

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

**Role genu WT1 v normální hematopoeze  
a leukemogenese**

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

Karolina Kramarzová

V Praze 2006

vedoucí práce

doc. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

# Abstrakt

Metody molekulární genetiky se v posledních desetiletích významně prosazují v onkologii a hematologii. Je tomu tak i při hledání mechanismů leukemogenese a sledování odpovědi na léčbu u dětských akutních leukémií – nejčastějšího nádorového onemocnění dětského věku.

Tato práce se zabývá rolí genu WT1 v normální hematopoeze a leukemogenese. Gen WT1, jehož exprese je charakteristická pro vyvíjející se uropoetickou tkáň, je exprimován i ve fyziologických prekurzorech krevních buněk a aberantně také v maligních buňkách celé škály leukémií. V současné době je intenzivně zkoumána jeho role v nádorové transformaci i možnost využití jeho aberantní exprese jako prognostického faktoru a znaku leukemického klonu pro sledování zbytkové nemoci u pacientů s leukémiemi.

V jednotlivých kapitolách práce se věnujeme charakteristikám dětských akutních leukémií, roli detekce reziduální nemoci v jejich léčbě, metodologickým možnostem monitorování zbytkové nemoci a především biologickým vlastnostem genu WT1.

Shrnujeme cíle experimentální práce, která se zaměřuje jak na roli proteinu WT1 v nemaligních hematopoetických buňkách, tak na praktické možnosti využití jeho aberantní exprese v maligních buňkách pro detekci reziduální nemoci.

# Seznam použitých zkratek

**WT1**.....Wilms' tumor gene 1

**ALL**..... acute lymphoblastic leukaemia

**AML**.....acute myeloid leukaemia

**Ig**.....imunoglobulin

**TCR**.....T-cell receptor

**RQ-PCR**.....real-time quantitative PCR

**CD**.....cluster of differentiation

**FAB**.....French – American – British (FAB) cooperative group

**LAIP**..... leukaemia-associated immunophenotypes

**Q-PCR**.....quantitative PCR

**Taq**.....Thermus aquaticus

**C<sub>T</sub>**.....treshold cycle

**Cys**.....cystein

**His**.....histidin

**bp**.....base pair

**PKA**.....protein kinase A

**PKC**.....protein kinase C

**EGR1**..... early growth response 1

**EGR2**..... early growth response 2

**IGF II**..... insulin growth factor II

**PDGF-A**..... platelet-derived growth factor alpha

**CSF-1**.....colony stimulating factor 1

**PAX2**.....paired box gene 2

**BM**.....bone marrow

**BCP-ALL**.....B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia

**WBC**.....leukocyte count

**CLIP**.....Childhood Leukemia Investigation Prague

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Nádorová onemocnění v dětském věku.....</b>	<b>7</b>
2.1. Rozdělení a celosvětová incidence.....	7
2.2. Charakteristika akutních leukémií.....	8
2.2.1. Akutní lymfoidní leukémie (ALL).....	9
2.2.2. Akutní myeloidní leukémie (AML).....	10
<b>3. Minimální reziduální nemoc (MRN).....</b>	<b>12</b>
3.1. Detekce minimální reziduální nemoci (MRN).....	12
3.1.1. Metody molekulární cytogenetiky.....	13
3.1.2. Imunologické metody.....	13
3.1.3. Molekulárně genetické metody.....	14
3.1.3.1. Detekce fúzních genů.....	14
3.1.3.2. Detekce přestaveb Ig/TCR .....	15
3.1.3.3. Detekce aberantních či aberantně exprimovaných genů .....	15
3.1.4. RQ-PCR.....	16
<b>4. Gen WT1 .....</b>	<b>19</b>
4.1. Struktura genu WT1.....	19
4.2. Alternativní sestřih genu WT1 a jeho isoformy.....	19
4.3. Protein WT1.....	21
4.4. Role genu WT1 v normální hematopoese.....	22
4.5. Role genu WT1 v leukemogeneze .....	24
<b>5. Detekce MRN pomocí WT1.....</b>	<b>24</b>
5.1. Detekce MRD pomocí WT1 u AML.....	25
5.2. Detekce MRN pomocí WT1 u ALL.....	26
<b>6. Budoucí cíle a směřování práce.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Poděkování.....</b>	<b>28</b>
<b>8. Seznam použité literatury.....</b>	<b>28</b>

# 1. Úvod

Téměř 170 let uplynulo od okamžiku, kdy bylo poprvé Virchowem použito slovo „Leukämie“ pro popis onemocnění dnes známého jako chronická leukémie. Vzhledem k faktu, že je hematopoesa u obratlovců nejintenzivnější během fetálního vývoje a během prvních let života jedince, není překvapujícím faktem, že je leukémie nejčastějším dětským maligním onemocněním (Raul *et al.* 2004). Tato choroba u dětských pacientů se za posledních 30 let změnila z fatální nemoci na nemoc léčitelnou a ve většině případů vyléčitelnou. Pomocí moderních metod jako je chemoterapie, ozařování či transplantace kostní dřeně lze v dnešní době vyléčit až 80% dětí s nově diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií, a 50 % u akutní myeloidní leukémie. Stále však zůstává část dětí, pro něž je bohužel tato choroba nevyléčitelná. Relaps, čili znovuobjevení nemoci, je pro pacienta nepříznivá událost, významně snižující jeho další šance na přežití. Tím se bohužel leukémie mění v nemoc chronickou, která vyžaduje pokračující, několik let trvající náročnou léčbu, která je pro pacienta i jeho okolí velice náročná, jak fyzicky tak i psychicky. Dokud budou k léčbě tohoto onemocnění používány chemoterapie a transplantace kostní dřeně, nepodaří se také zcela zabránit náhlým a neočekávaným úmrtím na komplikace léčby této nemoci (Starý *et al.* 2002).

Jedním z hlavních problémů v léčbě hematopoetických malignit je fakt, že ačkoli tato léčba vede k dramatické redukci nádorové masy, nedochází obvykle ke kompletní eradikaci leukemického klonu (Kreuzer *et al.* 2001). Proto je cílem hematologů nalezení potenciálních vlastností, díky kterým lze detekovat maligní buňky během remise. Tyto vlastnosti by měly poskytovat informaci jak o přítomnosti či absenci leukemického klonu, tak i o změnách v jeho proliferativním chování.

Obecný předpoklad, že vznik leukémie je spíše vícekový proces, ve kterém synergistické efekty několika genetických mutací vedou k leukemické transformaci, byl potvrzen již mnoha výsledky, přestože přesné mechanismy tohoto procesu stále zůstávají nejasné. Cílem vědců je tedy studium genů, jejichž mutace by mohly být jednou z událostí v tomto procesu, a jejich vzájemné souvislosti a kooperace. Jedním z těchto genů je gen WT1, jenž byl původně dáván do souvislosti jen s Wilmsovým tumorem, a který dle dosavadních výsledků zasluhuje pozornost vědců zabývajících se studiem hematopoetických malignit.

Tato práce je zaměřena na účinek WT1, který je jedním z významných genů, účastnících se jak normální hematopoesy, tak i leukemogenesy. V následujících kapitolách se pokusím nastínit nejdůležitější výsledky, které byly o genu WT1, jeho roli a jeho významu

publikovány. Než se však začnu věnovat tomuto tématu, je nutné uvést alespoň obecné informace o akutních leukémiích v dětském věku s důrazem na akutní myeloidní leukémie, neboť budoucí cíle práce týkající se genu WT1 jsou na tento typ dětské leukémie zaměřeny. Tato obecná charakteristika je tedy shrnuta v druhé kapitole společně s krátkým úvodem, jenž obsahuje výčet nejčastějších dětských malignit a incidence akutních leukémií. Pojem, který je s využitím genu WT1 v diagnostice a předpovědi průběhu choroby úzce spjat, je minimální reziduální nemoc (MRN). Vysvětlení fenoménu MRN a různým metodám její kvalitativní a kvantitativní detekce je věnována třetí kapitola s důrazem na metodu real-time quantitative PCR. (RQ-PCR) Ve čtvrté kapitole shrnuji již zmíněné základní informace o genu WT1 včetně jeho potenciálního účinku v hematopoeze a leukemogeneze. Pátá kapitola je věnována možnému významu monitorování exprese genu WT1 u pacientů s leukémií pro prediktivní a jiné účely a na závěr je krátce nastíněn budoucí cíl mé práce.

## **2. Nádorová onemocnění v dětském věku**

### **2.1. Rozdělení a celosvětová incidence**

Nádorové bujení v dětském věku je velmi vzácné onemocnění s věkově standardizovanou incidencí obvykle mezi 70 – 160 případy na 1 milion dětí ve věku 1 – 14 let. Oproti dospělým pacientům, u nichž patří k nejčastějším nádorům karcinomy, jsou dětské malignity z histologického hlediska velmi rozmanité. Podle „International classification of childhood cancer“ jsou tato onemocnění rozdělena do 12 hlavních skupin, mezi které patří leukémie, nádory mozku a míchy, lymfomy, nádory vycházející ze sympatiku, retinoblastomy, nádory ledvin, jater, nádory kostí, nádory měkkých tkání, nádory vycházející z gonadálních zárodečných buněk a další nespecifikované novotvary. V převládající bělošské populaci Evropy, Ameriky a části východní Asie představuje leukémie asi 1/3 dětských nádorů, s incidencí 35 – 50 případů na milion dětí. V jižní Asii, Středním Východě a v černošské populaci USA a Afriky je toto číslo nižší, většinou méně než 30 případů na milion dětí (Stiller 2004).

Asi 80 % těchto leukémií představují akutní lymfoblastické leukémie (ALL), jejichž vysoká incidence (40 případů/milion dětí) je zaznamenávána v bělošské populaci severní Ameriky, západní Evropy a Oceánie a také v Číně, HongKongu a Singapuru. Nižší incidence je ve východní Evropě, Japonsku, latinské Americe, a opět mezi černošskou populací. Leukémie T řady mají přibližně stejnou incidenci na celém světě. ALL B řady však vykazují rozdíly v incidenci, neboť u rizikovějších etnických skupin je incidence tohoto typu leukémie

vyšší (70% dětských ALL). V méně rizikových oblastech může důsledkem vzácnějšího výskytu ALL B řady dokonce převládat leukémie vycházející z T řady. Obecně lze říci, že tato incidence koreluje s úrovní socioekonomického vývoje, což naznačuje, že rizikové faktory spojené s životním prostředím jsou u těchto nádorových onemocnění velice důležité (Stiller 2004). Tento jev je i příčinou zvýšení incidence ALL v České republice ve věkové skupině předškolních dětí během 90. let na hodnotu podobnou státům západní Evropy (Hrušák *et al.* 2002).

Akutní myeloidní leukémie (AML), jejichž incidence je 4 – 10 případů na 1 milion dětí, opět vykazují velké variace v procentuálním zastoupení AL mezi různými oblastmi po celém světě. Relativně vyšší výskyt AML je obvykle důsledkem nižší incidence ALL spíše než zvýšeným rizikem AML. Vysoký výskyt tohoto typu byl také zaznamenán u Maorů na Novém Zélandě a u obyvatel Havaje. Příčina tohoto jevu zatím není známa, ale vzhledem k tomu, že se jedná vždy o etnickou skupinu, předpokládá se, že významným faktorem bude genetická predispozice (Stiller 2004).

## **2.2. Charakteristika akutních leukémií**

Obecná charakteristika leukémií je popisuje jako onemocnění, jež vzniká nahromaděním mutací v genomu kmenových buněk, nebo progenitorů jednotlivých řad hematopoesy. Změny v genomu mohou být jemné, jakými jsou bodové mutace, při kterých dochází v DNA k záměně jedné báze za druhou, až po změny v počtu chromosomů. Změny v genomu vznikají u převážné většiny leukémií v somatických buňkách – buňkách hematopoesy, v průběhu života jedince a jen zcela výjimečně mají dědičný základ (Starý *et al.* 2002).

Jak již bylo řečeno, akutní leukémie se dělí na akutní lymfoblastické (ALL) a akutní myeloidní leukémie (AML). Slovo akutní vyznačuje, že jde o onemocnění s prudkým nástupem, velmi často u osob bez jakékoliv známé hematologické anamnesy. První příznaky se objevují zpravidla jen několik týdnů před zjištěním definitivní diagnózy. Dále termín akutní znamená průběh nemoci, neboť neléčená či nedostatečně léčená choroba pacienta (zvláště AML) zahubí během několika týdnů. Dnešní moderní terapie těchto leukémií patří celkově mezi nejnáročnější onkologické postupy, ale díky těmto terapiím bylo možno výrazně zvýšit procento vyléčených pacientů (Starý *et al.* 2002).

Jedná se heterogenní skupinu onemocnění, jež se liší buněčným původem, klinickými projevy, průběhem a terapeutickou odpovědí. V průběhu nemoci dochází k akumulaci



nezralých krevních elementů v kostní dřeni. Nahromaděním těchto leukemických buněk dochází k utlačování normální krvetvorby (Slabý 2002). První příznaky onemocnění jsou zpravidla nespecifické a souvisejí s poklesem jednotlivých elementů cirkulujících v krvi. U nemocných se objeví anémie, trombocytopenie, únava, slabost, dušnost a krvácivé nebo infekční komplikace (Kalinová 2002).

Podezření na akutní leukémii bývá vysloveno při kontrole krevního obrazu. Prvním a nejdůležitějším diagnostickým cílem je rozlišení mezi ALL a AML. Dalšími vyšetřeními ve specializovaných pracovištích pak bývá stanovena přesná diagnosa. Hlavní kritéria pro tuto diagnosu, zahrnující morfologické charakteristiky, karyotypické charakteristiky a imunofenotyp, jsou shrnuta v tabulce 1. (Starý et al. 2002).

	ALL	AML
<b>morfologie</b>	žádná granula žádné Auerovy tyče	obvykle se mohou vyskytovat Auerovy tyče
<b>imunofenotyp</b>	B-řada: CD 19+, CD10+ T-řada: cyCD3+, CD7+	panmyeloidní antigeny CD13+, CD33+, CD65
<b>karyotyp</b>	t(8;14) (B-ALL) t(9;22) t(1;19) (pre- B-ALL) t(11;14) (T-ALL) t(4;11) (pro- B-ALL)	t(8;21) (FAB M2) t(15;17) (FAB M3) t(9;11) (FAB M5) inv(16) (FAB M4eo) monozomie 7 trizomie 8

tabulka 1. Rozdílné znaky AML a ALL (Starý *et al.* 2002)

### 2.2.1. Akutní lymfoidní leukémie (ALL)

Šance na vyléčení této dětské malignity dosáhla v poslední době 80 % (Silverman *et al.* 2001; Pui CH *et al.* 2003), neboť díky včasnému zařazení pacienta do rizikové skupiny umožňuje lékařům vybrat adekvátní léčbu a tím zajistit, aby pacient nebyl „přeléčen“ ani „nedoléčen“. Proto jsou tito pacienti rozděleni do 3 rizikových skupin podle kritérií jakými jsou: věk, leukocytosa, imunofenotyp (příslušnost B řadě či T řadě) a odpověď na iniciační fázi léčby. Uplatnění těchto kritérií se liší podle konkrétního léčebného protokolu, přičemž v posledních letech se stále více zohledňuje i kritérium MRN, o níž budu hovořit blíže v třetí kapitole.

Prognostický význam klinických vlastností pacientů se liší u ALL B řady a T řady. Pro

pacienty s B-ALL je nízký věk (1 – 9) a nízký počet leukocytů ( $<50 \times 10^9/l$ ) považován za pozitivní prognosu a pacienti s těmito charakteristikami obvykle spadají do nejméně rizikové skupiny. T-ALL jsou obecně řazeny do 2 rizikovějších skupin v závislosti na specifické odpovědi pacienta na léčbu (Pui CH *et al.* 2001).

Zvýšený výskyt ALL je zaznamenán u dětí s některými chromosomálními a konstitučními onemocněními. Pacienti s Downovým syndromem mají  $10 \times$  vyšší výskyt leukémie v prvních 10 letech života než zdravé děti. V prvním roce života se u nich vyskytuje častěji AML než ALL, dále je již zastoupení typů leukemie stejné jako v normální dětské populaci. Dalšími nepříznivými faktory jsou genetická onemocnění spojená s chromosomální nestabilitou jako např. Fanconiho anémie či Bloomův syndrom, která jsou však velmi vzácná. Unikátní je také jejich leukemogeneze, neboť je ovlivněna mutací v zárodečných buňkách na rozdíl od většiny pacientů, jejichž mutace se, pokud vůbec, objevuje pouze v somatických buňkách (Starý *et al.* 2002).

### 2.2.2. Akutní myeloidní leukémie (AML)

Na rozdíl od dospělých, tvoří akutní myeloidní leukémie (AML) pouze 15 % leukémií dětského věku. S malými výjimkami je biologie dětských myeloidních leukémií stejná jako u dospělých. Výsledky léčby AML jsou jednoznačně horší než výsledky léčby dětské ALL. V posledních 15 letech ale došlo i u dětské AML k významnému zlepšení. Intenzivní indukční chemoterapií lze dosáhnout kompletní remise u 70 – 90% dětí. Následnou konsolidací, intenzifikací a udržovací léčbou se daří dosáhnout dlouhodobého přežití bez známek nemoci u více než 50 % pacientů (Starý *et al.* 2002).

AML je morfologicky heterogenní onemocnění. Leukemickým procesem může být postižena granulocytární, monocytární, erytroidní i megakaryocytární řada. Světová zdravotnická organizace (WHO) navrhla v roce 2004 nové rozdělení podskupin AML na základě jak morfologických tak i cytogenetických charakteristik (Ross *et al.* 2004). Přesto je však v praxi stále používané rozdělení z roku 1976, které navrhla „French – American – British (FAB) cooperative group“ vycházející také z morfologických a cytochemických znaků. Podle této FAB klasifikace rozdělujeme AML na subtypy (Starý *et al.* 2002):

**M0** – akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciace (tzv. časná myeloidní leukémie)

**M1** – akutní myeloidní leukémie bez vyzrání

**M2** – akutní myeloidní leukémie s vyzráním

**M3** – akutní promyelocytární leukémie, do této skupiny patří také podskupina M3v – variantní mikrogranulární leukémie M3

**M4** – akutní myelomonocytární leukémie, sem patří také M4eo – varianta s eozinofilií

**M5** – akutní monocytární leukémie

**M6** – erytroleukémie

**M7** – akutní megakaryoblastická leukémie

Zastoupení jednotlivých subtypů je u dětí podobné jako u dospělých (viz tabulka 2), s výjimkou vyššího výskytu monocytární leukémie M5, která se typicky vyskytuje u dětí mladších 2 let (Starý *et al.* 2002).

Typ leukémie	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Přibližné zastoupení	3%	15 – 20 %	25 – 30 %	5 – 10 %	25 – 30 %	6 %	3 – 5 %	3 %

tabulka 2. Frekvence jednotlivých typů leukémií (Starý *et al.* 2002)

Zvýšené riziko AML mají opět děti s některými konstitučními onemocněními, např. Bloomův syndrom, ataxie-teleangiectazie, Schwachmanův-Diamondův syndrom, Downův syndrom, těžká vrozená agranulocytóza a Fanconiho anemie, opět se však jedná o velmi vzácná onemocnění. Více než 2/3 AML pacientů mají abnormality karyotypu v leukemických blastech. Typická je pseudodiploidie nebo hypodiploidie. Za příznivé faktory je považována přítomnost například t(8;12), t(15;17) a inverze 16, kdežto nález monosomie 7 je spojován s nepříznivou prognosou a vyskytuje se často u sekundárních AML. Léčebné výsledky jsou také velmi špatné u dětí s megakaryocytární leukémií u nichž bývá nalezena translokace t(1;22) (Starý *et al.* 2002).

Dosavadní výsledky studia AML opět poukazují na to, že se na jejím vzniku podílí více než 1 genetická aberace. Například fúzní gen AML1-ETO, který je nalézán velice často u pacientů s AML, sice sám osobě nedokáže indukovat AML, ale v kombinaci s jinými genetickými událostmi, například se zvýšenou expresí genu WT1 může ke vzniku leukémie dojít. Expresí AML1-ETO totiž způsobuje expanzi dysplastických myeloidních progenitorů a inhibuje jejich diferenciaci do zralých myeloidních buněk. V druhém kroku může zvýšená exprese WT1 poskytnout těmto progenitorům proliferační výhodu, výsledkem čehož může být transformace hematopoetických prekurzorů v leukemické buňky (Nishida *et al.* 2006).

### **3. Minimální reziduální nemoc (MRN)**

Pacient, jemuž byla diagnostikována leukémie, může mít v době diagnózy kolem  $10^{12}$  maligních buněk (Campana *et al.* 1995). Pokud během léčby množství morfologicky detekovatelných blastů klesne pod 5 %, nachází se pacient v tzv. kompletní remisi. V těle takového pacienta se však stále nachází teoreticky až  $10^{10}$  rakovinných buněk a tento zbytkový leukemický klon je nazýván minimální reziduální nemoc (MRN). Od časového bodu, kdy byla stanovena kompletní remise, až do tzv. relapsu (znovuobjevení nemoci) je počet leukemických blastů neznámý, neboť je morfologickými metodami nedetekovatelný. Postup léčby se tedy u pacientů s různou hladinou MRN dříve nijak nelišil a tudíž pacienti s vyšším rizikem relapsu podstupovali stejnou léčbu jako pacienti s nízkým rizikem. Přestože citlivost morfologických studií může být trochu zlepšena cytochemickým barvením, nebo zkoumáním frakce mononukleárních buněk, stále je citlivost těchto metod nízká (Campana *et al.* 1995).

Důležitost studia MRN tkví v tom, že přesnější odhad celkového množství leukemických buněk zlepšuje výsledky léčby, jelikož souvislost mezi velikostí zbytkové nádorové masy a pozitivními klinickými výsledky již byla vyzkoumána (Kaste *et al.* 2004). Navíc je také znám fakt, že větší množství leukemických buněk zvyšuje pravděpodobnost vzniku tzv. "Multidrug resistant mutants", které jsou schopny uniknout cílené léčbě (Arceci 1993).

V současné době tak několik světových pracovních skupin využívá detekci MRN ke stratifikaci pacientů do rizikových skupin a úpravě intenzity jejich léčby. Přestože výsledky těchto léčebných protokolů nejsou dosud k dispozici, je zřejmé, že sledování MRN bude v budoucnu důležitým klinickým fenoménem. Protokol, využívající MRN ke stratifikaci dětských pacientů s ALL, se rozběhne i v ČR v roce 2007.

Kromě akutních leukémií má detekce MRN prognostický význam i v dalších hematologických malignitách jako např. chronické leukémie, non-Hodgkinův lymfom či mnohočetný myelom (van der Velden *et al.* 2003).

#### **3.1. Detekce minimální reziduální nemoci (MRN)**

Detekce MRN pomocí různých technik je velmi významným způsobem, jak lze rozdělit pacienty do rizikových skupin a také včas odhalit blížící se relaps. Prognostické faktory jako např. iniciální počet leukocytů, genetické vlastnosti blastů a věk pacienta v době diagnózy mohou být také využity k stratifikaci pacientů (Pui CH *et al.* 1994; Hoelzer 1994).

Leukemické buňky mohou být rozpoznány od normálních hematopoetických progenitorů na základě morfologických a cytochemických vlastností, karyotypových a genových abnormalit, přestaveb genů pro antigenové receptory, na základě in vitro růstových vlastností a imunofenotypu. Kombinace těchto charakteristik mohou být využity k detekci i velmi malého množství nádorových buněk mezi normálními buňkami (Haber *et al.* 1991).

MRN může být detekována jak kvalitativně tak i kvantitativně. Ačkoli kvalitativní stanovení může být velice významné, poskytuje pouze omezenou informaci a neumožňuje preciznější analýzu kinetiky leukemického klonu. Naproti tomu kvantitativní stanovení MRN má význam u mnoha hematologických malignit, jelikož lze touto metodou získat informaci přímo o množství leukemického klonu (van der Velden *et al.* 2003).

### **3.1.1. Metody molekulární cytogenetiky**

Těmito metodami jsou detekovány buňky s abnormalitami karyotypu a jejich výhodou je možnost přesné identifikace leukemické buňky. Vymizení buněk nesoucích tuto mutaci během léčby je obecně známo jako jev, doprovázející nástup klinické morfologické remise. Stejná mutace, která byla detekována v době diagnózy, je v drtivé většině případů přítomna i během relapsu, což souhlasí s představou, že během remise jsou stále v těle pacienta přítomny leukemické buňky původního klonu, které unikly léčbě a které mohou způsobit opětovné rozšíření leukemického klonu (Freireich *et al.* 1992).

Jednou z metod, která je spíše semikvantitativní, je tzv. FISH (fluorescence in situ hybridization) a je založena na detekci nádorových buněk pomocí sekvenčně specifických sond, které jsou schopny detekovat numerické a strukturální chromosomální abnormality (Gray *et al.* 1990). Může být kombinována například s morfologickými analýzami buněk, což zvyšuje přesnost výsledků. Výhodou této metody je fakt, že umožňuje sledovat buňky v interfázi, tedy i buňky s nízkou schopností proliferace (Campana *et al.* 1995). Nevýhodou je omezená citlivost, pracnost a cena.

### **3.1.2. Imunologické metody**

Průtoková cytometrie je hlavní metodou této skupiny. Je často používána k určení diagnózy ALL pacientů a je použitelná také pro monitorování MRN u těchto ALL. Metoda je založena na identifikaci tzv. LAIP (leukaemia-associated immunophenotypes), které jsou přítomny na leukemických buňkách, ale nejsou exprimovány na normálních buňkách kostní dřeně a periferní krve. Protilátky reagující specificky s těmito antigeny umožňují studium MRN a umožňují tak detekovat 1 leukemickou buňku mezi  $10^4$  normálních krevních buněk.

Další výhodou této metody je fakt, že může být použita u více než 2/3 pacientů s akutní leukémií (Campana *et al.* 1999).

Imunologické techniky jsou obecně považovány za metodu, která dobře identifikuje pacienty s vysokým rizikem relapsu, přestože přímých literárních důkazů podporujících toto tvrzení není mnoho.

### **3.1.3. Molekulárně genetické metody**

Metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce (Q-PCR) jsou dalším způsobem detekce MRN. Od jejich představení ke konci 90. let (1997/1998) byla tato technika rychle zavedena pro studium MRN. V dnešní době je dostupno mnoho PCR cílů pro detekci MRN, které umožňují detekci MRN u většiny pacientů (van der Velden *et al.* 2003). Obecně je lze metodicky rozdělit do dvou skupin. V první skupině tzv. end-point Q-PCR je množství PCR produktu vyhodnocováno po ukončení reakce. Ve druhé skupině je prováděno kinetické sledování PCR produktu během celé reakce (kvantitativní PCR v reálném čase, real-time Q-PCR, RQ-PCR). Jelikož pro sledování exprese WT1 u AML pacientů používáme v naší laboratoři právě real-time PCR, budu se této metodě podrobněji věnovat v sekci 3.1.4.

Citlivost této metody je velmi vysoká, schopná detekovat 1 leukemickou buňku mezi  $10^5$ - $10^6$  buněk, je však náchylná na kontaminaci a je tedy nutná pečlivá manipulace se vzorky (van der Velden *et al.* 2003).

Existuje mnoho PCR cílů pro sledování MRN. Lze je rozdělit do 3 skupin: fúzní geny, přestavby imunoglobulinových genů a genů pro receptory T buněk (Ig/TCR) a poslední skupinou jsou aberantně exprimované geny. Většina těchto cílů je vysoce specifická a bez tzv. pozadí v normálních buňkách. Je možné je také rozdělit na cíle detekovatelné na úrovni genomové DNA (antigenové receptorové geny a některé fúzní geny) a detekovatelné na úrovni mRNA (aberantně exprimované geny a většina fúzních genů (Van der Velden *et al.* 2003).

#### **3.1.3.1. Detekce fúzních genů**

Podle velikosti fúzních genů je pro tuto proceduru použita buď DNA, nebo cDNA získaná reverzní transkripcí mRNA daného úseku DNA. Pokud se jedná o krátký úsek DNA (ne více než několik set párů bází) lze použít rovnou genomovou DNA, pokud je však úsek delší zahrnující i intronové sekvence, je lepší použít cDNA (Campana *et al.* 2005). Z mnoha použitelných fúzních genů zmíním např. TEL-AML1, MLL-AF4, AML1-ETO či BCR-ABL (viz tabulka 3) (van der Velden *et al.* 2003).

Disease	Chromosomal Abnormality	Molecular Target	Frequency (%)*		
			Adults	Children	
ALL					
B-lineage	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL</i> (RNA)	25-40	4-6	
	t(1;19)(q23;p13.3)	<i>E2A-PBX1</i> (RNA)	2-3	5-6	
	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i> (RNA)	5	2	
	t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3-IGH</i> (DNA)	<1	<1	
	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL-ENL</i> (RNA)	<1	<1	
	t(9;11)(p21-22;q23)	<i>MLL-AF9</i> (RNA)	<1	<1	
	t(17;19)(q22;p13)	<i>E2A-HLF</i> (RNA)	<1	<1	
	t(8;14)(q24;q32.3)	<i>MYC-IgH</i> (DNA)	4-5	1-2	
	T-lineage	—	<i>TAL1</i> deletion (DNA)	10-30	20-30
		t(11;14)(p13;q11)	<i>RHOM2-TCR<math>\delta</math></i> (DNA)	5-10	5-10
	t(1;14)(p34;q11)	<i>TAL1-TCR<math>\alpha</math></i> (DNA)	1-3	1-3	
	t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11-TCR<math>\alpha</math></i> (DNA)	1-3	1-3	
AML	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i> (RNA)	5-10	5-10	
	t(15;17)(q22;q11-22)	<i>PML-RARA</i> (RNA)	5-10	5-10	
	inv(16)(p13q22)/t(16;16)	<i>CBF<math>\beta</math>-MYH11</i> (RNA)	5-10	5-10	
	t(9;11)(p21-22;q23)	<i>MLL-AF9</i> (RNA)	1-5	5-10	
	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL</i> (RNA)	1-3	<1	
	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-CAN</i> (RNA)	<1	<1	

\* The frequency within B-lineage, T-lineage, or AML disease group.

Tab. 3. Abnormality genotypu, které mohou být využity jako molekulární cíle pro detekci MRN (Campana et al. 1995)

Fúzní geny na DNA úrovni jsou velmi výhodným PCR cílem pro studium MRN. Na rozdíl od přestaveb Ig/TCR tyto geny přímo souvisí s procesem leukemogeneze a jsou stabilní v průběhu nemoci. Oproti transkriptům fúzních genů jsou navíc stabilnější během detekce (van der Velden *et al.* 2003).

### 3.1.3.2. Detekce přestaveb Ig/TCR

Rozmanitost Ig a TCR molekul je výsledkem přestaveb a spojování V (variable), D (diversity) a J (joining) oblastí imunoglobulinových a TCR genů a tato diversita se ještě více zvýší vkládáním či delecemi náhodných nukleotidů do těchto oblastí. Tímto způsobem vzniká pro každou lymfoidní buňku, v případě leukémie lymfoidní maligní klon, unikátní nukleotidová sekvence, která může být využita pro detekci leukemických buněk. Díky tomu lze určit specifickou přestavbu pro každého pacienta, která je využita v následujících stádiích léčby k detekci přímo leukemických buněk pacienta (Pui CH *et al.* 1999). Tato metodika je dnes daleko nejrozšířenějším postupem využívaným v klinických aplikacích.

### 3.1.3.3. Detekce aberantních či aberantně exprimovaných genů

Aberantním genem použitelným pro sledování MRN je např. FLT3, jehož úsek je u některých pacientů s leukémií duplikován. Kromě duplikace dochází také k vkládání náhodných nukleotidů do tohoto genu. Tím vzniká opět sekvence, specifická pro určitého

pacienta, a využitelná pro detekci MRN (van der Velden *et al.* 2003).

Kromě výše zmíněných možností lze k detekci MRN použít i geny, jež jsou exprimovány jak v normálních buňkách tak i v buňkách leukemických. Exprese těchto genů je za fyziologického stavu místně i časově specifická a striktně regulována. V leukemických buňkách je tato regulace porušena a dochází zde k abnormální expresi těchto genů, čehož lze využít k MRN-PCR detekci. Jedním z těchto genů je WT1.

### 3.1.4. RQ-PCR

Pomocí RQ-PCR lze získat kvantitativní MRN data analýzou genových přestaveb Ig/TCR, fúzních zlomových míst chromozomových aberací, transkriptů fúzních genů, aberantních genů, nebo aberantně exprimovaných genů. Výběr těchto molekulárních cílů záleží na typu daného onemocnění (van der Velden *et al.* 2003).

Tato metoda dovoluje přesnou kvantifikaci PCR produktu během exponenciální fáze reakce, což je přesný opak metody klasické end-point PCR kvantifikace. Vzhled k tomu, že může probíhat detekce fluorescenčního signálu po každém PCR cyklu, mohou být vyhodnoceny i signály za krátký časový úsek a nejsou nutné žádné post-PCR manipulace s materiálem, díky čemuž došlo k výraznému snížení pravděpodobnosti kontaminace. Sensitivita této metody je nejméně  $10^{-3}$ , ale spíše  $10^{-4} - 10^{-5}$ . V dnešní době jsou nejpoužívanější 3 hlavní techniky k detekci fluorescenčního signálu: metoda využívající SYBR Green I, metoda využívající hydrolyzační sondy a třetí princip je založen na hybridizačních sondách (van der Velden *et al.* 2003).

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

Druhá metoda využívá 5' → 3' exonukleázovou aktivitu Taq polymerázy ke specifické detekci a kvantifikaci PCR produktu. Hydrolyzační „TaqMan“ sonda je spojena s reportérským fluorochromem a také se zhášečem. Pokud jsou zhášeč a fluorochrom v těsné blízkosti, sonda je neaktivní, protože světlo emitované fluorochromem je pohlcováno zhášečem. Během amplifikační fáze je však navázaná sonda z cílové sekvence hydrolyzována,

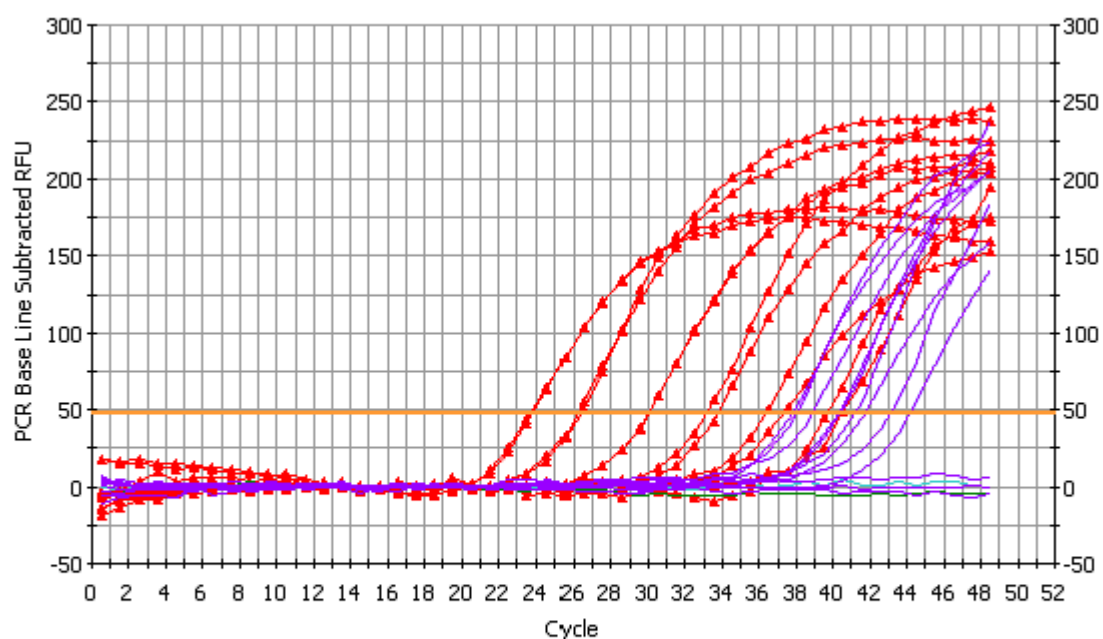


tím dojde k oddálení fluorochromu a zhášeče a fluorochrom emituje záření, které může být detekováno. Fluorescence se tedy měří na konci fáze syntézy DNA a výhodou této metody je detekce pouze specifických produktů (van der Velden *et al.* 2003).

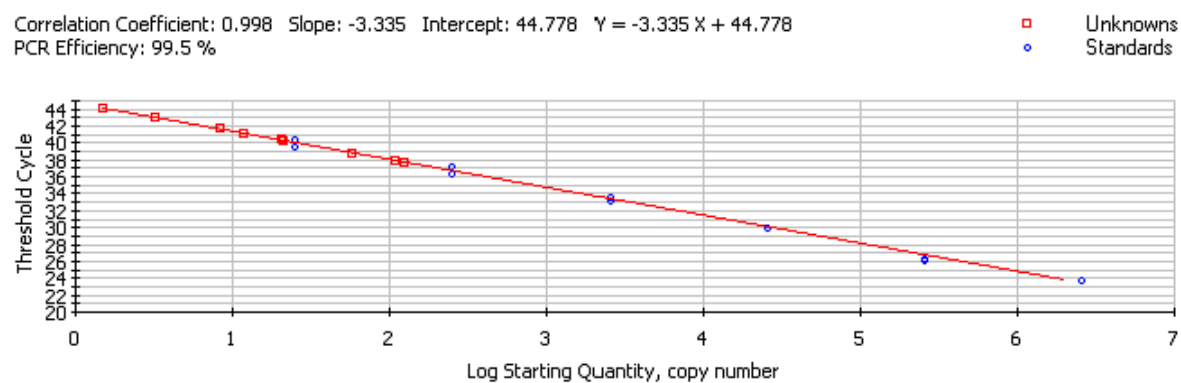
Metoda hybridizačních sond využívá dvou sousedících sekvenčně specifických sond. Jedna sonda je značena donorovým fluorochromem na 3' konci, druhá akceptorovým fluorochromem na 5' konci. Obě sondy by měly hybridizovat k blízké sousedícím cílovým sekvencím amplifikované DNA, čímž dochází k přiblížení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

Ve všech zmíněných způsobech RQ-PCR analýzy se množství signálu exponenciálně zvyšuje v exponenciální fázi PCR reakce. Na základě vyhodnocení nárůstu fluorescence software RQ-PCR analýzy sestavuje amplifikační křivky jednotlivých reakcí. V části amplifikačních křivek (viz obr. 1), kdy intenzita záření odpovídá pouze bazální fluorescenci, je prokládána přímka, která se nazývá „threshold“. Číslo cyklu, odpovídající průsečíku přímky threshold a amplifikační křivky, ukazuje hodnotu  $C_T$  (threshold cycle). Tato hodnota odpovídá počtu cyklů, ve kterém došlo k významnému nárůstu fluorescence v dané reakci a má zásadní význam pro výpočet kvantity. Při kvantifikaci jsou amplifikované testované vzorky porovnávány se standardní křivkou sestavenou na základě amplifikace DNA o známém počtu kopií sledovaného genu. Z této křivky pak software cycleru odečte podle  $C_T$  hodnoty jednotlivých vzorků původní počet kopií amplifikované sekvence. (viz obr. 2) (van Dongen *et al.* 1998; van der Velden *et al.* 2003)

Expresi specifického molekulárního markeru nádorových buněk je normalizována k expresi kontrolního genu (housekeeping gene), která umožňuje porovnání jednotlivých odběrů v průběhu léčby mezi sebou. Normalizace minimalizuje variabilitu, způsobenou rozdílnou kvalitou a kvantitou biologického materiálu, izolačními metodami, stupněm degradace nukleových kyselin, případně rozdílnou účinností transkripce a odhaluje přítomnost inhibitorů polymerázy. Genů, které byly navrženy do pozice kontrolního genu, byla publikována celá řada, při sledování vývoje leukémií pomocí RQ-PCR je v mnoha případech doporučován jako referenční gen ABL.



obr. 1. Amplifikační křivky real-time PCR (měření hladiny exprese WT1 ve vzorcích BM AML pacientů)



obr. 2 . Standardní křivka real-time PCR (vzorky BM AML pacientů)

## 4. Gen WT1

### 4.1. Struktura genu WT1

Gen WT1 byl izolován roku 1990 a je jedním z genů odpovědných za vznik Wilmsova tumoru ledviny (Call *et al.* 1990). Je esenciální pro normální urogenitální vývoj, neboť hraje důležitou roli v regulaci proliferace a diferenciaci nefroblastů a gonadální tkáně (Kreidberg *et al.* 1993). Posttranskripční modifikace mRNA a přítomnost několika možných míst, ze kterých lze zahájit transkripci, je příčinou vzniku mnoha různých isoform proteinů WT1 (nejméně 36). Tyto isoformy jsou lokalizovány ve specifických subnukleárních a subcelulárních oblastech a vykazují různé, částečně se překrývající nebo úplně odlišné role (Boublíková *et al.* 2006).

WT1 mRNA byla detekována pomocí Northern blotu ve tkáni ledvin vyvíjejícího se plodu a také v buňkách Wilmsova tumoru. Dále byla detekována u dospělých myši v děloze, ve varleti, ve vaječnících, slezině, brzlíku, játrech, a v menší míře i v srdeční tkáni a tkáni plic (Buckler *et al.* 1991; Pelletier *et al.* 1991). Kromě toho je gen WT1 exprimován také v buňkách akutních leukémií a také v řadě dalších nádorů, např. v nádorech vaječníků a prsu (Silberstein *et al.* 1997; Viel *et al.* 1994), dále v leukemických liniích K562 a HL-60 (Phelan *et al.* 1994).

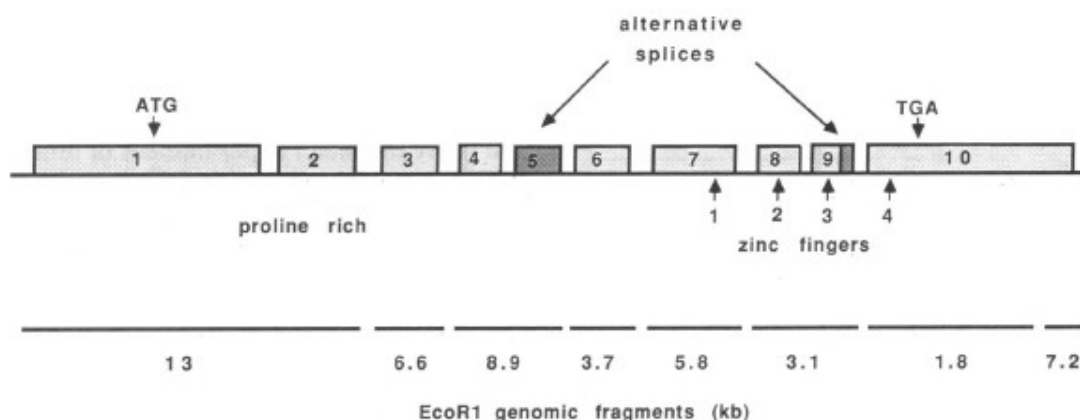
Mutace nebo delece tohoto genu jsou asociovány se vznikem Wilmsova tumoru, jednoho z častých solidních nádorů u dětí (Coppes *et al.* 1993) a často jsou asociovány s vrozenými vadami urogenitálního traktu jako např. Denys-Drash syndrom (Laity *et al.* 2000).

Tento gen dlouhý 50kbp se nachází na 11p13, skládá se z 10 exonů a kóduje protein se čtyřmi Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinkovými prsty (viz obr. 3) (Call *et al.* 1990). Každý zinkový prst je kódován 1 exonem (exony 7, 8, 9, 10) a je oddělen od následujícího pomocí krátké intronové sekvence. První exon kóduje amino konec bohatý na prolin a glutamin a celý exon 5 kóduje S1 insert (viz dále).

### 4.2. Alternativní sestřih genu WT1 a jeho isoformy

Alternativní sestřih dává vznik 4 hlavním isoformám o délce přibližně 3 kbp, které se liší přítomností či absencí 2 úseků DNA (Splice1 (S1) a Splice 2 (S2)). Nejčastější sestřihovou variantou přítomnou jak u člověka tak i u myši je protein, který obsahuje oba sestřihové úseky, a nejméně častou variantou je ten protein, u něhož oba úseky chybí. Poměr

těchto variant je udržován během vývoje myších ledvin a dalších tkání exprimujících gen WT1. Konzervativní struktura genu a poměr hladin exprese těchto různých WT1 mRNA naznačuje, že každý takto kódovaný polypeptid významně přispívá k normální funkci genu (Haber *et al.* 1991).



obr. 3. Schéma struktury genomu WT1 (boxy vyjadřují exony, S1 a S2 inserty jsou vyznačeny tmavě) (Haber *et al.* 1991)

Relativní poměr 4 základních sestřihových variant ([-, -], [S1, -], [-, S2], [S1, S2]) ve tkáni vyvíjející se myší ledviny je 1 : 2,5 : 3,8 : 8,3 a lze říci, že tyto poměry u myši jsou velmi podobné poměrům variant u lidských ledvin a také u Wilmsova tumoru. Tato relativní množství souhlasí s daty získanými pomocí RT-PCR, která poukazuje na poměr 2:1 pro přítomnost a absenci S1 a poměr 5:1 pro přítomnost a absenci S2 (Haber *et al.* 1990).

S1 sestává z odděleného exonu dlouhého 51 bp, který kóduje úsek 17 AK vkládaný mezi amino konec bohatý na prolin a „zincfinger“ domény. Druhým alternativním sestřihem dochází k zachování S2 insertu, který představuje 3 AK úsek mezi zinkovým prstem 3 a 4.

S1 obsahuje doménu bohatou na serin a threonin, což může sloužit jako potenciální místo pro fosforylaci. S2 také kóduje serin a threonin, čehož může být opět využito pro fosforylaci. Tento proces byl zkoumán pomocí PKA (proteinkináza A) a PKC (proteinkináza C), a bylo zjištěno že fosforylace jak varianty s S2 tak i bez způsobuje snížení vazebné afinity těchto proteinů k rozpoznávaným sekvencím (Ying *et al.* 1996).

Pozoruhodnou vlastností S2 insertu je to, že přerušuje vysoce konzervovaný spoj mezi

zinkovými prsty 3 a 4. Přítomnost alternativního sestřihového místa v takovémto „kolení“ mezi těmito dvěma motivy má dramatický dopad na vazebnou afinitu k DNA. Zkrácený polypeptid WT1 obsahující „zincfinger“ domény bez S2 insertu váže místa rozpoznávaná transkripčním faktorem EGR 1 (early growth response 1), kdežto vložení S2 do tohoto proteinu výrazně snižuje tuto vazebnou afinitu (Rauscher *et al.* 1990).

Obecně lze říci, že přítomnost či absence exonu 5 (S1) ovlivňuje aktivitu WT1 jakožto transkripčního regulátoru, zatímco S2 má vliv na DNA vazebnou aktivitu a subcelulární lokalizaci (Haber *et al.* 1991). Varianta s S2 preferenčně kolokalizuje v tzv. „speckles“, kde může kooperovat s molekulami, jež se účastní mRNA sestřihu (Larsson *et al.* 1995).

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

### 4.3. Protein WT1

Předpokládaný protein WT1 je velký od 45 do 49 kDa a sestává ze 2 domén, díky nimž se tento protein chová jako transkripční faktor. Jeho C-konec obsahuje již zmíněné 4 domény zinkových prstů, jež mají vysoký stupeň homologie se „zincfinger“ doménami transkripčního faktoru early growth response 1 a 2 (EGR1 a EGR2) (Hamilton *et al.* 1995) a bylo prokázáno, že tato vazebná doména váže DNA sekvence rozpoznávané transkripčním faktorem EGR1 (early growth response 1) (Rauscher *et al.* 1990). Amino konec proteinu WT1 sestává z domény bohaté na AK prolin a glutamin, což může hrát roli při zprostředkování vazby.

Protein WT1 se může vázat k mnoha DNA sekvencím a může se i účastnit v RNA post-transkripčních úpravách, neboť byl v jeho sekvenci odhalen potenciální „RNA recognition“ motiv (Kennedy *et al.* 1996). Z mnoha DNA sekvencí, které tyto isoformy mohou vázat, zmíním např. promotor genu IGF II (insulin growth factor II), gen pro PDGF-A (platelet-derived growth factor alpha), gen CSF-1 (colony stimulating factor 1) (Harrington *et al.* 1993), gen PAX2 (paired box gene 2), EGR-1 a paradoxně i gen WT1. Tyto sekvence jsou obecně GC bohaté, nebo obsahují (TCC)<sub>n</sub> motivy.

Kromě nukleotidových sekvencí může WT1 vázat i mnohé proteiny. Kromě již zmíněných molekul, podílejících se na sestřihu RNA, jsou těmito proteiny převážně transkripční faktory, které také mohou ovlivňovat jeho transkripčně regulační vlastnosti.

(Scharnhorst *et al.* 2001) Z těchto vazebných partnerů stojí za zmínku např. p53, jehož vazba s WT1 stabilizuje a zesiluje jeho vazbu k p53 „consensus“ sekvencím (Maheswaran *et al.* 1993), dále p73 (Scharnhorst *et al.* 2000), p63 (Scharnhorst *et al.* 2000) či Hsp70 (Maheswaran *et al.* 1998).

#### **4.4. Role genu WT1 v normální hematopoeze**

Hematopoeza probíhá v červené kostní dřeni, skládající se z různých typů buněk, z retikulárních vláken, z tukových buněk a z tzv. volných buněk, představujících různá stádia vývoje erytrocytů a leukocytů, dále z trombocytů a plazmatických buněk. Tato kostní dřev je prostoupena širokými krevními vlásečnicemi, jejichž tenká stěna dovoluje zralým nebo dozrávajícím krevním buňkám přestup do krevního oběhu. Výchozí kmenová pluripotentní buňka je stejná pro všechny typy krvinek. Jde o buňku, která si po celý život udržuje vysokou mitotickou aktivitu. Dělením kmenových buněk vznikají jednak nové buňky a jednak tzv. multipotentní buňky, které se dále diferencují v jednotlivé typy buněk jak myeloidní tak i lymfoidní linie (Dylevský *et al.* 2000).

Celý tento vývoj krevních buněk je komplexní proces regulovaný kromě růstových faktorů a faktorů stimulujících tvorbu buněčných kolonií také pomocí koordinované exprese různých transkripčních faktorů, které jsou aktivovány či inhibovány tak jak postupuje diferenciace (Tenen 2003). Deregulovaná exprese transkripčních faktorů a výsledná funkční nevyváženost je považována za nutný předpoklad pro maligní transformaci. Jedním z těchto regulačních faktorů je produkt genu WT1, nebo spíše konkrétní isoformy tohoto genového produktu. Snížení exprese tohoto genu během procesu hematopoesy je významným požadavkem pro maturaci hematopoetických buněk a naopak vysoká hladina WT1 diferenciaci a tudíž maturaci brání (Kreuzer *et al.* 2001).

Role WT1 během vývoje ledviny byla již dobře prozkoumána, ale jeho potenciál v lidské hematopoeze zůstává stále kontroverzní a nejasný (Weisser *et al.* 2005). Dřívější studie leukemických buněk transfekovaných konstruktem WT1 vykazovaly defekt v odpovědi na diferenciální agens, což napovídá inhibičnímu účinku „wild-type“ WT1 na diferenciaci, a tento jev může přispět k vzniku leukémie (Inoue *et al.* 1998). Jiní autoři naopak publikovali data, poukazující na pro-diferenční účinek WT1 (+ S2) formy (Smith *et al.* 1998).

Někteří autoři ve výsledcích svých prací ukazují, že efekt WT1 na buňky hematopoetických prekurzorů je nejspíše specifický pro jejich určité stádium vývoje. V tzv. „lineage-committed“ precursorech indukuje buněčnou diferenciaci, zatímco klidový stav

buňky (quiescence) je navozován u primitivnějších buněk. Dvoufázová exprese WT1 během hematopoese je pozoruhodně podobná expresi ve vyvíjející se ledvině, kde lze vysledovat nízkou hladinu transkriptu v blastických buňkách a velmi vysoké hladiny se objevují v následujících stádiích diferenciaci (Kreidberg *et al.* 1993).

Jiní autoři však publikovali výsledky, z nichž vyplývá, že je WT1 exprimován v CD34+ hematopoetických prekurzorech a jsou zde exprimovány všechny hlavní isoformy. Během diferenciaci dochází k snížení této exprese (Maurer *et al.* 1997).

Dále bylo zjištěno, že v primárních hematopoetických prekurzorech a v leukemických buněčných liniích schopných diferenciaci je exprese WT1 spojena se zastavením buněčného cyklu a spontánní diferenciací. Tyto výsledky argumentují proti onkogenní roli WT1 u lidských leukémií (Elisssen *et al.* 2001). Narušená funkce tohoto genu tedy může přispět ke vzniku určitých podtypů leukémií, ale většina případů spíše získává mutace, které je mohou učinit necitlivé k účinku „wild-type“ WT1. S těmito výsledky se také shodují data publikovaná Elisssenem, která poukazují na neschopnost ektopické WT1 exprese indukovat diferenciaci v leukemických buňkách, které nejsou schopny odpovědi na diferenciací agens (Elisssen *et al.* 2001).

In vitro studiemi byla prokázána kooperativní role dvou isoform proteinu WT1 během diferenciaci. Oproti WT1(- S2), hojnější forma, čili WT1(+ S2) nemá specifickou DNA vazebnou aktivitu (Rauscher *et al.* 1990). Bylo však také prokázáno, že tato forma i sama o sobě má nepatrný vliv na diferenciaci a také dokáže zvýšit diferenciaci indukovanou jinými diferenciací agens, z čehož vyplývá, že WT1(+ S2) má schopnost modulovat, ale ne iniciovat diferenciaci (Elisssen *et al.* 2001). Nicméně fyziologický význam této isoformy je zdůrazněn různými vývojovými abnormalitami (např. Frasierův syndrom), které jsou výsledkem snížené exprese tohoto proteinu (Barboux *et al.* 1997). Přesný mechanismus kooperace těchto dvou isoform při indukci diferenciaci však stále zůstává nejasný (Elisssen *et al.* 2001).

Obecně lze říci, že různé WT1 isoformy hrají různé role během hematopoese. Někteří autoři zjistili, že WT1 (obsahující S1 i S2) blokuje G-CSF-zprostředkovanou diferenciaci (Inoue *et al.* 1998), kdežto WT1 (bez S1 a S2) urychluje diferenciaci (DM Loeb *et al.* 2003). Také bylo zjištěno, že některé CD34+ progenitory exprimují pouze jednu isoformu WT1. Je tedy možné, že CD34+ buňky, exprimující WT1 (obsahující S1 a S2) nejsou ještě „lineage-committed“, zatímco buňky exprimující WT1 (bez S1 a S2) už podstupují granulocytární diferenciaci. Mechanismus, kterým dochází ke spouštění granulocytární diferenciaci, ještě

stále není jasný (Loeb DM *et al.* 2003).

Studie ektopické exprese WT1 také odhalily jeho schopnost indukovat kromě zastavení buněčného cyklu také apoptózu (Englert *et al.* 1995).

Z výše zmíněných poznatků a publikovaných dat lze vyznívat velké neshody v názorech a výsledcích jednotlivých pracovišť. Možné příčiny zmiňuji v kapitole 5.1, obecně lze však říci, že bude nutno provést ještě mnoho studií, týkajících se funkce tohoto genu ať už v hematopoese či leukemogeneze, abychom mohli učinit konkrétní závěry o jeho účinku.

#### **4.5. Role genu WT1 v leukemogeneze**

Jak již bylo zmíněno, WT1 je exprimován v hematopoetických progenitorech a poté je jeho exprese výrazně snížena během diferenciací. Pokud je ale toto snížení zatím ještě nedefinovaným způsobem narušeno, může tato porucha podle jedné z teorií vést k expansi hematopoetických progenitorů a tím je učiní citlivé k dalším genetickým změnám, které následně mohou vést ke vzniku leukémie. Jiní autoři předpokládají přímou účast aberantně exprimovaného proteinu na leukemogeneze, například v dříve zmíněné kooperaci s AML1-ETO (Nishida *et al.* 2006). Byla však také publikována práce, jejíž autoři považují WT1 pouze za marker proliferace (Olszewski *et al.* 2005).

Vysoká exprese genu WT1 byla nalezena téměř u všech leukémiích (Menssen *et al.* 1995). Stejně jako u Wilmsova tumoru však pouze 10 – 15 % lidských akutních leukémií má mutaci v tomto genu, zatímco většina exprimuje vysokou hladinu „wild-type“ transkriptu (Mensen *et al.* 1995; King Underwood *et al.* 1996; Miyagawa *et al.* 1999). Nejčastějšími mutacemi jsou malé inserce v exonu 1 a 7, nonsense mutace v exonu 9 a jejich výsledkem je ve všech případech zkrácený protein, jenž vykazuje defekt v „zincfinger“ doméně. Nález těchto mutací znamená pro pacienty vždy nepříznivou prognózu.

Vzhledem ke komplexitě této problematiky jsem se v následující části zaměřila pouze na využití WT1 k detekci MRN, neboť v naší laboratoři je monitorování MRN pomocí WT1 jedním z hlavních cílů, na které bude výzkum WT1 zaměřen.

### **5. Detekce MRN pomocí WT1**

Jak již bylo řečeno, monitorování MRN pomocí kvantitativní PCR by mohlo být hlavní metodou k identifikaci pacientů s vysokým rizikem relapsu. Kromě běžných molekulárních cílů PCR jako například fúzní transkripty AML1-ETO, CBFβ-MYH11, PML-RARA a fúzní geny MLL, BCR-ABL (viz tabulka 3) jsou stále hledány další potenciální



markery pro studium MRN. Důvodem je fakt, že více než 50 % všech AML (a přibližně 40% ALL) postrádá fúzní gen, jenž by mohl být pro toto sledování použitelný (Cilloni *et al.* 2004). Aby bylo možno zahrnout co nejvíce AML pacientů do studia MRN, je nutné identifikovat takový molekulární cíl, aplikovatelný na většinu případů. Gen WT1 byl navržen jako jeden z těchto možných cílů (Cilloni *et al.* 2004), neboť bylo zjištěno, že u více než 90 % případů s AML a u 70-90% ALL je jeho exprese výrazně zvýšena (Boublíková *et al.* 2006).

## 5.1. Detekce MRD pomocí WT1 u AML

Již dříve bylo zjištěno, že v kmenových buňkách zdravých dárců a AML pacientů v kompletní remisi jsou hladiny exprese WT1 srovnatelné (Weisser *et al.* 2005). Dále bylo také zjištěno, že navození morfologické kompletní remise bývá doprovázeno výrazným snížením hladiny WT1 a MRN-negativní vzorky regenerující kostní dřeň (BM) vykazují téměř identickou expresi během léčby leukémie jako normální BM zdravého jedince (Boublíková *et al.* 2006). Mnozí autoři zkoumali možnost použití tohoto genu jako univerzálního markeru pro studium MRN u AML (Cilloni *et al.* 2002; Trka *et al.* 2002; Ogawa *et al.* 2003) avšak výsledky si výrazně protiřečí. Zatímco někteří poukazují na významnou korelaci mezi průběhem léčby a hladinou WT1 (Trka *et al.* 2002; Inoue *et al.* 1996; Weisser *et al.* 2005), jiní autoři žádnou souvislost nepotvrdili (Schmid *et al.* 1997).

Mezi další kontroverzní výsledky patří interpretace vysoké hladiny WT1 v době diagnózy jakožto negativního prognostického faktoru. Vysoká hladina WT1 je některými vědci považována za nepříznivou prognosu (Trka *et al.* 2002; Inoue *et al.* 1996), jiní však korelaci neprokázali (Schmid *et al.* 1997; Weisser *et al.* 2005; Bergmann *et al.* 1997). Naopak monitorování této hladiny v průběhu nemoci se ukázalo být významným prognostickým faktorem (Weisser *et al.* 2005).

Dále bylo také zjištěno, že podskupiny AML s příznivým karyotypem vykazovaly nízkou hladinu WT1 exprese (Ostergaard *et al.* 2004) avšak u jiných autorů naopak vykazovaly vysoké hladiny exprese (Cilloni *et al.* 2002). Tyto neshody mohou být způsobeny výběrem jiných kohort pacientů, různým kontrolním genem, použitím primerů asociujících s odlišnými oblastmi genu (což může být problém při detekci různých isoform WT1), nebo použitím různých PCR protokolů pro detekci a kvantifikaci WT1, což může vést k odlišnostem v citlivosti této metody (Cilloni *et al.* 2002).

Dalším problémem, který může zkreslovat odhad exprese WT1 je variabilní hladina exprese v normálních hematopoetických buňkách přítomných v kostní dřeni. Ve vzorcích

periferní krve zdravých jedinců je však exprese významně nižší než ve vzorcích kostní dřeni (Cilloni *et al.* 2002) a někde dokonce nedetekovatelná. Proto je pro mnohé vědecké skupiny lákavá představa, že by analýza vzorků periferní krve sloužila k monitorování MRN. Zatím jsou však veškeré relapsy detekovány pouze ve vzorcích kostní dřeni (Weisser *et al.* 2005).

Korelace mezi hladinou WT1 a procentem infiltrace blastů, či hladinou exprese CD34+ nebyla prokázána, což naznačuje, že WT1 reprezentuje spíše množství leukemických blastů, než CD34 pozitivitu.

Signifikantně vyšší hladina WT1 byla naopak prokázána u M4eo a M3 podtypu AML, kdežto nejvyšší hladina byla u M5 podtypu a oproti jedincům s normálním karyotypem také u pacientů s fúzními geny jako např. CBFβ-MYH 11 a PML-RARA (Weisser *et al.* 2005). Obecně lze říci, že u AML je obvykle detekována nižší hladina WT1 u zralejších subtypů leukémií jako např. M5 AML, než u méně diferenciováných podskupin (Kreuzer *et al.* 2001; Trka *et al.* 2002), jiné výsledky však tento jev nepotvrdily (Ostergaard *et al.* 2004).

U pacientů, kde bylo možné sledovat hladinu WT1 během nemoci společně s jinými markery např. fúzními geny, byla zjištěna významná korelace exprese WT1 s expresí aberantního genotypu (Weisser *et al.* 2005). Kvantitativní odhad hladiny WT1 tak umožňuje dříve detekovat blížící se relaps a poskytuje tak možnost včasné aplikace další léčby (Weisser *et al.* 2005).

## **5.2. Detekce MRN pomocí WT1 u ALL**

Ačkoli se zdálo, že by výsledky studia exprese WT1 u ALL pacientů mohly být stejně hodnotné jako u AML, je bohužel hladina exprese WT1 u tohoto druhu akutních leukémií mnohem méně vypovídající než u AML. WT1 exprese u ALL je totiž velice variabilní a obecně mnohem nižší než u AML (Cilloni *et al.* 2002) a u žádných pacientů nebyla tato exprese signifikantně vyšší než exprese WT1 u zdravých kostních dření.

U BCP-ALL byla ve většině případů naměřena hladina WT1 blízka hodnotě naměřené v normální kostní dřeni, avšak u téměř 1/3 pacientů byla tato hladina dokonce nižší než ve zdravé kostní dřeni. Oproti BCP-ALL byla u T-ALL nalezena ve většině případů zvýšená exprese WT1 (Boublíková *et al.* 2006).

Pokud se zaměříme na srovnání hladin WT1 a přítomnost chromosomálních aberací, nalezneme zvýšenou expresi u ALL nesoucích MLL-AF4 oproti jiným fúzním genům jako např. TEL-AML1 a oproti pacientům postrádajícím tyto aberace (Boublíková *et al.* 2006).

Mezi hlavní rizikové faktory u ALL patří věk a WBC (množství leukocytů v době diagnózy). Jakákoli souvislost hladiny WT1 a WBC prokázána nebyla. Děti starší 10 let měly výrazně vyšší hladinu WT1, než děti mezi 1-10 lety, ale děti mladší 1 roku měly opět vyšší expresi. Tento výsledek však mohl být ovlivněn přítomností nepříznivého fúzního genu (Boublíková *et al.* 2006).

Podíváme-li se na expresi WT1 opět jako prognostický faktor relapsu, byla u ALL oproti myeloidním leukémiím nalezena korelace s negativní prognosou u pacientů s výrazně vyšší ale i výrazně nižší hladinou WT1 oproti průměrné hodnotě. Význam a vysvětlení tohoto jevu však nejsou známy (Boublíková *et al.* 2006).

Z těchto uvedených důvodů a vzhledem k tomu, že nalezené korelace nejsou velmi výrazné, lze obecně říci, že pro dětské ALL bohužel není WT1 užitečným markerem pro monitorování MRN (Boublíková *et al.* 2006); to však nemusí platit pro dospělé pacienty s ALL.

## 6. Budoucí cíle a směřování práce

Z dosavadních studií týkajících se biologických příčin leukémií lze vysledovat velký zájem hematologů o problematiku spojenou s genem WT1. Jak už jsem několikrát v textu zmínila, výsledky byly v minulosti velice nejednoznačné. Účelem teoretické části mé práce bylo shrnout nejdůležitější poznatky, které byly o genu WT1, jeho struktuře, roli v hematopoese a leukemogeneze publikovány s důrazem na jeho využití v detekci MRN u pacientů s leukémií.

Pracovní skupina CLIP, Laboratoř molekulární genetiky Kliniky dětské hematologie a onkologie, kde jsem svou bakalářskou práci vypracovala pod vedením doc. MUDr. Jana Trky, Ph.D., publikovala dvě práce zaměřené na gen WT1 u dětských akutních leukémií. První z nich se týká prognostického významu u AML a jedná se o pilotní studii na toto téma, neboť spíše naznačuje, jakým směrem budeme ve výzkumu ohledně WT1 a AML postupovat.

Druhou prací je publikace na téma exprese WT1 u ALL z roku 2006, která byla zaměřena na možný význam hladin exprese u pacientů s ALL.

V budoucnosti bychom se chtěli ve studiu genu WT1 zabývat těmito tématy:

- Stabilita transkriptu WT1 u zdravých dárců, hlavně ve vzorcích kostní dřeně, neboť většina dosavadních prací byla zaměřena hlavně na vzorky periferní krve. Význam

tohoto zjištění je zřejmý – určení stability transkriptu, zejména ve vztahu ke stabilitě transkriptu kontrolních genů, je klíčové pro využitelnost metodiky založené na kvantifikaci mRNA.

- Isoformy proteinu WT1 a jejich zastoupení u zdravých dárců a pacientů. Z literárního přehledu je zřejmé, že role isoform je dosud velmi kontroverzním tématem. Navíc nebyla publikována komplexní, metodicky dobře provedená studie využívající kvantitativní PCR. Zaměříme se na vzorky zdravých dárců i pacientů s leukémiemi.
- Prognostický význam poměru sestřihových variant WT1. Logickým pokračováním předchozího bodu je retrospektivní sledování prognostického významu nalezených poměrů jednotlivých isoform.
- Detekce exprese WT1 a jeho jednotlivých variant v izolovaných prekurzorech krevních buněk sortovaných ze vzorků fyziologických kostních dření. I v tomto případě chybí kvalitní kvantitativní data založená a na RQ-PCR.
- Rozšíření souboru pacientů AML, u nichž bude monitorována hladina WT1, a prodloužení doby jejich sledování by mělo přinést definitivní odpověď na otázku klinického významu detekce transkriptu WT1.

## 7. Poděkování

Na závěr bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. a RNDr. Markétě Kalinové, spolupracovníkům z naší laboratoře za trpělivost, odbornou radu, čas, který mi věnovali ve svém nabitém programu a v neposlední řadě také za přátelskou pomoc.

## 8. Seznam použité literatury

Arceci RJ, 1993, Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies, Blood, 81, 2215-2222

Barboux S., Niaudet P., Gubler MC., Grunfeld JP., Jaubert F., Kuttann F., Fekete CN., Souleyreau-Therville N., Thibaud E., Fellous M., McElreavey K., 1997, Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome, Nat Genet., 4, 467-70

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

Boublíková L., Kalinová M., Ryan J., Quinn F., O'Marcaigh A., Smith O., Browne P., Starý J., McCann SR, Trka J., Lawler M., 2006, Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring, *Leukemia*, 20, 254-263

Buckler A. J., Pelletier J., Haber D. A: Glaser T., Housman D. E, 1991, *Mol. Cell. Biol.*, 11, 1707-1712

Call K. M., Glaser T., Ito C. Y., Buckler A. J., Pelletier J., Haber D. A., Rose E. A., Kral A., Yeger H., Lewis W. H., Jones C., Housman D. E., 1990, Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus, *Cell* 60, 509-520

Campana D., Pui CH., 1995 Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance, *Blood*, 85, 1416-1434

Campana D, Coustan-Smith E, 1999, Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry, *Cytometry*, 38(4):139-52

Cilloni D., Gottardi E., De Micheli D., Serra A., Volpe G., Messa F., Rege-Cambrin G., Guerrasio A., Divona M., Lo Coco F., Saglio G., 2002, Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients, *Leukemia.*, 16, 2115-21

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

Coppes M. J., Campbell C. E, Williams B. R. G., 1993, The role of WT1 in Wilms tumorigenesis, *FASEB J.*,7, 886-894

Elissen L. W., Carlesso N., Cheng T., Scadden D. T., Haber D. A., 2001, The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells, *The EMBO journal*, 20, 1897-1909

Englert C., Hou X., Maheswaran S., Bennett P., Ngwu C., Re GG., Garvin AJ., Rosner MR., Haber DA., 1995, WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis, *EMBO J*, 4, 4662-75.

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

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

Haber D. A., Buckler A. J., Glaser T., Call K. M., Pelletier J., Sohn R. L., Douglass E. C., Housman D. E., 1990, An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilm's tumor, *Cell* 61, 1257-1269

Haber D.A., Sohn R. L., Buckler A. J., Pelletier J., Call K. M., Housman D. E., 1991, Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88, 9618-9622

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

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

Hoelzer D., 1994, Therapy and prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia, *Baillieres Clin Haematol.*, 7, 299-320

Hrusak O., Trka J., Zuna J., Polouckova A., Kalina T., Stary J., Czech Pediatric Hematology Working Group, 2002, Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years, *Leukemia*. 16, 720-5

Inoue K., Ogawa H., Yamagami T., Soma T., Tani Y., Tatekawa T., Oji Y., Tamaki H., Kyo T., Dohy H., Hiraoka A., Masaoka T., Kishimoto T., Sugiyama H., 1996, Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels, *Blood*, 88, 2267-78

Inoue K., Tamaki H., Ogawa H., Oka Y., Soma T., Tatekawa T., Oji Y., Tsuboi A., Ho Kim E., Kawakami M., Akiyama T., Kishimoto T., Sugiyama H., 1998, Wilms' Tumor Gene (WT1) Competes With Differentiation-Inducing Signal in Hematopoietic Progenitor Cells, *Blood*, 91, 2969-76

Kalinová M., 2002, Kvantitativní detekce exprese genu WT1 u dětských akutních myeloidních leukémií: prognostický význam sledování reziduální nemoci, diplomová práce, PřFUK

Kaste SC., Liu T., Billups CA., Daw NC., Pratt CB., Meyer WH., 2004, Tumor size as a predictor of outcome in pediatric non-metastatic osteosarcoma of the extremity, *Pediatr Blood Cancer*, 43, 723-8

Kennedy D., Ramsdale T., Mattick J., Little M., 1996, An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling, *Nat Genet.*, 12, 329-31

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

Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J. M., Maeda M., Pelletier J., Housman D., Jaenisch R., 1993, WT1 is required for early kidney development, *Cell* 74, 679-691

Kreuzer KA., Saborowski A., Lupberger J., Applet C., Na Il-Kang, Le coutre P., Schmidt C. A., 2001, Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias, *British journal of*

hematology, 114, 313-318

Laity J. H., Dyson H. Jane, Wright P. E., 2000, Molecular basis for modulation of biological by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein, PNAS, 97, 11932-11935

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

Loeb DM., Summers JL., Burwell EA., Korz D., Friedman AD., Sukumar S., 2003, AN isoform of the Wilms' tumor supressor gene potentiates granulocytic diferentiation, Leukemia, 17, 965-971

Maheswaran S., Englert C., Zheng G., Lee SB., Wong J., Harkin DP., Bean J., Ezzell R., Garvin J., McCluskey RT., DeCaprio JA., Haber DA., 1998, Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70, Genes Dev., 12, 1108-20

Maheswaran S., Park S., Bernard A., Morris JF., Rauscher FJ 3rd, Hill DE., Haber DA., 1993, Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins, Proc Natl Acad Sci USA., 90, 5100-4

Maurer U., Brieger J., Weidmann E., Mitrou PS., Hoelzer D., Bergmann L., 1997, The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro, Exp Hematol., 25, 945-50

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

Miyagawa K., Hayashi Y., Fukuda T., Mitani K., Hirai H., Kamiya K., 1999, Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies, 25, 176-83

Dylevský I., Druga R., Mrázková O., 2000, Funkční anatomie člověka, Grada Publishing



Nishida S., Hosen N., Shirakata T., Kanato K., Yanagihara M., Nakatsuka S., Hoshida Y., Nakazawa T., Harada Y., Tatsumi N., Tsuboi A., Kawakami M., Oka Y., Oji Y., Aozasa K., Kawase I., Sugiyama H., 2006, AML-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1, *Blood*, 107, 3303-3312

Ogawa H., Tamaki H., Ikegame K., Soma T., Kawakami M., Tsuboi A., Kim EH., Hosen N., Murakami M., Fujioka T., Masuda T., Taniguchi Y., Nishida S., Oji Y., Oka Y., Sugiyama H., 2003, The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia, *Blood*, 101, 1698-704

Ostergaard M., Olesen LH., Hasle H., Kjeldsen E., Hokland P., 2004, WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study, *Br J Haematol*, 125, 590-600

Pelletier J., Schalling M., Buckler A. J., Rogers A., Haber D. A., Housman D. E., 1991, Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system, *Genes Dev.* 5, 1345-1356

Phelan SA., Lindberg C., Call KM., 1994, Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is downregulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell growth Diff* 5:677

Pui CH et al., *Childhood Leukemias*, 1999, Cambridge University Press

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

Pui CH., Crist VM., 1994, Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia, *J Pediatr* 124:491

Pui CH., Sandlund JT., Pei D., et al., 2003, Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children, *JAMA*, 290, 2001–2007

Pui CH., Schrappe M., Masera G., et al. Ponte di Legno Working Group., 2004, statement on the right of children to have full access to essential treatment and report on the Sixth International Childhood Acute Lymphoblastic, Leukemia Workshop, *Leukemia*. 18, 1043–1053

Pui CH., Schrappe M., Ribeiro R., Niemeyer C. M., 2004 Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 118-45

Rauscher F. J., III, Morris J. F., Tournay O. E., Cook D. M., Curran T. 1990, Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR 1 consensus sequence, *Science*, 250, 1259-1262.

Ross ME., Onciu RMM., Liu HC., et al., 2004, Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood*, 1004, 3679-3687

Scharnhorst V., Dekker P., van der Eb AJ., Jochemsen AG., 2000, Physical Interaction between Wilms Tumor 1 and p73 Proteins Modulates Their Functions, *J Biol Chem.*, 275, 10202-11

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

Schmid D., Heinze G., Linnerth B., Tisljar K., Kusec R., Geissler K., Sillaber C., Laczika K., Mitterbauer M., Zochbauer S., Mannalter C., Lecher K., Jager U., Gaiger A., 1997, Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 11, 639-643

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

Silverman LB., Gelber RD., Dalton VK., et al., 2001, Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*, 97, 1211–1218

Slabý J., 2002, A kutní leukémie dospělých, [www.zdn.cz/prezentace/prezentace/onkologie/scripts/19~detail.html](http://www.zdn.cz/prezentace/prezentace/onkologie/scripts/19~detail.html)

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

Starý J., Mayer J. a kolektiv, 2002, *Leukemie*, Grada publishing

Stiller C. A., 2004, Epidemiology and genetics of childhood cancer, *Oncogene*, 23, 6429-6444

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

Trka J., Kalinová M., Hrušák O., Zuna J., Krejčí O., Madžo J., Sedláček P., Vávra V., Michalová K., Jarošová M., Starý J., 2002, Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry, *Leukemia*, 16, 1381-1389

van der Velden VHJ, Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen JJM, 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia*, 17, 1013-1034

van Dongen JJ., Seriu T., Panzer-Grumayer ER., Biondi A., Pongers-Willemse MJ., Corral L et al., 1998, Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood, *Lancet*, 352, 1731-1738

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

Weisser M., Kern W., Rauhut S., Schoch C., Hiddemann W., Haferlach T., Schnittger S., 2005, Prognostic impact of RT-PCR based quantification of WT1 gene expression during MRD

monitoring of acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 19, 1416-1423

Ying Y., Raychaundhuri B., Gurney A., Campbell C. E., Williams B. R. G., 1996, Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation, *The Embo Journal*, 15, 5606-5615