

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI HRÁLOVÉ**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

Jana Kozáková

**TRANSGENNÍ MYŠI:**  
**EXPERIMENTÁLNÍ MODEL PRO STUDIUM AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ**  
**LEUKEMIE**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký

Školitel specialista: Dr. Marika Pla

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký

Hradec Králové, květen 2008

Na tomto místě bych ráda poděkovala především Dr. Marice Pla za zájem, připomínky a čas, který věnovala mé práci.

Poděkování patří také Murielle Reboul a Martine Chopin za ochotnou pomoc, vstřícný přístup a pomoc se zvířaty.

Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Vladimírovi Semeckému, který mou práci v zahraničí ochotně podporoval a konstruktivními připomínkami rovněž přispěl k dokončení mé diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, květen 2008

## SEZNAM NEJČASTĚJI POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

ALL	Acute lymphoblastic leukemia	Akutní lymfoblastická leukémie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Sortování metoda průtokové cytometrie
FITC	Fluorescein isothiokyanát	Fluorescein isothiokyanát
FL1, FL2		Fluorescence 1, fluorescence 2
kb		Kilo bází
MRN		Minimální reziduální nemoc
LSC	Leukemia stem cell	Leukemické kmenové buňky
pb		Párů bází
PBL	Peripheral blood leucocytes	Leukocyty periferní krve
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PE	Phycoerythrin	Phycoerythrin
RQ-RT-PCR	Real time quantification reverse transcription PCR	Kvantitativní reverzně-transkriptázová PCR v reálném čase
RT-PCR	Reverse transcription PCR	Reverzně-transkriptázová PCR
RT	Revers transcriptase	Reverzní transkriptáza

# OBSAH

<b>1. SEZNAM NEJČASTĚJI UŽÍVANÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ÚVOD.....</b>	<b>5</b>
2.1. AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÁ LEUKEMIE U DĚTÍ.....	6
2.1.1. Význam TEL/AML u dětských akutních lymfoblastických leukémií .....	7
2.1.2. Role genu TEL/AML v prenatálním původu leukémií.....	8
2.1.3. Role genu TEL/AML v patogeneze ALL.....	8
2.2. TEL/AML1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL.....	9
2.3. CÍL PRÁCE.....	11
<b>3. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>12</b>
3.1. MATERIÁL.....	13
3.1.1. Myši .....	13
3.1.2. Enzymy.....	13
3.1.3. Primery.....	13
3.1.4. Nukleotidy.....	14
3.1.5. Roztoky a pufry.....	14
3.2. METODY.....	17
3.2.1. Extrakce DNA.....	17
3.2.2. Extrakce RNA.....	17
3.2.3. Reverzní transkripce .....	18
3.2.4. PCR.....	19
3.2.5. Elektroforéza.....	21
3.2.6. Cytofluometrická analýza.....	21
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>23</b>
4.1. APLIKACE MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY PCR NA IDENTIFIKACI PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU.....	24
4.2. OVĚŘENÍ EXPRESE TRANSGENU.....	27
4.3. ANALÝZA KREVNÍHO OBRAZU.....	30
4.4. APLIKACE CYTOFLUOMETRICKÉ METODY NA CHARAKTERIZACI BUNĚČNÝCH POPULACÍ.....	31
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>36</b>
5.1. IDENTIFIKACE PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU.....	37
5.2. OVĚŘENÍ EXPRESE TRANSGENU.....	38
5.3. ANALÝZA KREVNÍHO OBRAZU.....	38
5.4. CHARAKTERIZACE BUNĚČNÝCH POPULACÍ.....	41
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>44</b>
<b>8. SOUHRN.....</b>	<b>48</b>

## 2. ÚVOD

## 2. ÚVOD

Krvetvorba, neboli hematopoéza, je vysoce organizovaný proces, zahrnující vývoj krevních buněk - erytrocytů, trombocytů a všech druhů leukocytů - a jejich homeostázu. Poruchy krvetvorby mohou pro organismus znamenat velmi závažná onemocnění, jako je například leukemie, aplastická anemie, lymfom, myelodysplazie nebo myeloproliferativní syndrom

Leukemii můžeme definovat jako nově vytvořenou, abnormální hematopoetickou tkáň, iniciovanou jednou nebo několika leukemickými kmenovými buňkami (LSC, Leukemia Stem Cell). Jsou to buňky, které si udržely, nebo znovu získaly schopnost neomezené sebeobnovy a rychlé proliferace. Příčinou bývají mutace a změny funkce některých genů.

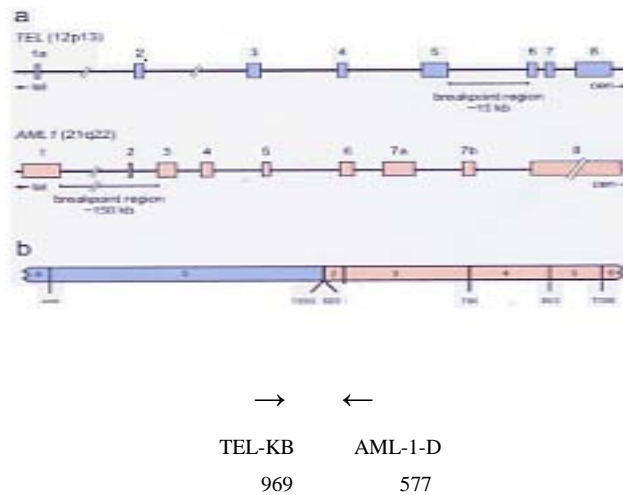
Po nahromadění více genetických změn dochází k neoplastické transformaci buněk, pro kterou je typická ztráta programované buněčné smrti, změna některých diferenciačních mechanismů a u progenitorů navíc získání proliferační aktivity. K maligním změnám dochází buď v důsledku ztráty funkce transkripčního faktoru, ztráty schopnosti jeho vazby k cílovým molekulám, abnormální exprese genu transkripčního faktoru, nebo translokace daného genu na jiný chromozom. Po translokaci vzniká fúzní (hybridní) gen, vytvořený spojením dvou existujících genů. Expresí fúzního genu pak vzniká proteinová chiméra, která má jinou funkci než původní proteiny.

### 2.1. AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÁ LEUKEMIE U DĚTÍ

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je nejčastějším dětským maligním onemocněním. Ročně jí onemocní v České republice 65 - 70 dětí. Nejvíce pozitivních pacientů má v době diagnózy 1-12 let (pík mezi 2-5 lety). Ještě nebyla popsána leukemie u dětí mladších než 1 rok a frekvence ALL u dospělých pacientů je velmi nízká (< 2%) (13, 16).

Pojem ALL zahrnuje celou řadu genotypově charakterizovaných podskupin, které se liší biologickými charakteristikami leukemických buněk a prognózou nemoci. Jednou z

těchto podskupin jsou leukemie nesoucí translokaci t(12;21)(p13;q22) a její hybridní genový produkt TEL/AML1 (Obr.1).



**Obr. 1: a)** Diagram exon/intron struktury genu TEL a AML1, jejichž translokací t(12;21)(p13;q22) vzniká fúzní gen TEL/AML1. Orientace centromer (cen) a telomer (tel), čísla exonů a místa zlomu jsou vyznačena.  
**b)** Diagram TEL/AML1 fúzního transkriptu. Čísla pod transkriptem fúzního genu odpovídají místu zlomu. Poloha primerů použitých v naší práci je naznačena.

Translokace TEL/AML1 byla poprvé popsána v roce 1995 (6, 18). Tato kryptická translokace, která je v klasickém karyotypovém vyšetření nedetekovatelná, byla objevena díky metodě fluorescenční in situ hybridisace (FISH). Klonování zlomových míst odhalilo, že v tomto případě dochází k fúzi N-koncové části genu TEL (ETV6) s téměř celým genem AML1 (RUNX1). Oba geny jsou známé transkripční faktory účastníci se normální hemopoézy (21). Je známo, že fúze genu AML1 s genem TEL a následná vazba s nukleárními korepresory mSin3A a N-CoR a deacetylázou histonů HDAC-3 způsobuje změnu aktivační role proteinu AML1 na represivní (21).

### 2.1.1. Význam TEL/AML1 u dětských akutních lymfoblastických leukemií

TEL/AML1 pozitivní ALL tvoří relativně velmi homogenní skupinu a vyskytují se téměř výhradně v dětském věku u pacientů s ALL z prekursorů B lymfocytů. Jsou obvykle charakterizovány nízkým iniciálním počtem leukocytů, věkem mezi dvěma a



šesti lety v době diagnózy (23), expresí CD10, diploidním obsahem DNA, častou expresí myeloidních povrchových znaků CD15 a CD33 a negativním vztahem k přítomnosti antigenu CD66c (KOR-SA3544) (10).

Klinický dopad translokace t(12;21) byl zkoumán v mnoha studiích a jeho role je stále kontroverzní. Minimální residuální nemoc (MRN) u části TEL/AML pozitivních ALL způsobují maligní buňky, které uniknou terapii a mohou se stát v průběhu léčby nebo po jejím skončení zárodkem relapsu onemocnění. Přítomnost transkriptu TEL/AML1 je dobrým parametrem pro sledování MRN metodou kvantitativní reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RQ-RT-PCR) (19) a případnou stratifikaci pacientů do rizikových skupin.

### **2.1.2. Role genu TEL/AML1 v prenatálním původu leukemií**

Dětské TEL/AML1 pozitivní ALL patřily k prvním, u kterých byl prokázán intrauteriní původ - ať již jako současný výskyt leukemií u dvojčat, či pomocí zpětného sledování ("backtrackingu") těchto hybridních genů v archivovaném materiálu odebraném krátce po narození. V těchto případech bylo využito podobné metodiky jako pro sledování MRN, pouze jako cílový materiál sloužily tzv. Guthrieho karty - archivované zaschlé krevní vzorky, původně určené pro screening metabolických vad novorozenců. Potvrzení přítomnosti malého množství leukemických nebo "preleukemických" buněk u dětí, které později onemocněly leukemií, vedlo ke hledání hybridních genů specificky asociovaných s leukemiemi v pupečnickových krvích zdravých novorozenců. Prokázalo se (23), že fúzní gen TEL/AML1 je možno detekovat v přibližně 3% pupečnickových krvích - tj. s frekvencí minimálně 40x vyšší, než je u těchto dětí pravděpodobnost vzniku TEL/AML1 pozitivní ALL. Podobných výsledků dosáhli nezávisle Mori et al, 2002.

### **2.1.3. Role genu TEL/AML1 v patogeneze ALL**

Důkazy o prenatálním původu (alespoň části) TEL/AML1 pozitivních ALL obrátily pozornost k mechanismům leukemogeneze u tohoto subtypu. In vitro experimenty a pokusy na zvířatech prokázaly, že hybridní gen TEL/AML1 sám o sobě není leukemogenní (1, 22). Byl tedy navržen vícezásahový model vzniku leukemie (25). Jako možný "druhý zásah" by tak mohla fungovat delece druhé alely genu TEL na

krátkém raménku chromosomu 12. Právě zkoumání delecí v oblasti genu TEL na 12p přineslo překvapivé zjištění, že u některých pacientů je delece při iniciální diagnóze rozsáhlejší než při následném relapsu. Tyto poznatky vedly Greaves a jeho spolupracovníky (7), kteří se touto problematikou dlouhodobě zabývají, k formulování teorie vzniku ALL. Vycházejí z toho, že prenatálně dojde k prvnímu genetickému zásahu (např. vzniku hybridního genu TEL/AML1) a objevení se "preleukemického" klonu; v případě kontaktu s druhým spouštěcím agens dojde k druhému zásahu a vzniku leukemie. To, co nyní považujeme za pozdní relaps TEL/AML1 pozitivní ALL, by pak ve skutečnosti mohlo být novým propuknutím leukemie z preleukemického klonu. Přesný mechanismus tohoto procesu stejně jako povaha spouštěcích agens je zatím předmětem spekulací. Nálezy onoho "preleukemického" klonu TEL/AML1 pozitivních buněk (a/nebo jiných buněk nesoucích "leukemogenní" aberace) u zdravých novorozenců nebo ve fetálních hemopoetických tkání tuto teorii podporují.

## 2.2. TEL/AML1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

V hostující laboratoři (INSERM U718, Institut Universitaire d'Hématologie, Hopital Saint-Louis v Paříži) byl za účelem studia kauzální souvislosti mezi fúzním genem TEL/AML1 a leukemogenezí použit experimentální model, transgenní myš. Tato myš byla připravena v Institute of Cancer Research v Londýně (ředitel Mel Greaves). Transgenní jedinec má ve svém genomu trvale vnesen fragment (genovou konstrukci) cizorodé DNA. V našem případě byla použita genová konstrukce TEL/AML1 tvořená fragmentem cDNA kódujícím translokaci t(12;21)(p13;q22) (Obr. 1b), která byla získána reverzní transkripcí mRNA pocházející od pacienta trpícího ALL. Tento fragment cDNA je spojen s fragmentem DNA odpovídajícím myc-epitopu. Oba fragmenty jsou pod kontrolou promotoru kódujícího těžký řetězec IgM. Uvedený promotor zajišťuje buněčně specifickou expresi v B lymfocytech. TEL/AML1 myši byly poslány do hostující laboratoře a byly chovány ve zvěřinci za účelem získání co největšího množství transgenních jedinců. V prosinci 2006 se v tomto zvěřinci vyskytla virová hepatitida. Většina experimentálních myší musela být utracena. Za účelem záchrany chovu bylo několik transgenních jedinců posláno do dekontaminačního střediska CNRS (CDTA, Orleans). Dekontaminace těchto myší byla provedena přenosem embryí. Transgenní samci byly zkříženi s netransgenními samicemi z kmene

C57BL/6. 24 hodin po kopulaci byla oplozená vajíčka přenesena do děloh náhradních matek, které byly chovány v SPF (specifických patogenů prostých) podmínkách. Potomci (dekontaminované myši) byly přibližně ve věku 6 týdnů vráceny do původního zvěřince v Hopital Saint-Louis. Celkem bylo takto připraveno 32 myší.

### 2.3. CÍL PRÁCE

Studium vztahu mezi přítomností translokace TEL/AML1 a leukemogenezí vyžaduje velké množství experimentálních zvířat, mezi kterými je třeba identifikovat transgenní jedince. Je nezbytné použít metodu, která by byla rychlá, spolehlivá, a při které není nutné zabít testované myši. Pro identifikaci TEL/AML1 pozitivních jedinců byla použita metoda PCR, která detekuje přítomnost daného transgenu na genové úrovni.

Mým úkolem bylo:

- 1) Pomocí PCR identifikovat transgenní jedince:
  - a) mezi jedinci získanými přenosem embryí (32 myši)
  - b) mezi potomky těchto myši
- 2) Ověřit expresi transgenu (na úrovni RNA) pomocí RT
- 3) Porovnat krevní obraz transgenní a netransgenní myši
- 4) Porovnat procentuální zastoupení B-buněk (B220<sup>+</sup>) a pre-B buněk (B220<sup>+</sup>/ CD43<sup>+</sup>) v PBL (periferní krvi) u transgenní a netransgenní myši použitím fluorescenční průtokové cytometrie

### 3. MATERIÁL A METODY

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. MATERIÁL

#### 3.1.1. Myši

Transgenní myši pro gen TEL-AML1 byly získány z Institute of Cancer Research v Londýně (ředitel: Mel Greaves). Byly chovány ve zvěřinci (Institut Universitaire d'Hématologie, Hopital Saint-Louis v Paříži).

#### 3.1.2. Enzymy

##### Použité při extrakci DNA

Proteináza K (15,3 mg/ml v 10 mM Tris HCl, pH 7,5; Roche) se používá při izolaci DNA.

##### Použité při reverzní transkripci

Reverzní transkriptáza (Roche) je enzym, který syntetizuje cDNA na základě templátu mRNA a oligonukleotidů.

RNase inhibitor (Roche) se používá k ochraně RNA před rozštěpením RNAzou.

##### Použité při PCR

Termostabilní Taq polymeráza, která byla s MgCl<sub>2</sub> součástí Ready mixu pro PCR (REDTaq ReadyMix; Sigma), syntetizuje komplementární řetězec podle templátu genomické DNA nebo cDNA přidáváním jednotlivých nukleotidů ve směru 5' → 3'.

#### 3.1.3. Primery

##### Použité při reverzní transkripci

Random hexamery jsou směsí krátkých šestinukleotidových fragmentů, ve kterých jsou všechny možnosti kombinací čtyř nukleotidů (A,G,C,T). Hexamer se váže na RNA a zahajuje syntézu cDNA na mnoha místech podél celého RNA templátu.

### Použité při PCR

Použité primery jsou oligonukleotidy specifické pro transgen TEL-AML1: TEL-KB (21 pb) sense a AML-1-D (18 pb) antisense (Obr. 1b).

### **3.1.4. Nukleotidy**

#### Použité při reverzní transkripci a PCR

Použité nukleotidy jsou: dGTP, dATP, dCTP, dTTP. Pomocí těchto nukleotidů Taq polymeráza syntetizuje komplementární řetězec DNA či cDNA a reverzní transkriptáza přepisuje sekvenci mRNA do cDNA.

### **3.1.5. Roztoky a pufr**

#### Použité při extrakci DNA

Lýzový pufr

0,1 M Tris (Tris-(hydroxymethyl) aminomethan; Research Organics), pH 8,5; upravené  
HCl

0,5 mM EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Merk Eurolab)

0,2 M NaCl (Merk Eurolab)

20% SDS (dodecyl sulfát sodný; Fluka)

v destilované vodě

TE pufr

1% Tris (Tris-(hydroxymethyl) aminomethan; Research Organics), pH 7,8; upravené  
HCl

0,2% EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Merk Eurolab)

v destilované vodě

#### Použité při extrakci RNA

TRIzol LS (Invitrogen)

Ethanol 75%(V/V)

75% ethanol

v destilované vodě

### Použité při elektroforéze

0,7% Agarózový gel

0,7% agaróza (Sigma)

99,3% TAE 1x (10 mM Tris, 40 mM acetát, 1 mM EDTA)

Agaróza byla rozpuštěna varem

5 µl BET (ethidium bromid; Merc Eurolab)

3% Agarózový gel

3% agaróza (Sigma)

97 % TAE 1x (10 mM Tris, 40 mM acetát, 1 mM EDTA)

Agaróza byla rozpuštěna varem

1 µl BET (ethidium bromid; Merc Eurolab)

Loading dye

0,25% bromfenolová modř (Merk Eurolab)

0,25% xylene cyanol FF (Merk Eurolab)

30% glycerol (Merk Eurolab)

0,05 µl/ml BET

v destilované vodě

### Použité při izolaci buněk a cytofluometrické analýze

PBS1x

PBS 10x (Phosphate – Buffered Saline, bez Ca, Mg a bikarbonátů, Invitrogen Corporation) desetkrát zředěný destilovanou vodou

PBS 1x + 0,5% SVF

0,5% SVF (Foetal Bovine Serum; Life Technologies)

v PBS 1x (Phosphate – Buffered Saline, bez Ca, Mg a bikarbonátů, Invitrogen Corporation)

Ficoll (Lymphocytes separation medium; Eurobio)



PBS-azid

1%  $\text{NaN}_3$  (Merk Eurolab)

v PBS 1x (Phosphate – Buffered Saline, bez Ca, Mg a bikarbonátů, Invitrogen Corporation)

pH = 7,2; filtrováno přes filtrační papír

Lýzový roztok 1x

Lýzový roztok 10x (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) desetkrát zředěný destilovanou vodou

Fixační roztok

30  $\mu\text{l}$  formaldehyd 37% (Merk Eurolab)

10 ml PBS-azid 1%

## 3.2. METODY

### 3.2.1. Extrakce DNA

Asi 0,3 cm myšího ocasu bylo podrobena působení (16 hod, 55°C) směsi 495  $\mu$ l lýzového pufru a 5  $\mu$ l proteinázy K (zkumavka Eppendorf 2 ml). Po inkubaci byly vzorky centrifugovány za laboratorní teploty (7 500 x g, 15 min; centrifuga Sigma). Supernatant byl přenesen do zkumavky obsahující 500  $\mu$ l isopropanolu (Eppendorf 2 ml). Po důkladném promíchání precipitovala DNA, která byla pomocí pipety přenesena do zkumavky s 200  $\mu$ l roztoku TE (mikrotube 0,5 ml shired + s/cap separat. VWR International). Následovala inkubace (6 hod, 55°C); izolovaná DNA byla uchovávána při teplotě 4°C.

### 3.2.2. Extrakce RNA

#### Příprava buněk ze sleziny

Slezina byla rozdrčena v Petriho misce obsahující 2 ml PBS 1x + 0,5% SVF. Vzniklá směs byla přenesena do zkumavky (15 ml) s 8 ml PBS 1x + 0,5% SVF. Fragменты tkáně volně (5 min) sedimentovaly a horní fáze obsahující buňky byla přenesena do nové zkumavky. Následně byly buňky dvakrát promyty v PBS 1x + 0,5% SVF (400 x g, 10 min, 4°C; centrifuga GR 412, Jouan). Pelet buněk byl určen pomocí destičky Malassez. Buňky byly centrifugovány v 1 ml PBS 1x (400 x g, 10 min, 4°C). Po dekantaci supernatantu byla získána peleta buněk.

#### Extrakce RNA

K peletě buněk  $5-10 \times 10^6$  bylo v digestoři přidáno 1000  $\mu$ l TRIzolu LS (Invitrogen) a připravené vzorky byly zamraženy na  $-80^\circ\text{C}$ . Před izolací RNA byly vzorky pomalu rozmraženy. Extrakce RNA probíhala ve sterilním laminárním boxu (Captair). Po přidání 270  $\mu$ l chloroformu byly vzorky inkubovány 10 min při pokojové teplotě. Centrifugací (12 000 x g, 15 min, 4°C; centrifuga Sigma) došlo k oddělení fází. Horní vodná fáze (asi 500  $\mu$ l) obsahující RNA byla přenesena do připravených zkumavek (Eppendorf 2 ml se zámkem). Po přidání 500  $\mu$ l isopropanolu a důkladném promíchání precipitovala RNA. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 10 min. Následnou centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4°C) se vytvořila peleta RNA na dně zkumavky. Po odstranění isopropanolu, byla získaná RNA promyta v 1 ml 75% EtOH (V/V)

(7 500 x g, 10 min, 4°C). Pomocí pipet byl odstraněn EtOH. Po úplném vyschnutí EtOH byla RNA resuspendována v 15 µl vody prosté RNAz. Koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky (Nanodrop) a upravena na koncentraci 1 µg/µl.

### 3.3.3. Reverzní transkripce

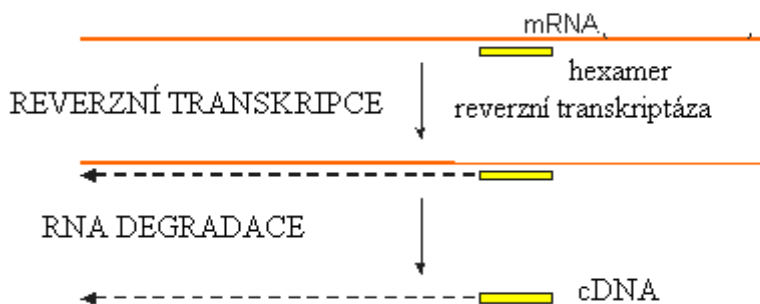
Příprava byla prováděna ve sterilním laminárním boxu (Astec). Všechny roztoky i připravená RNA se uchovávaly na ledu.

K denaturované (1 µg RNA ve 3 µl H<sub>2</sub>O; 3 min při 99°C) RNA bylo přidáno 17 µl reakční směsi pro reverzní transkripci (v tabulce je uvedeno množství na jednu zkumavku):

MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Tampon 10x	2 µl
dNTPs	2 µl každé báze (celkem 8 µl)
RNAse inhibitor	1 µl
Reverzní transkriptáza	1 µl
Hexamer	1 µl

Byla připravena negativní kontrola obsahující 3 µl H<sub>2</sub>O bez RNA a 17 µl reakční směsi pro reverzní transkripci. Po inkubaci (10 min při pokojové teplotě), zkumavky byly pevně uzavřeny a umístěny do termocykleru PCR (Stagbio). Byl zvolen program:

- 60 min 42°C
- 5 min 99°C
- uchovávání při 4°C až do doby ukonění programu. Schéma principu Reverzní transkripce je znázorněno na obr.2.



**Obr.2: Princip Reverzní transkripce:** Hexamery nasedají na mnoha místech podél celého mRNA templátu a reverzní transkriptáza jejich elongací syntetizuje řetězec cDNA příkládáním komplementárních nukleotidů. Po reverzní transkripci následuje PCR, při které je jako templát využita cDNA vzniklá RT reakcí (Obr.3).

### 3.3.4. PCR

Příprava se prováděla ve sterilním laminárním boxu (Astec). Všechny roztoky i připravená DNA se uchovávaly na ledu.

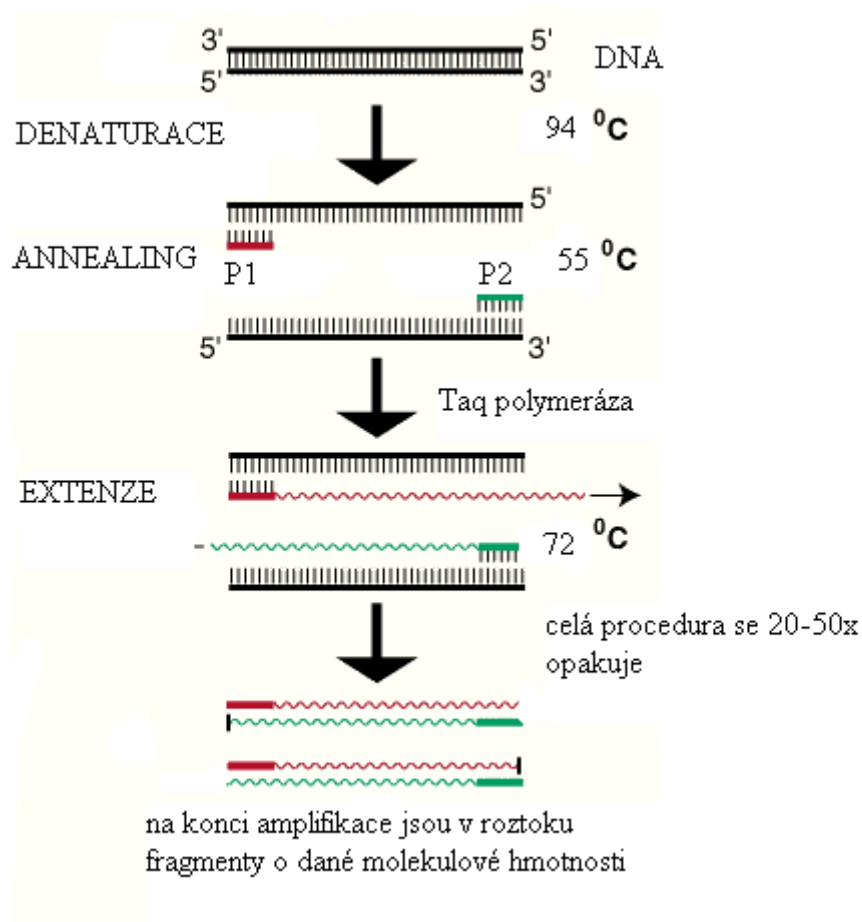
Byla připravena reakční směs pro PCR (v tabulce je uvedeno množství na jednu zkumavku):

H <sub>2</sub> O prostá nukleotidů	3,6 µl
Ready mix	5 µl
Primer sense TEL-KB	0,2 µl
Primer antisense AML-1-D	0,2 µl

Do každé zkumavky (8 caps/strip, Applied Biosystems) bylo pipetováno 9 µl reakční směsi a následně 1 µl genomické DNA nebo 1 µl cDNA. Byla připravena pozitivní kontrola (1 µl genomické DNA získané z myši TEL/AML1 pozitivní + 9 µl reakční směsi pro PCR) a negativní kontrola (1 µl H<sub>2</sub>O + 9 µl reakční směsi pro PCR). Zkumavky byly pevně uzavřeny a umístěny do termocykleru PCR (Stagbio). Byl zvolen program:

4 min při 95°C	.....	počáteční denaturace
35 x: 30 sec při 94°C	.....	denaturace
90 sec při 55°C	.....	hybridizace primerů (annealing)
90 sec při 72°C	.....	prodlužování primerů (extenze)
7 min při 72°C	.....	finální extenze

uchování při 4°C až do doby ukončení programu. Schéma principu PCR je znázorněno na obr.3.



**Obr.3: Princip PCR:** Při PCR dochází k exponenciálnímu množení zvoleného úseku řetězce DNA cyklickým opakováním specifických tepelných a funkčních kroků. Při tepelné denaturaci (94°C) dochází k rozvolnění struktury dvoušroubovice DNA na jednořetězcovou molekulu. Na ni se při teplotě 55°C vážou (annealing) specifické primery. Taq polymeráza za teploty 72°C nasedá na 3' konec primerů a doplňuje sekvenci k templátové molekule DNA (extenze) ve směru 5' za použití komplementárních nukleotidů. Poté opět dojde k denaturaci a celý cyklus se 20-50x opakuje.

### 3.3.5. Elektroforéza

10 µl produktu PCR získaného z genomické DNA bylo nanášeno do připraveného 0,7% agarózového gelu obsahujícího 5 µl ethidium bromidu (Merck Eurolab). Elektroforetická migrace trvala 15 min při 110 V. Po skončení elektroforézy byla migrace fragmentů DNA ověřována pod UV lampou a výsledky byly fotografovány. Velikost fragmentu DNA byla stanovena srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul DNA standartu (žebříček molekulové hmotnosti 1 Kb+).

5 µl produktu PCR získaného z cDNA bylo ve směsi s 2 µl Loading dye nanášeno na 3% agarózový gel obsahující 1 µl ethidium bromidu (Merck Eurolab). Elektroforetická migrace trvala 60 min při 110 V. Po skončení elektroforézy byla migrace fragmentů DNA ověřována pod UV lampou a výsledky byly fotografovány. Velikost fragmentu DNA byla stanovena srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul DNA standartu (žebříček molekulové hmotnosti 100 Kb).

### 3.2.6. Analýza krevního obrazu

35 µl periferní krve získané z retroorbitálního sinu myši bylo naředěno 140 µl PBS 1x. Analýza krevního obrazu byla provedena na přístroji Cell Differentiation Cytometr (Laboratoires Abbott Division Diagnostic).

### 3.3.7. Cytofluorometrická analýza

#### Příprava PBL (Peripheral Blood Leucocytes)

35 µl periferní krve získané z retroorbitálního sinu myši bylo inkubováno s 2,5 µl protilátek 30 min při 4°C. Během 7 min inkubace při 37°C byly lyzovány červené krvinky pomocí 2 ml lýzového roztoku 1x (FACS lysing solution). Po centrifugaci (400 x g, 10 min, 4°C; centrifuga GR 412, Jouan) a odsátím supernatantu byly získané buňky dvakrát promyty (400 x g, 10 min, 4°C) ve 2 ml PBS 1x. Buňky byly uchovávány v 200 µl fixačního roztoku nejméně 20 hodů (4°C). Zároveň byla stejným způsobem připravena isotypová kontrola.

### Analýza

Na průtokovém cytometru FACScan (Becton Dickinson) byla hodnocena imunofluorescence přibližně 3000 buněk. Analýza byla provedena pomocí programu Cell Quest.

## 4. VÝSLEDKY



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. APLIKACE MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY PCR NA IDENTIFIKACI PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU

*Jak je zmíněno v úvodu, prvním mým úkolem bylo aplikovat molekulárně biologickou metodu PCR (Polymerase chain reaction) na identifikaci přítomnosti transgenů TEL/AML1. Pomocí této metody může být rychle a vysoce selektivně namnožena daná nukleotidová sekvence obsažená ve studované DNA, v našem případě fragment specifický pro transgen TEL/AML1. Výhodou metody je její vysoká citlivost a specifita.*

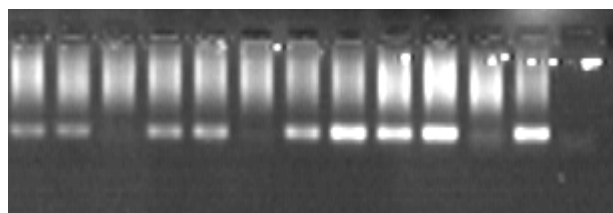
Z myší testovaných na přítomnost transgenů byla izolována DNA. Fragment DNA (140kb) charakteristický pro transgen (cDNA) byl amplifikován pomocí PCR a získané specifické produkty byly vizualizovány elektroforetickou migrací na agarózovém gelu.

Byly testovány dva typy myší:

1. Myši získané přenosem embryí.
2. Potomci těchto myší:
  - a) myši pocházející z křížení transgenní myši (hemizygota TEL/AML1) s netransgenní myší C57BL/6.
  - b) myši pocházející z křížení dvou transgenních jedinců pro gen TEL/AML1.

Příklad identifikace transgenních jedinců pro gen TEL/AML1 je uveden na obrázku 4. Ve sloupcích 1-12 migrovaly specifické PCR produkty získané z testovaných jedinců, sloupec 13 sloužil jako negativní kontrola (viz Materiály a metody). V některých sloupcích byly patrné proužky, které odpovídaly specifickému PCR produktu charakteristickému pro transgen TEL/AML1. Na obrázku 4 jsou tyto proužky přítomny v devíti sloupcích z dvanácti. Jamky číslo 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 a 12 tedy odpovídaly transgenním myším.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 H<sub>2</sub>O



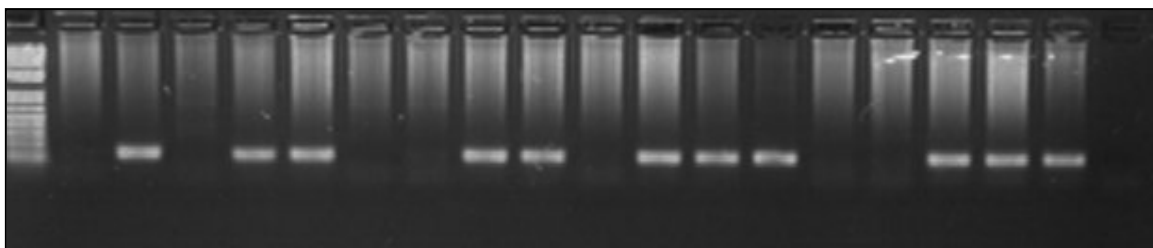
**Obr.4: Elektroforetická analýza produktů PCR.** DNA byla izolována z 12 myší. Přítomné proužky jsou produkty PCR specifické pro TEL/AML1 transgen. Jamky číslo 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 a 12 odpovídají transgenním myším. V poslední jamce označené H<sub>2</sub>O je negativní kontrola.

**Celkem bylo testováno 32 myší získaných přenosem embryí, z nichž 20 jedinců bylo TEL/AML1 pozitivních. Procentuální zastoupení transgenních jedinců bylo 62,5%.**

Příklad identifikace potomků pocházejících z křížení myši transgenní pro TEL/AML1 s netransgenní myší C57BL/6 je uveden na obrázku 5. Do jamky 1 a 2 byly naneseny produkty PCR získané amplifikací DNA rodičů (jamka číslo 1: netransgenní myš C57BL/6, jamka číslo 2: transgenní myš). Do jamek 3-10 byly naneseny produkty PCR jejich potomků. V jamce označené M migroval žebříček molekulové hmotnosti, do jamky číslo 18 byla nanesena pozitivní kontrola a jamka označená H<sub>2</sub>O odpovídala negativní kontrole (viz Materiály a metody). Podobně jako v předchozím případě byly v některých sloupcích viditelné proužky, které obsahovaly PCR produkty o molekulové hmotnosti 140 bp. Transgenní myši byly identifikovány na základě přítomnosti těchto proužků. Z osmi testovaných potomků byl transgen TEL/AML1 přítomen u čtyř jedinců (jamka číslo 4, 5, 8 a 9).

Příklad identifikace potomků získaných křížením dvou transgenních myší pro TEL/AML1 je uveden na obrázku 5. Produkty PCR získané z DNA rodičů byly naneseny do jamky číslo 11 a 12, produkty PCR jejich potomků (celkem 5 jedinců) do jamek číslo 12-17. Proužky poukazující na přítomnost transgenu TEL/AML1 byly patrné u tří potomků (jamka číslo 13, 16 a 17).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 H<sub>2</sub>O



**Obr. 5: Elektroforetická analýza produktů PCR.** DNA byla izolována z 18 myší.

Proužky odpovídají produktům PCR specifickým pro transgen TEL/AML1.

Rodiče: netransgenní myš C57BL/6 (jamka číslo 1), transgenní myš pro TEL/AML1 (jamka číslo 2). Křížením těchto myší jsme obdrželi 8 potomků (jamka číslo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10). Čtyři potomci jsou transgenní (jamka číslo 4, 5, 8, 9).

Rodiče: obě myši transgenní pro TEL/AML1 (jamka číslo 11 a 12). Mezi 5 potomky vzniklými tímto křížením (jamka číslo 13, 14, 15, 16 a 17) jsou tři jedinci transgenní (jamka číslo 13, 16 a 17).

V první jamce (M) migroval žebříček molekulové hmotnosti, srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforeticou pohyblivostí specifického PCR produktu byla určena molekulová hmotnost tohoto produktu (140 bp).

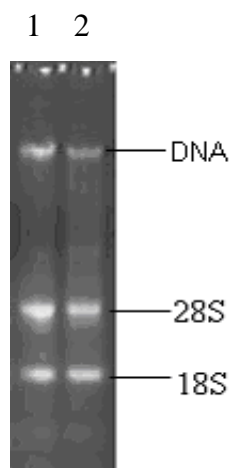
Jamka označená číslem 18 je pozitivní kontrola, poslední jamka (H<sub>2</sub>O) je negativní kontrola.

**Z celkového počtu 19 potomků získaných křížením myši transgenní pro gen TEL/AML1 s myší netransgenní C57BL/6 bylo 10 jedinců TEL/AML1 pozitivních, což odpovídá 53% testovaných jedinců. Z celkového počtu 25 potomků pocházejících z křížení dvou TEL/AML1 transgenních jedinců bylo 17 TEL/AML1 pozitivních, což odpovídá 68% testovaných jedinců.**

## 4.2. OVĚŘENÍ EXPRESE TRANSGENU

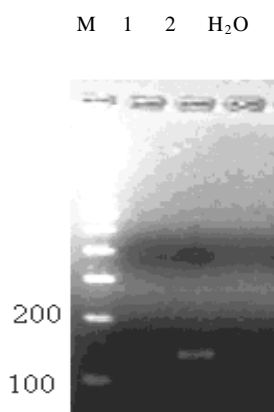
*Dalším mým úkolem bylo ověřit, zda je transgen TEL/AML1 exprimován. mRNA (produkt transgenů) lze identifikovat pomocí molekulárně biologické metody RT-PCR. Tato metoda je modifikací PCR, při které je jako templát použita RNA. Nejprve je RNA přepsána enzymem reverzní transkriptázou do cDNA a specifický fragment přítomný v této cDNA je následně namnožen pomocí PCR.*

Byly testovány dvě myši: netransgenní myš číslo 40 a transgenní myš číslo 41. Z těchto myší byly izolovány sleziné buňky a z nich získána RNA (viz Materiály a metody). Kvalita získané RNA byla ověřena pomocí elektroforetické migrace. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 6. V obou sloupcích jsou přítomny dva proužky odpovídající 18S a 28S RNA.



**Obr. 6: Elektroforetická analýza izolované RNA.** Byly testovány dvě myši: netransgenní myš (jamka číslo 1) a transgenní myš (jamka číslo 2). Ve sloupcích jsou přítomny dva proužky odpovídající 18S a 28S RNA. Je patrná kontaminace DNA.

RNA připravená ze slezinných buněk netransgenní (40) a transgenní (41) myši byla nejprve podrobena reverzní transkripci a získaná cDNA následně PCR. Výsledek elektroforetické migrace RT-PCR produktu je uveden na obrázku 7. V jamce označené M migroval žebříček molekulové hmotnosti. Jamka číslo 1 odpovídá RT-PCR produktu netransgenní myši a jamka číslo 2 RT-PCR produktu myši transgenní. Poslední jamka, označená H<sub>2</sub>O, je negativní kontrola. Ve sloupci číslo 2 (transgenní myš) je patrný proužek, který odpovídá specifickému RT-PCR produktu transgenů TEL/AML1 o molekulové hmotnosti 140 bp.



**Obr. 7: Elektroforetická analýza RT-PCR produktů.** Byly testovány dvě myši: netransgenní myš (jamka číslo 1) a transgenní myš (jamka číslo 2). Proužek ve sloupci číslo 2 odpovídá specifickému RT-PCR produktu transgenu TEL/AML1 (140 bp). Do jamky označené H<sub>2</sub>O byla nanášena negativní kontrola. V jamce označené M migroval žebříček molekulové hmotnosti.

Je běžné, že RNA izolovaná z buněk je kontaminovaná DNA. Specifické primery pro RT-PCR jsou navrženy tak, aby vyloučily možnost jejich reakce s genomickou DNA a reagují jen s cDNA. V našem případě je transgen cDNA, proto není možné vyloučit, že v případě kontaminace RNA genomickou DNA (v našem případě „cDNA“) dochází k amplifikaci fragmentu transgenu. K vyřešení tohoto problému byl proveden následující pokus. RNA izolovaná ze slezinných buněk transgenního (41) a netransgenního (40) jedince byla podrobena reverzní transkripci za přítomnosti (RT+) a bez (RT-) reverzní transkriptázy. Produkty těchto reakcí byly poslány do diagnostické laboratoře, ve které se rutinně hodnotí MRN TEL/AML1 pozitivních pacientů pomocí RQ-RT-PCR. Tato technika umožňuje monitorovat nárůst PCR produktu a kvantitativně zhodnotit rozdíly mezi danými vzorky. V reakci, při které jsme nepoužili reverzní transkriptázu, PCR produkt odpovídal jen cDNA přítomné v genomu transgenní myši. Ve vzorku, kde byla reakční směs připravena s reverzní transkriptázou, PCR produkt odpovídal jak cDNA přítomné v transgenu, tak cDNA vzniklé přepisem izolované RNA. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny v tabulce 1. Byly připraveny čtyři standardy, jde o specifické plazmidy o známé koncentraci (ředění plazmidů 10-10 000 x). Pozitivní kontrola odpovídala buněčné linii pocházející od TEL/AML1 pozitivního pacienta, negativní kontrola obsahovala vodu. Standardy, pozitivní a negativní kontrola byly amplifikovány současně s experimentálními vzorky. Kvantitativní vyhodnocení jsme získali jednak z kalibrační křivky porovnáním signálu

experimentálních vzorků se signálem standardů, ale také vyhodnocením počtu cyklů, při kterých fluorescence dosahuje prahové hodnoty.

Pouze v případě myši transgenní pro TEL/AML1 (41) byly zaznamenány specifické hodnoty. V případě RT+ bylo zaznamenáno 4519 vytvořených kopií při 26 cyklech a u RT- vzorku bylo nutné 31 cyklů k obdržení 164 kopií. U netransgenní myši (40) ani po maximálním počtu cyklů (50) nebyl zaznamenán pozitivní signál.

**Tab. 1: Souhrn výsledků získaných metodou RQ-RT-PCR**

Vzorek			Počet cyklů	Množství kopií
Standardy	Plazmid	10x	19,54	400 000
	Plazmid	100x	23,15	40 000
	Plazmid	1 000x	33,48	40
	Plazmid	10 000x	37,05	4
Kontrolní	Pozitivní		20,93	166 356
	Negativní		50	0
Experimentální	SPL-40	RT+	50	0
	SPL-40	RT-	50	0
	SPL-41	RT+	26,38	4 519
	SPL-41	RT-	31,40	164

Byly testovány dvě myši: 40 netransgenní a 41 transgenní jedinec. Oběma myším byla z buněk sleziny (SPL) izolována RNA, která byla následně podrobena reverzní transkripci za přítomnosti (RT+) a bez (RT-) reverzní transkriptázy. Standardy odpovídaly ředění plazmidů (10-10 000x), pozitivní kontrola byla buněčná linie pocházející od TEL/AML1 pozitivního pacienta, negativní kontrola obsahovala vodu. Je uveden počet cyklů, ve kterých fluorescence dosahovala prahové hodnoty. Množství kopií je relativní hodnota, která vyjadřuje změny množství templátu v porovnání se standardem.

#### 4.3. ANALÝZA KREVNÍHO OBRAZU

*Dalším mým úkolem bylo porovnat krevní obraz transgenních a netransgenních myší. Sledované parametry byly: bílé krvinky, červené krvinky, krevní destičky a lymfocyty.*

Testovaným myším (12 transgenních a 5 netransgenních) byla odebrána krev z retroorbitálního sinu. Z naředěné krve byl vyhodnocen krevní obraz. Výsledky (Tab. 2) byly rozděleny do skupin dle přítomnosti transgenu. Bylo hodnoceno celkové množství bílých krvinek, červených krvinek a krevních destiček obsažených v 1  $\mu\text{l}$  a procentuální zastoupení lymfocytů. Množství bílých krvinek v periferní krvi transgenních jedinců dosahovalo hodnot od  $2,6 \times 10^3/\mu\text{l}$  do  $7,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ , červených krvinek bylo minimálně  $8800 \times 10^3/\mu\text{l}$  a maximálně  $11\,150 \times 10^3/\mu\text{l}$ , množství krevních destiček u těchto jedinců se pohybovalo od  $67 \times 10^3/\mu\text{l}$  do  $152 \times 10^3/\mu\text{l}$  a množství lymfocytů bylo v rozmezí 66-91%. Množství bílých krvinek v periferní krvi netransgenních jedinců dosahovalo hodnot od  $3,3 \times 10^3/\mu\text{l}$  do  $10,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ , množství červených krvinek bylo v rozmezí od  $9700 \times 10^3/\mu\text{l}$  do  $10\,500 \times 10^3/\mu\text{l}$ , množství krevních destiček se pohybovalo v rozmezí hodnot od  $93 \times 10^3/\mu\text{l}$  do  $170 \times 10^3/\mu\text{l}$  a obsah lymfocytů se pohyboval v rozmezí 81-86%.

**Tab. 2: Krevní obraz testovaných myší**

Číslo myši	Přítomnost transgenu	Bílé krvinky x $10^3/\mu\text{l}$	Červené krvinky x $10^3/\mu\text{l}$	Krevní destičky x $10^3/\mu\text{l}$	Lymfocyty %
2	+	4,5	8 800	111	66
3	+	4,2	9 950	146	66
4	+	6,2	9 850	170	79
14	+	4,3	9 450	67	74
16	+	3,2	11 150	103	85
18	+	6,0	10 550	152	80
20	+	4,5	10 550	140	78
26	+	3,5	10 200	133	85
31	+	5,4	9 850	125	91
35	+	7,6	10 200	120	73
37	+	4,4	11 150	129	84
41	+	2,6	10 850	113	86
17	-	4,9	10 300	93	85
25	-	3,3	10 250	132	86
27	-	4,7	9 700	149	83
34	-	10,6	10 500	141	81
40	-	7,9	10 000	170	84

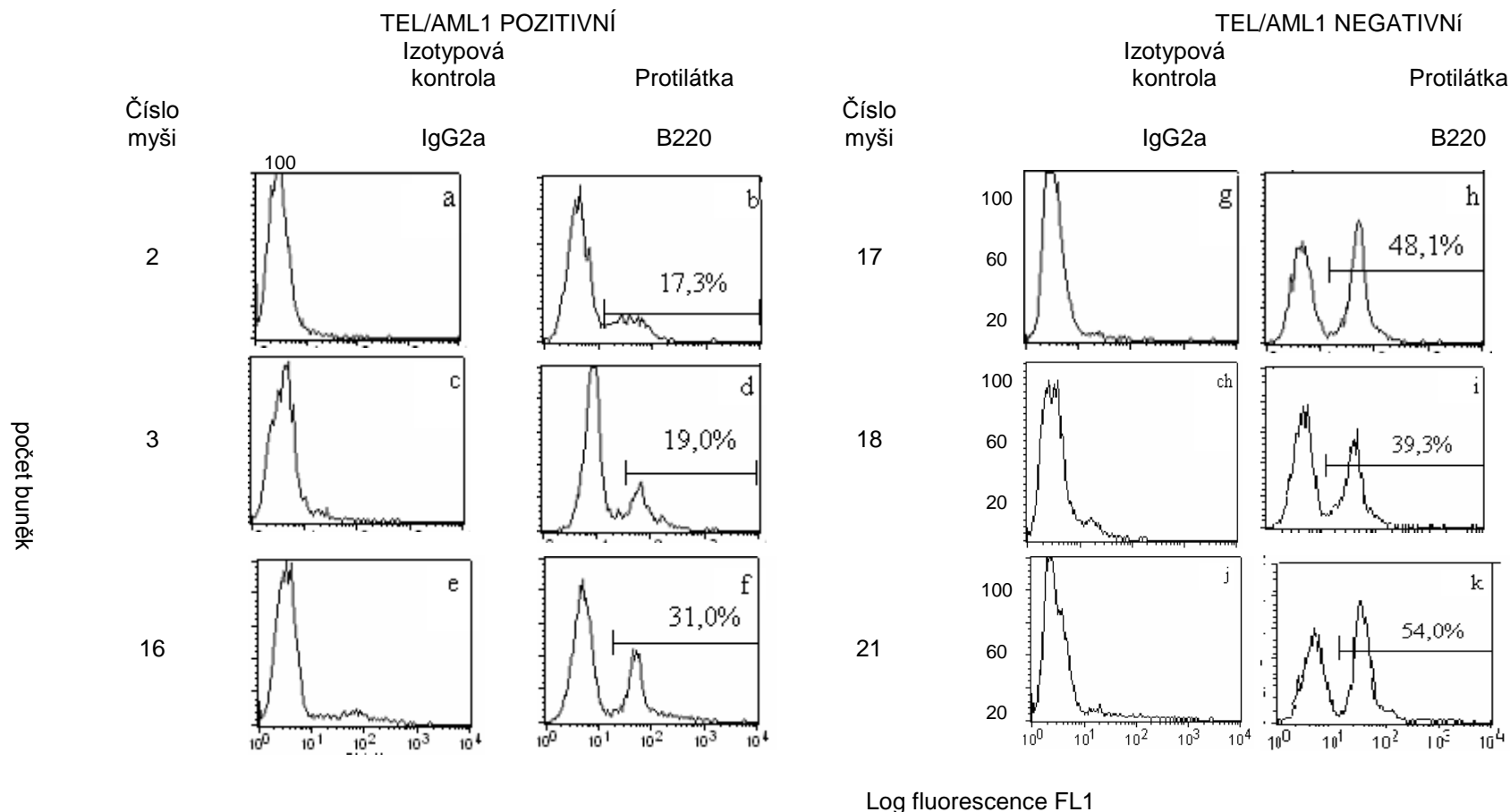
#### 4.4. APLIKACE CYTOFLUOMETRICKÉ METODY NA CHARAKTERIZACI BUNĚČNÝCH POPULACÍ

*Průtoková cytometrie je běžně používaná technika pro analýzu exprese molekul v cytoplazmě a na povrchu buněk, nebo pro definování a charakterizaci různých buněčných typů v rámci heterogenní populace. Tato technika se používá k měření intenzity fluorescence, která je způsobena fluorochromem značenými protilátkami. Tyto protilátky se specificky váží na detekované molekuly přítomné na povrchu buněk či v cytoplazmě. Mým úkolem bylo aplikovat cytofluorometrickou metodu na charakterizaci buněčných populací přítomných v periferní krvi transgenní a netransgenní myši.*

Buňky periferní krve získané z transgenních a netransgenních myší byly inkubovány s monoklonální protilátkou B220, která specificky reaguje s molekulou CD45R na povrchu B lymfocytů. Tato protilátka byla značena fluoresceinem (FITC) a fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru. Získané hodnoty byly zaznamenány a analyzovány pomocí programu Cell Quest. Negativní kontrolou byly buňky inkubované s izotopovou kontrolou IgG2a, která byla také značena fluoresceinem (FITC).

Procentuální zastoupení B lymfocytů v krvi TEL/AML1 pozitivních myší (myš číslo 2, 3, 16) a TEL/AML1 negativních myší (myš číslo 17, 18, 21) je uvedeno na obrázku 8. Histogramy fluorescence buněk transgenních i netransgenních myší inkubovaných s monoklonální protilátkou B220/FITC jsou posunuty k vyšším hodnotám fluorescence (doprava) v porovnání s histogramy buněk inkubovaných s izotypovou kontrolou IgG2a/FITC. U dvou TEL/AML1 pozitivních myší (myš číslo 2, 3) bylo procento B lymfocytů v periferní krvi 17,3% a 19%. Myš číslo 16, transgenní pro gen TEL/AML1, měla v periferní krvi 31% B lymfocytů. V periferní krvi TEL/AML1 negativních myší (17, 18, 21) bylo prokázáno 48,3%, 39,3% a 54% a B lymfocytů.



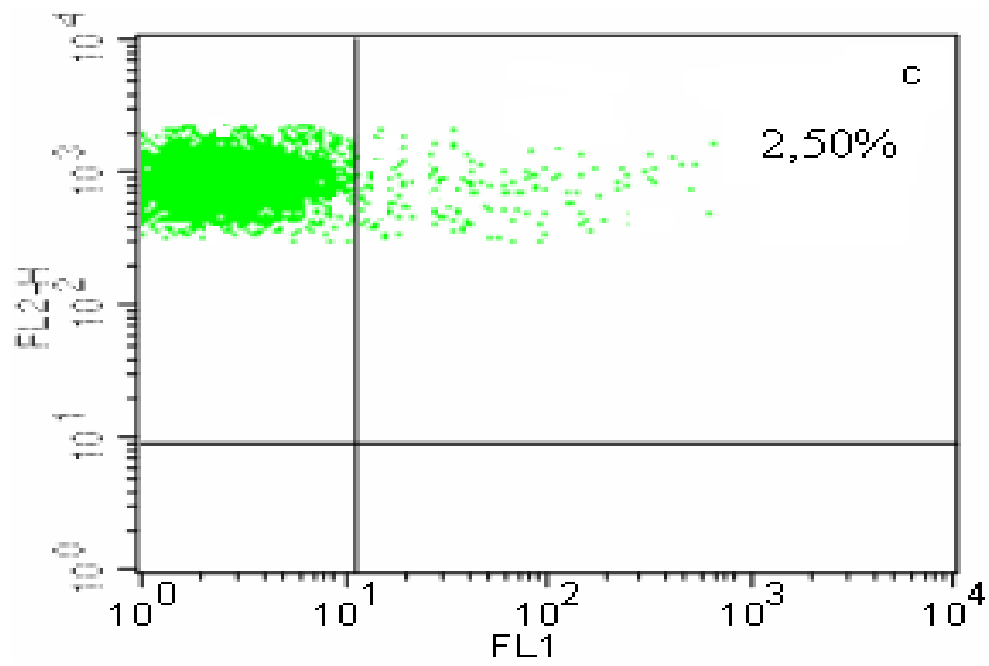
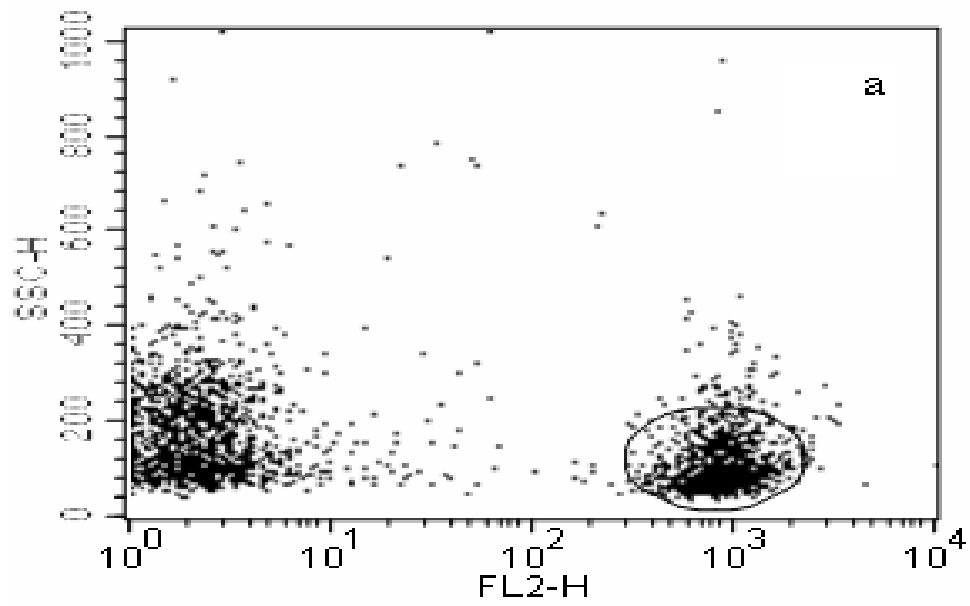


**Obr. 8: Cytofluorometrická analýza (%) B buněčné populace (B220<sup>+</sup>) v periferní krvi.** Testované myši: TEL/AML1 pozitivní jedinci (myš číslo 2, 3, 16), TEL/AML1 negativní jedinci (myš číslo 17, 18, 21). Byla použita krysí monoklonální protilátka B220 specificky reagující s molekulou CD45R značená FITC a izotypová kontrola IgG2a značená také FITC. Histogramy fluorescence buněk inkubovaných s monoklonální protilátkou B220 (b, d, f, h, i, k) jsou signifikantně posunuty k vyšším hodnotám fluorescence ve srovnání s histogramy fluorescence buněk inkubovaných s izotypovou kontrolou IgG2a (a, c, e, g, ch, j). Uvedená procenta odpovídají procentům buněk, jejichž fluorescence je větší než 10<sup>1</sup>.

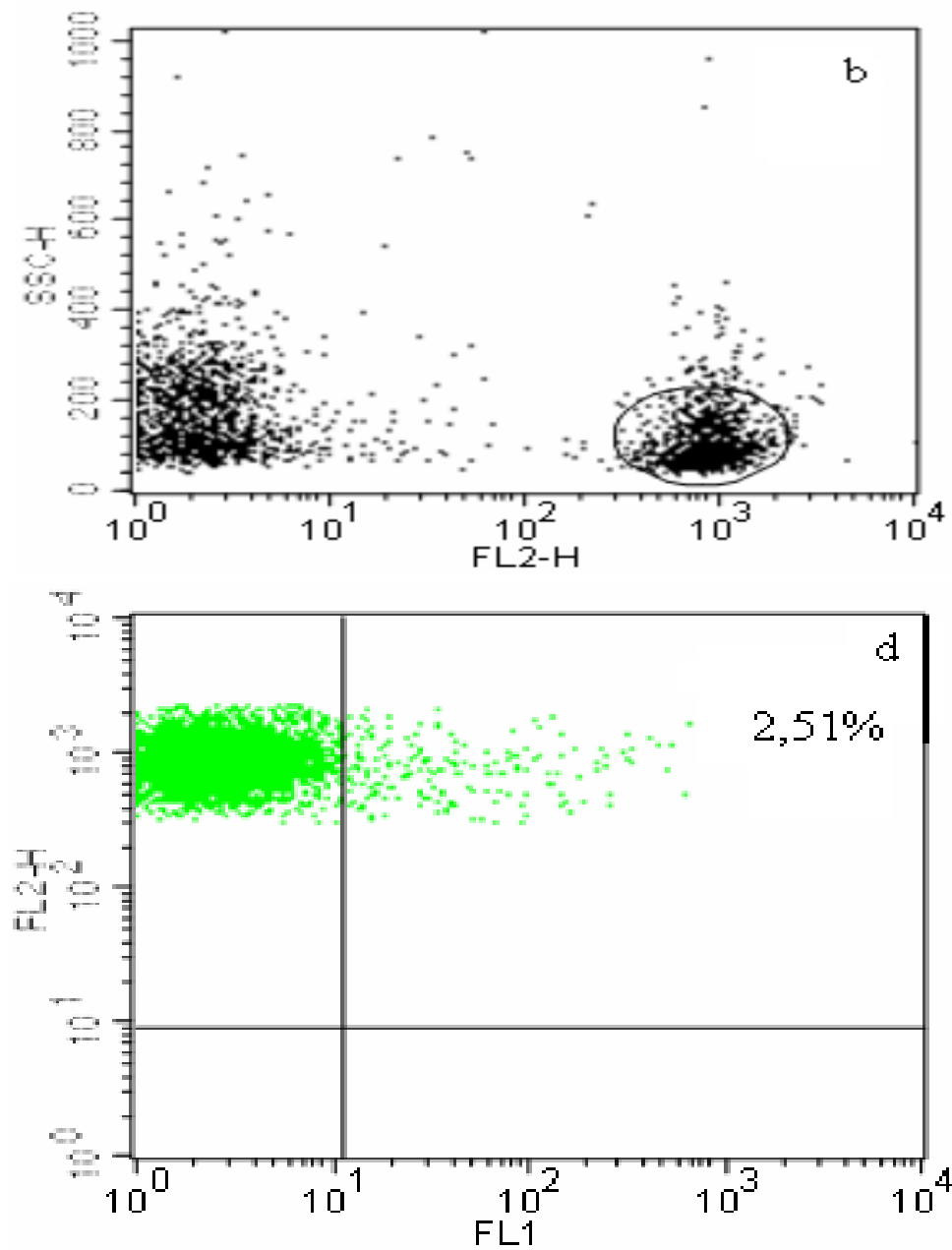
Většina buněk v periferní krvi, s výjimkou B lymfocytů ( $B220^+$ ) exprimuje na svém povrchu molekulu CD43. Pre-B lymfocyty přítomné v kostní dřeni mají fenotyp  $B220^+/CD43^+$ , proliferací a diferenciací postupně ztrácejí molekulu CD43 a diferencované B lymfocyty v periferní krvi mají fenotyp  $B220^+/CD43^-$ . Přítomnost  $B220^+/CD43^+$  buněk v PBL poukazuje na leukemický charakter.

Mým úkolem bylo charakterizovat pomocí specifických protilátek (CD43 a B220) buňky periferní krve transgenních a netransgenních jedinců. Za tímto účelem byly buňky periferní krve těchto jedinců inkubovány s monoklonální protilátkou B220 značenou phycoerytrinem (PE; FL2) a s monoklonální protilátkou CD43 značenou fluoresceinem (FITC; FL1) (Obr. 9). Nejprve byla na základě fluorescence vybrána populace  $B220^+$  buněk (Obr. 9a, b). Tato vybraná populace byla dále analyzována (Obr. 9c, d) pro přítomnost  $CD43^+$  buněk (FL1). U TEL/AML1 pozitivní myši bylo zjištěno 2,50%  $B220^+/CD43^+$  buněk a u TEL/AML1 negativní myši 2,51%  $B220^+/CD43^+$  buněk.

TEL/AML1 pozitivní myš



TEL/AML negativní myš



**Obr. 9: Cytofluorometrická analýza (%) B buněčné populace (CD43<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>) v periferní krvi.** Byla testována TEL/AML1 pozitivní myš a TEL/AML1 negativní myš. Použité protilátky: B220 specificky reagující s molekulou CD45R, značená PE (FL2) a CD43 specificky reagující s molekulou CD43, značená FITC (FL1). Dot-plot diagramy a, b znázorňují výběr populace B buněk (B220<sup>+</sup>). Procento v pravém horním rohu u Dot-plot diagramů c, d odpovídá buněčné populaci B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>.

## 5. DISKUZE

## 5. DISKUSE

### 5.1. IDENTIFIKACE PŘÍTOMNOSTI TRANSGENU

V hostující laboratoři je jedním z nejčastěji používaných experimentálních modelů transgenní myš. Identifikovat transgenní jedince je možné buď na genové úrovni detekcí daného transgenu pomocí molekulární biologie, nebo na základě exprese transgenu, detekcí přítomnosti jeho produktu. Během mého pobytu jsem používala myši transgenní pro gen TEL/AML1, které slouží jako model pro studium dětské akutní lymfoblastické leukémie.

Mým úkolem bylo detekovat transgen u potomků myši získaných přenosem embryí. Přítomnost transgenu jsem u těchto myši zjišťovala metodou PCR popsanou v části Materiály a metody. Nejprve byly testováni jedinci, získaní křížením transgenního hemizygotního samce (+/-) a netransgenní samice C57BL/6 (-/-). Transgen je přenášen jako klasický mendelovský znak, to znamená, že pouze 50% jedinců, získaných tímto křížením, má ve svém genomu integrovaný transgen. Z celkového počtu 19 myši bylo identifikováno 10 transgenních jedinců, což odpovídá 53%. Toto procento se signifikantně neliší od očekávaných 50%. Mezi potomky získanými křížením dvou transgenních hemizygotů (+/-) očekáváme 25% transgenních homozygotů (+/+), 50% transgenních hemizygotů (+/-) a 25% netransgenních homozygotů (-/-). Použitou metodou nelze rozlišit hemizygoty (+/-) od homozygotů (+/+), očekáváme tedy 75% pozitivních jedinců a 25% negativních jedinců. Z 25 testovaných myši byl transgen prokázán u 17 jedinců (68%). Toto procento se přibližuje očekávaným 75%. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

**Tab. 3: Souhrn výsledků získaných metodou PCR**

Křížení	Pozitivní jedinci/celkový počet myši (% pozitivních jedinců)
+/- x -/-	10/19 (53%)
+/- x +/-	17/25 (68%)

+/- : Transgenní (hemizygotní) jedinec

-/- : Netransgenní jedinec

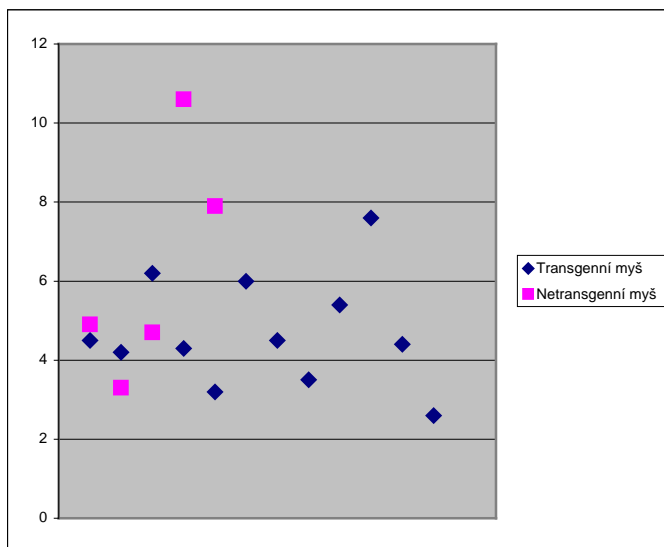
## 5.2. OVĚŘENÍ EXPRESE TRANSGENU

U transgenních myši může dojít k situaci, při které transgen není exprimován. Dalším mým úkolem bylo tedy ověřit, zda je transgen TEL/AML1 v našem modelu exprimován (na úrovni mRNA). Za tímto účelem byla izolována RNA ze slezinných buněk transgenní a netransgenní myši. Nejprve byla pomocí elektroforetické migrace hodnocena její kvalita. RNA se dle očekávání rozdělila na dvě jednoty odpovídající 18S a 28S RNA (Obr. 6). Na agarózovém gelu se objevil ještě jeden proužek o velké molekulové hmotnosti. Jeho přítomnost poukazuje na kontaminaci genomickou DNA, která je běžná. Otázkou je, zda produkt následně provedené RT-PCR neodpovídá pouze amplifikaci fragmentu genu TEL/AML1 (cDNA) obsaženému v genomické DNA. K vyřešení tohoto problému byl proveden následující pokus (Tab. 1). RNA izolovaná z transgenního a netransgenního jedince byla podrobena reverzní transkripci za přítomnosti (RT+) a bez (RT-) reverzní transkriptázy a poté RQ-PCR (viz Výsledky, Ověření exprese transgenu). Pouze v případě transgenního jedince vznikly kopie fragmentu transgenu TEL/AML1, a to 4519 kopií při RT+ a 164 kopií při RT-. Menší množství kopií při RT- dokazuje, že ve vzorku bez reverzní transkriptázy bylo přítomné pouze malé množství kontaminující DNA (cDNA). V případě RT+, kdy je amplifikace provedena na základě cDNA získané přepisem izolované RNA a cDNA obsažené v genomu myši, jsme získali více kopií. Rozdíl množství kopií mezi RT+ a RT- poukazuje na přítomnost mRNA. Další charakteristikou ukazující na přítomnost produktu transgenu je počet cyklů, ve kterých fluorescence dosahuje prahové hodnoty. U transgenního jedince v případě RT+ testu stačí 26 cyklů k obdržení prahové hodnoty, protože výchozí množství cDNA je větší než u RT- testu, kde je nutné provést 31 cyklů. Tento pokus prokázal, že v našem modelu je transgen TEL/AML1 exprimován.

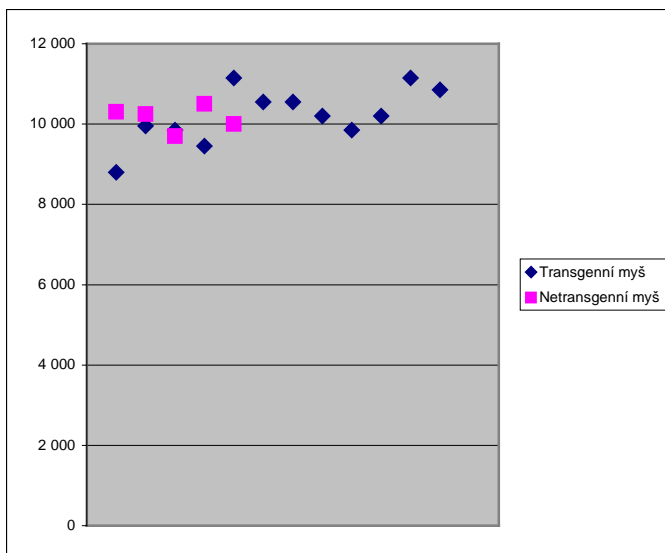
## 5.3 ANALÝZA KREVNÍHO OBRAZU

Prvním krokem ke stanovení diagnózy akutní lymfoblastické leukémie u pacientů je analýza krevního obrazu, která zpravidla ukáže: anemii, tj. snížení počtu červených krvinek a hemoglobinu; trombocytopenii, tj. snížení počtu krevních destiček; leukocytozu, tj. zvýšení počtu bílých krvinek, nebo vzácně leukopenii, tj. snížení počtu

bílých krvinek (17). Mým úkolem bylo porovnat krevní obrazy transgenních a netransgenních jedinců (Tab.2, Obr. 10-13). U sledovaných parametrů (bílé krvinky, červené krvinky, krevní destičky a lymfocyty), jak vyplývá z obrázku 10-13, se jednotlivé hodnoty překrývají a nejsou tedy patrné rozdíly mezi transgenními a netransgenními jedinci.

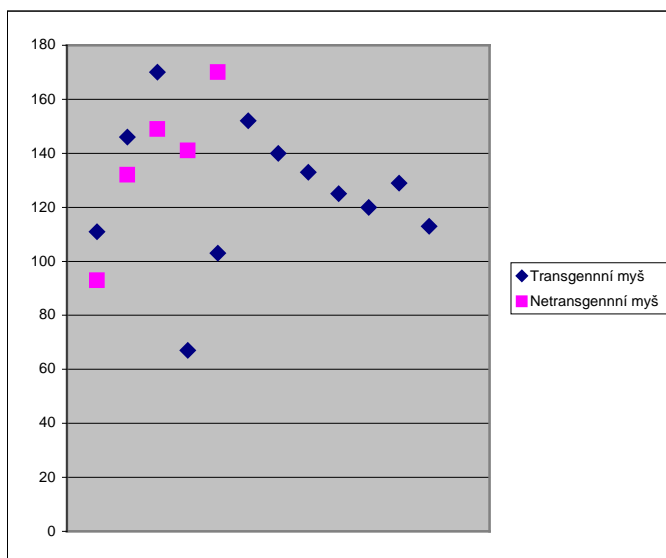


**Obr. 10: Množství bílých krvinek (x 10<sup>3</sup>/μl) v krvi transgenních a netransgenních myší**

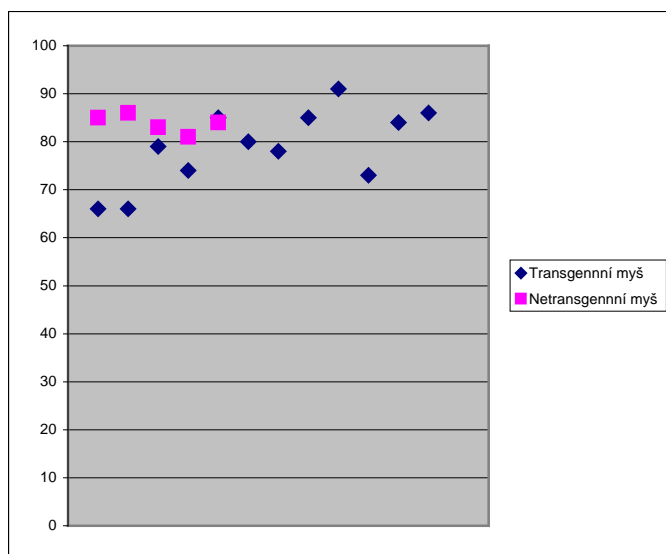


**Obr. 11: Množství červených krvinek (x 10<sup>3</sup>/μl) v krvi transgenních a netransgenních myší**





**Obr. 12: Množství krevních destiček (x 10<sup>3</sup>/μl) v krvi transgenních a netransgenních myší**



**Obr. 13: Množství lymfocytů (%) v krvi transgenních a netransgenních myší**

#### 5.4. CHARAKTERIZACE BUNĚČNÝCH POPULACÍ

Fragment transgenu TEL/AML1 je pod kontrolou promotoru kódujícího těžký řetězec IgM, který zajišťuje jeho expresi v B lymfocytech. Proto bylo zajímavé porovnat populace B lymfocytů u transgenní a netransgenní myši (Obr. 8). Ukázalo se, že v periferní krvi (PBL) transgenních myší je obsaženo 17,3%, 19,0% a 31% B lymfocytů. Nízké procento B lymfocytů u transgenních myší je v souladu s teorií nedostatečné proliferace a diferenciaci B lymfocytů pozorované u TEL/AML1 pozitivních pacientů (18, 22). U netransgenních myší bylo prokázáno 39-54% B lymfocytů v periferní krvi.

Molekula CD43 je exprimovaná na povrchu většiny T lymfocytů, granulocytů, monocytů, megakaryocytů a červených krvinek, na povrchu některých makrofágů a krevních destiček a jen na velmi malém množství B lymfocytů na periférii. Pre-B lymfocyty (B220<sup>+</sup>) v kostní dřeni na svém povrchu běžně exprimují molekulu CD43 (8). Během proliferace a diferenciaci tato molekula mizí a většina B lymfocytů na periférii má fenotyp B220<sup>+</sup>/CD43<sup>-</sup>. Přítomnost pre-B lymfocytů (B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>) v periferní krvi by znamenala jejich nedostatečnou diferenciaci a proliferaci a tudíž leukemogenezi (18, 22). V našem případě však nebyly zaznamenány rozdíly v procentuálním zastoupení B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> B lymfocytů u transgenní a netransgenní myši (Obr. 9).

Jak vyplývá z uvedených výsledků, TEL/AML1 transgenní myši nejeví jasné známky leukemogeneze a hybridní gen TEL/AML1 tedy není dostatečný k vyvolání leukémie (jak je uvedeno v Úvodu). V hostující laboratoři budou provedeny další pokusy zabývající se tímto problémem. Je také možné, že existují určité enviromentální faktory, které se podílejí na vzniku onemocnění. Další pokusy používající tento experimentální model umožní identifikovat tyto faktory a tím i navrhnout možnosti prevence této nemoci. Experimentální model TEL/AML1 transgenní myši může být též použit jako farmakologický model pro vývoj nových terapeutických strategií.

## 6. ZÁVĚR

## 6. ZÁVĚR

Prvním mým úkolem bylo použít metodu PCR na identifikaci jedinců nesoucích transgen TEL/AML1. Tuto metodu jsem použila na detekci transgenu u 32 myší získaných přenosem embryí. Výsledky ukázaly, že 20 jedinců bylo transgenních. Dále jsem stejnou metodou testovala jejich potomky: jedince získané křížením transgenní hemizygotní myši (+/-) s netransgenní myší C57BL/6 (-/-). U 10 jedinců z 19 byl nalezen daný transgen, což odpovídá 53%. Z 25 potomků získaných křížením dvou transgenních hemizygotních jedinců (+/-) bylo 17 myší transgenních (68%). Během mého pobytu (5 měsíců) jsem PCR metodu úspěšně aplikovala na analýzu genotypu 76 myší.

Metodou RQ-RT-PCR jsem prokázala expresi transgenu na úrovni mRNA.

Analýzou krevního obrazu nebyly prokázány rozdíly v počtu bílých a červených krvinek, krevních destiček a procentuálním zastoupení lymfocytů v periferní krvi transgenních a netransgenních myší.

Za pomocí metody byla charakterizována populace B lymfocytů u transgenních a netransgenních jedinců. Ze získaných výsledků vyplývá, že transgenní jedinci mají v periferní krvi nižší průměrný počet B lymfocytů (22%) ve srovnání s netransgenními jedinci (47%). Dále jsem použila stejnou metodu na vyhodnocení procenta B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> buněk v PBL TEL/AML1 pozitivních a TEL/AML1 negativních myší. Získané výsledky neprokázaly signifikantní rozdíl mezi transgenní a netransgenní myší a tím potvrdily neleukemický charakter TEL/AML1 transgenních myší.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., Aster, J., Gilliland, D.G.: The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 15: 93-104, 2001.
2. Bernardin, F., Yang, Y., Cleaves, R., Zahurak, M., Cheng, L., Civin, C.I., Friedman, A.D.: TEL/AML1 expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Research* 15: 3904-3908, 2002.
3. Burmester G.R., Pezzutto, A.: Atlas de poche d'immunologie. I.M.E., Paris, 322s. 2005.
4. Dongen, J., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., González Díaz, M., Malec, M., Langerak, A.W., San Miquel, J.F., Biondi, A.: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13: 1901-1928, 1999.
5. Fischer, M., Schwieger, M., Horn, S., Niebuhr, B., Ford, A., Roscher, S., Bergholz, U., Greaves, M., Löhler, J., Stocking, C.: Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24: 7579-7591, 2005.
6. Golup, T., Barker, G.F., Bohlander, S.K., Hiebert, S.W., Ward, D.C., Bray-Ward, P., Morgan E., Raimondi, S.C., Rowley, J.D., Gilliland, D.G.: Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in the acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4917-4921, 1995.
7. Greaves, M.: Pre-natal origins of childhood leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* 7: 233-245, 2003.
8. Hardy, R., Carmark, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., Hayakawa, K.: Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 1213-1225, 1991.
9. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie. Triton, Praha, 290s. 2001.
10. Hrušák, O., Trka, J., Zuna, J., Houskova, J., Bartůňková, J., Starý, J.: Abberant expression of KOR-SA 3544 antigen in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts TEL/AML1 negativity. *Leukemia* 12: 1064-1070, 1998.
11. Lopez, R.G., Carron, C., Oury, C., Gardellin, P., Bernard, O., Ghysdael, J.: TEL is a sequence-specific Transcriptional Repressor. *Journal of Biological Chemistry* 15. 30132-30138, 1999.

12. Madžo, J., Mužíková, K., Froňková E., Šrámková L., Zemanová, L., Zuna, J., Starý, J., Trka, J.: Je fúzní gen TEL/AML1 vhodným znakem pro sledování reziduální nemoci u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? *Transfúze a hematologie dnes* 10: 137-142, 2004.
13. Maloney, KW., Rubnitz, JE., Clary, ML., Frankel, LS., Hakami, N., Link, MP., Pullen, DJ., Hunger, SP.: Lack of ETV 6 (TEL) gene rearrangement or p<sup>16INK4A</sup>/p<sup>15INK4B</sup> homozygots gene deletions in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 11: 979-982, 1997.
14. Mori, H., Colman, S.M., Xiao, Z., Ford, A.M., Healy, C.D., Donaldson, C., Hows, J.M., Navarrete, C., Greaves, M.: Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 11: 8242-8247, 2002.
15. Passegué, E., Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., Weissman I.L.: Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11842-11849, 2003.
16. Raynald, S., Mauvieux, L., Cayuela, J., Bastard, C., Bilhou-Nabera, C., Debuire, B., Bories, D., Boucheix, C., Charrin, C., Fiere, D., Gabert, J.: TEL/AML1 fusion gene is a rare in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10: 1529-1530, 1996.
17. Ribera, JM., Sancho, JM.: Evropský informační manuál pro dospělé pacienty s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), 2007. [www.leukemia-net.org](http://www.leukemia-net.org) (25.1.2008).
18. Romana, SP., Mauchauffe, M., Le Cinkat, M., Chumakov, I., Le Paslier, D., Berger, R., Bernard, OA.: High Frequency of t(12;21) in childhood B-linesge Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 85: 3662-3670, 1995.
19. Sedláček, P., Trka, J., Zuna, J., Hrušák, O., Honzátková-Krsková, L., Starý, J.: Monitoring of minimal residual disease and mixed chimerism in a case of high-risk TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia pre- and post-bone marrow transplantation. Czech Pediatric Haematology Working Group. *Haematologica* 85:1100-2, 2000.
20. Starková, J., Krejčí, O., Otová, B., Krejčíková, K., Hrušák, O., Starý, J., Trka, J.: TEL/AML1 spuštěním metabolického stresu zvyšuje citlivost leukemických buněk na L-Asparaginázu. *Transfúze a hematologie dnes* 12: 70-75, 2006.
21. Tenen, D.G., Hromas, R., Licht, J.D., Zhang, D.E.: Transcription Factors, Normal Myeloid Development, and Leukemia. *Blood* 90: 489-519, 1997.
22. Tsuzuki, S., Seto, M., Greaves, M., Enver, T.: Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 8443-8448, 2004.

23. Trka, J., Zuna, J., Hrušák, O., Kalinová, M., Mužíková, K., Lauschman, H., Starý, J.: Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in Czech Republic. Pediatric Hematology Working Group in Czech Republic. *Leukemia* 12: 996-997, 1998.
24. Trka, J., Zuna, J., Haškovec, C., Brabencová A., Kalinová, M., Mužíková, K., Paukertová, R., Hrušák, O., Zemanová, Z., Michalová, K., Starý, J.: Detection of BCR/ABL, MLL/AF4 and TEL/AML1 hybrid genes and monitoring of minimal residual disease in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Transfúze a hematologie dnes* 138:12-17, 1999.
25. Trka, J., Zuna, J., Hrušák, O., Zemanová, Z., Mužíková, K.: Hybridní gen TEL/AML1 asociovaný s akutní leukémií vzniká v průběhu normálního fetálního vývoje a je detekovatelný v pupečnickových krvích zdravých novorozenců. *Česko-slovenská pediatrie* 58: 471-477, 2003.



## 8. SOUHRN

## 8. SOUHRN

Geny TEL a AML1 se vyskytují v nápadně vysokém počtu různých aberací provázejících hematologické malignity. Tato práce se zaměřuje na studium hybridního genu TEL/AML1 na modelu transgenní myši. Translokace  $t(12;21)(p13;q22)$ , odpovídající genu TEL/AML1, byla metodou PCR hledána u 76 jedinců. Tyto myši byly dále testovány na přítomnost mRNA fúzního genu TEL/AML1 použitím metody RQ-RT-PCR.

Analýzou krevního obrazu byly hledány rozdíly v počtu bílých a červených krvinek, krevních destiček a procentuálním zastoupení lymfocytů v periferní krvi transgenních a netransgenních myší. TEL/AML1 pozitivní Akutní lymfoblastická leukémie vzniká z prekursorů B lymfocytů, proto byly cytofluorometrickou metodou sledovány možné změny v procentuálním zastoupení B lymfocytů v periferní krvi transgenních a netransgenních myší. Dále byl sledován marker pre-B lymfocytů ( $B220^+/CD43^+$ ). Přítomnost pre-B lymfocytů v periferní krvi značí nedostatečnou proliferaci a diferenciaci těchto buněk a tudíž leukemogenezi.

## ABSTRACT

The TEL and AML1 genes occur in a markedly high number of different aberrations in hematological malignancies. We studied TEL/AML1 hybrid gene in transgenic mice model, translocation t(12;21)(p13;q22). This hybrid gene was searched by PCR method in 76 individuals. After, they were examined for presence of mRNA of fusion gene TEL/AML1 using RQ-RT-PCR.

Compared the blood cell analysis of transgenic and non-transgenic mice, we searched difference in the erythrocyte, lymphocyte, thrombocyte count and lymphocyte ratio in peripheral blood. The TEL/AML1 positive Acute lymphoblastic leukemia is B cell precursor leukemia, therefore we used cytofluometric analysis for study the ratio of the B lymphocytes of transgenic and non-transgenic mice. Then, we observed the leukemic cell marker of pre-B lymphocytes (B220<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>). Presence of the pre-B lymphocytes in peripheral blood show incomplete differentiation and proliferation of B lymphocytes, consequently leucemogenesis.

