněk v kostní dřeni (14.3.2017)

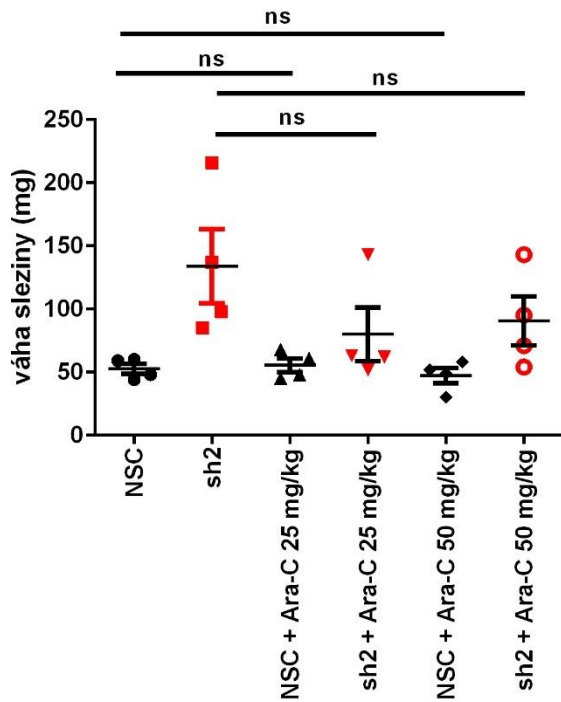


Obrázek 48 Graf absolutního počtu buněk ve slezině (14.3.2017)



Obrázek 49 Graf procenta buněk ve slezině (14.3.2017)

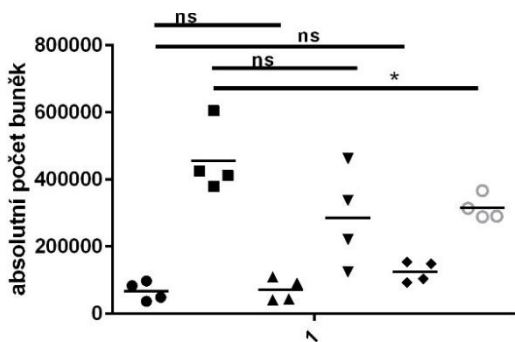
V dalších experimentech byl použit pouze Ara-C. V prvních dvou opakování byly podávány ve čtyřech dnech 2 různé koncentrace *i.p.* injekcí.



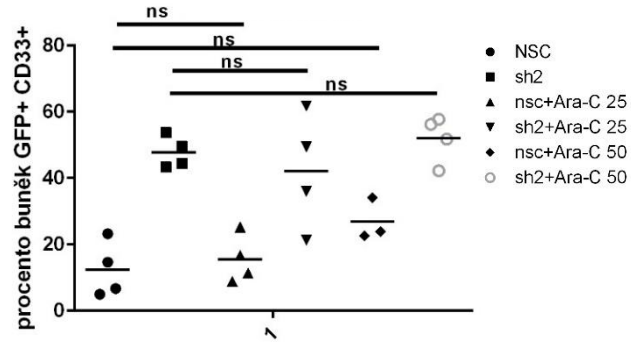
Obrázek 50 Graf váhy sleziny (8.8.2017)

Slezina izolovaná z myší, kterým byla injikovaná linie sh2, byla v datu 8.8.2017 opět zvětšená (Obr. 50). Podání cytostatika Ara-C její velikost snížilo u obou koncentrací s nesignifikantním rozdílem.

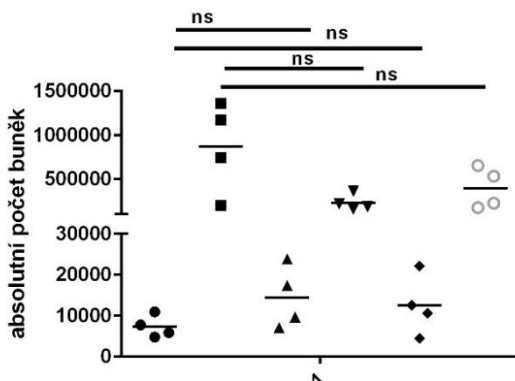
Absolutní počty buněk linie sh2 byly opět vyšší ve srovnání s linií NSC (Obr. 51-54).



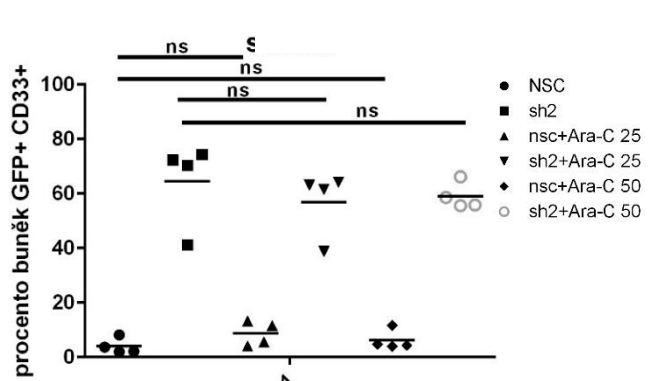
Obrázek 51 Graf absolutního počtu buněk v kostní dřeni (8.8.2017)



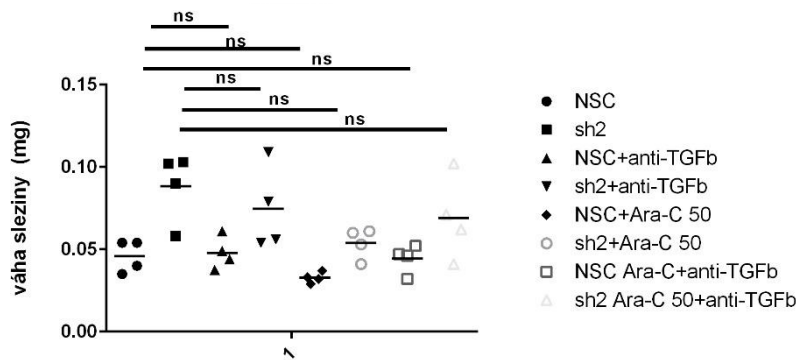
Obrázek 52 Graf procenta buněk v kostí dřeni (8.8.2017)



Obrázek 53 Graf absolutního počtu buněk ve slezině (8.8.2017)



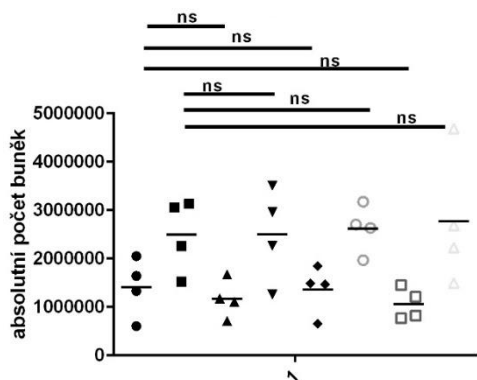
Obrázek 54 Graf procenta buněk ve slezině (8.8.2017)



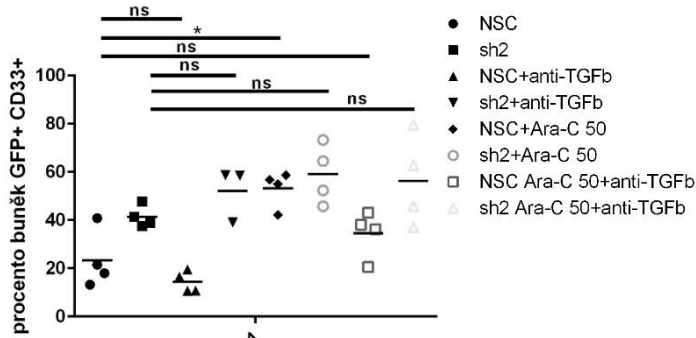
Obrázek 55 Graf váhy sleziny (8.2.2018)

Při posledním provedeném experimentu (8.2.2018) byla použita vyšší koncentrace Ara-C a blokátor TGF- β dráhy (1D11 Ab) a jejich kombinace. I v tomto opakování byl váha sleziny myši s injikovanými sh2 buňkami vyšší (Obr. 55)

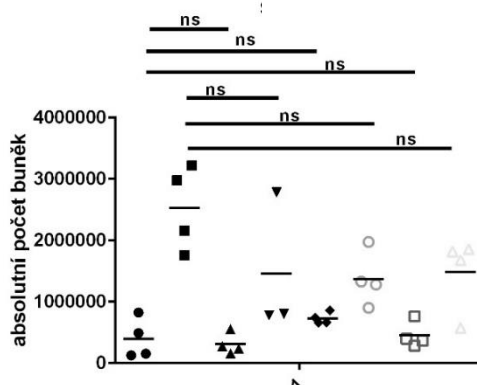
V tomto případě léčba Ara-C množství leukemických buněk linie sh2 v kostní dřeni nesnížil, naopak došlo k vzrůstu jejich počtu, a to i v kombinaci s blokátorem TGF- β dráhy. U linie NSC došlo k nejvýraznějšímu poklesu množství leukemických buněk v tkáních myši při podání blokátoru TGF- β dráhy v kombinaci s cytostatikem v kostní dřeni a blokátoru samotného ve slezině (Obr. 56-59).



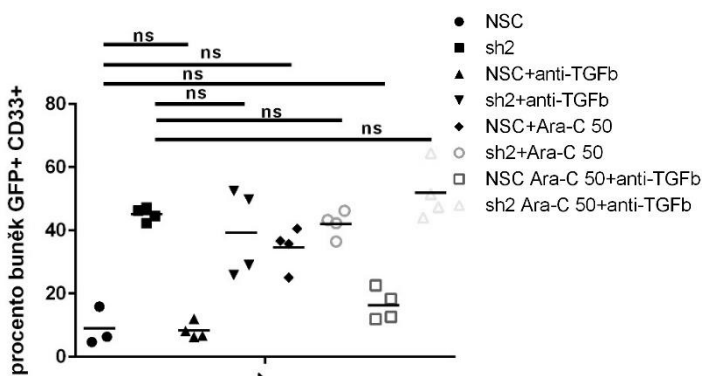
Obrázek 56 Graf absolutního počtu buněk v kostní dřeni (8.2.2018)



Obrázek 57 Graf procenta buněk v kostní dřeni (8.2.2018)



Obrázek 58 Graf absolutního počtu buněk ve slezině (8.2.2018)



Obrázek 59 Graf procenta buněk ve slezině (8.2.2018)

5.7 STUDIUM SIGNÁLNÍ DRÁHY TGF- β

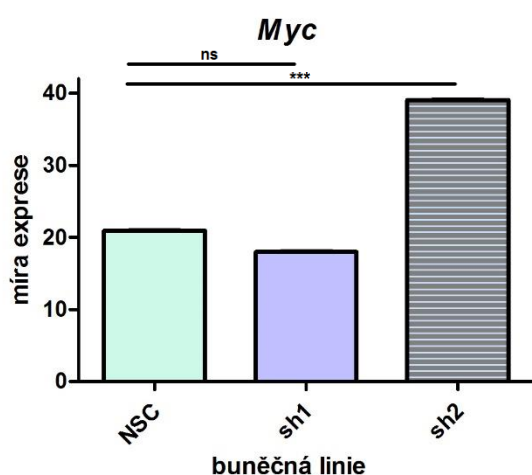
V kapitole Přehled literatury je popsána interakce proteinu DLX1 s komponenty TGF- β dráhy. Míra exprese několika cílových genů této signální dráhy byla sledována v buněčných liniích sh1 a sh2 v porovnání s kontrolní linií NSC pomocí qPCR (Tab. 14-21 a Obr. 60-67).

buněčná linie	míra exprese genu <i>Myc</i>	SEM	poměr k NSC
NSC	20,998	0,070641	1
sh1	17,966	0,12352	0,855605
sh2	39,053	0,058965	1,859844

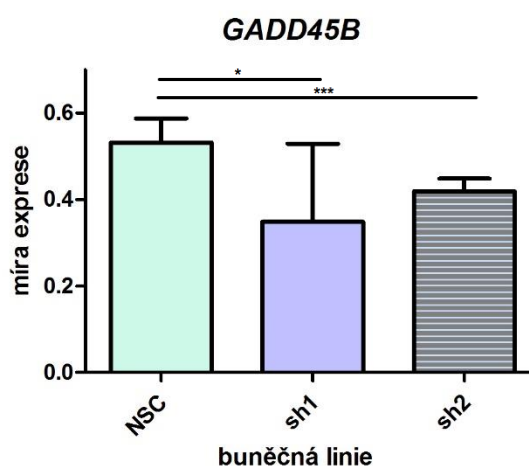
Tabulka 14 Porovnání relativní míry exprese genu *Myc* mezi jednotlivými liniemi

buněčná linie	míra exprese genu <i>GADD45B</i>	SEM	poměr k NSC
NSC	0,531	0,056174	1
sh1	0,348	0,180564	0,655367
sh2	0,419	0,029065	0,789077

Tabulka 15 Porovnání relativní míry exprese genu *GADD45B* mezi jednotlivými liniemi



Obrázek 60 Graf relativní míry exprese genu *Myc*



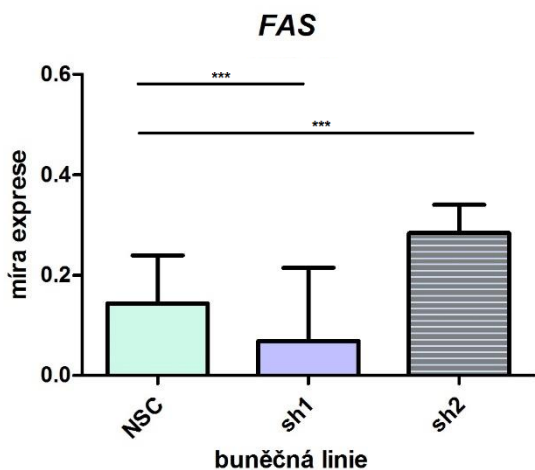
Obrázek 61 Graf relativní míry exprese genu *GADD45B*

buněčná linie	míra exprese genu <i>FAS</i>	SEM	poměr k NSC
NSC	0,144	0,09509	1
sh1	0,069	0,14574	0,479167
sh2	0,284	0,05643	1,972222

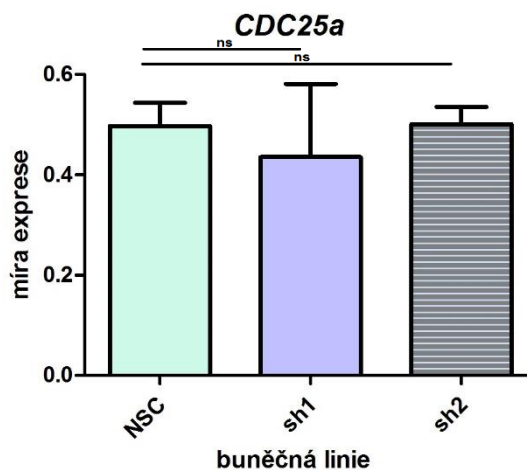
Tabulka 16 Porovnání relativní míry exprese genu *FAS* mezi jednotlivými liniemi

buněčná linie	míra exprese genu <i>CDC25a</i>	SEM	poměr k NSC
NSC	0,497	0,04698	1
sh1	0,435	0,04979	0,875252
sh2	0,501	0,03442	1,008048

Tabulka 17 Porovnání relativní míry exprese genu *CDC25a* mezi jednotlivými liniemi



Obrázek 62 Graf relativní míry exprese genu FAS



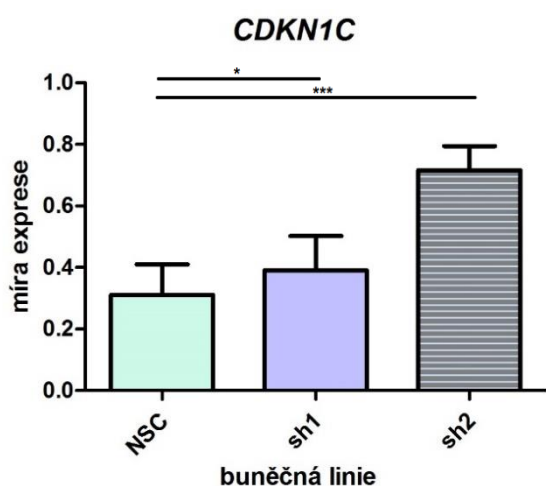
Obrázek 63 Graf relativní míry exprese genu CDC25a

buněčná linie	míra exprese genu CDKN1C	SEM	poměr k NSC
NSC	0,311	0,09934	1
sh1	0,391	0,11169	1,257235
sh2	0,716	0,07831	2,302251

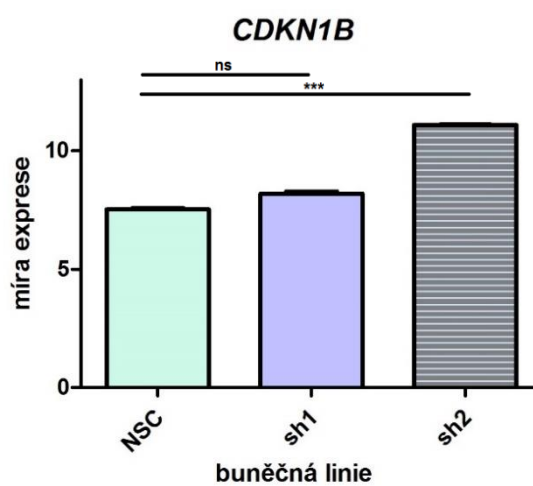
Tabulka 18 Porovnání relativní míry exprese genu CDKN1C mezi jednotlivými liniemi

buněčná linie	míra exprese genu CDKN1B	SEM	poměr k NSC
NSC	7,528	0,05466	1
sh1	8,199	0,07833	1,089134
sh2	11,086	0,02745	1,472635

Tabulka 19 Porovnání relativní míry exprese genu CDKN1B mezi jednotlivými liniemi



Obrázek 64 Graf relativní míry exprese genu CDKN1C



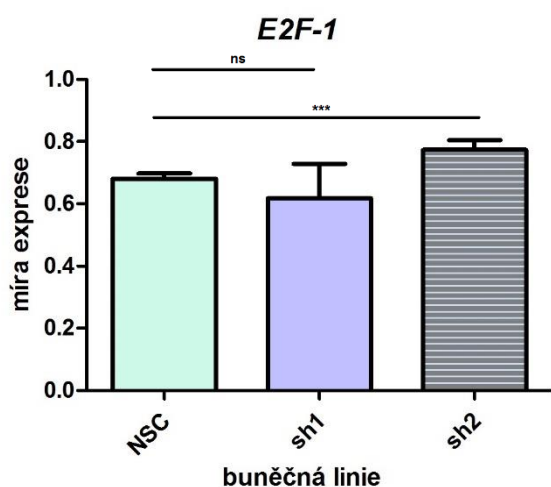
Obrázek 65 Graf relativní míra exprese genu CDKN1B

buněčná linie	míra exprese genu <i>E2F-1</i>	SEM	poměr k NSC
NSC	0,687	0,01743	1
sh1	0,618	0,11059	0,899563
sh2	0,774	0,03039	1,126638

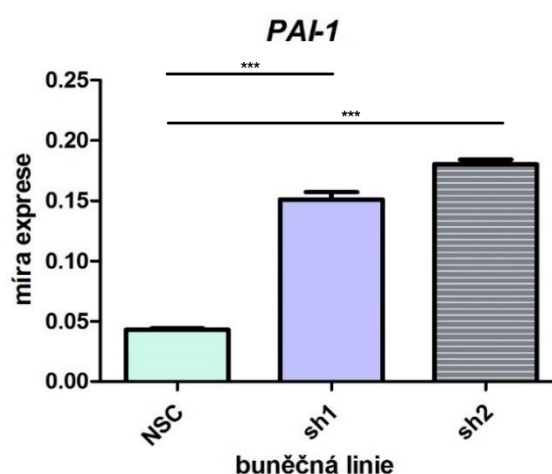
Tabulka 20 Porovnání relativní míry exprese genu *E2F-1* mezi jednotlivými liniemi

buněčná linie	míra exprese genu <i>PAI-1</i>	SEM	poměr k NSC
NSC	0,043	0,047299	1
sh1	0,151	0,053587	3,511628
sh2	0,180	0,029992	4,186047

Tabulka 21 Porovnání relativní míry exprese genu *PAI-1* mezi jednotlivými liniemi



Obrázek 66 Graf relativní míry exprese genu *E2F-1*

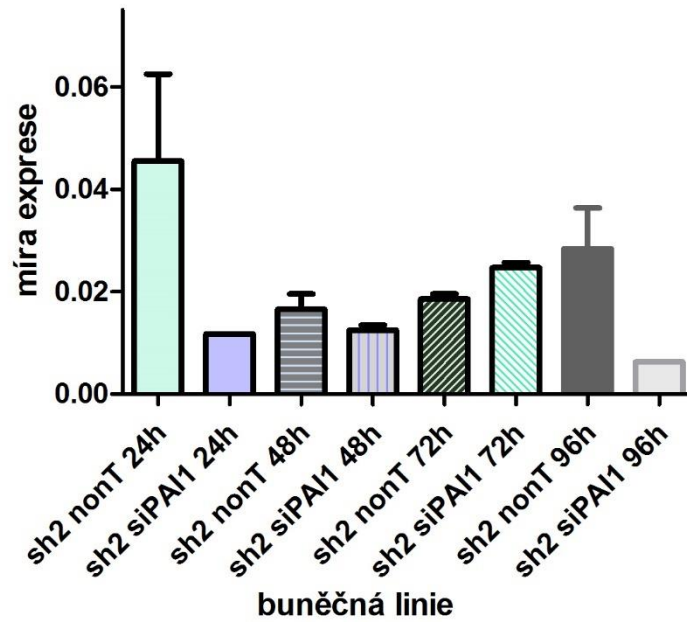


Obrázek 67 Graf míry exprese genu *PAI-1*

U obou buněčných linií se sníženou expresí genu *DXL1*, sh1 a sh2, v porovnání s linií NSC byl detekován signifikantní rozdíl v množství mRNA genu *PAI-1* (Obr. 60-67). Tento výsledek naznačuje vliv proteinu DLX1 na míru exprese tohoto genu.

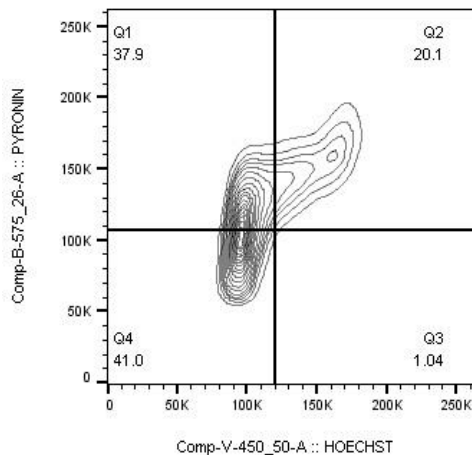
Největší rozdíl byl pozorován u linie sh2, proto byla tato linie použita pro experiment, kdy byla snížena hladina exprese genu *PAI-1* pomocí elektroporace spolu s siRNA se sekvencí k tomuto genu a nonT-siRNA (non-Target siRNA, necílená siRNA). Elektroporace proběhla ve dvou časových bodech (při prvním opakování experimentu pouze v jednom), a to 24 h a 72 h po nasazení buněk do destičky (Obr. 68).

PAI-1

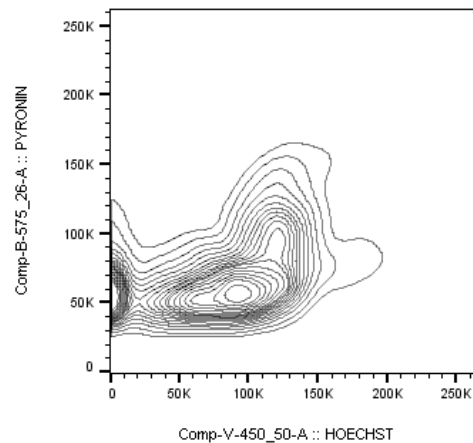


Obrázek 68 Graf relativní míry exprese genu PAI-1 po transfekci

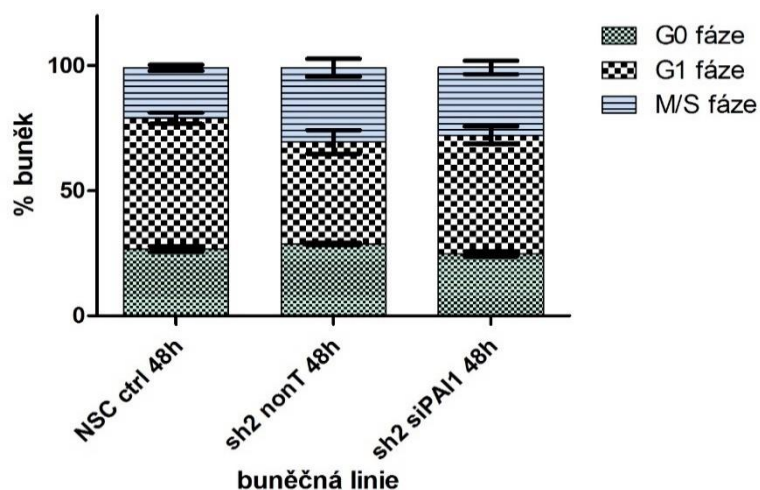
Ve 2 časových bodech (48 h a 96 h) byl měřen buněčný cyklus pro porovnání změny mezi jednotlivými časovými body (Obr. 71). Pro kontrolu byla elektroporována spolu s nonT-siRNA také buněčná linie NSC. V časovém bodě 96 h se buněčný cyklus nepodařilo změřit (Obrázky 69 a 70 ukazují porovnání dat získaných v programu FlowJo™ z měření buněčného cyklu v 48 h a 96 h po transfekci).



Obrázek 69 Měření buněčného cyklu ve 48 h po transfekci linie sh2

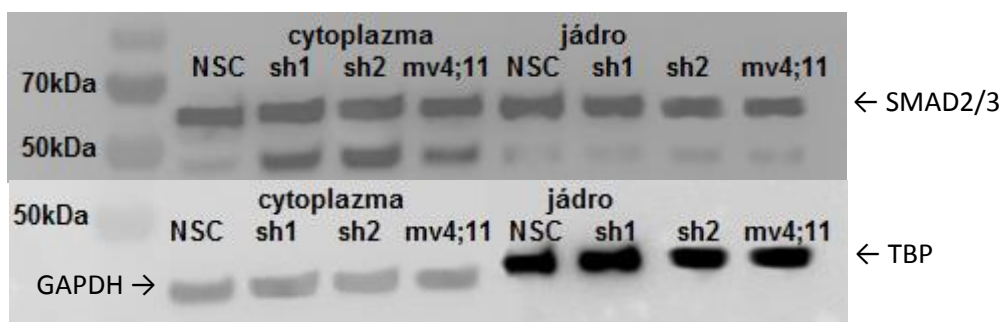


Obrázek 70 Měření buněčného cyklu v 96 h po transfekci linie sh2



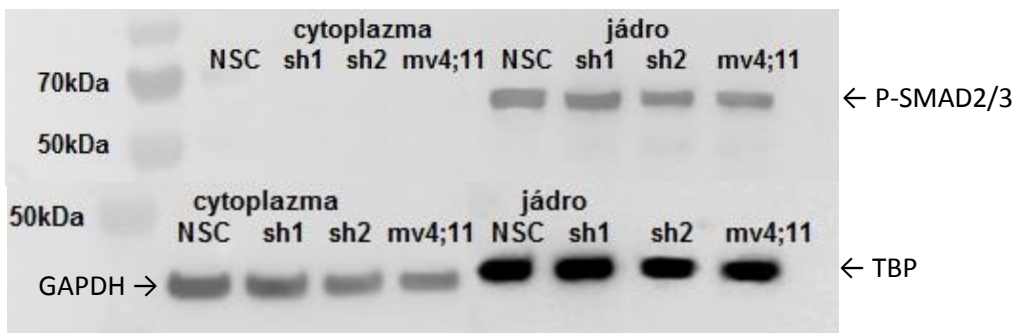
Obrázek 71 Graf rocentuální zastoupení buněk ve fázích buněčného cyklu (48 h po transfekci)

Proteiny SMAD2/3 jsou dalšími důležitými členy signální dráhy TGF- β . Ke zjištění vlivu proteinu DLX1 na tyto proteiny byla využita metoda western blot pro identifikaci proteinu. Množství takto detekovaného proteinu SMAD2/3 se mezi jednotlivými liniemi výrazně nelišilo (Obr. 72).



Obrázek 72 Detekce proteinu SMAD2/3; Pro kontrolu byly použity proteiny TBP a GAPDH

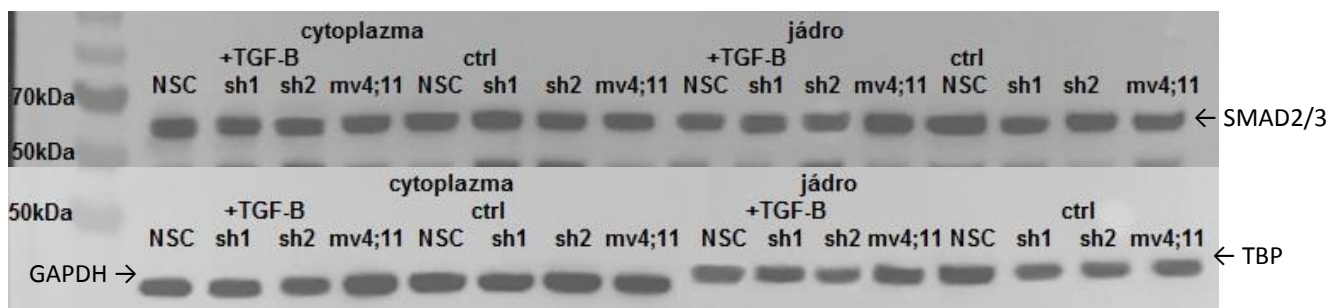
Fosforylovaná forma SMAD2/3, P-SMAD2/3, byla identifikována pouze v jádře. Mezi liniemi byly jen nevýrazné rozdíly (Obr. 73).



Obrázek 73 Detekce proteinu P-SMAD2/3; Pro kontrolu byly použity proteiny TBP a GAPDH

Následně byl k buněčným liniím přidán ligand TGF- β a po 1 h inkubace v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) z nich byla vytvořena peleta a izolován protein (viz 4.3.2 Izolace proteinu). Poté byla detekována hladina proteinu SMAD2/3, P-SMAD2/3 a DLX1 u jednotlivých buněčných linií inkubovaných s TGF- β a porovnána s kontrolními vzorky.

Hladina proteinu SMAD2/3 se po přidání ligandu výrazně nelišila (Obr. 74).



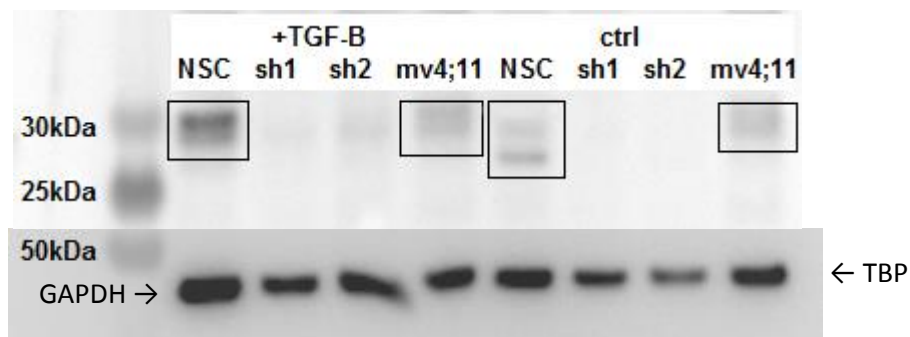
Obrázek 74 Detekce proteinu SMAD2/3 (+TGF- β /ctrl); Pro kontrolu byly použity proteiny TBP a GAPDH

Hladina proteinu P-SMAD2/3 se v jádře buněk po přidání ligandu TGF- β viditelně zvýšila (Obr. 75).



Obrázek 75 Detekce proteinu P-SMAD2/3 v jádře (+TGF- β /ctrl); Pro kontrolu byl použit protein TBP

Po inkubaci buněk s ligandem TGF- β byly pozorovány také rozdíly při detekci proteinu DLX1 v jádře v porovnání s buňkami bez přidaného ligandu. U linie NSC po přidání TGF- β pravděpodobně převažuje delší z izoform proteinu DLX1 (Obr. 76).



Obrázek 76 Detekce proteinu DLX1 v jádře (+TGF- β /ctrl); Pro kontrolu byl použit protein TBP

6 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo objasnit fenotypové rozdíly AML buněk linie MV4;11 s různou hladinou exprese genu *DLX1*. Dle analýzy dat patientských vzorků snížená exprese tohoto genu pozitivně koreluje s horší prognózou onemocnění AML.

6.1 SNÍŽENÁ EXPRESE GENU *DLX1*

Prvním krokem bylo potvrzení snížení exprese genu *DLX1* v modelových liniích sh1 a sh2 v porovnání s kontrolní linií NSC. Snížená hladina exprese byla u těchto dvou linií úspěšně potvrzena na úrovni mRNA i na proteinové úrovni v porovnání s buněčnou linií NSC.

6.2 ROZDÍLY IN VITRO A IN VIVO

U buněčných linií sh1 a sh2 byly pozorovány rozdíly v míře proliferace a buněčném cyklu v porovnání s linií NSC v *in vitro* prostředí. Linie sh1 a sh2 *in vitro* vykazovaly výrazně sníženou proliferaci a zvýšené množství buněk v G0 fázi buněčného cyklu. První *in vivo* pokusy ovšem ukázaly signifikantně vyšší počet buněk sh1 a sh2 v izolovaných tkáních NSG myši v porovnání s linií NSC po xenotransplantaci. Měření buněčného cyklu a apoptózy buněk sh1, sh2 a NSC izolovaných z myších tkání také ukázalo, že buněčné linie sh1 a sh2 *in vivo* méně apoptizují a nachází se v G0 fázi ve vyšším množství (data nejsou v práci prezentována). Na základě těchto výsledků jsme vyslovili hypotézu, že buňky v G0 fázi buněčného cyklu jsou v klidovém stavu, který přispívá k jejich akumulaci v kostní dřeni a slezině a pravděpodobně snižuje buněčnou smrt.

6.2.1 Identifikace senescentních buněk

Některé publikace (Jedema *et al.* 2003) popisují zvýšenou rezistenci senescentních AML buněk v G0 fázi k cytostatikům. G0 fáze by i v našem případě mohla buňky chránit v myších tkáních. Z toho důvodu následovalo určení procenta senescentních buněk u jednotlivých linií *in vitro* pomocí identifikace SA- β Gal. Tento způsob detekce senescentních buněk nebyl pro naše leukemické linie vhodný a naši myšlenku nepotvrdil.

6.2.2 Apoptická array

U linie NSC byla detekována vyšší hladina několika pro-apoptických proteinů v porovnání s liniemi sh1 a sh2. Největší rozdíl byl pozorován při porovnání linií NSC a sh2. Nejvýraznější odlišnosti v mezi liniemi byly detekovány v množství pro-apoptických proteinů Bad (Bcl-2-associated death promoter), Trail R1/DR4, Trail R1/DR5, Diablo a fosforylovaném p53 (S46).

Rozdíly byly detekovány i u dvou anti-apoptických proteinů, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a HSP27, ovšem nebyly tak výrazné. Množství proteinu Bcl-2 bylo mírně zvýšené u linií sh v porovnání s linií NSC. Na druhou stranu detekovaný signál proteinu HSP27 byl vyšší u linie NSC v porovnání s liniemi sh.

Takto získané výsledky jsou v souladu s naší hypotézou, že buněčné linie sh se sníženou expresí genu *DLX1* podstupují apoptózu v menší míře než kontrolní linie NSC s normální hladinou exprese genu *DLX1*.

6.2.3 Ko-ultivace s MSCs

Ko-kultivací leukemických linií s MSCs bylo simulováno prostředí kostní dřeně v *in vitro* podmínkách. Účelem ko-kultivačních experimentů bylo objasnit rozdíly pozorované v *in vitro* a *in vivo* prostředí. Buňky pěstované spolu s MSCs byly porovnány s kontrolními buňkami, pěstovanými ve stejných podmínkách bez MSCs. Všechny buněčné linie byly počítány a z kumulativních počtů buněk byly vytvořeny grafy.

Z grafů je zřejmé, že leukemické linie pěstované spolu s MSCs proliferovaly výrazně méně v porovnání s buňkami pěstovanými bez MSCs v rámci jedné linie. Tyto výsledky nejsou překvapivé. Předchozí práce ukázali, že v přítomnosti MSCs dochází k zástavě leukemických buněk v G0 fázi buněčného cyklu a snížení proliferace. (Konopleva *et al.* 2002)

Během ko-kultivačního experimentu byly v daných časových bodech odebrány buňky a měřen buněčný cyklus, množství proliferujících buněk a také apoptóza.

I tento rozsáhlý experiment byl proveden za účelem kvantifikace množství buněk jednotlivých linií v G0 fázi, tedy neproliferujících. Data získaná měřením buněčného cyklu byla doplněna také identifikací znaku proliferujících buněk Ki-67.

Více buněk v G0 fázi bylo detekováno u vzorků, kde bylo během počítacího experimentu zaznamenáno celkově menší množství buněk. Jedná se hlavně o linie sh ko-kultivované s MSCs.

Z části naše tvrzení potvrzuje i výsledky měření Ki-67, který byl detekován ve větší míře u kontrolních buněčných linií pěstovaných bez MSCs. Pro vyvození závěrů z tohoto měření je nicméně nutná konzultace získaných výsledků s cytometrickým specialistou.

Měření procentuálního zastoupení apoptických buněk pomocí Annexinu V ukázalo nesignifikantně vyšší množství apoptických buněk u buněčných linií pěstovaných spolu s MSCs v porovnání s kontrolními buněčnými liniemi pěstovanými bez MSCs. Tato data se liší od našeho očekávání, že buňky ko-kultivované s MSCs podstupují apoptózu v menší míře v porovnání s kontrolními buňkami, což by částečně mohlo vysvětlovat pozorované rozdíly v množství buněčných linií v *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Získaný výsledek může ovšem souviset s konkrétním modelem experimentu. Prostor kostní dřeně nezávisí pouze na MSCs a důležitou roli v něm hraje řada dalších faktorů.

6.2.4 Podání cytostatika *in vitro*

Leukemické buněčné linie NSC, sh1 a sh2 byly *in vitro* vystaveny cytostatikům Ara-C a Doxo, vždy ve dvou různých koncentracích, za účelem studia cytostatického vlivu na jednotlivé linie. Cílem pokusů bylo otestovat, zda sh buněčné linie, které mají velké procento buněk v G0 fázi buněčného cyklu, vykazují sníženou citlivost na terapii. To by mohlo podpořit

myšlenku, že leukemické buňky se sníženou expresí genu *DLX1* jsou všeobecně odolnější vůči vnějším faktorům a zčásti vysvětlovat asociaci snížené exprese genu *DLX1* a horší prognózy AML pacientů, pozorovanou při analýze dat z expresního profilování z databáze TCGA.

6.2.4.1 Cytarabin

Ara-C byl podán v koncentracích 0,25 μM a 0,5 μM . Nižší koncentrace způsobila pokles živých buněk všech tří linií na zhruba 50 % a rozdíly mezi jednotlivými liniemi a dny měření byly nepatrné. Výjimku tvořila linie sh1, u které se procento živých buněk druhý den po podání cytostatika zvýšilo na zhruba 70 % a třetí den opět kleslo.

Podobný trend byl pozorován i při podání vyšší dávky cytostatika. Procento živých buněk linie sh1 se 48 h po léčbě opět mírně zvedlo v porovnání s časovým bodem 24 h. Následně došlo k poklesu na zhruba na 20 % a vyrovnalo se liniím sh2 a NSC, které vykazovali pokles v procentu živých buněk po všechny tři dny konání experimentu.

6.2.4.2 Doxorubicin

Cytostatikum Doxo bylo všem buněčným liniím podáno v koncentraci 0,03 μM a 0,3 μM . Životnost buněk byla měřena ve 2 časových bodech (48 h a 72 h) stejným způsobem jako předchozí experiment s Ara-C. Nižší koncentrace Doxo způsobila pokles živých buněk pod 20 % u všech buněčných linií. Zdá se, že množství živých buněk linií sh1 a sh2 pokleslo více v porovnání s linií NSC. Rozdíl ovšem nebyl příliš výrazný a procento živých buněk všech linií velmi nízké.

Při podání vyšší koncentrace Doxo došlo k poklesu procenta živých buněk všech linií téměř na nulu v obou časových bodech měření.

6.2.5 Léčba *in vivo*

Během diplomové práce proběhlo celkem 6 *in vivo* experimentů na myším modelovém organismu s přiloženými leukemickými buňkami. Z toho 5 experimentů bylo věnováno léčbě cytostatiky Doxo a Ara-C.

Při prvních *in vivo* experimentech byla použita kombinace cytostatika Doxo a Ara-C. Po 16 až 18 dnech experimentu byly izolovány buňky z kostní dřeně, sleziny a periferní krve myší. Kombinace cytostatik byla velmi účinná a absolutní množství i procentuální zastoupení leukemických buněk linií NSC i sh2 se signifikantně snížil. Kromě leukemických lidských buněk se ovšem v myších tkáních snížil zároveň i počet normálních myších buněk, proto bylo dále přistoupeno k použití pouze jednoho cytostatika, Ara-C.

V dalších *in vivo* experimentech byly myším podány různé koncentrace cytostatika Ara-C. Po 14 dnech experimentu byl u linie sh2 pozorován mírný pokles absolutního počtu buněk ve slezině a kostní dřeni u obou koncentrací Ara-C, nicméně rozdíly mezi léčenými a neléčenými vzorky byly převážně nesignifikantní, přičemž u NSC linie došlo ke zvýšení

absolutního počtu a také procent lidských leukemických buněk zastoupených v kostní dřeni a slezině.

Při posledním *in vivo* experimentu bylo jedné skupině myší podáno cytostatikum Ara-C samotné, druhé skupině myší inhibitor TGF- β dráhy a další skupině myší kombinace Ara-C a inhibitoru. Procento leukemických buněk linie NSC se po vyšší koncentraci cytostatika zvýšilo v kostní dřeni i slezině, v kostní dřeni šlo o signifikantní vzrůst. Po podání Ara-C s inhibitorem dráhy TGF- β také došlo k mírnému růstu množství NSC buněk. Procentuální zastoupení linie sh2 částečně pokleslo po podání obou koncentrací Ara-C i kombinaci cytostatika s inhibitorem dráhy TGF- β . Rozdíly v absolutních počtech buněk izolovaných z tkání léčených myší v porovnání s kontrolní skupinou myší nebyly výrazné.

Z *in vivo* experimentů na popsaném myším modelu vyplývá, že sh buněčné linie nejsou méně senzitivní na podání cytostatika, konkrétně Ara-C.

6.3 STUDIUM TGF-B DRÁHY

Proteiny DLX1 a DLX2 byly popsány jako negativní regulátory TGF- β dráhy (Chan *et al.* 2017, Yilmaz *et al.* 2011, Chiba *et al.* 2003). Cílové geny TGF- β dráhy zasahují do proliferace, diferenciaci a také do regulace buněčného cyklu. Z těchto důvodů jsme se zaměřili na aktivitu TGF- β dráhy v našich modelových liniích.

Pomocí qPCR byla studována exprese několika cílových genů TGF- β signální dráhy u buněk sh1 a sh2 v porovnání s linií NSC. Největší rozdíl mezi buňkami se sníženou expresí genu *DLX1* a kontrolními buňkami NSC s vyšší hladinou exprese genu *DLX1* byl pozorován právě u genu *PAI-1*.

Buněčný cyklus sh linií a jejich poměr v G0 fázi může být regulován zvýšenou expresí genu *PAI-1*. Pro ověření této teorie byla pomocí RNA interference snížena hladinu *PAI-1* v buňkách sh2. Buňky bylo nutné elektroporovat dvakrát za účelem prodloužení umlčení genu *PAI-1*.

Takto provedené experimenty lze prozatím označit pouze za optimalizační a z nich získané výsledky jsou obtížně interpretovatelné. V budoucnu bude nutné vyřešit vysokou úmrtnost buněk způsobenou elektroporací, která ovlivnila měření buněčného cyklu a proliferujících buněk.

7 SOUHRN

V pilotní práci byla analýzou expresních dat pacientů AML nalezena korelace mezi sníženou expresí genu *DLX1* a horší prognózou pacientů. Na základě těchto dat byl pomocí vlásenkové RNA vytvořen model monocytární leukemické linie MV4;11 s nízkou hladinou exprese genu *DLX1* (sh1 a sh2 linie). Jeho fenotypové změny byly porovnány s parentální linií s vysokou hladinou exprese genu *DLX1* (NSC linie). V pilotní studii byly detekovány rozdíly v míře proliferace, při analýze buněčného cyklu a apoptózy. Buněčné linie sh vykazovali *in vitro* nižší proliferaci a signifikantně větší procento buněk v G0 fázi buněčného cyklu ve srovnání s linií NSC, přičemž v *in vivo* prostředí na myším modelu byl detekován zvýšený počet přihojených buněk linie sh a buňky si nadále zachovávali zástavu v G0 fázi. Během diplomové práce byla potvrzena pilotní data a k měření buněčného cyklu bylo přidáno měření znaku proliferujících buněk Ki-67. Pomocí tohoto měření bylo zaznamenáno více proliferujících buněk u linie NSC v porovnání s sh liniemi. Vyslovili jsme hypotézu, že sh buňky se nachází v klidovém stavu, který jim pravděpodobně umožňuje dlouhodobé přežívání v *in vivo* prostředí. Tento klidový stav jsme se pokusili lépe popsat. V první řadě byla detekována senescence, kterou se však zatím nepodařilo dostatečně prokázat. V této souvislosti bylo prokázáno, že sh buňky mají signifikantně vyšší expresi cílového genu TGF- β dráhy, *PAI-1*, který aktivuje replikativní senescenci. Pomocí RNA interference byla úspěšně umlčena hladina tohoto genu, změny v buněčném cyklu budou dále studovány. Další experimenty byly zaměřeny na určení míry apoptózy a nižší hladinu pro-apoptotických proteinů u linie sh2, což by mohlo také souviset s perzistencí sh buněk v kostní dřeni a slezině transplantovaných myší.

V další části byla provedena ko-kultivace leukemických buněk s MSCs za účelem simulace prostředí kostní dřene. Během tohoto experimentu byl srovnán fenotyp leukemických buněk pěstovaných bez přítomnosti a v přítomnosti MSCs, pro porovnání *in vitro* a *in vivo* podmínek. Bylo zjištěno, že všechny typy buněk pěstované společně s MSCs celkově méně proliferují a dochází k nárůstu buněk v G0 fázi. Je však stále patrný rozdíl mezi NSC a sh1, sh2 liniemi. V rámci srovnání NSC linie byl rozdíl v růstu menší na rozdíl od srovnání sh linií, kde přítomnost MSCs snižovala proliferaci buněk významněji.

Buněčné linie byly vystaveny cytostatikům Ara-C a Doxo v *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Cílem bylo ověřit citlivost jednotlivých linií na podaná cytostatika. Během *in vitro* pokusů nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi jednotlivými liniemi. *In vivo* experimenty proběhly v několika opakováních. Nejprve byla myším podána kombinace Ara-C a Doxo, která se ukázala být velmi agresivní. Proto byl v dalších experimentech podáván pouze Ara-C, ke kterému byla v posledním experimentu přidána neutralizující protilátka TGF- β dráhy. Největší rozdíl byl detekován v procentuálním zastoupení NSC buněk izolovaných z kostní dřene a sleziny, které se zvýšilo po podání samotného cytostatika i cytostatika v kombinaci s inhibitorem TGF- β dráhy. Procento buněk linie sh2 mírně pokleslo při podání cytostatika i v kombinaci inhibitoru s cytostatikem. Na základě dat z *in vivo* experimentů se zdá, že sh buněčné linie nejsou méně citlivé k terapii použitými cytostatiky.

8 REFERENCE

- Acampora, D., G.R. Merlo, L. Paleari, B. Zerega, M.P. Postiglione, S. Mantero, E. Bober, O. Barbieri, A. Simeone, a G. Levi. 1999. „Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*". *Development* 126 (17): 3795.
- Amadori, Sergio, Stefan Suci, Dominik Selleslag, Franco Aversa, Gianluca Gaidano, Maurizio Musso, Luciana Annino, et al. 2016. „Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial". *Journal of Clinical Oncology* 34 (9): 972–79.
- Anderson, Stewart A, Mengsheng Qiu, Alessandro Bulfone, David D Eisenstat, Juanito Meneses, Roger Pedersen, a John L.R Rubenstein. 1997. „Mutations of the Homeobox Genes *Dlx-1* and *Dlx-2* Disrupt the Striatal Subventricular Zone and Differentiation of Late Born Striatal Neurons". *Neuron* 19 (1): 27–37.
- Andreeff, M, V Ruvolo, S Gadgil, C Zeng, K Coombes, W Chen, S Kornblau, A E Barón, a H A Drabkin. 2008. „HOX Expression Patterns Identify a Common Signature for Favorable AML". *Leukemia* 22 (11): 2041–47.
- Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola, a J. W. Vardiman. 2016. „The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia". *Blood* 127 (20): 2391–2405.
- Argiropoulos, B, a R K Humphries. 2007. „Hox Genes in Hematopoiesis and Leukemogenesis". *Oncogene* 26 (47): 6766–76.
- Borthakur, G., H. Kantarjian, F. Ravandi, W. Zhang, M. Konopleva, J. J. Wright, S. Faderl, et al. 2011. „Phase I Study of Sorafenib in Patients with Refractory or Relapsed Acute Leukemias". *Haematologica* 96 (1): 62–68.
- Boyd, Allison L., Jennifer C. Reid, Kyle R. Salci, Lili Aslostovar, Yannick D. Benoit, Zoya Shapovalova, Mio Nakanishi, et al. 2017. „Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelopoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche". *Nature Cell Biology* 19 (11): 1336–47.
- Cohen, Stephen M., a Gerd Jürgens. 1989. „Proximal-Distal Pattern Formation In *Drosophila*: Graded Requirement For Distal-Less Gene Activity during Limb Development". *Roux's Archives of Developmental Biology* 198 (3): 157–69.
- Ding, Li, Timothy J. Ley, David E. Larson, Christopher A. Miller, Daniel C. Koboldt, John S. Welch, Julie K. Ritchey, et al. 2012. „Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing". *Nature* 481 (7382): 506–10.
- Döhner, Hartmut, Elihu H. Estey, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Alan K. Burnett, Hervé Dombret, Pierre Fenaux, David Grimwade, a Richard A. Larson. 2010. „Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet". *Blood* 115 (3): 453–474.
- Döhner, Hartmut, Daniel J. Weisdorf, a Clara D. Bloomfield. 2015. „Acute Myeloid Leukemia". Editoval Dan L. Longo. *New England Journal of Medicine* 373 (12): 1136–52.
- Drabkin, H. A., C. Parsy, K. Ferguson, F. Guilhot, L. Lacotte, L. Roy, C. Zeng, A. Baron, S. P. Hunger, a M. Varella-Garcia. 2002. „Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia". *Leukemia* 16 (2): 186.
- Eppert, Kolja, Katsuto Takenaka, Eric R Lechman, Levi Waldron, Björn Nilsson, Peter van Galen, Klaus H Metzeler, et al. 2011. „Stem Cell Gene Expression Programs Influence Clinical Outcome in Human Leukemia". *Nature Medicine* 17 (9): 1086–93.
- Estey, Elihu H. 2014. „Acute myeloid leukemia: 2014 Update on risk-stratification and management". *American journal of hematology* 89 (11): 1063–1081.
- Faderl, Stefan, Meir Wetzler, David Rizzieri, Gary Schiller, Madan Jagasia, Robert Stuart, Siddhartha Ganguly, et al. 2012. „Clofarabine Plus Cytarabine Compared With Cytarabine Alone in Older

- Patients With Relapsed or Refractory Acute Myelogenous Leukemia: Results From the CLASSIC I Trial". *Journal of Clinical Oncology* 30 (20): 2492–99.
- Ferrara, Felicetto, a Charles A. Schiffer. 2013. „Acute myeloid leukaemia in adults". *The Lancet* 381 (9865): 484–495.
- Ferrari, Nicoletta, Giulio L. Palmisano, Laura Paleari, Giuseppe Basso, Manuela Mangioni, Vincenzo Fidanza, Adriana Albini, Carlo M. Croce, Giovanni Levi, a Claudio Brigati. 2003. „DLX Genes as Targets of ALL -1: DLX 2,3,4 down-Regulation in t(4;11) Acute Lymphoblastic Leukemias". *Journal of Leukocyte Biology* 74 (2): 302–5.
- Fortunel, Nicolas O., Antoinette Hatzfeld, a Jacques A. Hatzfeld. 2000. „Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis". *Blood* 96 (6): 2022–2036.
- Frisch, Benjamin J., John M. Ashton, Lianping Xing, Michael W. Becker, Craig T. Jordan, a Laura M. Calvi. 2012. „Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia". *Blood* 119 (2): 540–550.
- Frohling, S. 2002. „Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm". *Blood* 100 (13): 4372–80.
- Gao, Li, Junzhong Sun, Fang Liu, Hui Zhang, a Yigai Ma. 2016. „Higher Expression Levels of the HOXA9 Gene, Closely Associated with MLL-PTD and EZH2 Mutations, Predict Inferior Outcome in Acute Myeloid Leukemia". *Oncotargets and Therapy*, únor, 711.
- Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhom, Kimberly Chambert, et al. 2014. „Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence". *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477–87.
- Geyh, S, M Rodríguez-Paredes, P Jäger, C Khandanpour, R-P Cadeddu, J Gutekunst, C M Wilk, et al. 2016. „Functional Inhibition of Mesenchymal Stromal Cells in Acute Myeloid Leukemia". *Leukemia* 30 (3): 683–91.
- Gilliland, D. G. 2002. „The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia". *Blood* 100 (5): 1532–42.
- Golub, T. R. 1999. „Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring". *Science* 286 (5439): 531–37.
- Grimwade, D., R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett, a on behalf of the National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. 2010. „Refinement of Cytogenetic Classification in Acute Myeloid Leukemia: Determination of Prognostic Significance of Rare Recurring Chromosomal Abnormalities among 5876 Younger Adult Patients Treated in the United Kingdom Medical Research Council Trials". *Blood* 116 (3): 354–65.
- Hara, Fumikata, Shaija Samuel, Jinsong Liu, Daniel Rosen, Robert R. Langley, a Honami Naora. 2007. „A Homeobox Gene Related to Drosophila Distal-Less Promotes Ovarian Tumorigenicity by Inducing Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2". *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1594–1606.
- Hayakawa, F, K Sugimoto, Y Harada, N Hashimoto, N Ohi, S Kurahashi, a T Naoe. 2013. „A Novel STAT Inhibitor, OPB-31121, Has a Significant Antitumor Effect on Leukemia with STAT-Addictive Oncokinases". *Blood Cancer Journal* 3 (11): e166–e166.
- Hayakawa, Fumihiko, Masayuki Towatari, Hitoshi Kiyoi, Mitsune Tanimoto, Toshio Kitamura, Hidehiko Saito, a Tomoki Naoe. 2000. „Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines". *Oncogene* 19 (5): 624.
- Chan, D. W., W. W. Y. Hui, J. J. Wang, M. M. H. Yung, L. M. N. Hui, YIMING Qin, R. R. Liang, T. H. Y. Leung, D. Xu, a K. K. L. Chan. 2017. „DLX1 acts as a crucial target of FOXM1 to promote ovarian cancer aggressiveness by enhancing TGF- β /SMAD4 signaling". *Oncogene* 36 (10): 1404.
- Chiba, Shigeru, Kenichi Takeshita, Yoichi Imai, Keiki Kumano, Mineo Kurokawa, Shigeo Masuda, Kiyoshi Shimizu, Shuji Nakamura, Frank H. Ruddle, a Hisamaru Hirai. 2003. „Homeoprotein

- DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (26): 15577–15582.
- Choi, Yeo-Jin, Ga-Young Baek, Hae-Ran Park, Sung-Kee Jo, a Uhee Jung. 2016. „Smad2/3-Regulated Expression of DLX2 Is Associated with Radiation-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Radioresistance of A549 and MDA-MB-231 Human Cancer Cell Lines". Editoval Aamir Ahmad. *PLOS ONE* 11 (1): e0147343.
- Jabbour, Elias, Nicholas J. Short, Farhad Ravandi, Xuelin Huang, Lianchun Xiao, Guillermo Garcia-Manero, William Plunkett, et al. 2017. „A Randomized Phase 2 Study of Idarubicin and Cytarabine with Clofarabine or Fludarabine in Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: CIA Versus FIA in AML". *Cancer* 123 (22): 4430–39.
- Jedema, I, R M Y Barge, B A Nijmeijer, R Willemze, a J H F Falkenburg. 2003. „Recruitment of Leukemic Cells from G0 Phase of the Cell Cycle by Interferons Results in Conversion of Resistance to Daunorubicin". *Leukemia* 17 (10): 2049–51.
- Kato, T., N. Sato, A. Takano, M. Miyamoto, H. Nishimura, E. Tsuchiya, S. Kondo, Y. Nakamura, a Y. Daigo. 2008. „Activation of Placenta-Specific Transcription Factor Distal-Less Homeobox 5 Predicts Clinical Outcome in Primary Lung Cancer Patients". *Clinical Cancer Research* 14 (8): 2363–70.
- Kayser, Sabine, a Mark J. Levis. 2014. „FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Clinical Implications and Limitations". *Leukemia & Lymphoma* 55 (2): 243–55.
- Kim, Hyang-Suk, Young-Don Min, a Cheol-Hee Choi. 2001. „Double-Edged Sword of Chemosensitizer: Increase of Multidrug Resistance Protein (MRP) in Leukemic Cells by an MRP Inhibitor Probenecid". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (1): 64–71.
- Kluk, Brian J., Yebo Fu, Trina A. Formolo, Lei Zhang, Anne K. Hindle, Yan-gao Man, Robert S. Siegel, Patricia E. Berg, Chuxia Deng, a Timothy A. McCaffrey. 2010. „BP1, an isoform of DLX4 homeoprotein, negatively regulates BRCA1 in sporadic breast cancer". *International journal of biological sciences* 6 (5): 513.
- Konopleva, M, S Konoplev, W Hu, A Y Zaritskey, B V Afanasiev, a M Andreeff. 2002. „Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins". *Leukemia* 16 (9): 1713–24.
- Lee, Dongjun, Ying-Hua Wang, Demetrios Kalaitzidis, Janani Ramachandran, Homare Eda, David B. Sykes, Noopur Raje, a David T. Scadden. 2016. „Endogenous Transmembrane Protein UT2 Inhibits PSTAT3 and Suppresses Hematological Malignancy". *Journal of Clinical Investigation* 126 (4): 1300–1310.
- Lee, Su Yeon, Hyun Min Jeon, Cho Hee Kim, Min Kyung Ju, Hye Sun Bae, Hye Gyeong Park, Sung-Chul Lim, Song Iy Han, a Ho Sung Kang. 2011. „Homeobox gene Dlx-2 is implicated in metabolic stress-induced necrosis". *Molecular cancer* 10 (1): 113.
- Liu, Jen Kuei, Ingrid Ghattas, Shiyong Liu, Sandy Chen, a John LR Rubenstein. 1997. „Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation". *Developmental dynamics* 210 (4): 498–512.
- Liu, Jinxia, Xiaopeng Cui, Lishuai Qu, Lu Hua, Miaomiao Wu, Zhongyi Shen, Cuihua Lu, a Runzhou Ni. 2016. „Overexpression of DLX2 Is Associated with Poor Prognosis and Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma". *Experimental and Molecular Pathology* 101 (1): 58–65.
- Lowry, Oliver H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, a Rose J. Randall. 1951. „PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT". *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
- Lynn, R. C., M. Poussin, A. Kalota, Y. Feng, P. S. Low, D. S. Dimitrov, a D. J. Powell. 2015. „Targeting of Folate Receptor on Acute Myeloid Leukemia Blasts with Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells". *Blood* 125 (22): 3466–76.
- Mayer J, Starý J et al (2002). *Leukemie*. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., 2002.
- Marcucci, Guido, Torsten Haferlach, a Hartmut Döhner. 2011. „Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications". *Journal of Clinical Oncology* 29 (5): 475–86.

- Massagué, Joan. 2008. „TGF β in Cancer". *Cell* 134 (2): 215–30.
- Merlo, GIORGIO R., BARBARA Zerega, LAURA Paleari, SONYA Trombino, STEFANO Mantero, a GIOVANNI Levi. 2004. „Multiple functions of Dlx genes." *International Journal of Developmental Biology* 44 (6): 619–626.
- Möllgård, Lars, Stefan Deneberg, Hareth Nahi, Sofia Bengtzen, Kerstin Jonsson-Videsäter, Thoas Fioretos, Anna Andersson, Christer Paul, a Sören Lehmann. 2008. „The FLT3 Inhibitor PKC412 in Combination with Cytostatic Drugs in Vitro in Acute Myeloid Leukemia". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62 (3): 439–48.
- Morini, Monica, Simonetta Astigiano, Yorick Gitton, Laura Emionite, Valentina Mirisola, Giovanni Levi, a Ottavia Barbieri. 2010. „Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 is associated with the metastatic potential of the human breast cancer cell line MDA-MB-231". *BMC Cancer* 10 (1): 649.
- Nygren, Peter, a Rolf Larsson. 1991. „Differential in Vitro Sensitivity of Human Tumor and Normal Cells to Chemotherapeutic Agents and Resistance Modulators". *International Journal of Cancer* 48 (4): 598–604.
- Panayiotidis, P., D. Jones, K. Ganeshaguru, L. Foroni, a A. V. Hoffbrand. 1996. „Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro". *British journal of haematology* 92 (1): 97–103.
- Patel, Jay P., Mithat Gönen, Maria E. Figueroa, Hugo Fernandez, Zhuoxin Sun, Janis Racevskis, Pieter Van Vlierberghe, et al. 2012. „Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia". *New England Journal of Medicine* 366 (12): 1079–89.
- Petersdorf, S. H., K. J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R. A. Larson, et al. 2013. „A Phase 3 Study of Gemtuzumab Ozogamicin during Induction and Postconsolidation Therapy in Younger Patients with Acute Myeloid Leukemia". *Blood* 121 (24): 4854–60.
- Qiu, M, A Bulfone, S Martinez, J J Meneses, K Shimamura, R A Pedersen, a J L Rubenstein. 1995. „Null mutation of Dlx-2 results in abnormal morphogenesis of proximal first and second branchial arch derivatives and abnormal differentiation in the forebrain." *Genes & Development* 9 (20): 2455–65.
- Ross, John F., Hui Wang, Frederick G. Behm, Prasad Mathew, Marietta Wu, Robert Booth, a Manohar Ratnam. 1999. „Folate receptor type β is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia". *Cancer* 85 (2): 348–357.
- Saini, Lalit, Joseph Brandwein, Artur Szkotak, Sunita Ghosh, a Irwindeep Sandhu. 2018. „Persistent Cytogenetic Abnormalities in Patients Undergoing Intensive Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia". *Leukemia & Lymphoma* 59 (1): 121–28.
- Santos, Fabio P. S., Dan Jones, Wei Qiao, Jorge E. Cortes, Farhad Ravandi, Elihu E. Estey, Dushyant Verma, Hagop Kantarjian, a Gautam Borthakur. 2011. „Prognostic Value of FLT3 Mutations among Different Cytogenetic Subgroups in Acute Myeloid Leukemia". *Cancer* 117 (10): 2145–55.
- Scott, Matthew P. 1992. „Vertebrate homeobox gene nomenclature". *Cell* 71 (4): 551–553.
- Shih, Alan H., Yanwen Jiang, Cem Meydan, Kaitlyn Shank, Suveg Pandey, Laura Barreyro, Ileana Antony-Debre, et al. 2015. „Mutational Cooperativity Linked to Combinatorial Epigenetic Gain of Function in Acute Myeloid Leukemia". *Cancer Cell* 27 (4): 502–15.
- Shimamoto, Takashi, Shuji Nakamura, Jacques Bollekens, Frank H. Ruddle, a Kenichi Takeshita. 1997. „Inhibition of DLX-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (7): 3245–3249.
- Sorokina, Tamara, Irina Shipounova, Alexey Bigildeev, Nataliya Petinati, Nina Drize, Anna Turkina, Ekaterina Chelysheva, et al. 2016. „The Ability of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from the Bone Marrow of Patients with Leukemia to Maintain Normal Hematopoietic Progenitor Cells". *European Journal of Haematology* 97 (3): 245–52.
- Starkova, J., S. Gadgil, Y. H. Qiu, N. Zhang, I. Hermanova, S. M. Kornblau, a H. A. Drabkin. 2011. „Up-Regulation of Homeodomain Genes, DLX1 and DLX2, by FLT3 Signaling". *Haematologica* 96 (6): 820–28.

- Stirewalt, Derek L., a Jerald P. Radich. 2003. „The role of FLT3 in haematopoietic malignancies". *Nature Reviews Cancer* 3 (9): 650–65.
- Stock, David W., Debra L. Ellies, Zhiyoung Zhao, Marc Ekker, Frank H. Ruddle, a Kenneth M. Weiss. 1996. „The evolution of the vertebrate Dlx gene family". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (20): 10858–10863.
- Suh, Yongjoon, Kirsten Obernier, Gabi Hölzl-Wenig, Claudia Mandl, Alexia Herrmann, Kerstin Wörner, Volker Eckstein, a Francesca Ciccolini. 2009. „Interaction between DLX2 and EGFR Regulates Proliferation and Neurogenesis of SVZ Precursors". *Molecular and Cellular Neuroscience* 42 (4): 308–14.
- Tang, Peng. 2013. „Increased Expression of DLX2 Correlates with Advanced Stage of Gastric Adenocarcinoma". *World Journal of Gastroenterology* 19 (17): 2697.
- Thiede, Christian, Christine Steudel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Schäkel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, Martin Bornhäuser, Markus Ritter, a Andreas Neubauer. 2002. „Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis: Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334)." *Blood* 99 (12): 4326–4335.
- Tholouli, Eleni, Sarah MacDermott, Judith Hoyland, John Liu Yin, a Richard Byers. 2012. „Quantitative Multiplex Quantum Dot In-Situ Hybridisation Based Gene Expression Profiling in Tissue Microarrays Identifies Prognostic Genes in Acute Myeloid Leukaemia". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (2): 333–39.
- Uy, Geoffrey L., Sumithra J. Mandrekar, Kristina Laumann, Guido Marcucci, Weiqiang Zhao, Mark J. Levis, Heidi D. Klepin, Maria R. Baer, Bayard L. Powell, a Peter Westervelt. 2017. „A phase 2 study incorporating sorafenib into the chemotherapy for older adults with FLT3-mutated acute myeloid leukemia: CALGB 11001". *Blood advances* 1 (5): 331–340.
- Walter, Matthew J., Dong Shen, Li Ding, Jin Shao, Daniel C. Koboldt, Ken Chen, David E. Larson, Michael D. McLellan, David Dooling, a Rachel Abbott. 2012. „Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia". *New England Journal of Medicine* 366 (12): 1090–1098.
- Wheatley, Keith, Alan K. Burnett, Anthony H. Goldstone, Richard G. Gray, Ian M. Hann, Christine J. Harrison, John KH Rees, Richard F. Stevens, a Helen Walker. 1999. „A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial". *British journal of haematology* 107 (1): 69–79.
- Wrana, Jeffrey L., Liliana Attisano, Juan Cárcamo, Alejandro Zentella, Jacqueline Doody, Marikki Laiho, Xiao-Fan Wang, a Joan Massague. 1992. „TGFβ signals through a heteromeric protein kinase receptor complex". *Cell* 71 (6): 1003–14.
- Xu, Jinfei, a Joseph R. Testa. 2009. „DLX5 (Distal-Less Homeobox 5) Promotes Tumor Cell Proliferation by Transcriptionally Regulating MYC". *Journal of Biological Chemistry* 284 (31): 20593–601.
- Yee, K. W. H. 2004. „Synergistic Effect of SU11248 with Cytarabine or Daunorubicin on FLT3 ITD-Positive Leukemic Cells". *Blood* 104 (13): 4202–9.
- Yilmaz, Mahmut, Dorothea Maaß, Neha Tiwari, Lorenz Waldmeier, Petra Schmidt, François Lehenbre, a Gerhard Christofori. b.r. „Transcription factor Dlx2 protects from TGFβ-induced cell-cycle arrest and apoptosis". *The EMBO Journal* 30 (21): 4489–99.
- Zhang, Hailan, Gezhi Hu, Hongyu Wang, Peter Sciavolino, Nancy Iler, Michael M. Shen, a Cory Abate-Shen. 1997. „Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism." *Molecular and cellular biology* 17 (5): 2920–2932.
- Zhang, Lianmei, Manman Yang, Lin Gan, Tao He, Xiuli Xiao, M. David Stewart, Xiaoyan Liu, et al. 2012. „DLX4 Upregulates TWIST and Enhances Tumor Migration, Invasion and Metastasis". *International Journal of Biological Sciences* 8 (8): 1178–87.