

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Genová exprese v průběhu
chronické myeloidní leukémie**

Disertační práce

Mgr. Karel Fišer

Ústav hematologie a krevní transfuze

Školitel: **RNDr. Jana Moravcová, CSc.**

Poděkování

Děkuji RNDr. J. Moravcové, CSc. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a za konzultace a revizi předkládané práce.

Děkuji Prof.Ing. K. Michalové, DrSc.(Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN, Praha) za informace o cytogenetických nálezech u testovaných pacientů a MUDr. H. Klamové, CSc. (ÚHKT, Praha) za konzultace o klinických charakteristikách testovaných pacientů.

Dále děkuji všem spolupracovníkům z Oddělení molekulární genetiky ÚHKT za veškerou pomoc a přátelský přístup.

Prohlašuji, že jsem práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury.

Tato disertační práce byla vypracována v Ústavu hematologie a krevní transfuze za podpory grantů IGA MZ ČR NC/7550-3 a IGA MZ ČR NR/8758-3.

Obsah

Cíle práce.....	5
Úvod.....	6
CML.....	6
Charakteristika CML.....	6
Diagnostika a monitorování CML.....	8
Geny BCR, ABL a BCR-ABL.....	9
Gen BCR.....	9
Gen ABL.....	12
Fúzní gen BCR-ABL.....	14
Fúzní gen ABL-BCR.....	14
Proteiny signálních kaskád v CML.....	15
JAK/STAT signální dráha.....	15
Ras/Raf/MEK/ERK signální dráha.....	16
PI3K/Akt signální dráha.....	16
NOTCH signální dráha.....	16
Geny regulující apoptosu.....	17
Další interakce BCR-ABL se signálními drahami.....	17
Léčba CML.....	19
Chemoterapie.....	19
Interferon.....	20
Imatinib.....	20
Transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	22
Jiné možnosti léčby.....	23
Materiál a metody.....	23
Materiál.....	23
Pacienti.....	23
Chemikálie.....	24
Metody.....	24
Zpracování krve a izolace krevních elementů.....	24
Izolace nukleových kyselin.....	24
Izolace DNA.....	24
Izolace RNA.....	25
Kontrola kvality nukleových kyselin.....	25
Stanovení koncentrace nukleových kyselin.....	26
Reverzní transkripce a PCR.....	26
Reverzní transkripce.....	26
PCR – hladina BCR-ABL.....	27
PCR – poměr BCR-ABL/BCR.....	27
Kapilární elektorforéza.....	28
PCR v reálném čase.....	28
Reakce.....	28
Příprava standardů.....	30
Analýza.....	30
CGH Array.....	31
cDNA macroarray.....	32
Analýza.....	34

Statistické metody.....	34
Výsledky.....	35
Expresí genu BCR-ABL a poměr BCR-ABL/BCR.....	35
Charakterizace genové exprese v CML.....	37
Charakterizace genové exprese v sadě 37 vzorků CML.....	42
Shluky vzorků pacientů s CML.....	42
Shluky genů.....	44
Geny uniformně exprimované v CML.....	44
Geny charakteristické pro shluk vzorků I.....	47
Geny charakteristické pro shluk vzorků II.....	50
Jiné skupiny genů.....	51
Charakterizace genové exprese jednotlivých pacientů.....	51
Monitorování exprese genů AHI1, MMP8 a PBP.....	63
Vybrané geny.....	63
Kontrolní geny.....	63
Intra- a interassay variabilita.....	64
Expresí AHI1, MMP8 a PBP v CML.....	65
Stanovení nestability genomu v CML.....	72
Diskuze.....	75
Závěry.....	83
Seznam použitých zkratk a lékařských termínů.....	85
Reference.....	87
Prezentace výsledků.....	98
Příloha publikací.....	100

CÍLE PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo charakterizovat genovou expresi v jednotlivých stadiích CML, se zřetelem na hledání molekulárních markerů progresu CML.

Konkrétně pak:

- pomocí metody cDNA arrayí sledovat profily genové exprese v leukocytech pacientů CML s různou léčbou a různou odpovědí na léčbu
- na úrovni genové exprese nalézt a charakterizovat související skupiny vzorků CML
- vybrat potenciální markery progresu CML, zavést metody pro jejich kvantifikaci a kvantifikovat úroveň exprese těchto markerů
- hledat další změny v genomu pacientů s CML na DNA úrovni

Charakterizace genové exprese v CML a případná identifikace markerů progresu onemocnění by pak měly pomoci lépe pochopit mechanismy CML a její progresu a tím i přispět k úspěšnosti léčby.

ÚVOD

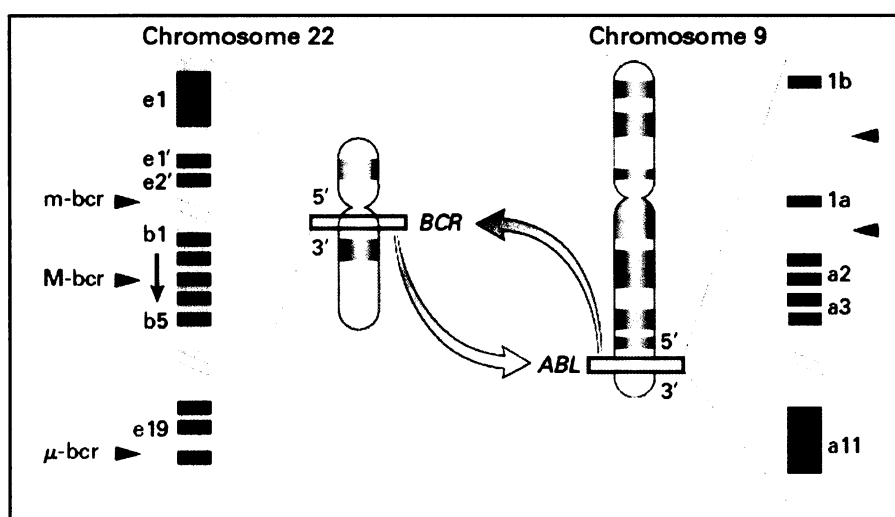
CML

Charakteristika CML

Chronická myeloidní leukemie (CML) patří mezi maligní onemocnění hematopoetických buněk.^a Jedná se o klonální myeloproliferativní onemocnění.

Mezi klinické symptomy CML patří splenomegalie a z ní plynoucí potíže, tlaková bolest sterna, hmotnostní úbytek, únava, hepatomegalie, potivost, hemoragická diatéza, teploty, bolesti kostí a kloubů a nechutenství [Savage, et al., 1997, Sokal, et al., 1984].

U více, než 30 % pacientů nejsou patrné žádné klinické symptomy choroby. Při hematologickém vyšetření je zjištěn zvýšený počet bílých krvinek a případně i trombocytů, nízké hladiny hemoglobinu a leukocytární alkalické fosfatázy. Z těchto poruch vyplývají další symptomy onemocnění, jako cerebrovaskulární příhody, trombózy, vazookluzivní poruchy, poruchy zraku a plicní nedostatečnost. Na krvácení se etiologicky podílejí trombocytopenie, trombopatie, případně i koagulopatie [Mayer, et al., 2002]. Sérová hladina vitamínu B12 a proteinu, který jej váže, je zvýšená [Savage, et al., 1997]. S postupem choroby se objevují lymfadenopatie a chloromy. Při bazofilii se zvyšuje hladina histaminu [Savage, et al., 1997, Sokal, et al., 1984], v jejímž důsledku pacienti trpí návaly a průjmy.



Obr. 1. Translokace chromozomů 9 a 22, t(9;22)(q34;q11), dává vznik Ph chromozomu. Červené šipky ukazují místa zlomů. Upraveno dle [Faderl, et al., 1999].

a Podle mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) jde o skupinu II. novotvary, kód C921.

Cytogenetickým markerem CML je Philadelphia chromozom (Ph)^a (obr. 1) [Nowell et Hungerford, 1960]. Ph chromozom se vyskytuje v buňkách myeloidní řady, v erytrocytech, megakaryocytech a B lymfocytech. Je uváděno, že Ph chromozom byl nalezen i v T lymfocytech [Haferlach, et al., 1997]. Ph chromozom vzniká reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22, t(9;22)(q34;q11) [Rowley, 1973]. Místem translokace je 9q34.1 a 22q11.21 a výsledkem je fúzní gen *BCR-ABL* [Prakash et Yunis, 1984].

Ph chromozom se vyskytuje zhruba u 90-95 % pacientů s CML. U 5 % vzniká Ph chromozom a fúzní gen *BCR-ABL* jako součást komplexnějších translokací, zahrnujících, kromě chromozomu 9 a 22, i změny dalších chromozomů. U 5 % pacientů s klinickými projevy CML není detekován Ph chromozom ani fúzní gen *BCR-ABL* [Shepherd et al., 1987, Wiedeman et al., 1988]. U takových pacientů je však označení CML sporné a jedná se spíše o jiné, klinickými příznaky blízké onemocnění [Hirsh-Ginsberg, et al., 1990, Kurzrock, et al., 1989].

U 20 % pacientů v chronické fázi jsou přítomny další chromozomální změny a s progresí onemocnění dochází ke změnám u 75 % pacientů. Nejčastější je nález izochromozomu 17, trisomie chromozomů 8, 17, 19, 21, duplikace Ph chromozomu a ztráty chromozomů 7, 11 a Y [Bernstein, 1988, Hagemeijer, 1987, Potter et Watmore, 1992, Rowley et Testa, 1982].

Někteří autoři popsali, že při vzniku Ph chromozomu je chromozom 9 paternálního a chromozom 22 maternálního původu [Haas, et al., 1992]. Na genové úrovni však genomický imprinting nebyl potvrzen [Melo et Goldman, 1995].

CML je progresivní onemocnění, v jehož průběhu lze většinou rozeznat tři stadia. Prvotní stadium, tzv. chronická fáze (CP), kdy onemocnění dobře odpovídá na léčbu a pacienti jsou většinou bez významějších klinických potíží, je následováno akcelerací (akcelerovaná fáze, AP), která většinou rychle přechází do terminálního stadia blastické krize (BC). Přehled kriterií pro klasifikaci přechodu do AP a BC ukazuje tabulka 1.

a Philadelphia podle města, v němž k objevu došlo.

AP (akcelerovaná fáze)	BC (blastická krize)
<ul style="list-style-type: none"> ● ztráta účinnosti léčby ● zdvojovací čas leukocytů <5 dní ● počet blastů v periferní krvi nebo kostní dřeni 10 až 30% ● počet blastů a promyelocytů v periferní krvi a kostní dřeni 20 – 50% ● počet bazofilů a eosinofilů v periferní krvi >20% ● neúčinnost léčby (anémie a trombocytopenie nebo naopak trvající trombocytóza i při léčbě hydroxyureou nebo busulfanem) ● vznik dalších chromozomálních anomálií ● progredující splenomegalie ● vznik myelofibrózy nebo chloromu (infiltrace kůže) 	<ul style="list-style-type: none"> ● počet blastů v kostní dřeni nebo v periferní krvi >30% ● počet blastů a promyelocytů v periferní krvi nebo v kostní dřeni >50%

Tab 1. Tabulka kritérií pro akcelerovanou fázi a blastickou krizi CML. K zařazení do příslušné fáze je třeba splnění alespoň jednoho z uvedených kritérií.

Diagnostika a monitorování CML

V době diagnózy dominuje v krevním obraze zmíněná leukocytóza, často dosahující hodnot více jak $100 \times 10^9/l$ a téměř vždy nad $25 \times 10^9/l$ (normální hodnoty: $2-10 \times 10^9/l$). Trombocytóza je popisována u nadpoloviční většiny pacientů. U některých pacientů byla naopak popsána trombocytopenie. V krevním nátěru periferní krve nepřesahuje obsah myeloblastů a promyelocytů 10-15 % jaderných krevních elementů. Naopak metamyelocyty a myelocyty mohou tvořit až 50 % z celkového počtu bílých krvinek. Z cytochemických nálezů je to pak velmi nízká hladina alkalické fosfatázy [Savage, et al., 1997; Mayer, et al., 2002].

Standardní diagnostickou metodou je cytogenetické vyšetření. Detekce a sledování množství Ph chromozomu se provádí buď klasickým G-pruhováním nebo pomocí I-FISH (interfázická fluorescenční *in situ* hybridizace).

Pro monitorování průběhu onemocnění se používá sledování exprese hlavního markeru CML, genu *BCR-ABL*. K detekci a sledování množství transkriptů fúzního genu *BCR-ABL* se používá RT-PCR (reverzní transkriptázová polymerázová reakce) a to buď kompetitivní nebo PCR v reálném čase (real-time PCR). PCR je oproti cytogenetickým metodám výrazně (přibližně o tři řády) citlivější s detekčním limitem až 0,001 % hladiny transkriptu *BCR-ABL*. V minulém desetiletí byla používána kompetitivní PCR, od které se v současnosti přechází k PCR v reálném čase, vzhledem k automatizaci v post-PCR fázi.

Geny *BCR*, *ABL* a *BCR-ABL*

Gen *BCR*

Název genu *BCR*^a je odvozen od 5,8 kb velké oblasti na 22 chromozomu (22q11) nazvané break point cluster region [Groffen J, 1984]. Gen *BCR* je tvořen 23 exony, je orientován svým 5' koncem k centromere a měří 135 kb [Heisterkamp, et al., 1985, 1989, Chisoe, et al., 1995]. Transkribuje se na 4,5 kb a 6,7 kb mRNA [Shtivelman, et al., 1985]. Je zajímavé, že i když byly popsány dva produkty translace, proteiny p130^{BCR} a p160^{BCR} [Dhut, et al., 1988], i kratší transkript obsahuje celou sekvenci pro p160^{BCR} [Hariharan, et al., 1987].

V oblasti 22q11 leží i tři netranslatované pseudogeny genu *BCR*. Jsou to *BCRL2* (BCR-like 2), *BCRL3* a *BCRL4* [Croce, et al., 1987]. Celkem je na 22 chromozomu sedm pseudogenů příbuzných *BCR* [Karlin, et al., 2002].

V oblasti přibližně 1 kb před místem začátku transkripce bylo popsáno několik cis-transkripčně regulačních elementů [Zhu, et al., 1990; Shah, et al., 1991]. Regulace transkripce *BCR* je významná i proto, že pod stejným promotorem se nachází celý fúzní gen *BCR-ABL*.

Gen *BCR* je dělen na několik oblastí, dle výskytu zlomů uplatňujících se při vzniku *BCR-ABL*. V oblasti M-bcr (major) dochází ke zlomu nejčastěji. Tuto oblast tvoří 5 exonů, původně popsáných jako b1 až b5, odpovídající exonům 12 až 16 genu *BCR*. Oblast M-bcr je dlouhá zhruba 5,8 kb. Dalšími oblastmi, které jsou však v CML méně časté, jsou m-bcr (minor, typický pro akutní lymfoblastickou leukemii, ALL) a μ -bcr (mikro).

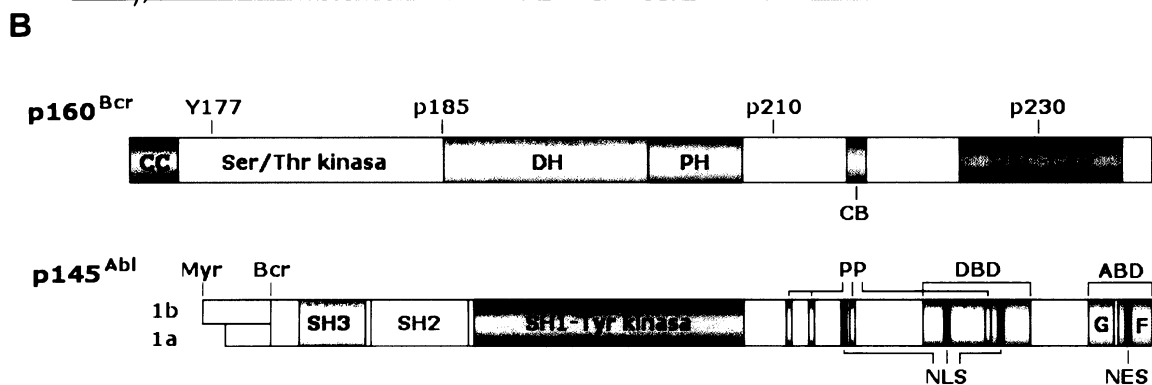
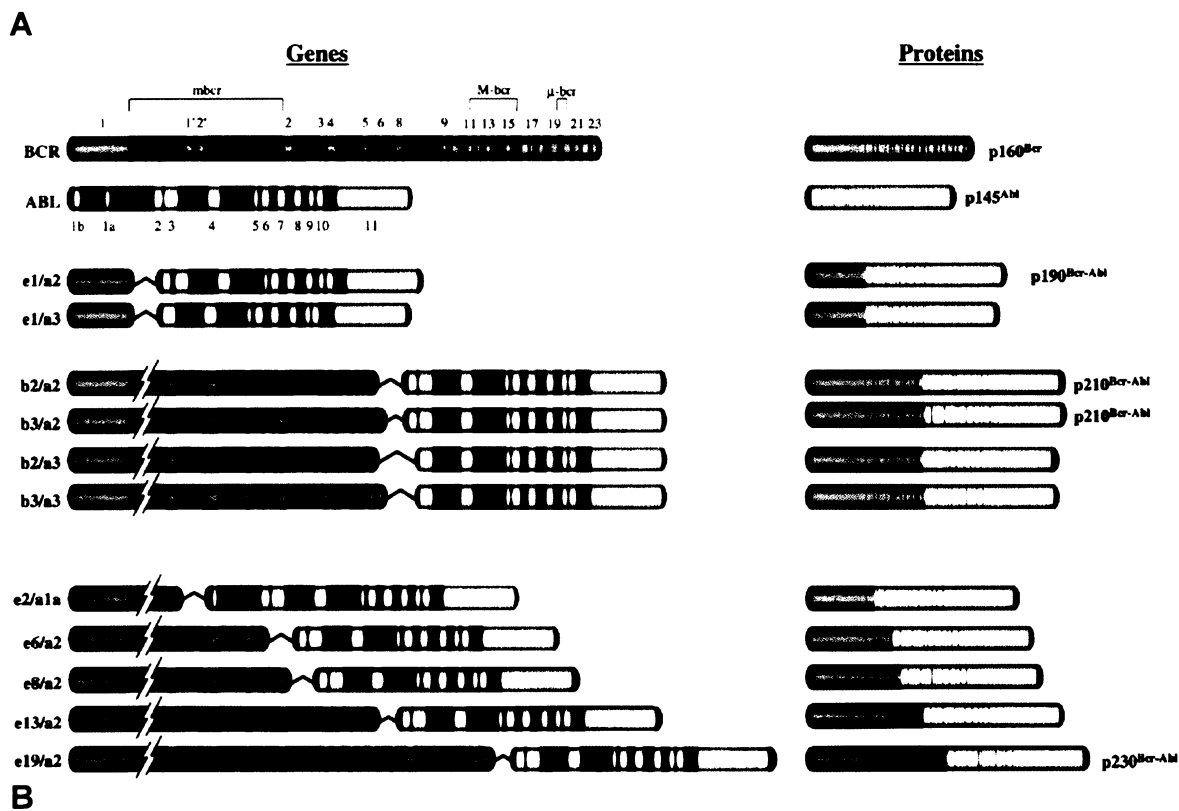
Protein p160^{BCR}, je tvořen 1271 aminokyselinou (molekulová hmotnost 160 kDa) a vykazuje serin/threoninproteinkinázovou aktivitu [Stam, et al., 1987]. Vytváří se ve všech

a HGNC: 1014, Entrez Gene ID: 613, RefSeq: NM_004327 (vysvětlení zkratk v Terminologické poznámce v závěru práce)

tkáních, zvláště v embryogenezi [Fioretos, et al., 1995] a jeho buněčná lokalizace je zejména cytoplasmatická [Dhut, et al., 1988].

Protein obsahuje několik funkčních domén (obr. 2). Na N-konci je coiled-coil motivem tvořená oligomerizační doména [McWhirter, et al., 1993, McWhirter et Wang, 1991, Muller, et al., 1991]. Následuje serin-threoninová kinázová doména jejímiž substráty jsou, krom samotného bcr, například kasein, histony a proteiny rodiny 14-3-3 [Maru et Witte, 1991, Reuther, et al., 1994]. V oblasti prvního exonu je také několik SH2-vazebných (Src Homology) domén, interagujících mimo jiné i s SH2 doménou v proteinu ABL [Pendergast, et al., 1991]. V centrální oblasti molekuly (exony 3-10) je DH (Dbl homology) doména s GEF (Guanine nucleotide exchange factor) funkcí [Ron, et al., 1991]. DH doména je následována PH (pleckstrin homology) doménou. Na C-konci je pak GAP (GTPase-activating protein) doména, která akcelerací hydrolýzy GTP působí inhibičně na p21^{RAC}, GTPázu z rodiny ras [Diekmann, et al., 1991, Heyworth, et al., 1993]. Působením na proteiny vázající GTP (CDC42, Rho, Rac1 a Rac2) ovlivňuje p160^{BCR} regulaci a koordinaci buněčné signalizace [Cerione et Zheng, 1996, Chuang, et al., 1995, Overbeck, et al., 1995, Quilliam, et al., 1995, Yaku, et al., 1994].

Funkce genu *BCR* je zatím málo prozkoumána, přesto existují důkazy o možném vlivu na průběh CML. Byla zjištěna vazba p160^{BCR} a proteinu p210^{BCR-ABL}. Protein p160^{BCR} v aktivní fosfoserinové formě snižuje tyrozinkinázovou aktivitu proteinu p210^{BCR-ABL}. p210^{BCR-ABL} naopak snižuje serinproteinkinázovou aktivitu p160^{BCR} [Lu, et al., 1993]. Bylo popsáno, že zvýšení exprese genu *BCR* v buněčných leukémických liniích vedlo ke snížení transformační schopnosti genu *BCR-ABL* [Arlinghaus, 1998].



Obr. 2 Geny *BCR* a *ABL*.

A - Vlevo struktura genů *BCR* a *ABL* a jejich fúzních variant. Vpravo proteiny vzniklé translací transkriptů příslušných genů vlevo. mbc, M-bcr a μ -bcr, jsou minor-bcr, Major-bcr a mikro-bcr oblasti zlomů v genu *BCR*.

B - Proteiny p160^{Bcr} a p145^{Abl}. Proteiny jsou v orientaci N → C. Domény p160^{Bcr}: CC- oligomerizační coiled-coil, Ser/Thr kinasa-serin/treoninová kinázová doména, DH-Dbl/CDC24 guanine-nucleotide exchange factor homologní doména, PH-pleckstrin homologní doména, CB-předpokládaná doména se závislostí na vápníku vážící lipidy, RAC-GAP-RAC guanosine triphosphatase-activating protein doména. Krom toho jsou v p160^{Bcr} označena nejčastější místa zlomu a tyrozin 177, který je vazebným místem pro adaptorový protein GRB2. Domény p145^{Abl}: SH3-1-Src homologní domény 3-1, PP-4, na prolin bohaté, SH3 vazebné domény, NLS-3 jaderné lokalizační signály, DBD-DNA vazebná doména, NES-jaderný exportní signál a ABD-aktin vazebná doména, s částmi vázajícími aktin monomerní (G) i ve vláknech (F). Upraveno dle Laurent, et al., 2001 a Ren R., 2005.

Gen *ABL*

Gen *ABL*^a, lokalizovaný na chromozomu 9q34 [Heisterkamp, 1983], se účastní základních buněčných procesů. Tento evolučně stálý gen nacházíme nejen u obratlovců, ale například i u *Drosophila melanogaster* [Holland, et al., 1990].

Velikost genu *ABL* je 225 kb. Gen je tvořen 12 exony (dvě alternativy prvního exonu a dalších 10 exonů). Při transkripci dochází k alternativnímu sestřihu prvního exonu, jehož dvě varianty, 1b a 1a, jsou v genu v tomto pořadí. Exon 1a je 19 kb před exonem 2 a dává vznik transkriptu o velikosti 6 kb. S exonem 1b, který je umístěn 200 kb před exonem 2, vzniká transkript o velikosti 7 kb. [Ben-Neriah, et al., 1986, Bernards, et al., 1987, Wang, et al., 1984].

Produktem normálního *ABL* genu je protein o velikosti 145 kDa. Protein p145^{ABL} je nereceptorová tyrozinproteinkináza. Působí v jádře i cytoplazmě. Transkripce 1b exonu umožňuje na rozdíl od 1a myristylaci N-konce proteinu. Myristylace umožní ukotvení proteinu do buněčné membrány a má za následek, že protein působí pouze v cytoplazmě [Pendergast, 1996, Wang, 1993]. V jádře působí nemyristylovaný protein vzniklý přeepisem od 1a exonu.

Protein p145^{ABL} obsahuje řadu domén. V N-koncové oblasti jsou to SH3, SH2 a samotná kinázová SH1 doména. V karboxy-terminální části jsou pak čtyři PP (proline rich) domény, tři NLS (nuclear localization signals), jedna NES (nuclear exporting signal), jedna DNA-vazebná doména a aktin vazebná doména. Domény C-koncové části proteinu se částečně prolínají, jak ukazuje obrázek 2.

SH3 doména se podílí na regulaci p145^{ABL}. Například při vazbě proteinu BP1 (binding protein) na SH3 dochází k inhibici SH1 domény. Molekuly nesoucí SH2 pro vazbu s fosforylovaným tyrozinem a SH3 pro vazbu dalšího proteinu jsou adaptorové (Shc) molekuly [Franz, et al., 1989, Mayer et Baltimore, 1994]. SH3 váže řadu dalších proteinů, např. proteiny Abi rodiny, Pag/MSP23, ATM, SHPTP1 a RFX1 [Shi, et al., 1995; Dai et Pendergast, 1995; Wen et Etten, 1997; Shafman, et al., 1997; Baskaran, et al., 1997, Kharbanda, et al., 1996; Agami et Shaul, 1998].

Regulační SH2 doména je tvořena 125 aminokyselinami. Na SH2 se váže fosforylovaný tyrozin SH1 domény. Dochází k zablokování katalytické domény a p145^{ABL} je inaktivován. Při navázání SH1 domény na jinou molekulu s SH2 doménou nedochází k zablokování aktivního místa proteinkinázy a ta zůstává v aktivní formě. SH2 doména

a HGNC: 76 (*ABL1*), Entrez Gene ID: 25, RefSeq: NM_007313

ABL se může vázat s oblastmi v exonu e1 p160^{BCR}. Zablokování SH2 vysvětluje zvýšenou aktivitu p210^{BCR-ABL} [Pendergast, et al., 1991].

Vlastní kinázová doména (SH1) je tvořena 260 aminokyselinami. Nachází se v ní fosforylovatelný tyrozin, důležitý pro regulaci funkce proteinu. SH1 je evolučně nejstálejší částí *ABL* proteinu [Henkemeyer, et al., 1988, Shtievelman, et al., 1986]. Substráty *ABL* kinázy nejsou příliš známy. Patří mezi ně fosfolipáza C- γ 1 a Sos-1, [Plattner, et al., 2003; Sini, et al., 2004].

Tři bazické NLS (nuclear localization signal) domény, z nichž jedna je výhradně polylyzinová, jsou odpovědné za možnost jaderné lokalizace p145^{ABL} a působí nezávisle [Wen, et al., 1996]. Funkčnost NES (nuclear export signal) domény byla však nedávno zpochybněna [Hantschel, et al., 2005].

DNA-vazebná doména je tvořena třemi HLB (high-mobility-group-like boxes) motivy, které se kooperativně váží na A/T bohaté sekvence DNA [Miao et Wang, 1996].

Na C-konci jsou domény vázající F a G aktin, jejichž prostřednictvím se protein p145^{ABL} podílí na tvorbě svazků aktinových vláken [McWhirter et Wang, 1993; Van Etten, et al., 1994].

Pro aktivaci p145^{ABL} ve fibroblastech je nutná adheze buňky. Aktivita p145^{ABL} je patrně přísně řízena integriny. Soudí se, že p145^{ABL} propojuje signály buněčného cyklu s integriny zprostředkovaným adhezním signálem [Lewis, et al., 1996]. p145^{ABL} se v interfázi váže na jadernou DNA. CDK2-proteinkináza fosforyluje p145^{ABL} na tyrozinu, a v mitóze se jeho vazba s DNA přeruší [Kipreos et Wang, 1992, Wang, 1993]. Při přechodu z G0 do G1 buněčné fáze se váže na C-koncovou doménu retinoblastomového proteinu (Rb), čímž je inhibována jeho kinázová funkce. V přechodu z G1 fáze do S fáze je p145^{ABL} aktivován, protože se nemůže vázat na fosforylovaný Rb [Welch et Wang, 1993, 1995.]. Aktivovaný p145^{ABL} působí na RNA polymerázu II a další substráty. RNA polymeráza II je specificky ovlivňována SH2 doménou p145^{ABL}, ale ne jinými Src tyrozinkinázami [Duyster, et al., 1995, Baskaran, et al., 1996]. Zvýšená exprese p145^{ABL} vede k zastavení buněčného cyklu na přechodu G1/S. Protein p145^{ABL} brání replikaci DNA, ovšem pouze za přítomnosti p53 a Rb proteinů, tj. produktů tumor supresorových genů [Wen, et al., 1996].

Fúzní gen BCR-ABL

Po reciproké translokaci chromozomů 9 a 22 vzniká ze dvou samostatných genů, *BCR* a *ABL*, fúzní gen *BCR-ABL*. Gen *BCR-ABL*, je plně funkční a je exprimován do funkčního proteinu. Konkrétní podoba genu *BCR-ABL* však záleží na přesných místech, kde došlo ke zlomům na chromozomech (obr. 2).

V genu *ABL* dochází ke zlomům na třech místech 5' oblasti o rozsahu přibližně 300kb, před prvním exonem 1b, za druhým exonem 1a a (nejčastěji) mezi oběma exony 1b a 1a [Melo, 1996]. Nezávisle na místě zlomu v *ABL*, je primární transkript *BCR-ABL* sestřihován tak, že za *BCR* sekvencemi následují *ABL* sekvence počínaje exonem a2 [Morris, et al., 1991].

V *BCR* genu dochází ke zlomům ve třech oblastech. Nejčastěji v oblasti *M-bcr* (Major- breakpoint cluster region), což je 5,8 kb velká oblast pokrývající exony 12 – 16 (původně označované b1-b5). Další oblast zlomů, *m-bcr* (minor-*bcr*), leží mezi prvními dvěma exony. Třetí oblast, v níž dochází ke zlomům nejméně často, je μ -*bcr* (mikro-*bcr*) pokrývající sekvenci genu *BCR* mezi 19 a 21 exonem (obr. 2).

Podle místa zlomu v genu *BCR* vznikají tři velikosti fúzního proteinu. Po zlomu v oblasti *M-bcr*, která je u CML zdaleka nejčastější, je to p210^{BCR-ABL} (varianty e13a2 (b2a2) a e14a2 (b3a2)), po zlomu v *m-bcr* vzniká protein p190^{BCR-ABL} (e1a2), který je typický pro ALL a po zlomu v μ -*bcr* je to p230^{BCR-ABL} (e19a2). Výjimečně byly nalezeny i fúzní geny vznikající po zlomech v jiných oblastech *BCR* a *ABL*. Jsou to například b2a3, b3a3, e1a3, e6a2, e8a2 nebo e2a2 [Melo, 1997; Hochhaus, et al., 1996; Leibundgut, et al., 1999; Moravcová, et al., 2005; Demehri, et al., 2005]. Různé doménové složení fúzního proteinu může mít vliv na fenotyp onemocnění.

Na translokacích dávajících vznik Ph chromozomu se podílejí Alu sekvence zúčastněných genů [Chisoe, et al., 1995; Jeffs, et al., 1998].

Fúzní gen ABL-BCR

Je známo, že u pacientů s Ph⁺ onemocněním vznikají i transkripty v důsledku druhé části reciproké translokace, tedy *ABL-BCR*. Zdá se, že transkript *ABL-BCR* nehraje roli v prognóze onemocnění [Huntly, et al., 2002]. Nicméně je možné, že delece konce translokováného chromozomu 9 na prognózu vliv mít může, i když tato domněnka nebyla s jistotou potvrzena [Huntly, et al., 2003].

Proteiny signálních kaskád v CML

Fúzní gen *BCR-ABL* je deregulovaná kináza, která hraje roli v široké škále buněčných signálních kaskád. Přesný mechanismus jejího působení v leukemogenezi není znám, je ovšem známa řada interakcí *BCR-ABL* se signálními drahami. Přehledně to ukazuje obr. 3.

Konstitutivní aktivaci p210^{BCR-ABL} umožňuje dimerizace (resp. tetramerizace) zprostředkovaná coiled-coil motivem na N-konci proteinu [McWhirter, et al., 1993, McWhirter et Wang, 1991]. Protein p210^{BCR-ABL} na rozdíl od p145^{ABL} působí výhradně v cytoplazmě, je autofosforylován, což zabraňuje jeho regulaci, a jeho aktivita je několikanásobně zvýšena. Protein p210^{BCR-ABL} tak neregulovaně zasahuje do signálních drah buněk, což vede ke změnám v jejich proliferaci, diferenciaci, apoptóze a adhezi. To vše pak vede k onkogenní transformaci buněk [Dhut, et al., 1990].

I přes celou řadu dílčích poznatků o interakcích p210^{BCR-ABL} se signálními drahami není znám celkový obraz působení toho proteinu v CML. Zejména děje na přechodu CML do akcelerované fáze a blastické krize jsou nejasné.

JAK/STAT signální dráha

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) signální dráha je tvořena řetězcem: signální molekula (některý z cytokinů) → membránový receptor → s receptorem asociovaná proteintyrozinkináza (*JAK*) → transkripční faktor (*STAT*). Krom toho jsou součástí *JAK/STAT* signalizace i inhibiční faktory v podobě proteinů rodiny CIS/SOCS (cytokine-induced SH2-containing/suppressors of cytokine signaling).

Byly popsány případy ALL a CML s přestavbou vedoucí k fúznímu genu *TEL-JAK2* [Peeters, et al., 1997; Lacronique, et al., 1997; Lacronique, et al., 2000]. Byl také popsán případ CML s přestavbou *BCR-JAK2* [Griesinger, et al., 2005]. Krom toho je známo, že p210^{BCR-ABL} a p190^{BCR-ABL} indukují fosforylaci *STAT* i jejich schopnost vázat DNA [Ilaria et Van Etten, 1996].

Disregulace genů rodiny *STAT* byla popsána v řadě lidských malignit. v-Abl a *BCR-ABL* způsobují konstitutivní aktivaci *STAT4* [Danial et Rothman, 2000; Migone, et al., 1995]. V *BCR-ABL*⁺ buňkách je fosforylaci aktivovaný *STAT5* a imatinib a Ara-C inhibují tuto fosforylaci, což vede k supresi proliferace indukci apoptózy [Kindler, et al., 2003].

Ras/Raf/MEK/ERK signální dráha

Tato signální dráha je jednou z centrálních signálních cest v buňce a obecně bývá také označována jako MAP kinázová signální dráha. Ve stručnosti probíhá takto: signální molekula → membránový receptor (RTK, receptor tyrosin kinase) → aktivace malého GTP vazebného proteinu (ras) → aktivace (fosforylací) serin-threoninové kinázy (Raf) → aktivace dalších MAP kináz, až k aktivaci ERK (extracellular signal-regulated kinase), která je translokována do jádra, kde aktivuje transkripční faktory a další proteiny.

BCR-ABL aktivuje Ras, což je podpořeno inhibicí p120^{GAP} a tedy prolongací aktivní formy Ras vázající GTP [Skorski, et al., 1994]. *BCR-ABL* interaguje s Raf-1 izoformou Raf při potlačování apoptózy regulací lokalizace mitochondriálního proteinu BAD [Salomoni, et al., 1998]. *BCR-ABL* neaktivuje (na rozdíl od *ABL*) *ERK2* [Raitano, et al., 1995]. Kromě cesty Ras/Raf-1/ERK aktivuje *BCR-ABL ERK* také prostřednictvím Rap1/B-Raf/ERK [Mizuchi, et al., 2005; Jin, et al., 2006].

PI3K/Akt signální dráha

PI-3 kináza (PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase) fosforyluje fosfoinositidy na hydroxyskupině třetího uhlíku inozitolu. Dráha je potom tvořena sledem: signál → RTK → SH2 doména PI3K váže RTK → PI3K fosforyluje inozitidy a dává tak vznik fosfatidyl 3,4-bisfosfátu nebo fosfatidyl 3,4,5-trisfosfátu → ten je vázán Akt čímž se Akt částečně aktivuje → úplná aktivace Akt (za přispění PDK1) → aktivace transkripčních faktorů nebo jiných efektorů.

Zajímavé je, že regulační podjednotka PI3K třídy I obsahuje doménu homologní s *BCR GAP* doménou [Musacchio, et al., 1996]. Konstitutivně aktivní Akt obnovuje transformační aktivitu defektního BCR-ABL v myších [Skorski, et al., 1997]. Fosfatáza PTEN (phosphatase and tensin homolog) je negativním regulátorem PI3K/Akt signální dráhy, protože defosforyluje PI3 fosforylované kinázou PI3K. Disregulace PTEN byla popsána v několika hematologických malignitách, což naznačuje cestu abnormálního antiapoptického působení Akt [Dahia, et al., 1999]. Exprese fosfatidylinositolfosfatázy SHIP, je v CML inhibována prostřednictvím BCR-ABL [Sattler, et al., 1999].

NOTCH signální dráha

Rodina membránových receptorů *NOTCH* je tvořena u savců 4 členy: *NOTCH1-4*. Ligandů *NOTCH* je 5: Jagged1/2 a Delta-like 1/3/4. *NOTCH* signalizace spočívá v pro-

teolytickém štěpení NOTCH po aktivaci signálem/ligandem a následné translokaci produktu štěpení-NotchIC (Notch intracellular domain) do jádra. V jádře se NotchIc váže na transkripční represor CBF1 (C protein binding factor 1), čímž ho mění v aktivátor a dále společně váží transkripční faktory rodiny MAML (Mastermind-like). Tento komplex pak váže a tím aktivuje histon-acetyltransferázu p300/CBP, která acetylací histonů umožňuje aktivaci transkripce. Geny pod kontrolou Notch jsou většinou transkripční represory [Leong et Karsan, 2006].

Role *NOTCH* v CML není známa, i když zde byla popsána jeho downregulace [Bruchova, et al., 2000; Bruchova, et al., 2002]. Působení Notch bylo ale popsáno v jiných hematologických malignitách, kde může NOTCH působit pro- i anti-onkogeně [Pear et Aster 2004; Leong et Karsan, 2006].

Geny regulující apoptosu

Ve vlastním procesu apoptózy (řízené buněčné smrti) hrají klíčovou roli proteázy kaspázy. Kaspázy lze rozdělit na iniciační (*CASP2*, *CASP8*, *CASP9*, *CASP10*) a exekuční (*CASP3*, *CASP6*, *CASP7*). K aktivaci iniciačních kaspáz dochází různě, například *CASP8* je aktivována signalizací pomocí „signálu smrti“ z receptoru TNF (Tumor Necrosis Factor) nebo Fas receptoru, zatímco k aktivaci *CASP9* dochází po interakci nefosforylovaného BAD s heterodimerem Bcl-2/Bcl-xl a s cytochromem c a proteinem Apaf-1 na mitochondriální membráně.

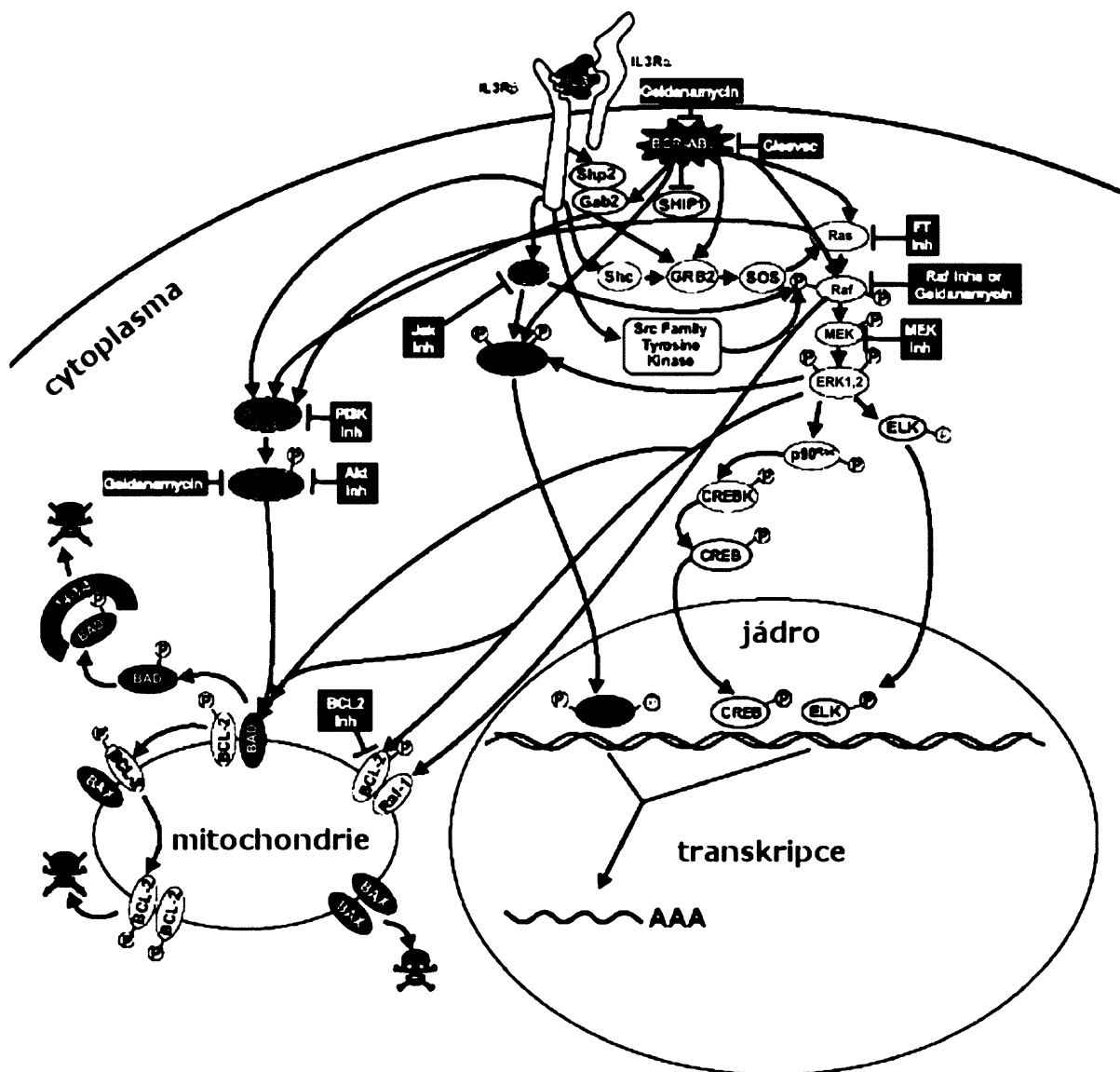
Proapoptotický protein BAD je fosforylován v buňkách exprimujících BCR-ABL a vysoká exprese funkčního BCR-ABL zabraňuje translokaci proapoptotických proteinů BAX a BAD do mitochondriální membrány [Salomoni, et al., 2000; Keeshan, et al., 2002]. Vysoká hladina proteinu Fas korelovala se špatným stavem v diagnóze CML i se špatnou prognózou onemocnění, zatímco vysoká hladina *CASP3* korelovala naopak s dobrou prognózou [Ravandi, et al., 2001]. Zajímavé je, že antiapoptotická funkce BCR-ABL je pravděpodobně zprostředkována PI3K a Raf a může fungovat i bez fosforylace BAD [Neshat, et al., 2000].

Další interakce BCR-ABL se signálními drahami

BCR-ABL váže prostřednictvím autofosforylačního Y177 GRB2 adaptorový protein Gab2 [Sattler, et al., 2002]. Zajímavé je, že mutace Y177F výrazně snížila myeloidní leukemogenezi *BCR-ABL*, zatímco lymfoidní leukemogenezi výrazně neovlivnila. *BCR-ABL* tvoří komplex s GRB2 a SOS a fosforyluje GRB2 [Puil, et al., 1994; Li, et al., 2001].

Jeden z nejčastěji fosforylovaných proteinů v buňkách pacientů s CML, CRKL je fosforylován BCR-ABL na Y207 [Oda, et al., 1994; Nichols, et al., 1994; ten Hoeve, et al., 1994; de Jong, et al., 1997]. CRKL hraje roli v IFN I receptorové signalizaci/inhibici buňčného růstu [Platanias, et al., 1999]. Fosforylovaný CRKL tvoří CRKL-STAT5 dimery, které (po translokaci do jádra) váží GAS elementy [Fish, et al., 1999].

MAP kináza p38 zprostředkovává inhibici růstu *BCR-ABL*⁺ buněk způsobenou IFN [Mayer, et al., 2001].



Obr. 3 Interakce BCR-ABL se signálními kaskádami. Upraveno dle Ren R., 2005 a Steelman, et al., 2004.

Léčba CML

Jediným kurativním (a kauzálním ve smyslu eliminace maligního buněčného klonu) léčebným postupem pro CML je v současné době alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (TKB). Všechny ostatní přístupy k léčbě CML nelze v současnosti označit za kurativní, i když mohou vést k dlouhodobým dobrým odpovědím na léčbu [Stone, 2004].

Úspěšnost léčby lze posuzovat dle míry odpovědi na léčbu, která je charakterizovaná jako hematologická (HR), cytogenetická (CR) nebo molekulární. Částečná hematologická odpověď je charakterizována znatelnou změnou počtů krevních elementů směrem k normálním hodnotám. Hematologická odpověď je kompletní, pokud počet leukocytů je do $10 \times 10^9/l$, počet trombocytů do $450 \times 10^9/l$, v periferní krvi nejsou nezralé buněčné formy a není hmatná splenomegalie. Cytogenetickou odpověď dále dělíme na minor (mCR, počet Ph^+ buněk v periferní krvi je v rozmezí 35-94 %), částečnou (pCR, 1-34 % Ph^+ buněk) a kompletní (CCR, 0 % Ph^+ buněk) [srov. Bonifazi, et al., 2001]. Lze také definovat molekulární odpověď na základě množství detekovaného transkriptu *BCR-ABL* (viz. např. [Moravcova, et al., 2003]). Zde ovšem závisí na metodě použité k monitorování, protože standardizace molekulárních metod dosud neproběhla.

Chemoterapie

Mezi chemoterapeutika používaná při léčbě CML patří, busulfan, hydroxyurea, cytosin arabinozid (Ara-C) a fludarabin.

Busulfan (BU) je alkylační činidlo a poprvé bylo jeho použití v CML popsáno v roce 1953 [Galton, 1953]. Busulfan je aplikován k snížení velkého množství bílých krvinek a to na úroveň částečné hematologické odpovědi na léčbu. K vedlejším účinkům patří dlouhodobý útlum krvetvorby, plicní fibrózy (tzv. busulfanové plíce) a zhoršení výsledků následné TKB [Hehlmann, et al., 1993].

Hydroxyurea (HU) je inhibitor ribonukleotidreduktázy a tedy inhibuje syntézu DNA. V léčbě CML se používá k snížení počtu bílých krvinek, k čemuž se hodí lépe než busulfan [Kennedy, et al., 1966]. Působí totiž nejen rychleji, ale její působení nemá také nežádoucí prolongovanou fázi po jejím vysazení. Hydroxyurea bývá používána jako lék první volby, který normalizací krevního obrazu připravuje půdu pro nasazení jiných terapeutik (interferon, imatinib). Mezi vedlejší účinky patří nauzea, kožní změny, stomatitida, alopecie a některé neuropsychiatrické symptomy. Hydroxyuera navozuje částečnou či

úplnou hematologickou odpověď až u 80 % pacientů, cytogenetickou odpověď však zřídka (do 5 % případů).

Cytozin arabinosid (cytarabin, Ara-C) zabraňuje inkorporaci 2'-deoxycytidinu do DNA a je schopen navodit kompletní cytogenetickou odpověď v CML [Robertson, et al., 1993].

Interferon

Cytokin interferon- α (IFN- α) patří mezi důležité složky neadaptivních antivirových imunitních mechanismů [Isaacs, et al., 1957]. Interferonů- α je celá řada (více než 15 různých genů a 4 pseudogeny [Pestka, et al., 1987]), pro léčbu je používán nativně nejhojnější interferon- α 2 (resp. 2a, 2b a 2c).

Mechanismus účinku IFN v CML není přesně popsán. IFN- α však ovlivňuje imunitní systém mnoha způsoby. Zvyšuje množství povrchově prezentovaných antigenů, zvláště prostřednictvím MHC I třídy glykoproteinů. Indukuje diferenciaci několika typů buněk lymfoidní řady. Aktivuje efektorové buňky (NK buňky, makrofágy a T-lymfocyty). Krom toho IFN- α inhibuje, jako součást své protivirové funkce, replikaci a tím i proliferaci buněk [Pfeffer, et al., 1998].

IFN navozuje u 5-33 % nemocných kompletní cytogenetickou remisi [Bonifazi, et al., 2001]. Oproti chemoterapii zvyšuje IFN dobu přežití o 20 měsíců. Interferon je dávkován nejčastěji s maximem 5 MU/m² a den, často v kombinaci s Ara-C. Ara-C, však přispívá také k vedlejším účinkům léčby. Rezistence k léčbě IFN se objevuje u 20-30 % nemocných. Vedlejší účinky jsou různé a klinicky významné, i když většinou dobře zvladatelné symptomatickou léčbou. Patří mezi ně slabost, horečky, pocení, bolesti svalů a kloubů, nevolnost, nechutenství, bolesti břicha, průjem a neurologické a psychiatrické potíže. Poslední dvě jmenované kulminují kolem třetího roku léčby, zatímco většina ostatních se projeví do šesti měsíců po zahájení léčby. Výjimečně se objevují i autoimunní reakce.

Imatinib

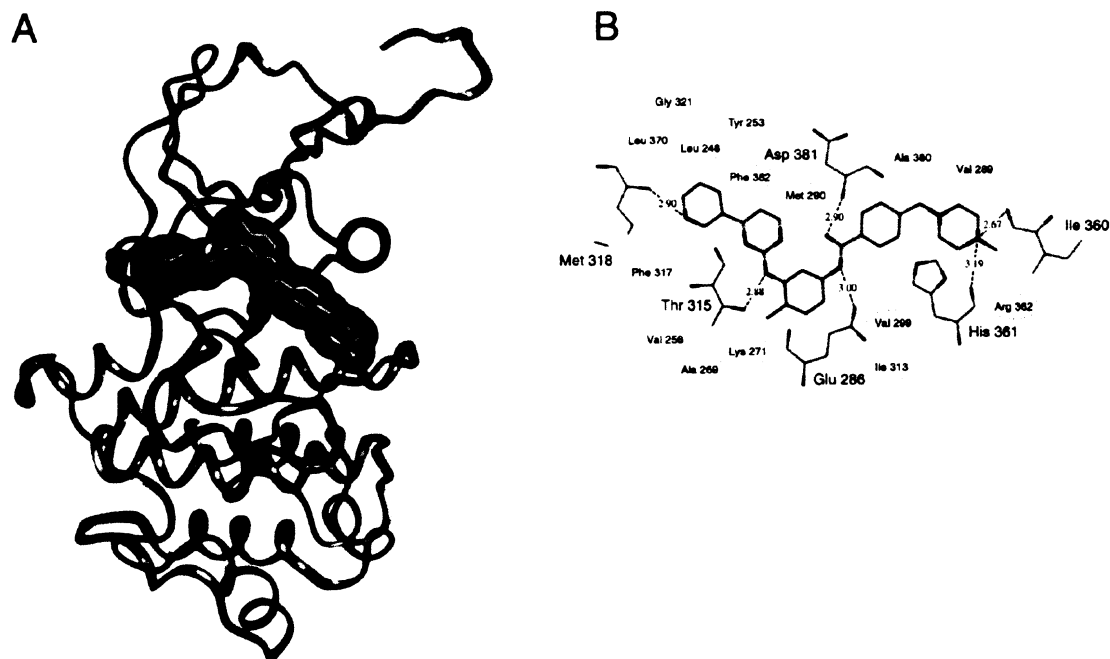
V roce 1996 byl popsán specifický inhibitor kinázy *ABL*, imatinib mezylát^a [Buchdunger, et al., 1996]. Imatinib (C₃₀H₃₅N₇S₀₄, MW 589,7) je derivát 2-fenylaminopyrimidinu. Tato látka blokuje kinázovou aktivitu *BCR-ABL* tím, že se váže do kinázové domény

a Původně CGP 57148, Novartis Pharmaceuticals, Basel Switzerland. Později mimo jiné G 571, STI 571 (signal-transduction inhibitor), Glivec[®], Cleevec[®] a imatinib mesylate.

ABL ve vazebném místě pro ATP. Tím imatinib brání ABL-specifickým fosforylacím proteinů (obr. 4).

Imatinib navozuje u více než 90 % pacientů léčených v CP (u 20 % v BC) kompletní hematologickou odpověď v několika týdnech [Marin, et al., 2002]. U 80 % nově diagnostikovaných pacientů navozuje imatinib kompletní cytogenetickou odpověď [Deininger, et al., 2005]. Navození kompletní molekulární odpovědi léčbou imatinibem je ovšem komplikovanější a i v případech dosažení *BCR-ABL* negativity jde většinou o odpověď krátkodobou. Přesto bylo v jedné studii popsáno, že je imatinib schopen navozovat kompletní molekulární odpověď i dlouhodobě až u 27 % sledovaných pacientů [Colombat, et al., 2006]. Zde je ovšem třeba brát v úvahu i detekční limity použitých metod. Například v uvedené studii autoři uvádějí citlivost 10^{-5} ředění plazmidu, což ovšem neodpovídá situaci *in vivo*. Metoda používaná v ÚHKT je o několik řádů citlivější, nehledě na možnost detekovat i overexpresi, což při poměru *BCR-ABL/ABL* nelze [Moravcová et al., 1998]. Pravděpodobnost 4-letého přežití je při léčbě imatinibem 86 % (při léčbě IFN je to jen 43 %) [Hagop, et al., 2004]. Imatinib je poměrně dobře tolerován.

Závažná komplikace spojená s léčbou imatinibem je rezistence k tomuto léčebnému postupu. Rezistence je buď primární, kdy imatinib postrádá očekávaný léčebný efekt již od počátku. Nebo je rezistence k imatinibu získaná, takže po první fázi úspěšné léčby přichází relaps onemocnění. Etiologie rezistence může být v overexpresi genu *BCR-ABL* (deregulací či amplifikací genu), v mutaci *BCR-ABL* vedoucí k opětovné aktivitě produktu tohoto genu, nebo v rozvoji CML částečně nebo úplně nezávislé na *BCR-ABL* [Gorre, et al., 2001; Donato, et al., 2004]. Případně může dojít k zvýšení hladiny buď P-glykoproteinu (Pgp, produkt genu *MDR1*), který exportuje imatinib z buňky, nebo alfa 1 kyselého glykoproteinu (AGP), který imatinib vyvazuje [Mahon, et al., 2003; Gambacorti-Passerini, et al., 2003]. V přehledovém článku popisuje Hochhaus a Rosée četnosti primární, resp. sekundární rezistence k léčbě imatinibem v druhém roce léčby v procentech léčených pacientů takto (primární/sekundární rezistence): časná CP 5/4 %, pozdní CP 4/13 %, AP 24/51 % a BC 66/88 % [Hochhaus et Rosée, 2004].



Obr. 4 Vazba ABL a jeho inhibitoru imatinibu.

A - Schematické znázornění kinázové domény ABL (zeleně) vázající imatinib (modře). Aktivační smyčka je znázorněna červeně, na jejím N konci je DFG (podle názvů aminokyselin) oblast (žlutě). Tmavě zeleně jsou znázorněny α C helix a úsek spojující oba laloky domény.

B - Schéma znázorňující interakce ABL s imatinibem. Atomy dusíku jsou znázorněny modře, kyslíku červeně, síry žlutě a uhlíku oranžově (ABL) a zeleně (imatinib). Vodíkové můstky jsou naznačeny čárkovanými čarami a aminokyselinové zbytky tvořící van der Waalsovy vazby jsou v čárkovaných oválech. Upraveno dle Nagar, et al., 2002.

Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (TKB) je v současnosti jedním kurativním způsobem léčby CML. S touto výhodou je však bohužel spojena nevýhoda velké toxicity a mortality tohoto přístupu. Kromě náročnosti samotného výkonu je nebezpečí spojeno hlavně s velkou cytotoxicitou myeloablativního režimu, který samotnou TKB předchází. Nejčastěji se přistupuje ke kombinaci celotělového ozáření s aplikací cyklofosfamidu, nebo cyklofosfamidu kombinovaného s busulfanem (BUCY) [Mayer, et al., 2002]. Pro úspěšnost TKB je podstatný GvL (Graft versus Leukemia) efekt, ke kterému po TKB dochází. Při GvL cytotoxické buňky štěpu reagují proti leukemickým buňkám pacienta. K takovému efektu lze buňky štěpu i stimulovat (např. IL-2), ale na druhou stranu je třeba vyhnout se přemrštěnému efektu vedoucímu ke GvHD (Graft versus Host Disease).

K TKB lze také přikročit po tzv. nemyeloablitivním režimu, při kterém nedochází k ablaci a kde je třeba použít silná imunosupresiva.

Na úspěšnost TKB má vliv řada faktorů. Mezi ně patří: věk nemocného, stadium onemocnění, interval od diagnózy k TKB a pohlaví dárce (kombinace žena-dárce/muž-příjemce je negativní prognostický faktor).

Jiné možnosti léčby

Mezi další možnosti léčby patří cytostatika homoharringtonin, fludarabin a decitabin, interleukin-2 nebo například nukleové kyseliny způsobující RNA interferenci. Dalšími možnostmi jsou Geldanamycin, který inhibicí Hsp90 podporuje degradaci p210^{BCR-ABL} a inhibitory členů signálních kaskád ovlivněných p210^{BCR-ABL}: Lonafarnib (inhibitor farnesyl transferázy), Wortmanin (inhibitor PI3K), Rapamycin (inhibitor mTOR) a PD98059 (inhibitor MEK1).

MATERIÁL A METODY

Materiál

Pacienti

DNA i RNA použité v této práci byly získány z leukocytů pacientů s CML léčených BU, HU, IFN, Ara-C a imatinibem. V blastických krizích byla použita intenzivní chemoterapie dle standardního léčebného protokolu.

Hladina *BCR-ABL* a poměr *BCR-ABL/BCR* byly sledovány ve 217 vzorcích 48 pacientů v průběhu léčby (21 CCR, 24 pCR, 36 mCR, 45 HR, 78 NonR (bez odpovědi) a 13 BC).

Genová exprese byla pomocí macroarrays analyzována u 37 vzorků patnácti pacientů s CML. Popis jednotlivých vzorků ukazuje tabulka 4.

Hladiny transkriptů vybraných genů byly sledovány pomocí PCR v reálném čase v 93 vzorcích 13-ti pacientů (10 CCR, 11 pCR, 11 mCR, 17 HR, 31 NonR, 13 BC).

Metodou GenoSensor™ Array 300 bylo testováno 10 vzorků pacientů s CML, z nichž 7 bylo rezistentních k léčbě (tab. 7).

Veškeré odběry vzorků lidských tkání byly prováděny na základě informovaného souhlasu pacienta dle směrnic Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku (NRL) pro odběr vzorku a dle pravidel etické komise ÚHKU.

Chemikálie

Použité chemikálie byly od firem: GIBCO, KRD, Lachema, Merck, Pharmacia, Promega, Serva a Sigma.

Metody

Zpracování krve a izolace krevních elementů

Testy byly prováděny na celkových leukocytech pacientů s CML a zdravých jedinců. Leukocyty byly izolovány z periferní krve metodou osmotické lýzy, kdy byly v hypotonickém prostředí odstraněny erytrocyty.

Vzorky periferní krve byly odebírány v objemech 10 nebo 20 ml do antikoagulačního média. Pro zachování dobré životaschopnosti buněk, nutné mimo jiné i pro izolaci kvalitní RNA, je nejvhodnější citrátové antikoagulans (citrát sodný). Nevhodný je heparin, u kterého bylo popsáno, že brání následné RT-PCR. Po osmotické lýze erytrocytů byly izolovány celkové leukocyty. Stanovení koncentrace leukocytů bylo prováděno počítáním v Bürkerově komůrce po obarvení buněk trypanovou modří. Leukocyty byly bezprostředně po izolaci lyzovány roztokem guanidium isothiokyanátu (ITG) s přidáním merkapt ethanolu (4 M guanidinium thiokyanát, 25 mM citrát sodný pH 7, 0,5%^a N-lauroylsarcosin-Na, 0,72% 2-merkptoetanol) [Chomczynsky et Sacchi, 1987].

Izolace nukleových kyselin

Izolace DNA

Modifikovaná metoda dle Millera [Miller, et al., 1988]. K 3 ml roztoku obsahujícího intaktní, nebo lyzované buňky bylo přidáno 0,6 ml proteinázy K (2 mg/ml) a 0,2 ml 10% SDS. Po zamíchání byla směs inkubována 12-18 hodin při 37° C. Po inkubaci bylo přidáno 1,5 ml 6M NaCl a po prudkém zamíchání byl vzorek centrifugován 30 minut při 18° C a při 2200 g. Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a smísen, v objemovém poměru 1:2,5, s 96% etanolem (-20° C). DNA, která se objevuje jako mléčné vlákno, byla mechanicky převedena (např. pomocí plastového nástavce automatické pipety) do nové zkumavky a propláchnuta 70% etanolem. Etanol byl odsát a jeho zbytek byl odpařen při 25-40° C. DNA byla rozpouštěna v TE pufru, nejprve 2-3 hodiny při 50° C a poté 10-48 hodin při pokojové teplotě.

^a V případě použití spojení x% roztok se vždy jedná o procentní podíl objemů.

Izolace RNA

RNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí v kyselém prostředí, dle modifikované metody Chomczinského [Chomczynsky et Sacchi, 1987; Moravcová, et al., 1998].

Do sterilních 1,5 ml plastikových zkumavek bylo napipetováno postupně 50 μ l roztoku Na acetátu, 450 μ l fenolu, 125 μ l chloroformu s izoamylalkoholem a přidáno 500 μ l lyzovaného vzorku. Výchozí koncentrace leukocytů byla $2 \cdot 10^7$ /ml. Po důkladném promíchání se vzorek bíle zakalí. Zkumavky byly umístěny do ledové lázně na 10 min. a následně centrifugovány 20 min. při $10\,000 \times g$ při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Z horní vodné fáze bylo opatrně odebráno $4 \times 100\ \mu$ l do nové 1,5 ml zkumavky. Po přidání 400 μ l isopropanolu vychlazeného na $-20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ a byly vzorky promíchány překlápěním. Vzorky byly ponechány minimálně 10 min. při $-20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ (je možno ponechat přes noc) a dále centrifugovány 20 min. při $10\,000 \times g$ při $4 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Po opatrném slítí supernatantu a krátkém okapání zbylého supernatantu na sterilní filtrační papír bylo k sedimentu přidáno 500 μ l 75% ethanolu vychlazeného na $-20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ a vzorek byl krátce promíchán. Vzorek byl centrifugován 10 min. při $10\,000 \times g$ při $4 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Po opětovném slítí supernatantu následovalo další propláchnutí sedimentu 75% etanolem. Po posledním slítí supernatantu byla zkumavka krátce zcentrifugována na mikrocentrifuze a zbylý supernatant byl opatrně odsát pipetou se špičkou s filtrem a s tenkým hrotem. Po přidání 15 μ l vody RNA kvality byla izolovaná RNA rozpouštěna nejdříve 10 min. ve vodní lázni při $55\text{ }^\circ\text{C}$ a následně 15 min. při pokojové teplotě. Rozpuštěná RNA je skladována krátkodobě při $-20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, dlouhodobě při $-70 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

Výtěžek je 2-5 μ g RNA na 10^7 leukocytů.

Kontrola kvality nukleových kyselin

O kvalitě nukleových kyselin se lze přesvědčit horizontální agarózovou elektroforézou, případně měřením příslušných absorbancí na spektrofotometru.

Pro přípravu elektroforetického gelu byla použita 1,5% agaróza v pufru $1 \times \text{TAE}^a$. Agaróza byla za občasného promíchání rozvařena v mikrovlnné troubě, roztok byl zchlazen asi na $60\text{ }^\circ\text{C}$ a byl přidán ethidium bromid v koncentraci 1 μ l ethidium bromidu (10mg/ml) na 15 ml gelu. Po nalití a ztuhnutí gelu jsou nanášeny vzorky ve směsi s nanášecím pufrem obsahujícím glycerol a barvivo (např. Orange G). Elektroforéza probíhala při napětí maximálně 6 V na 1 cm gelu. K vizualizaci bylo použito UV světlo a pro dokumentaci snímání CCD kamerou propojenou s počítačem.

a Zjistili jsme, že není nutné provádět elektroforézu denaturační.

V elektroforetogramu izolované RNA by měly být patrné dva jasné distinktní pruhy odpovídající ribozomální 18S a 28S RNA a neměla by být viditelná kontaminující genomová DNA na startu nebo v jeho blízkosti.

V elektroforetogramu izolované DNA by mělo být maximum viditelné v oblasti 20 – 40 kb, bez degradované DNA.

O kontaminaci vzorku nukleových kyselin proteiny, resp. solemi vypovídá i poměr absorbancí vzorku při vlnových délkách $A_{260}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260}/A_{230\text{nm}}$. A to tak, že poměr $A_{260}/A_{280\text{nm}}$ by neměl být nižší, než 1,8 a poměr $A_{260}/A_{230\text{nm}}$ by se měl pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,2.

Stanovení koncentrace nukleových kyselin

Stanovení koncentrace nukleových kyselin bylo prováděno buď denzitometrickou analýzou agarozového gelu, nebo na spektrofotometru Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

Denzitometrickou analýzu byla prováděna pomocí softwaru GelBase/GelBlot (UVP Ltd., Cambridge, UK). Koncentrace se vypočítá z poměru jasů, sledovaného proužku a proužku odpovídající velikosti o známé koncentraci.

Měření koncentrace nukleových kyselin na spektrofotometru se provádí měřením extinkce při vlnové délce 260 nm. Při 260 nm odpovídá jeden stupeň optické denzity (OD) 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA (resp. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA). Tedy $c_{\text{DNA}} = 50 \cdot A_{260}$ a $c_{\text{RNA}} = 40 \cdot A_{260}$, kde c je koncentrace v $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Reverzní transkripce a PCR

Reverzní transkripce

Celkový objem reakční směsi pro 1 vzorek RNA o objemu 3,75 μl (0,5-1,25 μg RNA) byl 10 μl . Reakční roztok (Master mix) pro jeden vzorek obsahoval: 2 μl 5 \times RTpufr, 1 μl DTT (dithiotreitol, 100 mM), 0,5 μl dNTP (směs ATP, CTP, GTP a TTP po 10 mM), 0,25 μl RNasin (40 U/ μl) a 0,5 μl RT Super Script II (200 U/ μl).

Do zkumavek byly napipetovány 2 μl hexamerů (25pmol/ μl) a 3,75 μl RNA. Po promíchání byl vzorek inkubován 5 min. při 70° C a potom zchlazen v ledové lázni. (Nutno dodržet přesný čas, protože by mohlo dojít k degradaci RNA. Teplota nesmí překročit 70° C). K směsi bylo přidáno 4,25 μl master mixu. Vzorek byl mírně promíchán (ne pomocí vortexu) a zcentrifugován. Následovala inkubace 13 minut při 25° C a 1,5 hod při

42° C. Vzorek byl denaturován 3 minuty při 94° C, zchlazen v ledové lázni a krátce zcentrifugován.

PCR – hladina *BCR-ABL*

Hladina transkriptu *BCR-ABL* byla stanovována kompetitivní PCR s exogenním standardem získaným z buněčných linií vždy s opačnou přestavbou, než ve sledovaném vzorku (b3a2 resp. b2a2). To umožnilo rozlišit produkty PCR na elektroforetogramu a vzhledem k použití ředící řady kompetitoru o známé koncentraci doplněné vždy stejným množstvím sledovaného templátu stanovit bod ekvivalence a tedy i koncentraci *BCR-ABL* ve sledovaném PCR templátu. Použité buněčné linie jsou: K562 (přestavba b3a2) a BV172 (b2a2). Kompetitory byly smíchány se vzorky na úrovni buněčných lyzátů, což eliminovalo vliv variability v izolaci RNA a reverzní transkripci.

Rakční směs, primery a amplifikační podmínky byly stejné, jako v metodě sledování poměru *BCR-ABL/BCR*, jejíž popis následuje.

PCR – poměr *BCR-ABL/BCR*

Poměr množství transkriptu *BCR-ABL* k množství transkriptu *BCR* byl stanovován metodou RT-PCR s interním endogenním standardem, transkriptem genu *BCR*. Transkript *BCR* vzniká na homologním chromozomu 22 nepostiženém Ph translokací. Templáty *BCR* a *BCR-ABL* mají částečně shodné nukleotidové sekvence a sense primer je navržen tak, aby nasedal do této společné sekvence. To je jedním z předpokladů zachování stejné amplifikační účinnosti. Při koamplifikaci dochází ke kompetici. Tato metoda je v jedné reakci jak kompetitivní, tak i komparativní (porovnání exprese dvou genů).

Reakční směs byla smíchána z 16,875 µl RNA vody, 5 µl Taq polymerázového pufru s Mg (1,5mM), 0,5 µl dNTP (10mM), 0,25 µl primerů BCR-2-S, ABL-2-AS, BCR-4-AS (všechny 50 µM), a 0,125 µl Taq polymerázy (0,025 U/µl). Primery BCR-2-S byly fluorescenčně značeny (HEX: hexachloro-6-carboxy-fluorescein). K 23 µl směsi, byly přidány 2 µl cDNA. Všechny vzorky byly testovány v paralelách.

Vzorky byly amplifikovány v cycleru Perkin Elmer 480, vyhřátém na 94°C. Amplifikace probíhala dle programu: 3 minuty při 95°C, 2 minuty při 57°C, 2 minuty při 72°C, pak 35 cyklů: 1 minutu při 94°C, 1,5 minuty při 57°C, 1,5 minuty při 72°C, a nakonec 7 minut při 72°C, pak následovalo chlazení. Vzorky byly uchovávány v chladničce při 4°C.

PCR primery:

sense primer cílený do exonu b2 *BCR* genu (BCR-2-S) [Izraeli et Lion, 1991]
5'TTCAGAAGCTTCTCCCTG 3'

antisense primer cílený do exonu a2 genu *ABL* (ABL-2-AS) [Izraeli et Lion, 1991]
5'CTCCACACTGGCACAAAAT 3'

antisense primer cílený do exonu b4 genu *BCR* (BCR-4-AS) [Moravcová, et al., 1998b] 5'CCTCCTTGGGGATCTTCG 3'.

Amplifikací vznikají produkty o délce 252 b (b2a2), 327 b (b3a2) a standard, produkt o délce 361 b, odpovídající transkriptu *BCR* genu.

Kapilární elektroforéza

PCR produkty byly separovány pomocí kapilární elektroforézy. K 12 μ l formamidu bylo přidáno 0,5 μ l markeru Tamra a 1 μ l PCR produktů. Po denaturaci 3 minuty při 95°C byly vzorky zchlazeny na ledu. Produkty PCR byly separovány v přístroji ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, USA), v pufru POP 4 výrobce. Vyhodnocování bylo prováděno pomocí softwaru GeneScan 2.1. Poměr *BCR-ABL* k *BCR* (hodnota R) byl stanoven z průměru hodnot v paralelách. Senzitivita detekce transkriptu *BCR-ABL* je 5 %.

PCR v reálném čase

PCR v reálném čase umožňuje sledování přírůstku produktů po celou dobu amplifikace. Tak je možné ověřit amplifikační účinnost a stanovovat koncentraci produktů v exponenciální fázi PCR. V této práci bylo použito kvantifikace pomocí externí kalibrační přímky a standardizace dat pomocí stabilně exprimovaných kontrolních genů.

Reakce

PCR v reálném čase byla prováděna na stroji Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sydney, Australie). Jako detekční systém byl pro svoji univerzálnost zvolen SYBR Green I, fluorescenční barvivo interkalující do dsDNA. Měření fluorescence, přímo závislé na množství dsDNA (a tedy vznikajících produktů PCR) probíhá v každém z amplifikačních cyklů bezprostředně po elongaci. Měření fluorescence probíhá při teplotě, při které jsou homo- a heteroduplexy primerů denaturovány a tak nedochází k ovlivnění kvantifikace nespecifickým signálem. Zároveň byly všechny reakce optimalizovány tak, aby nevznikaly nespecifické PCR produkty, které by tvořily falešný pozitivní signál. To bylo ověřeno analýzou křivky tání (Rotor-Gene 6, Corbett Research, Sydney, Australie).

Reakční směs o celkovém objemu 20 μ l obsahovala: 12,6 μ l H₂O, 2 μ l 10 \times FastTaq polymerase buffer (konečná koncentrace 100 \times), 2,8 μ l 25mM MgCl₂ (konečná koncentrace 3,5mM), 0,4 μ l 10mM dNTP (konečná koncentrace 0,2mM), 2 \times 0,1 μ l 50 μ M primer (konečná koncentrace 0,05 μ M), 0,8 μ l 800 \times SYBR Green (konečná koncentrace 2.10⁴ \times), 0,2 μ l (5U/ μ l) FastTaq polymerase (1U/reakci) a 1 μ l cDNA. Sekvence primerů jsou v tabulce 2.

Primer	Sekvence (5'→3')	Velikost amplikonu [b]	Zdroj/použitý software
B2M _{up}	GAGTATGCCTGCCGTGTG		
B2M _{low}	AATCCAAATGCGGCATCT	109	[Pallisgaard, et al. 1999]
GUS _{up}	CTGTCAAGGGCAGTAACCTGT		
GUS _{low}	AGATAGGCAGGGCGTTCGT	154	Vector NTI
TBP _{up}	AGAGAGCCACGAACCACGG		
TBP _{low}	TCACAGCTCCCCACCATATTC	176	Vector NTI
AH _{Iup}	CTGTACAGAGGTGATACGTTT		
AH _{Ilow}	GACTGTTGTGAGGAACTGCTG	87	[Jiang, et al., 2004]
MMP8 _{up}	AAAGTTCTACCAATTACCAAGCAA		
MMP8 _{low}	TGTGGGTATAGTTTCGAATCC	254	Vector NTI
PBP _{up}	TAGACAGTGACTTGTATGCTG		
PBP _{low}	ATCCTTCAGTGTGGCT	143	Vector NTI

Tab. 2. Tabulka primerů pro PCR v reálném čase pro 3 kontrolní a 3 sledované geny. Vector NTI- Vector NTI 8 Suite, InforMax, Bethesda, USA.

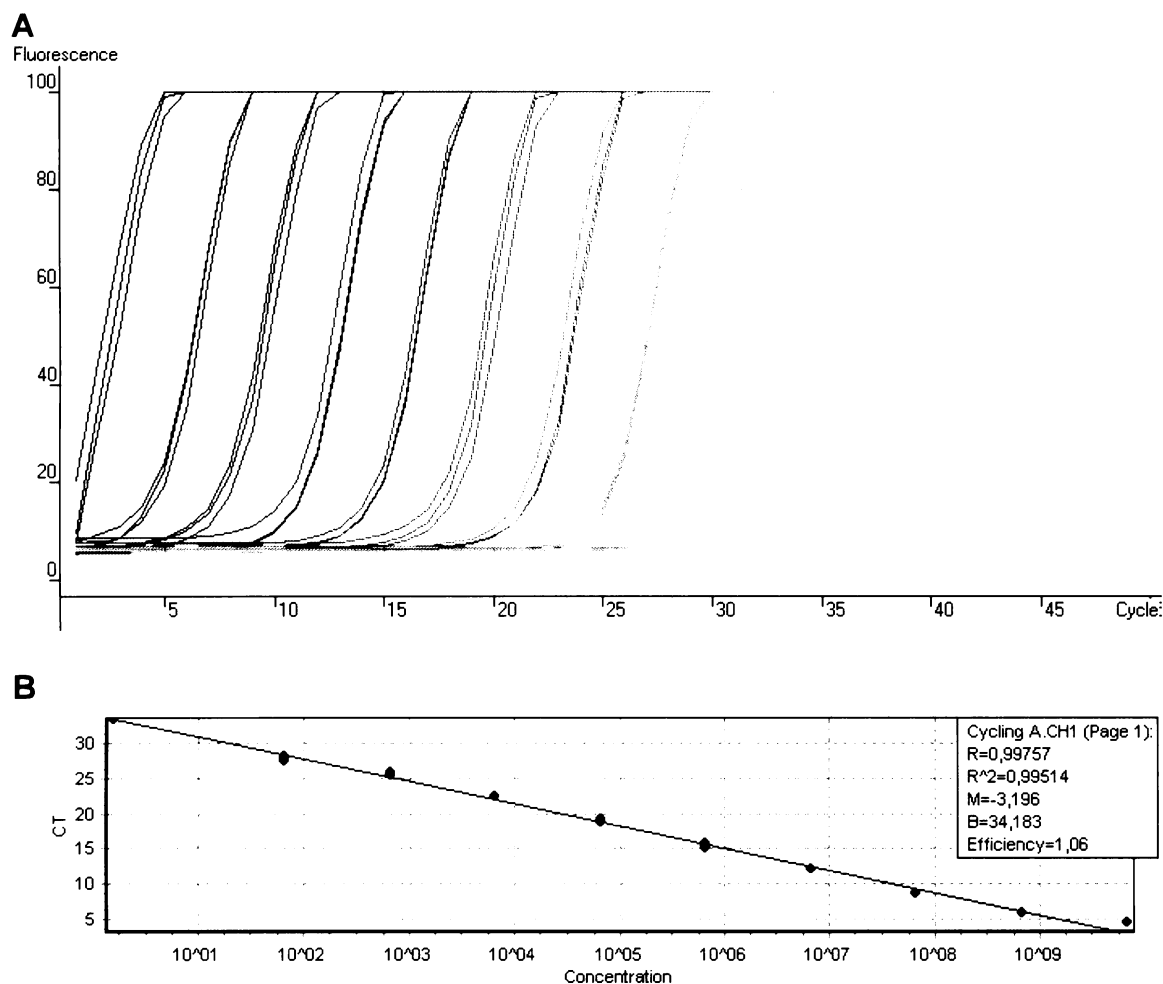
Reakční podmínky byly optimalizovány tak, aby amplifikace všech genů probíhala za stejných podmínek, což umožnilo testovat abundanci všech šesti transkriptů v jediném PCR běhu. Reakční podmínky ukazuje tabulka 3.

Program	Segment	Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]	Měření fluorescence
Denaturation Amplification		1	95	240	
		50			
	Denaturation		95	25	
	Annealing		57	25	
	Elongation		72	25	Ano
Melting Curve		1	50-99 ¹	po 5	Ano

Tab. 3. Tabulka reakčních podmínek PCR v reálném čase. ¹ Změna teploty po jednom stupni.

Příprava standardů

Standardy pro kalibrační křivky byly, kromě standardu pro beta-2-mikroglobulin, připraveny PCR amplifikací a izolací PCR produktů. K izolaci byl použit kit QuiaQuick Gel Extraction Kit (Quiagen, Crawley, UK). Standard pro beta-2-mikroglobulin byl používán ve formě plazmidu (poskytl Mgr. Polák).



Obr. 5. Ukázka amplifikace standardu pro kalibrační přímku.

A - Nárůst fluorescence v deseti triplikátech deseti řádů koncentrací templátů. Na ose x jsou vyneseny počty cyklů, na ose y relativní intenzita fluorescence. Červeně negativní kontrola (amplifikace pouze dimerů primerů).

B - Kalibrační přímka.

Analýza

Pro kvantifikaci pomocí externí kalibrační přímky, bylo nejprve třeba připravit kalibrační přímky. Ty vznikly z reakcí, kde byly jako templát použity standardy v deseti ředěních pokrývající deset řádů koncentrace a měření bylo prováděno ve třech paralelách (Obr.

5). Pro externí kalibraci bylo také nutné ověřit, že účinnost amplifikace je stejná, nezávisle na typu templátu. To bylo ověřeno pomocí software Rotor-Gene 6.

Pro analýzu stability exprese genů byl použit soubor maker do programu MS Excel, který se jmenuje GeNorm [Vandesompele, et al., 2002]. GeNorm určuje míru stability (označovanou M) daných genů v souboru na základě průměrné variability párového testu vždy jednoho genu se všemi ostatními. Nižší M znamená stabilnější expresi genu.

CGH Array

Pro analýzu genomové stability byla zavedena metoda CGH Array (comparative genomic hybridization array). Použitým, a jediným dostupným, systémem byl GenoSensor™ Array 300 firmy Vysis (Vysis, Des Plaines, USA). Tato metoda, založená na principu CGH na úrovni macroarrayí porovnává četnost vybraných sekvencí genomové DNA vzorku s kontrolou pomocí porovnání fluorescečních signálů fluoresceinem značených DNA fragmentů. Jednotlivé arraye jsou tvořeny sadou 287 lokusů lidského genomu, jejichž sekvence jsou v podobě DNA klonů natištěny v triplikátech na hybridizační sklíčko. Jedná se o vybrané oblasti genomu tak, aby jednak přibližně pokrývaly celý genom a zároveň aby reprezentovaly místa, o kterých je známo, že mohou hrát významnou roli v onkogenezi. Součástí této sady lokusů jsou i oblasti na chromozomech X a Y, které slouží jako kontrola správné hybridizace (testovaný a kontrolní vzorek jsou vybírány tak, aby se jednalo vždy o dvojici muž-žena).

Průběh jednotlivých experimentů spočívá v izolaci DNA z testovaného vzorku (leukocyty izolované z periferní krve), ověření její kvality a změření koncentrace a amplifikaci s fluoresceinem Cy-3 (Cyanine-3) značenými nukleotidy (Cy-3 dCTP). Jedná se o reverzní transkripci o složení reakční směsi: 4 µl (1 µg) DNA, 41,6 µl TE pufr, 40 µl 2,5× Random Priming Mix, 10 µl GenoSensor Array 300 Nucleotide Mix, 2,4 µl 1 mM Cy-3 dCTP a 2 µl RT Klenow. Podobně byla značena pomocí Cy-5 (Cyanine-5) dCTP kontrolní DNA dodávaná výrobcem. Poté byly obě DNA částečně štěpeny DNázou (k 100 µl vzorku je přidáno 17 µl DNázového reakčního pufru a 3 µl DNAase Amp Grade; reakce probíhala hodinu při 15°C a byla ukončena přidáním 6 µl Stop Pufru) a naštěpená DNA byla purifikována pomocí kolonek (Amersham Biosciences, Vienna, Austria). Po opětovném ověření kvality takto vzniklých vzorků pomocí elektroforézy, byly oba společně s hybridizačním puftrem aplikovány na hybridizační sklo. Po 72 hodinové hybridizaci a omytí (3× 10 min. 50% roztokem formamid/10× SSC při 40°C a 4× 5 min. 1× SSC (20× SSC je roztok 175,3

g NaCl a 88,2 g Na₃citrát·2H₂O v 1 l H₂O) hybridizačních skel bylo aplikováno DAPI, DNA kontrastní fluorescenční bravivo. Arraye byly skenovány a analyzovány pomocí GenoSensor Reader systému (GenoSensor™ Reader, Vysis, Des Plaines, USA) (Obr. 6). Metoda byla zaváděna ve spolupráci s Hemato-onkologickou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc (Prof. M. Jarošová, PhD), kde bylo prováděno skenování skel.



Obr. 6. Ukázka CGH arraye. Snímek Cy-5 a Cy-3 značené DNA na jedné arrayi. Lokusy jsou přítomny v triplikátech pod sebou.

cDNA macroarray

Metoda je založena na hybridizaci komplementárních úseků nukleových kyselin. Na pevný nosič je vázána próba a k ní hybridizuje značená cílová sekvence v roztoku. Dle typu značení je pak kvantitativně odečten signál odpovídající svou intenzitou množství cílové sekvence ve vzorku.

Pro naše experimenty byl zvolen systém Atlas™ Human Cancer cDNA Expression Array od firmy Clontech (Clontech, Mountain View, USA), čítající 597 genů.

Po prvním kroku standardní izolace RNA následoval druhý krok, degradace potenciálních zbytků DNA štěpením DNazou. K 250 µl RNA bylo přidáno 50 µl 10×DNazového pufru, 25 µl DNasa I (1 U/µl) a 175 µl TK H₂O. Po promíchání následovala inkubace 30 min. při 37°C a po té bylo přidáno 50 µl 10× ředěného terminačního mixu. Z této směsi byla opět izolována RNA.

Pomocí reverzní transkripce byla RNA přepsána do ^{32}P dATP značené cDNA. K reakční směsi (2 μl 5 \times pufr, 1 μl 10 \times dNTP, 0,5 μl DTT) bylo přidáno 1 μl MMLV a 3,5 μl ^{32}P dATP, zatím co směs 2 μl RNA (2-5 μg) a 1 μl CDS primerů byla inkubována 2 min. při 70 $^{\circ}\text{C}$ a 2 min. při 50 $^{\circ}\text{C}$. K RNA s primery bylo přidáno 8 μl reakční směsi a nyní kompletní reakční směs byla inkubována 25 min. při 50 $^{\circ}\text{C}$. Reakce byla ukončena přidáním 1 μl terminačního mixu.

Značená cDNA byla z reakční směsi izolována kolonovou chromatografií pomocí Atlas NucleoSpin[®] Extraction Kitu.

K takto vzniklé sondě (200 μl) bylo přidáno 22 μl 10 \times denaturačního roztoku a sonda byla inkubována 20 min. při 68 $^{\circ}\text{C}$. Dále bylo přidáno 5 μl Cot-1 DNA a 225 μl 2 \times neutralizačního roztoku a směs byla inkubována dalších 10 min. při stejné teplotě. Takto připravená sonda byla smíchána s 5 ml hybridizačního roztoku (s již přidanými 50 μl salmon DNA) a celá směs pak převedena do hybridizačních tub s nylonovými membránami samotných array, které již byly prehybridizovány směsí hybridizačního roztoku s 50 μl salmon DNA po 30 min. při 68 $^{\circ}\text{C}$. Následovala hybridizace 10-16 hodin při 68 $^{\circ}\text{C}$.

Po hybridizaci byly membrány promyty 3 \times 30 min. při 68 $^{\circ}\text{C}$ v roztoku WS I (2 \times SSC, 1% SDS) a 1 \times 30 min. při 68 $^{\circ}\text{C}$ v roztoku WS II (0,1 \times SSC, 0,5% SDS). Na závěr pak ještě 5 minut při pokojové teplotě v roztoku 2 \times SSC. 10% SDS byl roztok 100 g SDS v 1 l H₂O. Membrány byly exponovány na Kodak BioMax MS-1 filmy. Příklad arraye je na Obr. 7.



Obr. 7. Ukázka cDNA arraye. Array je rozdělena do 6 bloků A-F, každý o sedmi sloupcích a řádcích a-n. K tomu ještě přistupuje sada „housekeeping“ genů dole. Zcela dole a vpravo jsou řady kontrolních bodů sloužících k správné orientaci arraye při analýze.

Jako reference normální exprese sloužil směsný normál z leukocytů 12-ti zdravých jedinců. Mezi nimi bylo 6 mužů (M) a 6 žen (Ž) rozdělených po dvojicích rovnoměrně do tří věkových kategorií: 4 jedinci (2 M a 2 Ž) do 25-ti let věku, 4 jedinci od 25 do 45 let a 4 jedinci nad 45 let věku. Směsný normál byl tvořen smícháním buněčných lysátů, RNA byla izolována již ze směsi.

Analýza

Radiogramy byly skenovány na přístroji (Epson Perfection 4990 PHOTO, Epson, Düsseldorf, Německo) v rozlišení 600 dpi. Následně byla provedena analýza pomocí softwaru AtlasImage 2.7 (BD-Bioscience Clontech, Palo Alto, USA). Pomocí tohoto programu byly jednotlivé body odpovídající genům lokalizovány do odpovídající mřížky a byla provedena denzitometrická analýza. Funkce pro normalizaci dat nebyly využity. Surová data denzitometrické analýzy byla exportována do textového souboru a další analýza byla prováděna v programu Calc (OpenOffice.org). Data byla normalizována (transformace dat v jednotlivých errayích do intervalu $<0;1>$) a takto normalizované hodnoty byly pak vyděleny odpovídajícími hodnotami normalizovaného standardu. Tyto poměry byly logaritmovány (\log_2) a exportovány pro další analýzu pomocí programu Genesis [Sturn, et al., 2002].

Statistické metody

Pro analýzu rozptylu byl použit Kruskal-Wallisův test, který je vhodný v případech, kdy nelze vycházet z předpokladu, že data jsou normálně rozdělena (hladiny transkriptů *BCR-ABL*, poměr *BCR-ABL/BCR*, *AH11*, *MMP8* a *PBP* ve skupinách vzorků s různou odpovědí na léčbu). Pomocí Mann Whitneyova testu byla testována shoda rozdělení pro dva nezávislé výběry, které nemusí mít normální rozdělení (porovnání exprese *PBP* ve dvou skupinách).

Pro analýzu stability exprese kontrolních genů byl použit program GeNorm (sada marker pro MS Excel). Ten určuje stabilitu exprese kontrolního genu pomocí průměrné variability párových testů s ostatními kontrolními geny [Vandesompele, et al., 2002].

Shlukové analýzy dat z cDNA arrayí byly prováděny pomocí programu Genesis [Sturn, et al., 2002]. Vybrané analýzy byly: hierarchická shluková analýza a analýza hlavních komponent.

VÝSLEDKY

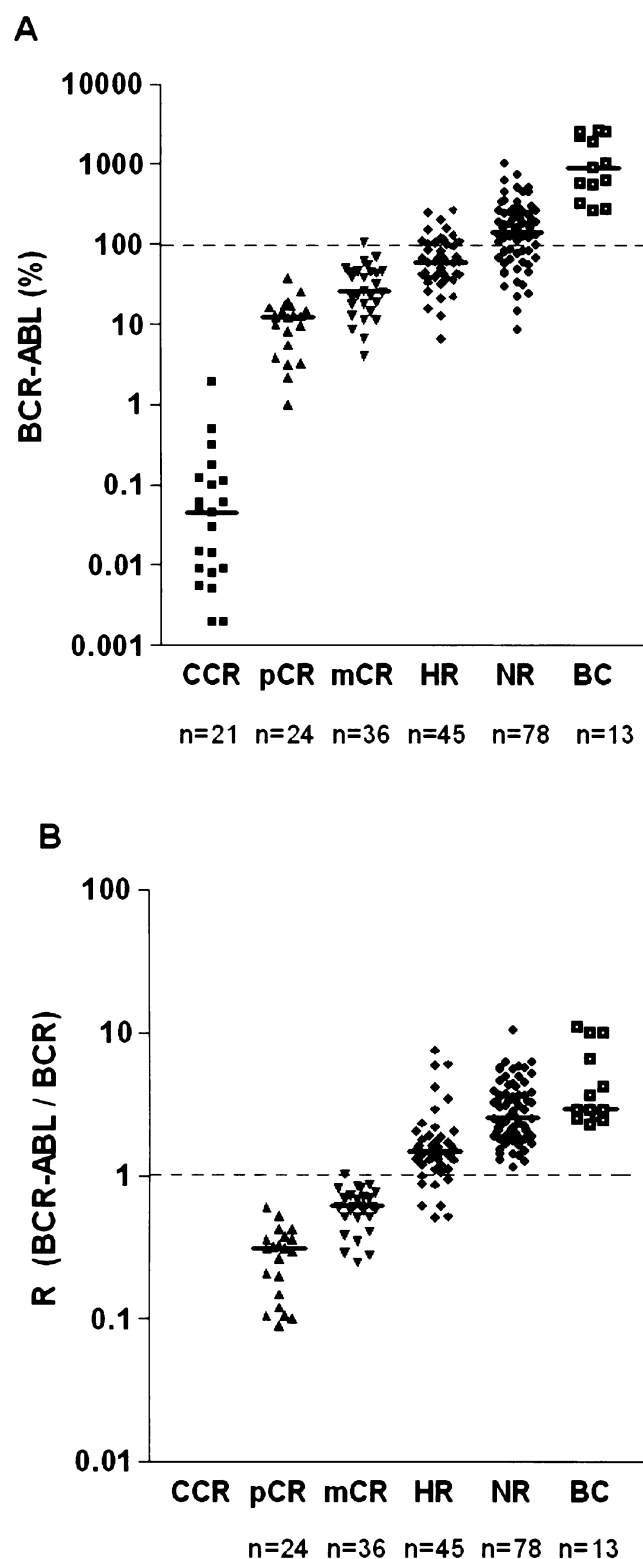
Exprese genu *BCR-ABL* a poměr *BCR-ABL/BCR*

Při snaze analyzovat genovou expresi v leukocytech pacientů s CML bylo přirozeným výchozím bodem sledování hladiny transkriptu fúzního genu *BCR-ABL*, který je pro CML příznačný. Bylo porovnáváno sledování hladiny transkriptu *BCR-ABL* a sledování poměru *BCR-ABL* ku normálnímu *BCR* (R) [Moravcová, et al., 1998; Moravcová, et al., 1998b]. Pro monitorování *BCR-ABL* a R byly vybírány vzorky pacientů s různou odpovědí na léčbu CML na základě klinických, hematologických a cytogenetických kritérií (popis odpovědí viz. Úvod). Výsledky tohoto monitorování posloužily jako další (molekulární) kritéria při výběru vzorků pro jiné analýzy.

Hladiny *BCR-ABL* a R byly sledovány ve 217 vzorcích 48 pacientů v průběhu léčby [Moravcová, et al., 2005]. Bylo zjištěno, že hladina transkripů *BCR-ABL* i R statisticky významně koreluje s odpovědí na léčbu (obr. 8). Hladina *BCR-ABL* < 100 % a R < 1 ukazovaly na dobrou odpověď, *BCR-ABL* > 100 % a R > 1 ukazovaly na špatnou odpověď na léčbu.

Během monitorování se ale ukázalo, že několik pacientů neodpovídajících, nebo slabě odpovídajících na léčbu má hladinu *BCR-ABL* relativně nízkou (< 100 %). V těchto případech tedy hladina *BCR-ABL* necharakterizuje dobře stav onemocnění. Kinetika poměru *BCR-ABL/BCR* však dobře korelovala se stavem onemocnění i u těchto pacientů. V těchto případech, kdy hladina *BCR-ABL* nekoreluje se špatnou odpovědí na léčbu lze předpokládat jiné, na *BCR-ABL* nezávislé mechanismy v CML.

Tyto výsledky posloužily jako výchozí bod pro další experimenty. Pomohly zejména při výběru materiálu a jeho zařazení do kategorií s různou odpovědí na léčbu CML.



Obr. 8. Porovnání hladiny transkriptu *BCR-ABL* a poměru *BCR-ABL/BCR* (R) u pacientů s různou odpovědí na léčbu CML. A - Hladiny transkriptu *BCR-ABL*. B - Poměr hladin transkriptů *BCR-ABL* a *BCR*. Mediány hodnot jsou pro různé odpovědi na léčbu signifikantně ($p < 0,0001$) rozdílné v obou případech (*BCR-ABL* i R). Hodnoty R pro CCR nebyly stanoveny (nedetekovaný signál *BCR-ABL* při fragmentační analýze). CCR, pCR a mCR-kompletní, částečná a minor cytogenetická odpověď; HR-hematologická odpověď; NR-bez odpovědi na léčbu; BC-blastická krize.

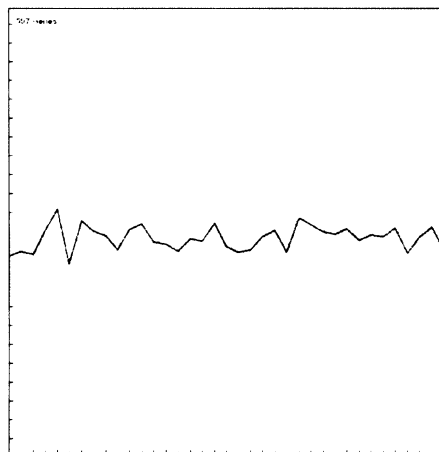
Charakterizace genové exprese v CML

Genová exprese byla pomocí macroarrays analyzována u 37 vzorků patnácti pacientů s CML. Popis jednotlivých vzorků ukazuje tabulka 4. Exprese genů ve vzorcích CML pacientů byla poměřována k expresi ve směsném normálu 12-ti zdravých jedinců, jak je popsáno výše.

Pacient	Pohlaví	Věk v diagnóze	Přestavba	Vzorek	Léčba	Odpověď na léčbu	Měsíce od diagnózy	Bcr-Abl [%]	R ¹	WBC [10 ⁹ /l]	PLT [10 ⁹ /l]	Blasty [%]	Ph* [%]	Přidatné aberace
A	M	38*	b3a2	A-1	TKB	BC	10*	277	-	277	N/A	-	-	-
B	M	36	b3a2	B-1	IFN/HU	NonR-dis	55	55	4,4	14	112	-	-	-
				B-2	IFN/HU	NonR	68	269	5,9	9	142	-	-	-
C	M	47	b3a2	C-1	IFN/HU	NonR	11	42	1,7	17	284	-	100	-
				C-2	IFN	mCR	20	10	0,4	4	123	-	84*	-
				C-3	IFN	NonR	40	82	1,9	14	251	-	100	der(17)t(3;17)
				C-4	IM	NonR	72	137	2,9	42	380	-	100	der(17)t(3;17)
				C-5	IM	HR	78	38	1,4	4	75	-	100	der(17)t(3;17)
				C-6	IM	NonR	85	608	-	80	33	-	100	der(17)t(3;17)
D	M	43	b2a2	D-1	IFN/HU	HR	66	143	0,4	7	70	-	-	-
				D-2	HU	NonR	99	267	1,3	23	164	-	-	-
				D-3	HU	NonR	130	185	1,7	13	166	-	-	-
E	M	28	b2a2	E-1	IFN/HU	NonR	21	19	1,1	7	121	-	100	-
				E-2	IFN/HU	NonR	51	554	1,8	6	100	-	100	-
				E-3	IFN/HU	NonR	55	568	2,7	129	183	1	100	-
F	M	21	b2a2	F-1	IFN/HU	NonR-dis	9	47*	2,3*	80	209	1	100	-
				F-2	IFN/HU	NonR	22	208	2,8	62	93	-	100	der7t(7;?)
				F-3	IM	HR	30	31	2,8	5	200	-	100	-
				F-4	ICT	NonR	33	635	3,7	67	117	-	100	der7t(7;?)
				F-5	ICT	NonR	35	390	2,9	11	78	-	100	der7t(7;?)
				F-6	ICT	BC	37	1000	2,9	8	21	76	100	der7t(7;?)
G	F	38	b2a2	G-1	IFN/HU	NonR	39	207	1,9	-	-	-	100	-
				G-2	IFN/HU	NonR	75	321	4,0	69	509	-	100	-
H	M	18*	b3a2	H-1	TKB	NonR	37*	17	0,8	-	-	43*	-	
I	F	59	b2a2	I-1	IFN/HU	HR	31	33	2,2	8	226	-	100	-
				I-2	HU	NonR	43	129	4,6	6	47	1	100	-
				I-3	IM	HR	58	27	1,1	2	193	-	100	-
				I-4	IM	HR	68	370	-	7	355	-	100	-
J	M	46	b3a2	J-1	ICT	BC	2	282	1,7	-	-	-	100	-
K	F	46	b3a2	K-1	HU	NonR-dis	35	-	2,1	105	337	-	100	-
				K-2	ICT	NonR	44	370	4,0	91	173	2	100	-
L	M	29	b2a2	L-1	IFN	NonR	40	159,0	4,8	30	184	1	-	-
				L-2	IFN	NonR	45	-	5,5	44	196	-	-	-
M	F	30	b3a2	M-1	HU	NonR	3	93	4,8	67	886	3	-	-
				M-2	IFN	NonR	12	44	2,6	20	293	-	100	-
N	F	18	b2a2	N-1	IFN/HU	NonR	10	-	-	68	572	1	-	-
O	F	39	b3a2	O-1	IFN/HU	NonR	5	114	1,7	10	181	-	100	-

Tab. 4. Tabulka vzorků pacientů analyzovaných pomocí expresních arrayů. M – muž, F – žena, IFN – interferon α , HU – hydroxyurea, IM – imatinib, TKB – transplantace hematopoetických kmenových buněk, ICT – intenzivní chemoterapie, tedy fludarabin, cytozin arabinosid a buď mitoxantron nebo G-CSF (granulocytární kolonie stimulující faktor), mCR – malá cytogenetická odpověď, HR – hematologická odpověď, NonR – bez odpovědi na léčbu (případně NonR-dis – s hladinou BCR-ABL nekorelující s klinickým stavem pacienta) a BC – blastická krize. pomlčka – nebylo stanoveno nebo není známo. ¹ R – poměr BCR-ABL/BCR, * – od TKB, + – průměr 2 okolních hodnot.

K charakterizaci genové exprese na transkriptomové úrovni byla zvolena metoda cDNA expresních macroarrayí firmy BD Biosciences, s 597 dvojicemi spotů, odpovídajícími 597 genům. Po prvotní denzitometrické analýze radiogramů a normalizaci dat byly provedeny shlukové analýzy pomocí programu Genesis. Celkový obraz úrovně exprese v jednotlivých vzorcích vzhledem k průměrné expresi v těchto vzorcích je na obr. 9.



Obr. 9. Celkový obraz rozložení exprese 597 genů v 37 vzorcích CML. Na ose x jsou jednotlivé vzorky, na ose y poměr exprese k normálu od $2^{-10,4}$ do $2^{10,4}$ v logaritmickém měřítku a šedé křivky odpovídají jednotlivým genům. Obrázek ukazuje přibližně rovnoměrné rozložení exprese kolem průměru v každém ze vzorků (fialová čára).

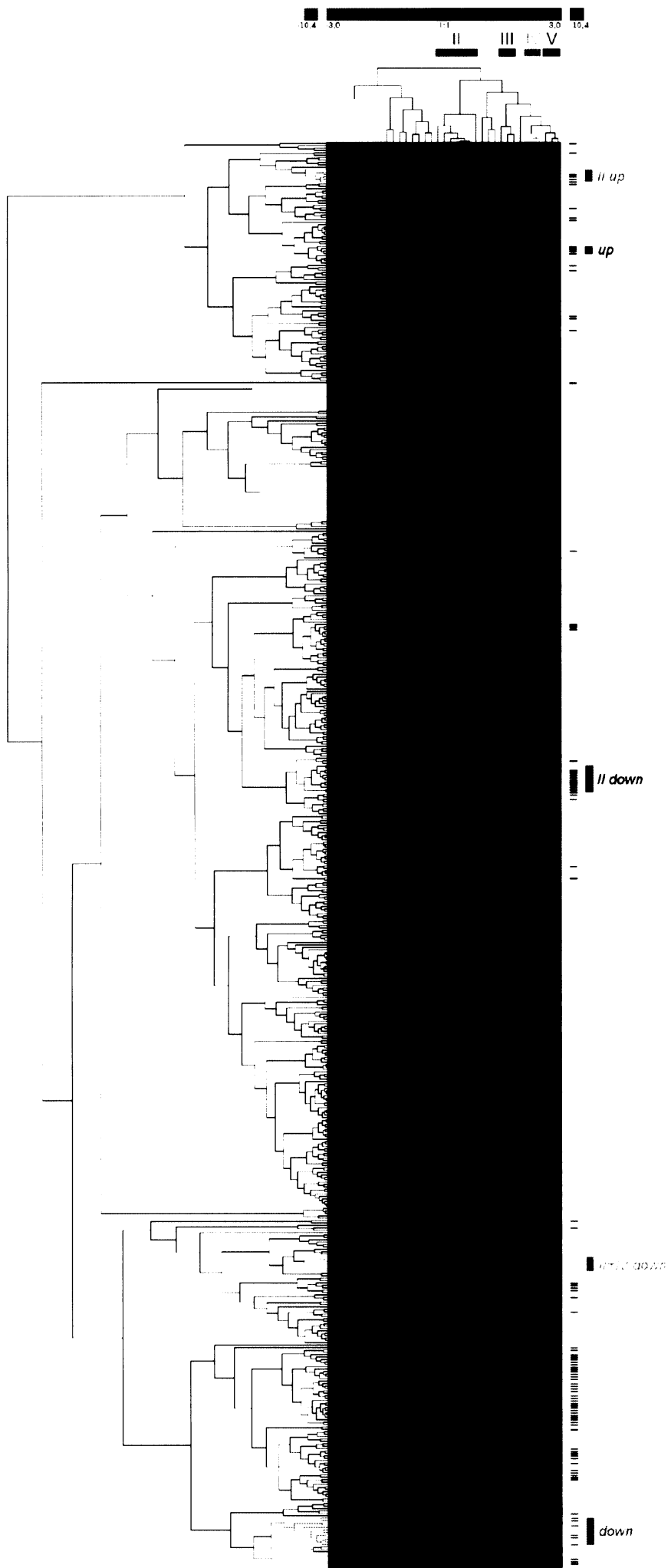
Hierarchická shluková analýza umožňuje sestavit dendrogram na základě podobnosti dat. Podobnost je stanovena jako vzdálenost n-rozměrných vektorů (zde hodnoty exprese jednoho genu ve všech vzorcích nebo všech genů v jednom vzorku). Pro tvorbu dendrogramů je tedy třeba nejprve utvořit matici vzdáleností všech jednotlivých vektorů a ty potom na základě slučovacích pravidel sloučit do dendogramu. Pro výpočet vzdálenosti vektorů byl v této práci použit Pearsonův korelační koeficient [Claverie J.M., 1999]. Pro slučování bylo použito pravidlo Average Linkage. Podobnost lze hledat jak mezi vzorky, tak mezi geny a výsledkem jsou pak shluky vzorků nebo genů nebo vzorků a genů. Jako shluk je označována skupina vzorků/genů v rámci vybrané větve dendogramu tak, že členové této skupiny jsou si vzájemně podobnější, než jak jsou podobní svému okolí. Celkový obraz shlukové analýzy současně vzorků i genů i s vyznačením jednotlivých shluků je na obr. 10.

Analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis), pracuje na principu redukce počtu proměnných v souboru dat. Dělá tak pomocí tzv. hlavních komponent, které pak popisují variabilitu proměnných. Pro grafické znázornění jsou hodnoty hlavních

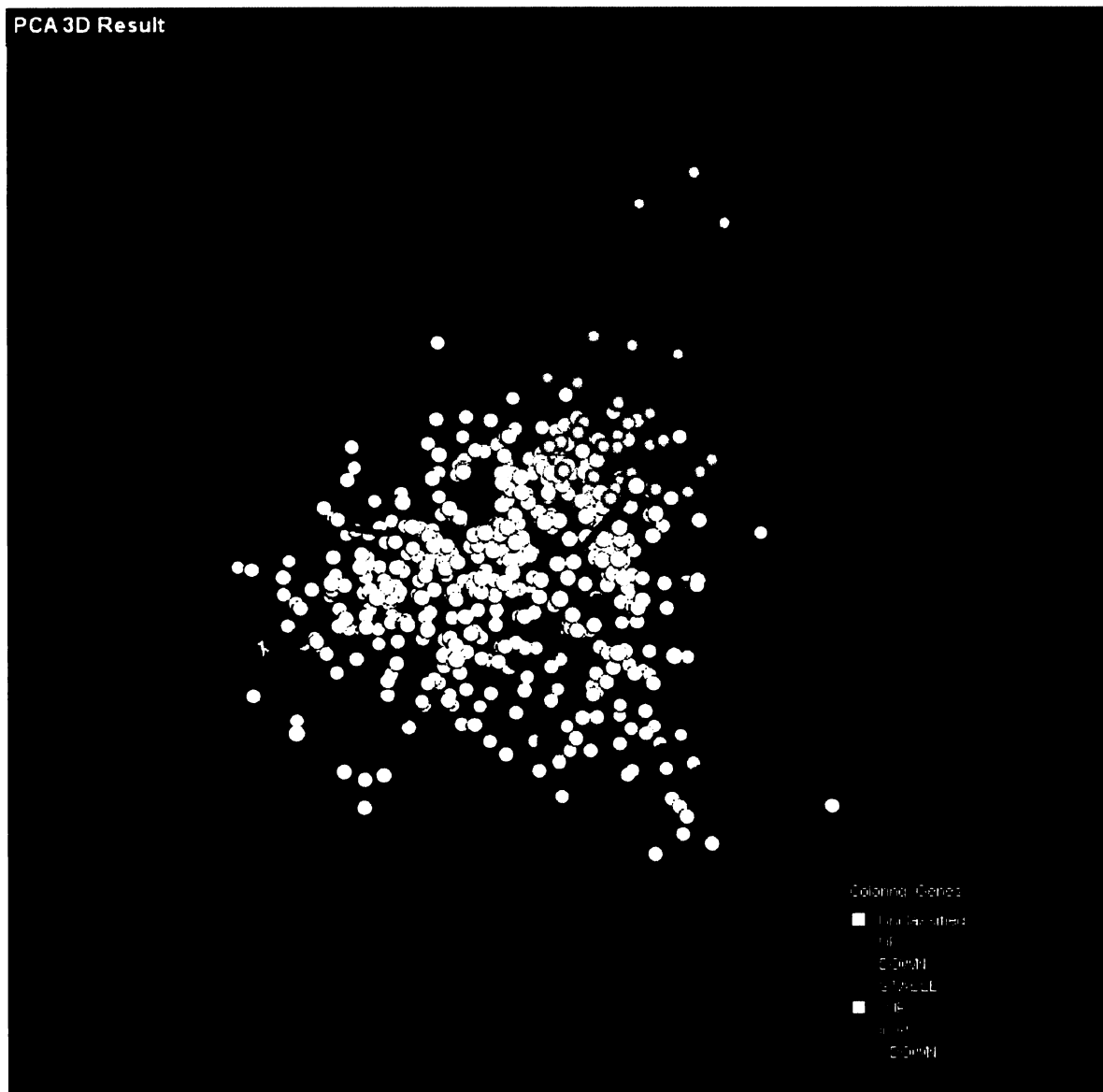
komponent vynášeny do souřadnicového systému, kde každá z os odpovídá jedné hlavní komponentě.

Analýza hlavních komponent ukázala podobné skupiny, jako hierarchické shlukování. Na obr. 10. je vidět překryv odpovídajících si skupin genů. Plné pruhy odpovídají shlukům z hierarchického shlukování, přerušované z PCA. Shluky s překryvem genů, které jsou jejich součástí si odpovídají barevně. Výstup PCA genů ukazuje obr. 11.

Obr. 10. Celkový obraz hierarchické shlukové analýzy vzorků a genů. Vzorky (jednotlivé arraye) jsou ve sloupcích, geny v řádcích. Zeleně je znázorněna downregulace, červeně upregulace. Míra změny exprese je úměrná jasnosti barvy, jak znázorňuje barevný proužek nahoře. Maximum jasnosti odpovídá $2^3 \cdot 2^{10.4}$ násobku exprese v normálu, takže jasně zelená odpovídá downregulaci 8× a více a jasně červená upregulaci 8× a více (až do maxima $2^{10.4}$). Sloupce odpovídají 37 vzorkům popsaným v tab. 4. Vodorovné barevné pruhy nahoře, označené římskými číslicemi znázorňují shluky vzorků I-V. Svislé barevné pruhy označují shluky genů, shora: II up (modře; název naznačuje, že jde o upregulaci genů zejména ve vzorcích shluku II, podobně tak i další názvy), up (červeně), I up a I up 2 (žlutě), II down (fialově), II+IV down (olivově zeleně), down (zeleně) a stable (šedě). Přerušované svislé pruhy vyznačují skupiny genů vydělených pomocí PCA. Podobné shluky v obou metodách si barevně odpovídají (popis PCA shluků je na obr. 11). Shluky jsou také znázorněny obarvením příslušné větve dendrogramu. Dendrogramy samotné jsou vyjádřením míry podobnosti jednotlivých vzorků/genů. Objekty uvnitř jedné větve dendrogramu (hierarchického stromu) jsou si navzájem podobnější, než jak jsou podobné ostatním objektům. Výška větve (u genů horizontální vzdálenost, u vzorků vertikální vzdálenost) v oblasti od jednoho k druhému větvení vyjadřuje míru „odlišnosti“ dané větve od druhé větve v rámci jednoho větvení.



Obr. 10. Celkový obraz hierarchické shlukové analýzy vzorků a genů.

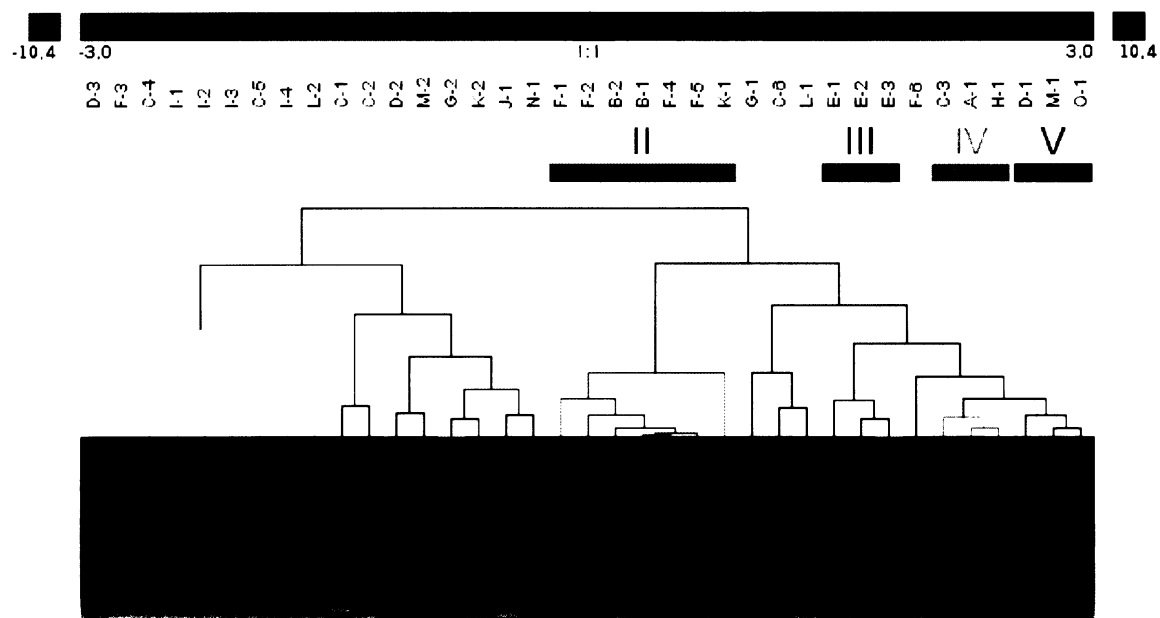


Obr. 11. Obrázek projekce PCA (Principal Component Analysis) genů do trojrozměrného prostoru. PCA se snaží popsat variabilitu všech proměnných souboru pomocí variability menšího množství nových proměnných, tzv. hlavních komponent. První tři z nich, popisující největší díl variability pak slouží jako osy pro vynášení bodů do trojrozměrného prostoru. Zde jednotlivé body odpovídají genům a vzdálenost v prostoru odpovídá míře „odlišnosti“ těchto genů navzájem. Orientace os je taková, aby byly dobře vidět pokud možno všechny barevně označené skupiny genů. Bílé body jsou geny nezařazené do žádné skupiny, ostatní značení je: UP a DOWN, geny upregulované či downregulované napříč všemi vzorky CML. STABLE-geny stejně exprimované ve všech vzorcích a zároveň bez rozdílu od exprese v normálu. I UP, geny upregulované u vzorků ze shluku I hierarchické shlukové analýzy. II UP resp. II DOWN, geny upregulované resp. downregulované ve vzorcích ze shluku II hierarchické shlukové analýzy (přesnější popis viz. text).

Charakterizace genové exprese v sadě 37 vzorků CML

Shluky vzorků pacientů s CML

Dendrogram hierarchické shlukové analýzy vzorků CML pacientů ukazuje obr. 12. Celkem bylo nalezeno 5 shluků vzorků, *I-V*.



Obr. 12. Detail dendrogramu vzorků hierarchické shlukové analýzy z obr. 10. Popis jednotlivých shluků *I-V* je uveden v textu.

Vzhledem ke stavu onemocnění byly nalezeny tři shluky: *I*, *IV* a *V*.

I, Tato skupina je tvořena 9 vzorky (C-4,5; D-3; F-3; I-1,2,3,4; L-2). Obsahuje 4 z celkového počtu 5-ti vzorků pacientů léčených imatinibem. Všechny tyto vzorky jsou z období hematologické odpovědi a dohromady je v této skupině 5 z 6-ti vzorků pacientů v hematologické odpovědi. Došlo tak k částečnému vyčlenění vzorků z období, kdy CML je ještě terapeuticky zvládnutelná a kde nedochází k progresi onemocnění. Zároveň je minimálně u části vzorků pravděpodobně inhibovaná kinázová funkce BCR-ABL a ta tedy pravděpodobně u těchto vzorků nemá vliv na rozvoj onemocnění.

IV, Shluk 3 vzorků (A-1; C-3; H-1) tří různých pacientů z období rozvinuté CML. V jednom případě jde o BC.

V, Tato skupina ukazuje na případy časně CML. Je tvořena třemi vzorky tří různých pacientů (D-1; M-1; O-1), z nichž dva jsou v období do pěti měsíců od zahájení léčby a jeden je pacientem s netypickým průběhem CML, kdy se prakticky nikdy nepodařilo dostat krevní obraz do rozmezí normálních hodnot. Všichni tři pacienti byli v tomto období léčeni hydroxyureou, případně v kombinaci s IFN.

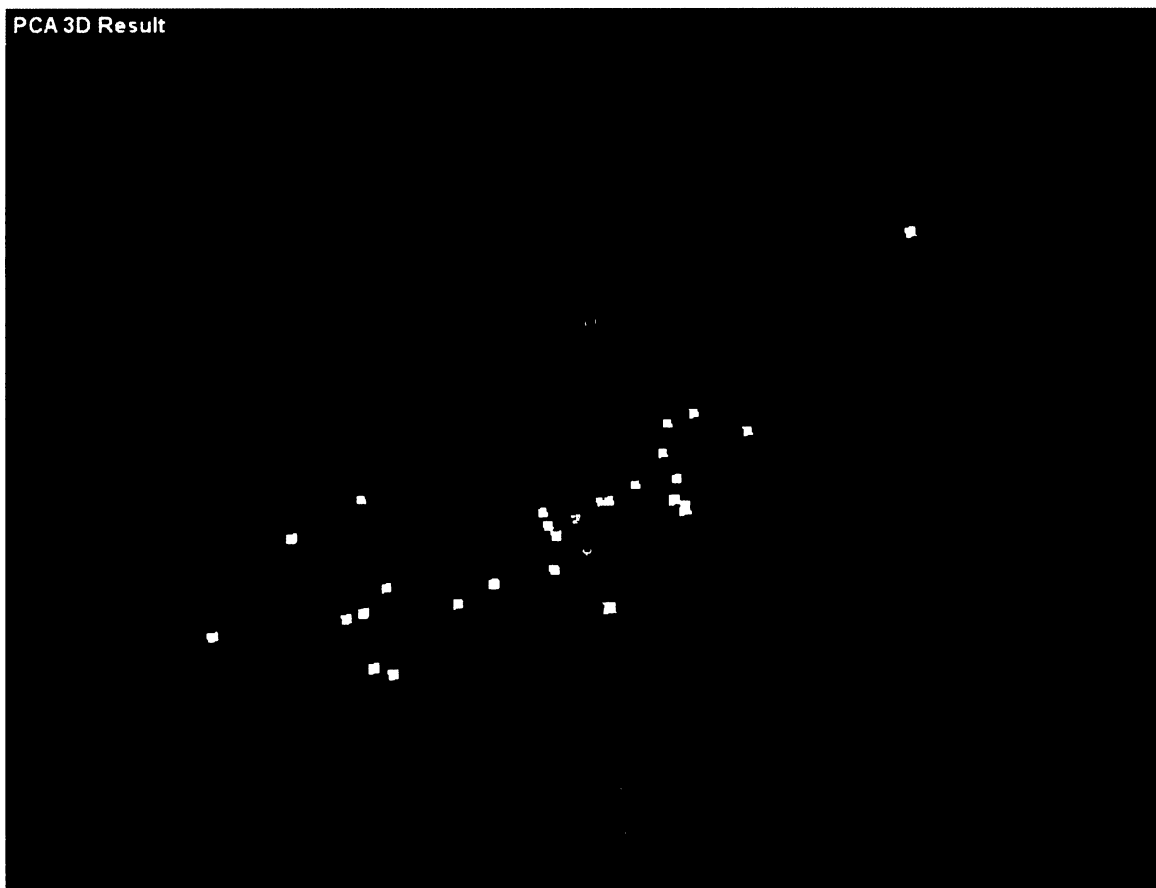
Kromě shluků ukazujících na stav onemocnění, byly charakterizovány také shluky ukazující spíše na typ CML.

III, Shluk tří vzorků jednoho pacienta s CML s oscilujícím hematologickým obrazem i hladinou transkriptů BCR-ABL (E-1,2,3). Jedná se o tzv. periodickou CML (PCML), která je pravděpodobně vyvolána léčbou hydroxyureou [Fortin et Mackey, 1999; Bennett et Grunwald, 2001].

II, Zajímavý shluk vzorků pacientů, u nichž hladina transkriptu *BCR-ABL* nekorelovala s klinickým stavem onemocnění (B-1,2; F-1,2,4,5; K-1). Takoví pacienti byli nalezeni už při rutinním monitorování hladiny *BCR-ABL*. V tomto shluku je 7 z 10 vzorků pacientů, u nichž se tato diskrepance objevila. V těchto případech se může jednat o CML s mechanismy nezávislými na *BCR-ABL*. Jak je popsáno dále, je u těchto vzorků exprese relativně velkého množství genů odlišná od ostatních vzorků CML.

PCA jasně vydělila skupinu vzorků, která svým složením odpovídá shluku II z hierarchické shlukové analýzy (obr. 13). První 3 hlavní komponenty PCA vzorků popisují 61,5 % (33,831 + 15,809 + 11,860) variability mezi sledovanými vzorky. Tyto tři hlavní komponenty tvoří osy při vynášení vzorků, jakožto bodů, do trojrozměrného prostoru.

Pomocí uvedených analýz nebyly nalezeny shluky vzorků se stejnou přestavbou *BCR-ABL* (b3a2 nebo b2a2) ani shluky vzorků pacientů stejného pohlaví.



Obr. 13. Obrázek projekce PCA (Principal Component Analysis) vzorků do trojrozměrného prostoru. Jednotlivé body odpovídají vzorkům uvedeným v tabulce 4. Sedm fialově označených vzorků odpovídá sedmi vzorkům shluku II z hierarchické shlukové analýzy.

Shluky genů

Geny uniformně exprimované v CML

Jedním z našich cílů bylo nalézt geny, které by byly charakteristické pro CML obecně. CML je známa svou heterogenitou [Ohmine, et al., 2001; Kantarjian, et al., 2003; Nowicki, et al., 2003; Yong, et al., 2006]. Přesto se podařilo nalézt dvě skupiny genů s expresí uniformně odlišnou od exprese u zdravých jedinců (obr. 10 a obr. 11). Pomocí hierarchického shlukování byly nalezeny tyto skupiny genů:

up, je skupina čtyř genů se zvýšenou expresí oproti kontrolní skupině zdravých jedinců. Patří sem gen pro matrix metaloproteázu-8 (MMP8)^a, ECM (extracellular matrix) remodelující enzym působící na ECM štěpením kolagenu. Aktivita MMP8 v hematologických onemocněních byla popsána [Bruchova, et al., 2002]. Dalším upregulovaným

a HGNC: 7175, Entrez Gene ID: 4317, RefSeq: NM_002424

genem je inhibitor apoptózy survivin. O overexpresi survivinu v CML se zmiňuje několik autorů [Hernandez-Boluda, et al., 2005; Carter, et al., 2006]. Urokináza, další z upregulovaných genů je aktivátor plazminogenu, který štěpí za vzniku plazminu, čímž stimuluje migraci buněk. Koncentrace urokinázy v krevní plazmě pacientů s CML byla popsána jako nízká [Rosc, et al., 2000], může tedy jít o posttranskripční regulaci v expresi urokinázy v CML. Posledním ze skupiny upregulovaných genů je gen pro interleukin 1-alfa (IL1A). IL1 může fungovat jako růstový faktor pro leukemické buňky a jeho inhibice byla testována jakožto možný léčebný postup pro CML [Estrov, et al., 1993].

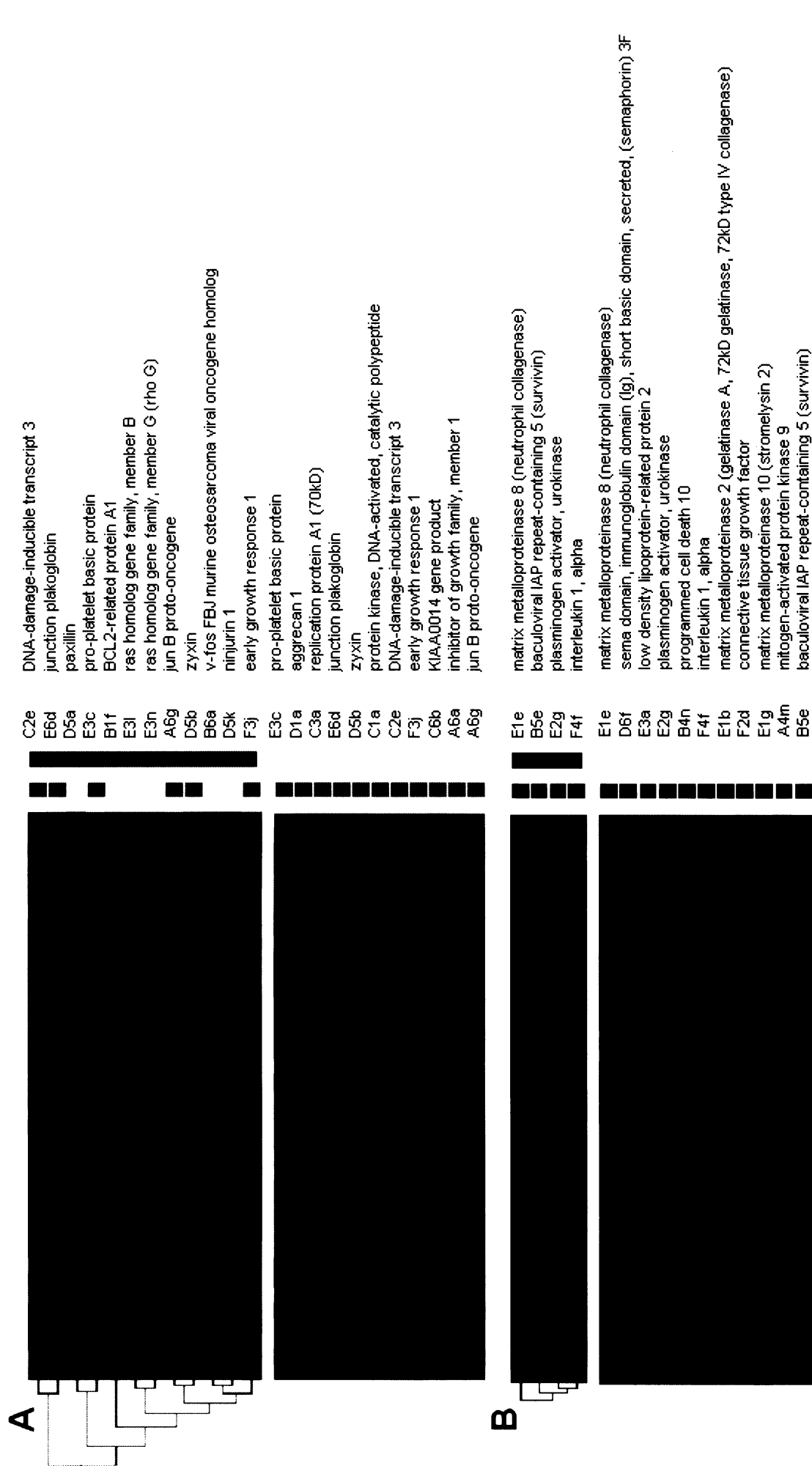
down, je skupina 12-ti genů s downregulovanou expresí ve sledovaných vzorcích. Patří sem pro-platelet basic protein (PBP)^a, který je prekurzorem proteinů: platelet basic protein (PBP), connective tissue-activating peptide III, beta-thromboglobulin a neutrophil-activating peptide-2. Produkty tohoto genu ovlivňují mimo jiné mitogenezi a tvorbu ECM [Castor, et al., 1983]. RhoB (ras homolog gene family, member B) a RhoG (ras homolog gene family, member G), další geny této skupiny, jsou malé GTP-vazebné proteiny ras rodiny. Downregulované byly také geny *JunB* a *FOS*, které jsou jednou z možných dvojic proteinů tvořících dimerní transkripční faktor AP-1 (activator protein 1). *JunB* funguje jako tumor supresor a oba geny byly popsány jako downregulované v CML [Szremska, et al., 2003; Radich, et al., 2006]. Dalšími členy této skupiny jsou například: zyxin, ninjurin 1 a early growth response 1 (EGR1).

Poslední skupinu tvoří geny, jejichž exprese je podobná ve všech vzorcích, ale která se neliší od normálu (*stable*, 8 genů). Jedná se o geny, které v CML patrně nehrají významnou roli a které by mohly pro svou stabilní expresi sloužit jako kontrolní geny v jiných metodách sledování genové exprese. Mezi těmito geny je i 5 z 9-ti genů označených výrobcem jako tzv. housekeeping geny.

Pomocí PCA analýzy byly nalezeny skupiny genů podobné skupinám z hierarchického shlukování: UP (11 genů), DOWN (11 genů) a STABLE (15 genů). Je zajímavé, že tyto skupiny leží přibližně na přímce (obr. 11), což potvrzuje jedinou proměnnou rozlišující tyto skupiny. Tou je hodnota odlišnosti exprese od normálu v jinak uniformně expri-movaných skupinách. První 3 hlavní komponenty PCA genů popisují 59,857 % (32,690 + 16,908 + 10,259) variability mezi geny.

Srovnání genů se zvýšenou a sníženou expresí v CML získaných pomocí hierarchického shlukování a PCA je na obr. 14.

a HGNC: 9240, Entrez Gene ID: 5473, RefSeq: NM_002704



Obr. 14. Porovnání shluků genů uniformně ale od normálu rozdílně exprimovaných v CML. A - downregulace B – upregulace. Vždy nahoře skupina získaná hierarchickou shlukovou analýzou a dole skupina získaná pomocí PCA. Na horních panelech je vidět průnik skupin genů v místech, kde je jak plná čára (hierarchické shlukování), tak barevný čtvereček (PCA).

Geny charakteristické pro shluk vzorků I

V rámci vzorků ze skupiny *I* (CML léčená IM a odpovídající na léčbu) byly hierarchickým shlukováním nalezeny dvě zajímavé skupiny genů s odlišnou expresí oproti ostatním vzorkům CML. Exprese genů obou skupin byla upregulovaná.

První skupina (*I up*) je tvořena 11 geny mezi které patří 3 růstové faktory: EGF (epidermal growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) a FGF12 (fibroblast growth factor 12). A také 2 interleukiny: IL9 a IL12A.

Druhá skupina (*I up2*) je tvořena 22 geny. Patří sem mimo jiné plazminogen, zymogen štěpený urokinázou (srov. *up cluster*) za vzniku proteázy plazminu. Plazmin štěpí složky ECM, fibronektin, vitronektin, fibrin a aktivuje některé z metaloproteáz [Skrzydłowska, et al., 2005; Murphy, et al., 1992]. Dále do této skupiny patří angiopoietin 1, podílející se na angiogenezi a udržující hematopoetické buňky v kostní dřeni v klidovém stavu [Arai, et al., 2004] a také *RND1* (Rho6), člen Rho rodiny GTPas.

Ve skupinách z PCA analýzy by těmito shlukům odpovídala skupina I UP (31 genů, obr. 11). Skupina I UP má však celou řadu genů v oblasti mimo *I up/I up 2*. Tato oblast je definovatelná spíše jako oblast s geny s downregulací exprese u jiných vzorků, než u vzorků ze skupiny *I* (tedy ne upregulace genů u vzorků ve skupině *I*).

Tabulka 5A obsahuje geny ze všech tří skupin (*I up*, *I up2* a I UP) a ukazuje na překryv mezi výsledky hierarchického shlukování a PCA. Mezi geny z obou typů analýz je například KDR (kinase insert domain receptor), receptor růstového faktoru VEGF (Vascular endothelial growth factor). U pacientů s CML byla nalezena zvýšená hladina VEGF v plazmě, což ukazuje na zvýšenou angiogenezi, která je typická pro maligní onemocnění obecně. Sekrece VEGF leukemickými buňkami je, při dobré odpovědi na léčbu, inhibována imatinibem [Di Raimondo, et al., 2001; Ebos, et al., 2002]. Na druhou stranu exprese KDR byla popsána jako zvýšená v buňkách pacientů s CML nezávisle na fázi onemocnění [Verstovsek, et al., 2003]. Dalšími geny přítomnými v obou skupinách jsou keratin 8, který je v karcinogenezi spojen s JNK1/c-Jun signální drahou [He, et al., 2002], a desmin, protein tvořící intermediární filamenta cytoskeletu.

Hier. PCA	Gen
A7l	keratin 8
A7n	desmin
B1m	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
C4m	patched homolog (Drosophila)
C6f	insulin-like growth factor binding protein 5
C6k	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
D1g	collagen, type I, alpha 2
D1l	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)
D3c	thrombospondin 1
D4a	integrin, alpha 7
D4e	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
D4g	integrin, beta 4
D4h	integrin, beta 5
D5l	L1 cell adhesion molecule (hydrocephalus, stenosis of aqueduct of Sylvius 1, MASA (mental retardation, aphasia, shuffling gait and adducted thumbs) syndrome, spastic paraplegia 1)
D5l	neural cell adhesion molecule 1
D5l	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
D6e	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F
D6g	TAX1; axonin-1/TAQ1
D6i	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
D6l	caveolin 1, caveolae protein, 22kD
D6m	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
D6n	fms-related tyrosine kinase 4
D7h	angiopoietin 1
D7k	fibroblast growth factor receptor 4
E1d	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uteme)
E2l	plasminogen
E2j	seme (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin; plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
E2k	seme (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
E2l	seme (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 5
E4a	GTP-binding protein
E4k	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma
E7c	desmocollin 2
E7e	ephrin-A5
E7h	ephrin-B3
E7j	ephrin type-A receptor 5 precursor; tyrosine-protein kinase receptor EHK1; EPH homology kinase-1; HEK7
E7k	EphB1
E7l	EphB2
E7m	EphB4
F1a	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)
F1h	bone morphogenetic protein 2
F1i	bone morphogenetic protein 3 (osteogenic)
F1l	bone morphogenetic protein 5
F1m	bone morphogenetic protein 6
F1n	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
F2b	quiescin Q6
F2c	ciliary neurotrophic factor
F2e	epidermal growth factor (beta-urogastrone)
F2h	endothelin 3
F2i	fibroblast growth factor 1 (acidic)
F2m	fibroblast growth factor 6
F2h	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)
F3c	fibroblast growth factor 12
F3m	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
F4n	interleukin 9
F5c	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
F5m	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
F6b	neurotrophin 3
F7l	interferon-gamma receptor (IFNGR)

Tab. 5. Porovnání shluků genů získaných PCA a hierarchickým shlukováním, A. Popis je u části C této tabulky.

Hier. PCA	Gen
	A11 cell division cycle 25C
	A3g cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
	B1i BCL2-antagonist of cell death
	B4g tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
	B4j RATS1
	B6j breast cancer 2, early onset
	B6n tumor protein p73
	C2a excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)
	C2n replication factor C (activator 1) 2 (40kD)
	C3f Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
	C3i Notch homolog 4 (Drosophila)
	C3k jagged 2
	C3n lunatic fringe homolog (Drosophila)
	C4i frizzled homolog 9 (Drosophila)
	C4l sonic hedgehog homolog (Drosophila)
	C5m v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
	D1k collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
	D2k netrin 2-like (chicken)
	D3f fibronectin 1
	D3g ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)
	D3j integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
	D6d sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
	D6h protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
	D7a frns-related tyrosine kinase 3
	D7j fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
	E1m matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
	E5k cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
	E6b catenin (cadherin-associated protein), alpha 2
	E7b desmocollin 3
	E7i EphA2
	F1b B-cell growth factor 1 (12kD)
	F1d nerve growth factor, beta polypeptide
	F1j growth differentiation factor 10
	F1k bone morphogenetic protein 4
	F2k fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2) oncogene homolog)
	F3a fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)
	F3g transforming growth factor, beta 2
	F4a hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
	F4h interleukin 2
	F4i interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
	F4m interleukin 7
	F5a interleukin 10
	F5d interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
	F5i interferon, alpha 10
	F6a serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
	F6g stromal cell-derived factor 1
	F6j T cell receptor alpha variable 14/delta variable 4
	F7d tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
	F7e tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)

Tab. 5. Porovnání shluků genů získaných PCA a hierarchickým shlukováním, B. Popis je u části C této tabulky.

Hier. PCA	Gen
	A1f cyclin-dependent kinase 6
	A3i cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
	A6c growth factor receptor-bound protein 2
	A7m vimentin
	B3a caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)
	B3c caspase 3, apoptosis-related cysteine protease
	B3d caspase 4, apoptosis-related cysteine protease
	B5h LPS-induced TNF-alpha factor
	B5l ras homolog gene family, member A
	B6c v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
	B6d Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
	C5c insulin-like growth factor 2 receptor
	C6n SEX gene
	D4k integrin, beta 8
	E3f non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in
	E5a Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
	E5b Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha

Tab. 5. Porovnání shluků genů získaných PCA a hierarchickým shlukováním, C. V prvním sloupci (Hier.) jsou geny v příslušných skupinách z hierarchického shlukování, ve druhém (PCA) z PCA. Ve sloupci „Gen“ je nejprve uvedeno umístění genu na Arreyi (6 bloků A-F, každý o sedmi sloupcích a řádcích a-n, plus blok G „housekeeping“ genů) a pak jeho název. **A** - Geny (58) upregulované ve shluku vzorků *I*, tedy skupiny *I up*, *I up2* a *I UP*. **B** - Geny (49) upregulované ve shluku vzorků *II*, tedy skupiny *II up* a *II UP*. **C** - Geny (17) downregulované ve shluku vzorků *II*, tedy skupiny *II down* a *II DOWN*. Barvy odpovídají shlukům na obr. 10. Názvy genů přítomných ve skupinách podle obou typů analýz jsou podbarveny příslušnou barvou.

Geny charakteristické pro shluk vzorků II

Shluková analýza genů ukázala také na zajímavé skupiny genů s expresí odlišnou ve skupině vzorků pacientů s hladinou fúzního transkriptu *BCR-ABL* nekorelující s klinickým obrazem pacienta (shluk *II*).

Hierarchickou shlukovou analýzou byly získány dvě skupiny genů. V první skupině (*II up*) jsou všechny geny upregulovány ve všech vzorcích ze skupiny *II*, zatímco u většiny ostatních vzorků upregulovány nejsou. Mezi šest genů této skupiny patří i *BAD* (BCL2-antagonist of cell death), proapoptotický protein tvořící heterodiméry s BclX, represorem apoptózy. Tím *BAD* tlumí účinky BclX, což může vést k apoptóze [Yang, et al., 1995]. *BAD* je ovšem inhibován proteinem Raf1, jehož exprese je v těchto vzorcích také zvýšena (Raf1 není ve skupině *II up*) [Wang, et al., 1996]. Jiný gen této skupiny je *RFC2* (replication factor C (activator 1) 2), 40kDa velká podjednotka multiproteinového komplexu RFC. Kromě své role v replikaci má *RFC2* zřejmě také úlohu v rozpoznávání abnormalit v DNA a postreplikačních opravách [Wang, et al., 2000].

II down, je skupina 12-ti genů jejichž exprese je downregulována u šesti ze sedmi vzorků shluku *II* a i v dalších 2 vzorcích pacientů s hladinou *BCR-ABL* nekorelující se stavem onemocnění. Tedy celkem v 8 z 10 všech takových vzorků. Mezi zástupce této skupiny patří vimentin, protein tvořící intermediární filamenta cytoskeletu. Dále je to RhoA (ras homolog gene family, member A), další z členů Rho rodiny malých GTPas. Patří sem i již zmíněný adaptorový protein GRB2, který přímo interaguje s *BCR-ABL* [Puil, et al., 1994]. Posledním zástupcem této skupiny je kaspáza 4 jeden z členů rodiny proteáz podílejících se na procesu apoptózy.

PCA ukázala na podobné dvě skupiny genů. *II UP* (47 genů), je skupina genů, která má kromě 4 zástupců shodných s geny v *II up*, také velký počet genů v oblasti, kde je upregulace exprese ve vzorcích ze shluku *II* méně výrazná (přerušovaný modrý pruh na obr. 10 vpravo dole). Druhá skupina, *II DOWN* (15 genů), má naopak většinu genů (10 z 15-ti) shodnou se shlukem *II down*.

Tabulky 5B a C opět obsahují geny zmíněných skupin a ukazují na překryvy mezi hierarchickým shlukováním a PCA. Mezi geny upregulované podle obou metod patří zmíněný *RFC2* a *TNFSF8* (tumor necrosis factor superfamily member 8). Mezi geny downregulované ve shluku *II* podle obou metod patří většina genů z obou skupin.

Jiné skupiny genů

K dalším zajímavým skupinám genů, zjištěným pomocí hierarchického shlukování, patří například skupina *II+IV_down* (7 genů). Jde o skupinu genů s nízkou transkripční aktivitou ve vzorcích ze shluků *II* (vzorky s nekorelující hladinou *BCR-ABL* s klinickým stavem pacienta) a *IV* (rozvinutá CML, včetně jedné BC) a navíc ještě v jednom vzorku BC (vzorek F-6, viz. tab. 4 a obr. 12). U ostatních vzorků byla exprese těchto genů většinou podobná normálu, nebo byla vyšší. Patří sem například gen *NOTCH2* (Notch homolog 2 (Drosophila)), domnělý tumor supresor [Leong et Karsan, 2006] a B-Raf (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), člen *BCR-ABL* aktivovatelné kaskády Rap1/B-Raf/ERK. Dalším z genů této skupiny je proapoptotická kaspáza-8 (*CASP8*), jejíž aktivaci (proteolýzou) v *BCR-ABL* buňkách podporuje imatinib [Fang, et al., 2000].

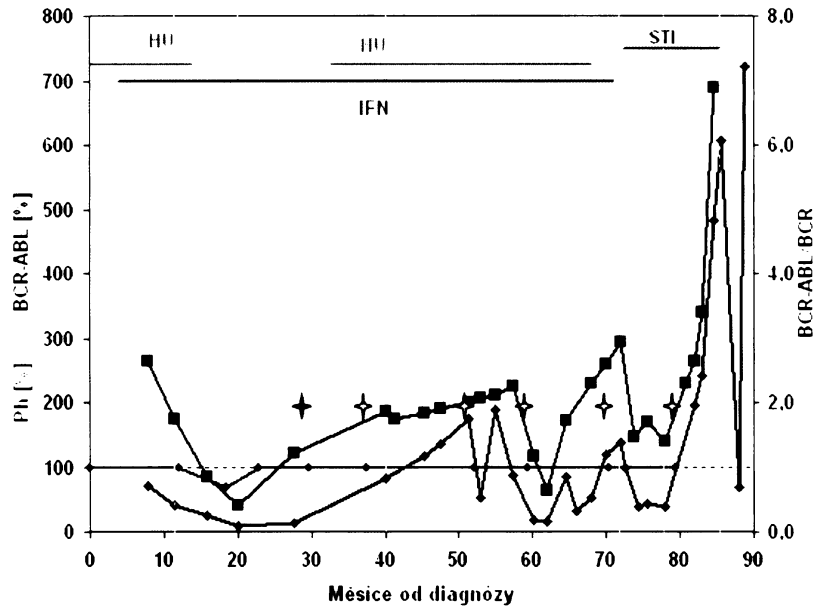
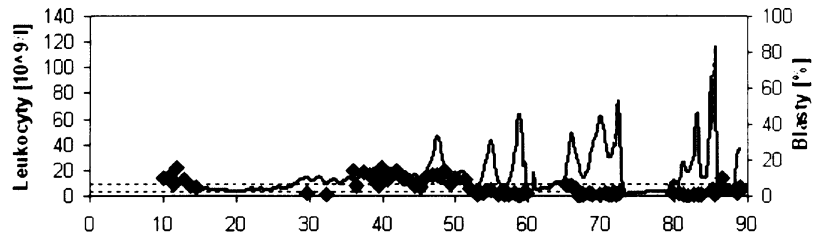
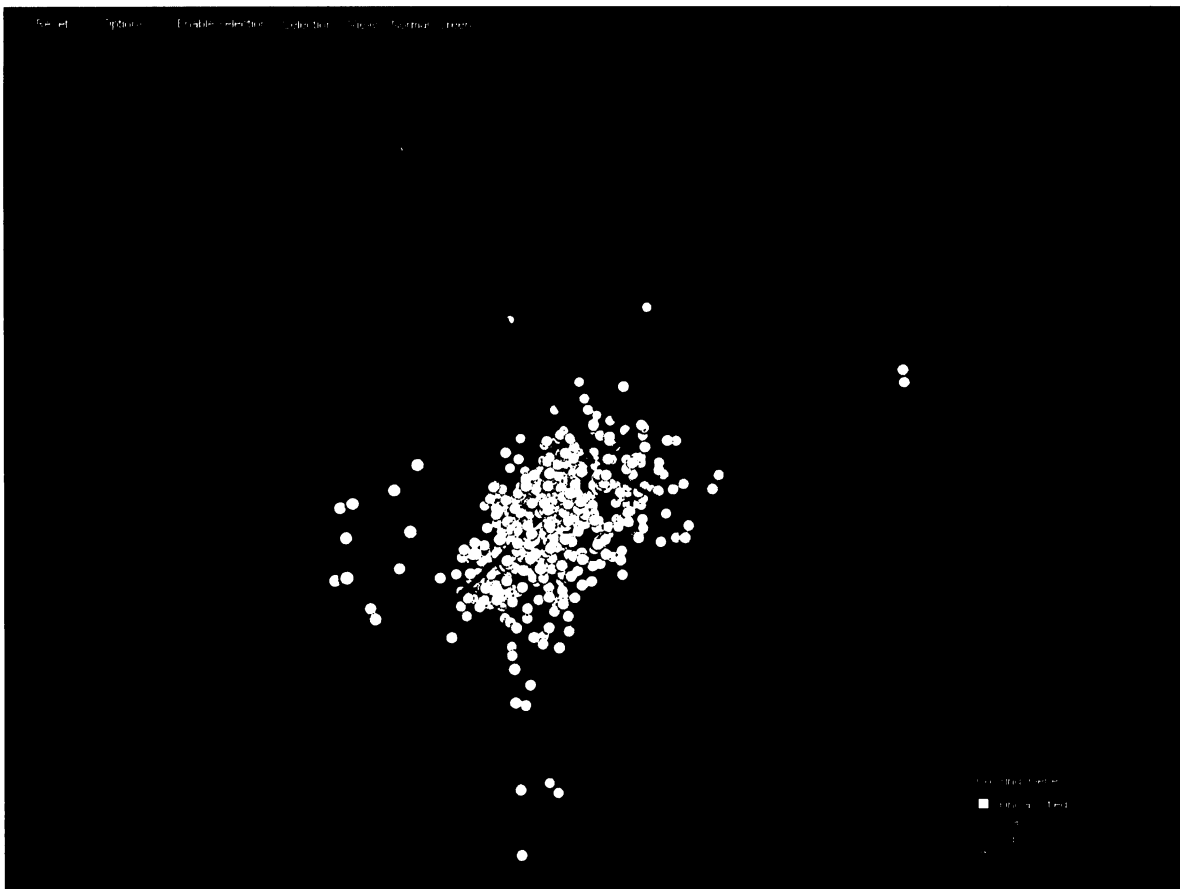
Charakterizace genové exprese jednotlivých pacientů

U tří pacientů jsme sledovali profily genové exprese pomocí cDNA arrayí v několika po sobě následujících vzorcích. Tak bylo možné sledovat genovou expresi v průběhu onemocnění těchto pacientů. Jako shlukovou analýzu jsme zde použili PCA.

Pacient označený v tabulce 4 jako C (6 vzorků) byl léčen nejprve IFN/HU a následně, po progresi, IM. První vzorek (C-1) byl odebrán na počátku, ještě před tím, než se projevil vliv léčby IFN/HU. Počáteční léčba IFN/HU byla úspěšná, z krevního obrazu zmizely blasty, počty leukocytů v periferní krvi dosáhly normálních hodnot, procento Ph chromozomů kleslo pod 100 %, hladina *BCR-ABL* byla pod 50 % a R klesl pod 1. V té době byl odebrán druhý vzorek (C-2). Poté ale došlo postupně od 20. měsíce k progresi onemocnění, kdy R dosáhl hodnoty 1,22 ve 28. měsíci a v dalším průběhu onemocnění se nedostal pod 1. V 30. měsíci se v krevním obraze objevily blasty. V 37 měsíci od diagnózy byla metodou G-pruhování detekována přídatná aberace *der(17)t(3;17)*, která už z cytogenetického obrazu nezmizela (vzorek C-3 byl odebrán ve 40. měsíci od diagnózy). V 73 měsíci od diagnózy začal být pacient léčen IM (vzorek C-4), který znormalizoval krevní obraz a hladina *BCR-ABL* klesla pod 100 % (vzorek C-5). Po sedmi měsících léčby IM došlo k nárůstu R, následovaném vzestupem počtu leukocytů v periferní krvi a objevením se blastů (vzorek C-6). V 85. měsíci od diagnózy byl IM vysazen (po 13. měsících léčby) a pacient byl transplantován.

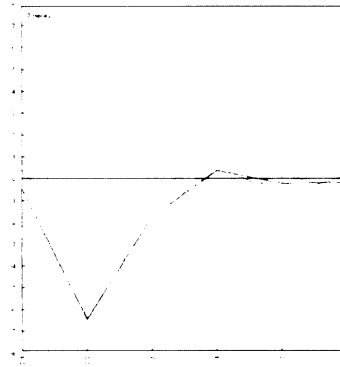
Byly stanoveny tři skupiny po sedmi genech: C-a, C-b a C-c (obr. 15). Skupina C-a je tvořena geny se silnou downregulací ve druhém vzorku, z období, kdy došlo k odpovědi na léčbu a kdy poměr *BCR-ABL/BCR* byl menší, než 1. Ve skupině C-b jsou geny, jejichž exprese stoupala v celém průběhu onemocnění, kromě BC, kde došlo k mírnému poklesu overexprese. Skupina C-c je charakterizována poklesem exprese v období po detekci *der(17)t(3;17)*. Mezi geny této skupiny patří např. *NOTCH4* (Notch homolog 4 (*Drosophila*)) a retinoid X receptor beta.

Obr. 15. PCA genů ve vzorcích pacienta C. **A** - Graf hladiny *BCR-ABL* a poměru *BCR-ABL/BCR*. Graf znázorňuje typ a trvání léčby (HU-hydroxyurea, IFN-interferon, STI-imatinib), přítomnost aberace *der(17)t(3;17)* detekovaná G-pruhováním (čtyřcípé hvězdy) a místa odběru vzorků pro analýzu pomocí cDNA expresních arrayí (svislé přerušované čáry). **B** - Graf množství leukocytů a blastů v periferní krvi. Přerušované vodorovné čáry ukazují spodní a horní hranici normálního počtu leukocytů. **C** - PCA analýza genů, barevně jsou označeny tři skupiny po sedmi genech. **D** - Jednotlivé skupiny genů: C-a, C-b a C-c, vždy nahoře s grafem exprese genů v jednotlivých arrayích (osa x – vzorky C-1 až C-6, osa y - poměr exprese genů vzhledem k normálu v logaritmickeém měřítku, šedé křivky jsou jednotlivé geny) s fialovou křivkou znázorňující průměrnou expresi ve skupině, dole vlevo s grafickým znázorněním exprese v celé skupině a vpravo s výčtem genů.

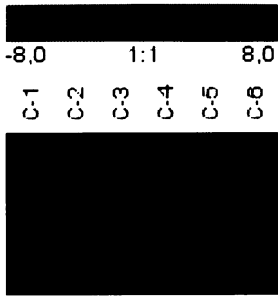
A**B****C**

Obr. 15. PCA genů ve vzorcích pacienta C.

D

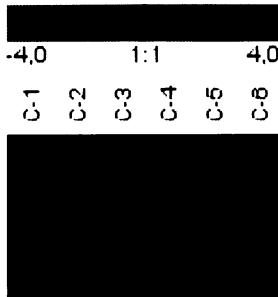


C-a

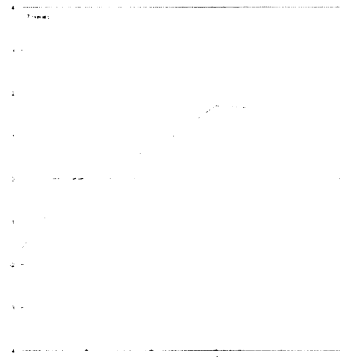


- B5a phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent
- F1n bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
- F2n fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)
- B5c CD27-binding (Siva) protein
- F3n hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
- B7c retinoblastoma binding protein 2
- B7a retinoblastoma-like 2 (p 130)

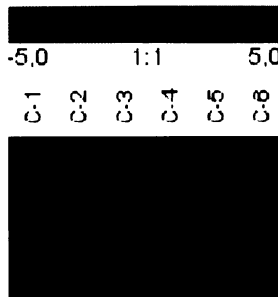
C-b



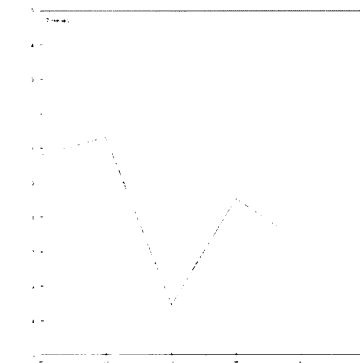
- E1f matrix metalloproteinase 9
- E1d matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
- D3c thrombospondin 1
- E1b matrix metalloproteinase 2
- D2d collagen, type XVI, alpha 1
- D4f integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
- D2c collagen, type XI, alpha 2



C-c



- C7m retinoid X receptor, beta
- E3m ras homolog gene family, member C
- C7h tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
- D1a aggrecan 1
- C3b superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
- D7m fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor receptor)
- C3i Notch homolog 4 (Drosophila)



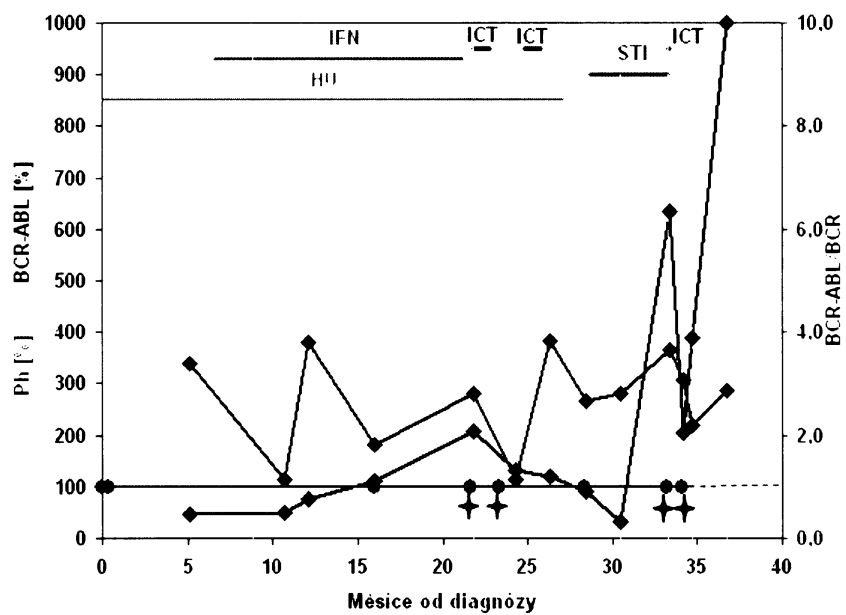
Obr. 15. PCA genů ve vzorcích pacienta C.

Pacient F (6 vzorků) byl od počátku našeho sledování léčen IFN/HU, bez odpovědi na léčbu. V této fázi (vzorek F-1) byla hladina *BCR-ABL* nízká, což neodpovídalo klinickému obrazu, naopak R byl větší než 1 (R u toho to pacienta nikdy neklesl pod 1) tedy lépe charakterizoval stav onemocnění. CML postupně progredovala, až se ve 21. měsíci po diagnóze (F-2) objevila přídavná aberace der(7), blasty v periferní krvi stouply na 4 % (z krevního obrazu ovšem nikdy zcela nezmizely) a byla zahájena léčba intenzivní chemoterapií (FLAM/FLAG (fludarabin, cytosin arabinosid a mitoxantron/G-CSF)). To sice snížilo WBC, ale hladina *BCR-ABL* neklesla pod 100 %. Poté následoval přechod na léčbu IM, který normalizoval krevní obraz a hladina *BCR-ABL* klesla na 31 % (F-3). Od 33. měsíce se stav pacienta opět začal zhoršovat, léčba byla změněna na FLAM/FLAG (F-4), CML však dále progredovala (F-5), až do blastické krize (F-6), (obr. 16).

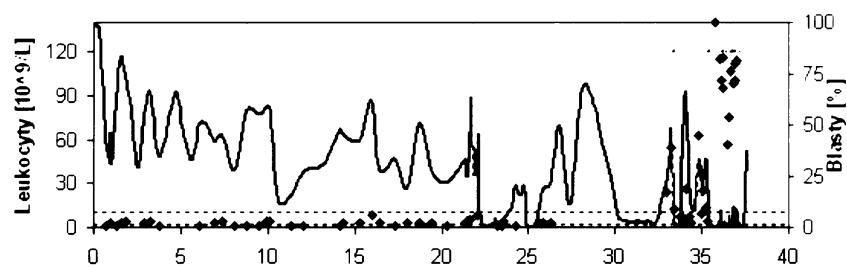
Pomocí PCA byly nalezeny čtyři shluky genů: F-a (n=7), F-b (n=29), F-c (n=30) a F-d (n=50). U tohoto pacienta byly nalezeny geny s upregulací, či downregulací ve všech vzorcích (shluky F-a a F-b) a geny, jejichž exprese se měnila s léčbou (vliv imatinibu v F-c a F-d) nebo s nástupem BC (F-d). Ke genům z těchto skupin patří například kaspáza 8, jedna z iniciačních kaspáz apoptózy, jejíž downregulace je utlumena v době léčby imatinibem (obr. 16, F-c). *RAF1* (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1), jeden z regulátorů apoptózy je člen skupiny F-d, kde overexprese klesala v době léčby imatinibem a v BC. K dalším členů této skupiny patří interleukiny *IL2* a *IL7*, *NOTCH1* a *STAT5B*. Zajímavé je, že k poklesu exprese v BC zde došlo i u metaloproteázy *MMP8*, která byla v ostatních vzorcích CML stejnoměrně overexprimovaná.

Obr. 16. PCA genů ve vzorcích pacienta F. **A** - Graf hladiny *BCR-ABL* a poměru *BCR-ABL/BCR*. Graf znázorňuje léčbu (HU-hydroxyurea, IFN-interferon, ICT-intenzivní chemoterapie, STI-imatinib), přítomnost aberací detekovaných G-pruhováním (čtyřcípé hvězdy) a místa odběru vzorků pro analýzu pomocí cDNA expresních arrayí (svislé přerušované čáry). **B** - Graf množství leukocytů a blastů v periferní krvi. Přerušované vodorovné čáry ukazují spodní a horní hranici normálního počtu leukocytů. **C** - PCA analýza genů, barevně jsou označeny čtyři skupiny genů. **D** - Skupiny genů: F-c a F-d, vždy vpravo s grafem exprese genů v jednotlivých arrayích, vlevo s grafickým znázorněním exprese v celé skupině a s výčtem genů.

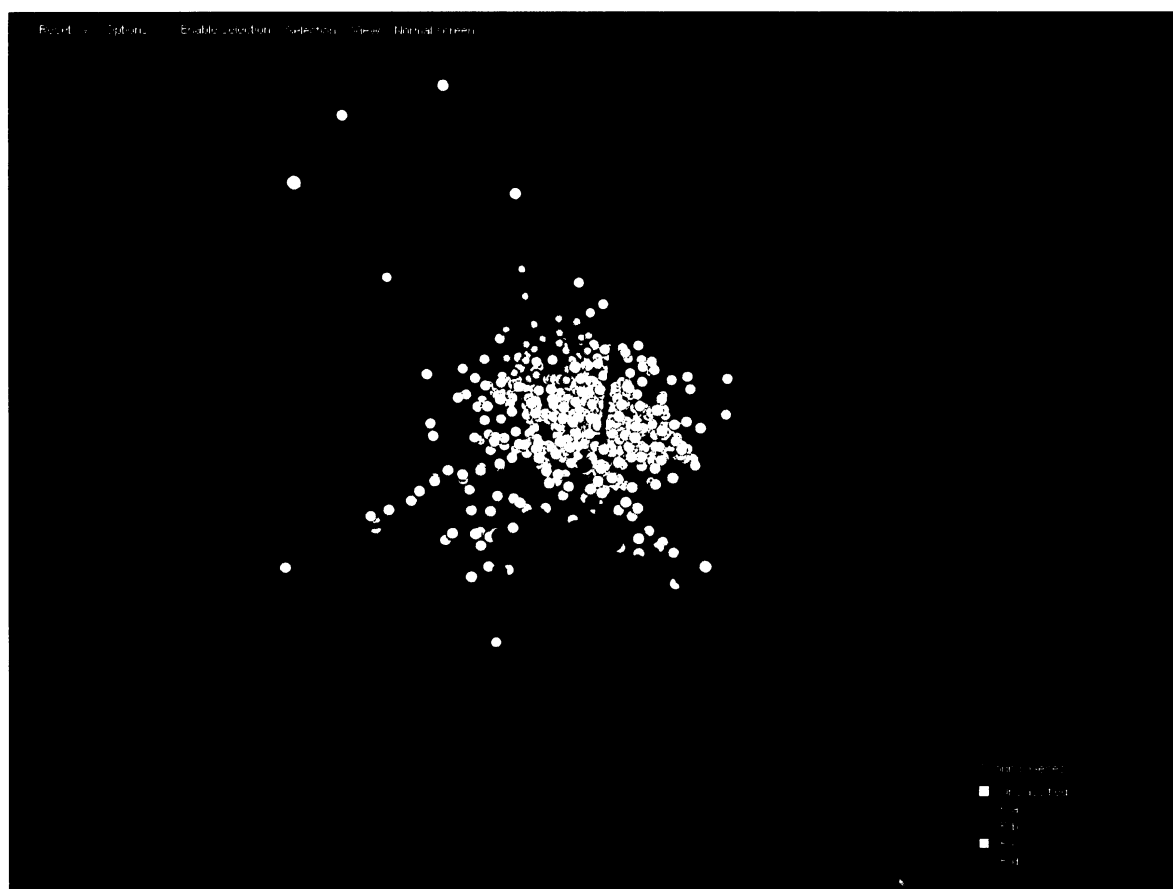
A



B



C

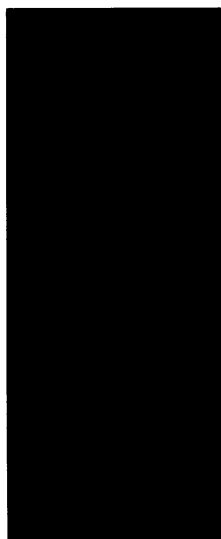


Obr. 16. PCA genů ve vzorcích pacienta F.

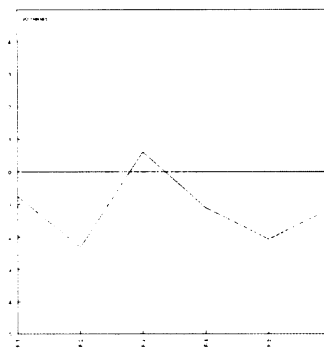
D

F-c

-5.0 1:1 5.0
F-1 F-2 F-3 F-4 F-5 F-6



- C6g insulin-like growth factor binding protein 6
- C5a trophoblast glycoprotein
- C7g tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
- B3h caspase 8, apoptosis-related cysteine protease
- C6a hyaluronan binding protein 2
- C2j Ras-related associated with diabetes
- C5j Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ribosomal protein S30
- A4e CDC8 cell division cycle 8 homolog (S. cerevisiae)
- C8e insulin-like growth factor binding protein 4
- C5d tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5
- C5b AXL receptor tyrosine kinase
- B1g BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
- C1j RAD50 homolog (S. cerevisiae)
- B4k DNA fragmentation factor, 45 kD, alpha polypeptide
- C4f frizzled homolog 2 (Drosophila)
- C7b transmembrane trafficking protein
- B1h BCL2-antagonist/killer 1
- B1d BCL2-like 2
- C7e neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
- F1g bone morphogenetic protein 1
- C4n smoothened homolog (Drosophila)
- C1l RAD52 homolog (S. cerevisiae)
- C8h insulin-like growth factor 1 receptor
- C4g frizzled-related protein
- A6d growth factor receptor-bound protein 10
- C1k RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)
- C8d insulin-like growth factor binding protein 3
- A4c CDC10 cell division cycle 10 homolog (S. cerevisiae)
- B2h TNF receptor-associated factor 2
- B2e TNF receptor-associated factor 5

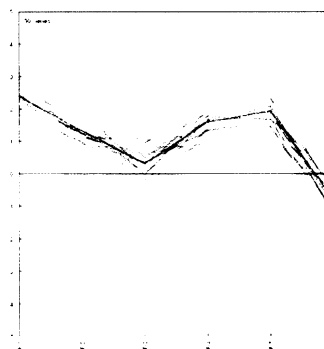


F-d

-5.0 1:1 5.0
F-1 F-2 F-3 F-4 F-5 F-6



- C2g O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
- B3n programmed cell death 2
- C4l sonic hedgehog homolog (Drosophila)
- C3k jagged 2
- A3g cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
- F4i interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
- C7c neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
- C4i frizzled homolog 9 (Drosophila)
- C3n lunatic fringe homolog (Drosophila)
- F3g transforming growth factor, beta 2
- B6j breast cancer 2, early onset
- D7a fms-related tyrosine kinase 3
- E2f basigin (OK blood group)
- F2k fibroblast growth factor 3
- B4j RATS1
- F4h interleukin 2
- F4m interleukin 7
- E7b desmocollin 3
- E1e matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
- F0a serine (or cysteine) proteinase inhibitor, (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)
- F7e tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)
- C2l replication factor C (activator 1) 4 (37kD)
- D3j integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
- E7i EphA2
- B6n tumor protein p73
- C5f epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
- E6b catenin (cadherin-associated protein), alpha 2
- A5c mitogen-activated protein kinase kinase 6
- C3f Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
- D6d sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, (semaphorin) 3A
- D3g ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)
- B4g tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10B
- C2n replication factor C (activator 1) 2 (40kD)
- F4d interleukin 1 receptor antagonist
- A1l cell division cycle 25C
- D3f fibronectin 1
- D1m collagen, type VI, alpha 2
- B7i Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
- A6e v-rat-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
- F4g interleukin 1, beta
- A5m retinoblastoma binding protein 5
- E5g cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal)
- B7n signal transducer and activator of transcription 5B
- F5d interleukin 12B
- C3e RAD23 homolog A (S. cerevisiae)
- F3e glia maturation factor, beta
- C2m replication factor C (activator 1) 3 (38kD)
- F7d tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
- F1b B-cell growth factor 1 (12kD)
- B2f TNF receptor-associated factor 8

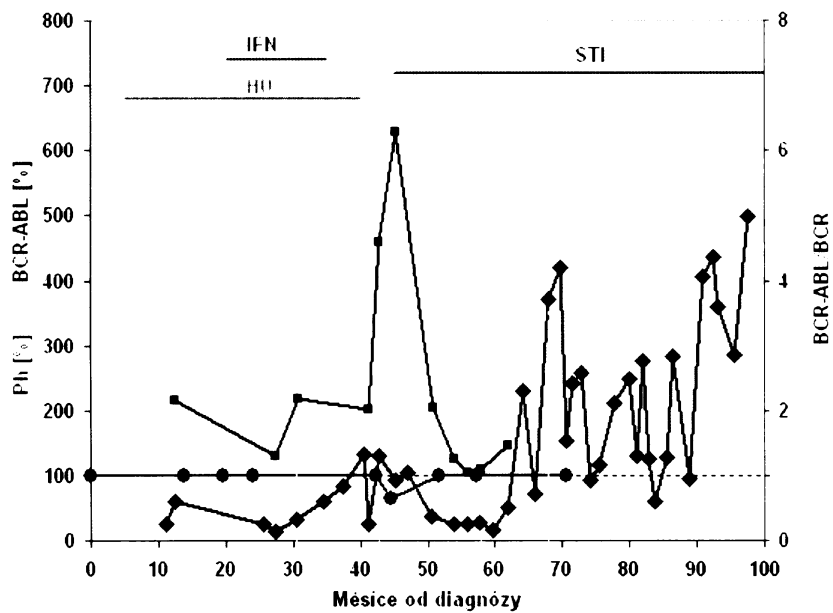
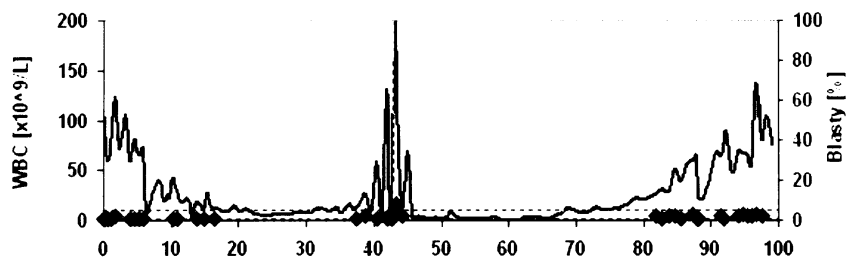
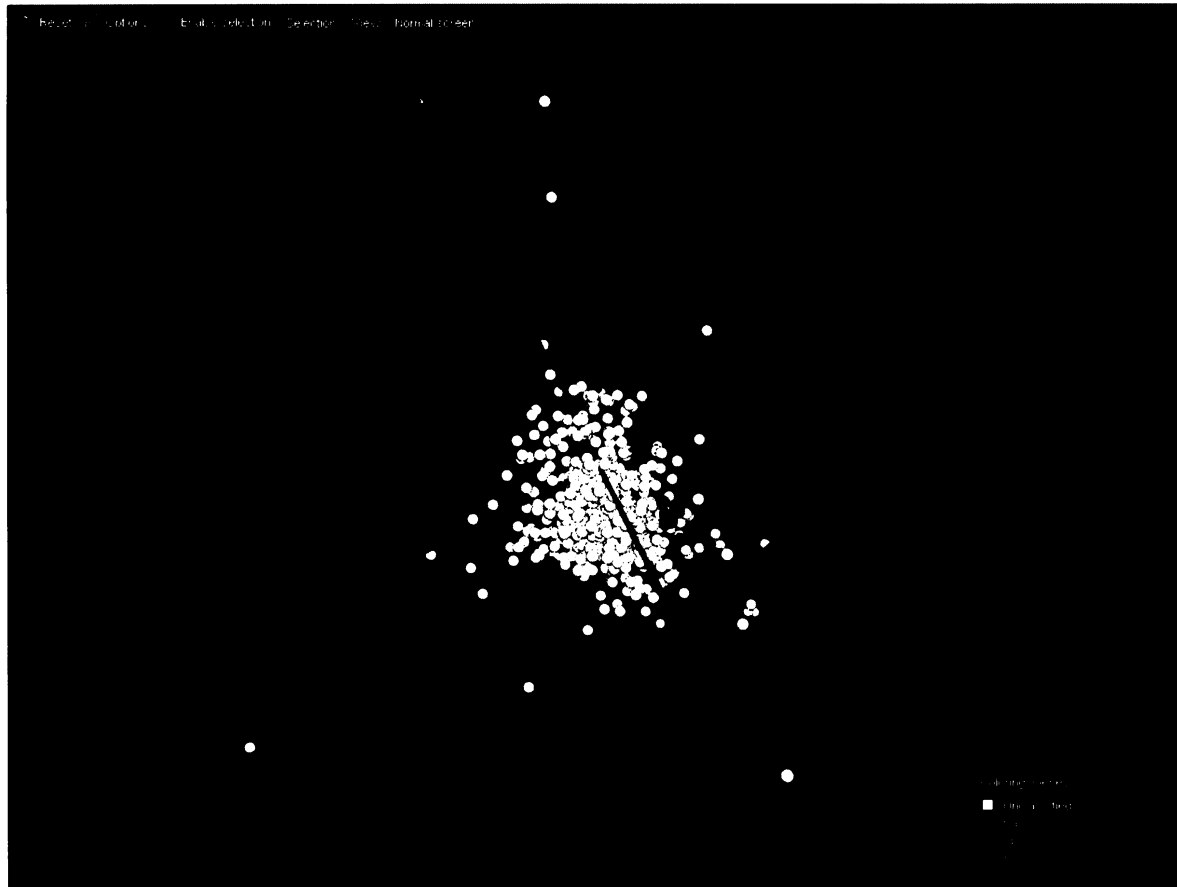


Obr. 16. PCA genů ve vzorcích pacienta F.

Dalším pacientem byl pacient I (4 vzorky), u kterého došlo ke dvěma progresím v onemocnění. Zpočátku pacient odpovídal na léčbu (IFN/HU) (vzorek I-1), ale od 32. měsíce od diagnózy se jeho stav začal zhoršovat, až ve 43. měsíci CML akcelerovala (I-2). Poté došlo k změně léčby na IM, na kterou pacient dobře odpověděl (I-3), ale postupně se jeho stav začal opět zhoršovat (I-4) a od 90. měsíce byla CML opět v akceleraci.

Pomocí PCA byly získány shluky I-a (n=10), I-b (n=15) a I-c (n=30) (obr. 17). Geny ve skupině I-a byly nejdříve downregulované a při léčbě imatinibem jejich exprese stoupla, směrem k úrovni v normálu (polovina z nich jsou různé typy kolagenu). V obou skupinách I-b a I-c došlo k snížení exprese při léčbě imatinibem. U I-b šlo o mírný pokles v rámci celkové overexprese. Sem patří například gen pro *IL-1A*, kaspázu 6 a urokinázu. Zvýšená exprese exekuční kaspázy 6 ukazuje, že deregulace apoptózy musí být na vyšší úrovni, kde dochází k regulaci spouštění apoptotických mechanismů. Naopak zvýšená exprese urokinázy pravděpodobně souvisí s prostředky leukemických buněk k migraci, neboť urokináza v důsledku může způsobit aktivaci ECM remodelujících metaloproteáz. Ve skupině I-c, kde po expresi shodné s expresí v normálu došlo při léčbě imatinibem k downregulaci, jsou mimo jiné geny pro *Rho G*, *JunB*, *FOS* a Interferon beta. Snížení exprese transkripčních faktorů *JunB* a *FOS* v období léčby imatinibem, který inhibuje kinázovou aktivitu *BCR-ABL* ukazuje na vliv *BCR-ABL* na tyto transkripční faktory.

Obr. 17. PCA genů ve vzorcích pacienta I. A - Graf hladiny *BCR-ABL* a poměru *BCR-ABL/BCR*. Graf znázorňuje léčbu (HU-hydroxyurea, IFN-interferon, STI-imatinib) a místa odběru vzorků pro analýzu pomocí cDNA expresních arrayí (svislé přerušované čáry). **B** - Graf množství leukocytů a blastů v periferní krvi. Přerušované vodorovné čáry ukazují spodní a horní hranici normálního počtu leukocytů. **C** - PCA analýza genů, barevně jsou označeny tři skupiny genů. **D** - Skupiny genů: I-a, I-b a I-c, vždy vpravo s grafem exprese genů v jednotlivých arrayích, vlevo s grafickým znázorněním exprese v celé skupině a s výčtem genů.

A**B****C**

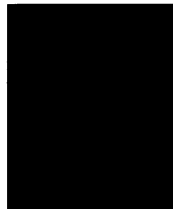
Obr. 17. PCA genů ve vzorcích pacienta I.

D

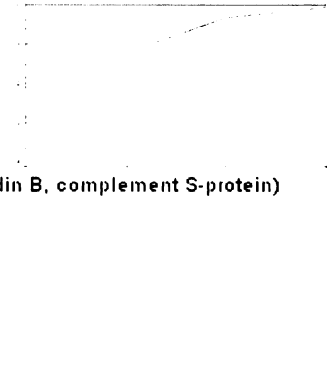
I-a

-4,0 1:1 4,0

I 2 3 4



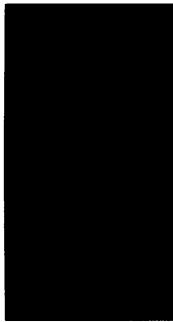
- D3e vitronectin (serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein)
- D1m collagen, type VI, alpha 2
- D1g collagen, type I, alpha 2
- D1f collagen, type IV, alpha 6
- D1e decorin
- A1c cyclin-dependent kinase 3
- D2a collagen, type VIII, alpha 1
- D1b biglycan
- A1m CDC-like kinase 1
- D2e collagen, type XVIII, alpha 1



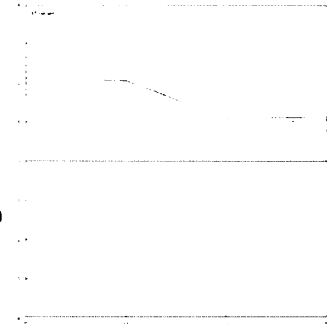
I-b

-4,0 1:1 4,0

I 2 3 4



- E1g matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
- E1d matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
- E2e tissue inhibitor of metalloproteinase 4
- B4n programmed cell death 10
- B5d CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
- A4k mitogen-activated protein kinase 14
- A3j WEE1+ homolog (S. pombe)
- F7f interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
- E2g plasminogen activator, urokinase
- A5f protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1
- B3e caspase 8, apoptosis-related cysteine protease
- C2h deoxyribonuclease I-like 1
- F8h stromal cell-derived factor 1
- F6d PDGFA associated protein 1
- F4f interleukin 1, alpha



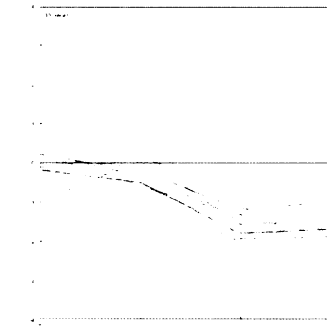
I-c

-4,0 1:1 4,0

I 2 3 4



- G13 ribosomal protein L13a
- E3n ras homolog gene family, member G (rho G)
- F3j early growth response 1
- A6g jun B proto-oncogene
- C5j Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ribosomal protein S30
- G6 tubulin, alpha, ubiquitous
- D5k ninjurin 1
- E2m plasminogen activator, urokinase receptor
- E3m ras homolog gene family, member C
- D5b zyxin
- C8n SEX gene
- F5g interleukin 15
- E6e adenomatous polyposis coli
- B6a v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
- G14 ribosomal protein S9
- F3g transforming growth factor, beta 2
- F5j interferon, beta 1, fibroblast
- C4c wingless-type MMTV integration site family, member 8B
- C5c insulin-like growth factor 2 receptor
- D4k integrin, beta 8
- E7i EphA2
- C3b superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
- B5a phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent
- E4l T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
- D7m fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor receptor)
- B4c tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12
- E8g microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1
- C3a replication protein A1 (70kD)
- E3l ras homolog gene family, member B
- F6e platelet-derived growth factor alpha polypeptide



Obr. 17. PCA genů ve vzorcích pacienta I.

Monitorování exprese genů *AH11*, *MMP8* a *PBP*

Expresie tří vybraných genů na úrovni transkriptu byla sledována pomocí PCR v reálném čase. Cílem bylo stanovit dynamiku exprese genů, které by mohly sloužit jako molekulárně biologické markery změny stavu onemocnění nebo jejichž exprese by mohla mít vztah k expresi *BCR-ABL* a ukazovat tak na mechanismy CML.

Vybrané geny

Sledovány byly hladiny transkriptů tří genů:

AH11 (Abelson helper integration site-1) byl vybrán na základě údajů z literatury. Jedná se o gen, jehož funkce sice není známa, ale který hraje pravděpodobně roli v buněčné diferenciaci a byla popsána jeho upregulace v CML [Jiang, et al., 2004]. Myší homolog je aktivován ve v-abl indukovaných leukemiích [Jiang, et al., 2002]. Proto bylo zajímavé pokusit se sledovat expresi *AH11* v průběhu onemocnění a stanovit, zda dochází ke korelaci jeho exprese s kvalitou odpovědi na léčbu CML.

MMP8 (matrix metalloproteinase 8) byl vybrán na základě předběžných výsledků které ukázaly jeho zvýšenou expresi v naprosté většině vzorků CML analyzovaných pomocí cDNA arrayí (srov. shluk *UP*, genů se zvýšenou expresí v CML). *MMP8* je ECM remodelující proteáza, která štěpí kolagen, agrekan, fibronectin, gelatin a laminin [Curry, et al., 2003]. Ovlivňování ECM je podstatné pro buněčnou migraci a deregulace remodelace ECM je u malignit často popisována. Z těchto důvodů bylo zajímavé potvrdit výsledky z cDNA arrayí a dále zjistit, jaká je kinetika exprese *MMP8* v CML pomocí citlivější metody PCR v reálném čase.

PBP (platelet basic protein), byl zvolen také na základě našich předběžných výsledků, kdy byla porovnávána exprese CP a BC. *PBP* vykazoval downregulaci ve všech vzorcích pacientů s BC (pro srovnání viz. také shluk *DOWN*, genů se sníženou expresí v CML). Produkty *PBP*, ovlivňují řadu procesů, mimo jiné mitogenezi a tvorbu ECM [Castor, et al., 1983]. Cílem sledování *PBP* bylo jednak zjistit jeho kinetiku v CML vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu, aby se upřesnily předběžné výsledky a zejména stanovit, zda snížení jeho exprese koreluje s progresí CML do BC.

Kontrolní geny

Naměřené absolutní množství transkriptů je třeba normalizovat k vnitřní kontrole, aby došlo k vyloučení vlivu variability nezpůsobené relevantními biologickými vlivy na výsle-

dek. Jako vnitřní kontrola je standardně používán gen (nebo geny), jehož exprese je v buňce stálá. Kromě stálosti exprese je třeba při volbě kontrolních genů vybírat takové, které nemají pseudogeny a u kterých lze navrhnout primery tak, aby amplicon překrýval oblast spojení dvou exonů (tím se vyloučí vliv případné kontaminace genomovou DNA). Kromě toho je vhodné použít takových genů několik a v takovém případě je výhodné, když jsou jednotlivé kontrolní geny exprimovány v různých množstvích v sledovaném systému (pro přehled kritérií pro výběr viz [Beillard, et al., 2003]).

Vybrané kontrolní geny, splňující tyto podmínky pro náš systém, byly beta-2-mikroglobulin (*B2M*), beta glukuronidáza (*GUS*) a TATA box binding protein (*TBP*) [Vandesompele, et al., 2002; Beillard, et al., 2003].

Výběr probíhal na základě analýzy rozptylu dat z 96 vzorků všech tří zmíněných genů programem GeNorm. Hodnoty M pro tři kontrolní geny byly: $M_{GUS} = 6,460$, $M_{TBP} = 4,824$ a $M_{B2M} = 4,661$. Z těchto genů byly nakonec zvoleny dva s nejnižšími hodnotami M : *B2M* a *TBP*. Z hodnot těchto dvou genů byl pak počítán normalizační faktor (geometrický průměr) v každém běhu PCR.

Intra- a interassay variabilita

Intra-assay variabilita byla stanovena na základě variability hodnot Ct vždy deseti paralel jednoho genu na stejném templátu v rámci jednoho běhu PCR (tab. 6).

Inter-assay variabilita byla stanovena jako variabilita Ct pěti separátních běhů PCR jednotlivých genů ve dvou paralelách na stejném templátu (tab. 6).

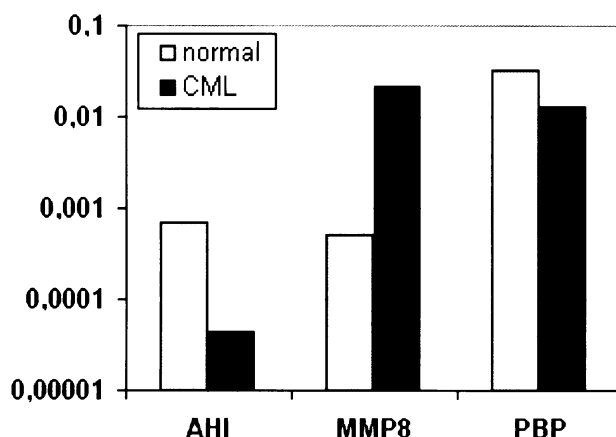
intra-assay variabilita			inter-assay variabilita		
Geny	Směrodatná odchylka [Ct]	Variační koeficient [%]	Geny	Směrodatná odchylka [Ct]	Variační koeficient [%]
B2M	0,43	3,24	AHI	2,21	14,19
GUS	0,19	0,7	B2M	2,39	11,95
TBP	0,16	0,56	GUS	6,77	26,98
PBP	0,15	1,26	MMP8	3,14	14,19
MMP8	0,46	2,85	PBP	2,95	16,79
AHI	0,31	2,31	TBP	2,18	11,04
Minimum	0,15	0,56	Minimum	2,18	11,04
Maximum	0,46	3,24	Maximum	6,77	26,98
Median	0,25	1,79	Median	2,67	14,19

Tab. 6. Variabilita PCR v reálném čase. Intra-assay variabilita je variabilita hodnot Ct vždy deseti paralel jednoho genu na stejném templátu v rámci jednoho běhu PCR. Inter-assay variabilita je variabilita Ct pěti separátních běhů PCR jednotlivých genů ve dvou paralelách na stejném templátu.

Expresse *AH11*, *MMP8* a *PBP* v CML

Hladiny transkriptů uvedených genů byly sledovány v 93 vzorcích 13-ti pacientů. Vzorky pokrývaly kompletní škálu odpovědí na léčbu CML (10 CCR, 11 pCR, 11 mCR, 17 HR, 31 NonR, 13 BC).

Expresse tří sledovaných genů v CML byla porovnávána s jejich expresí ve smíšeném normálu dvanácti zdravých jedinců (viz. Materiál a metody). Medián exprese genů *AH11* a *PBP* byl v CML nižší a medián exprese *MMP8* byl v CML vyšší než v normálu (obr. 18).

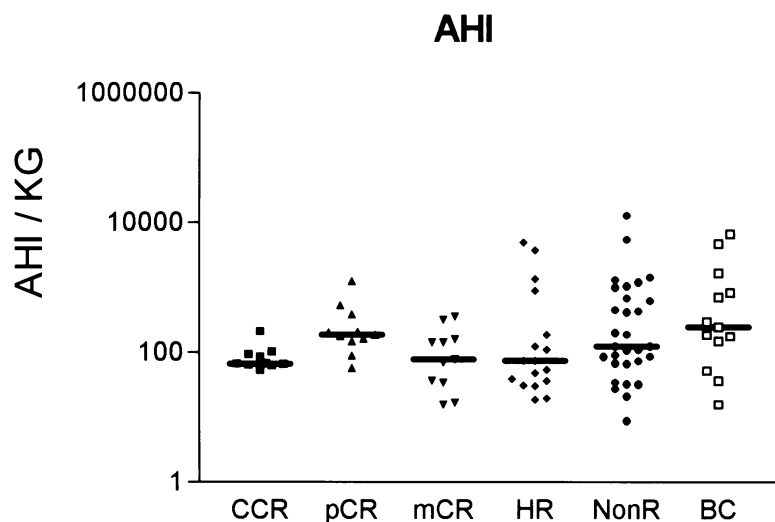


Obr. 18. Expresse genů *AH11*, *MMP8* a *PBP* v leukocytech zdravých jedinců a pacientů s CML. Zelené sloupce-hladina transkriptů ve smíšeném normálu. Oranžové sloupce-Medián hladin transkriptů v 93 vzorcích CML.

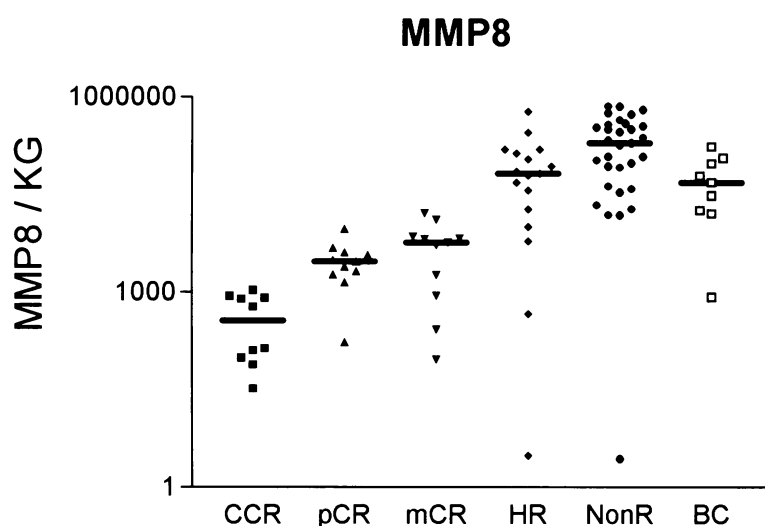
Hladiny transkriptu genu *AH11* nevykazovaly signifikantní rozdíly mezi skupinami odpovědí na léčbu CML ($p=0,0767$, Kruskal-Wallis), i když v oblasti od HR k BC je patrný nárůst (obr. 19). Nízká exprese *AH11* v leukocytech pacientů CML byla překvapivá a to zejména vzhledem k popsanému zvýšení *AH11* transkriptů v leukemických buňkách [Jiang, et al., 2004].

Expresse genu *MMP8* je v CML celkově zvýšená. Krom toho se jeho exprese zvyšuje se zhoršující se odpovědí na léčbu ($p<0,0001$, Kruskal-Wallis). Nárůst množství transkriptu je patrný až do skupiny NonR. V BC dochází k poklesu (obr. 20).

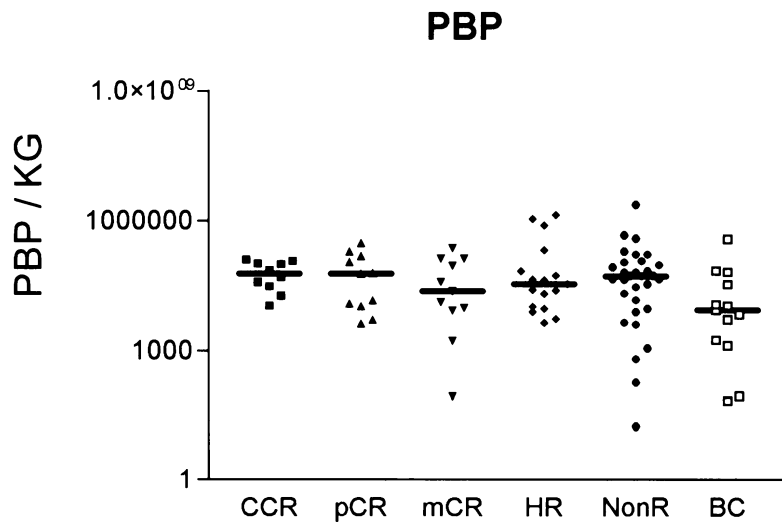
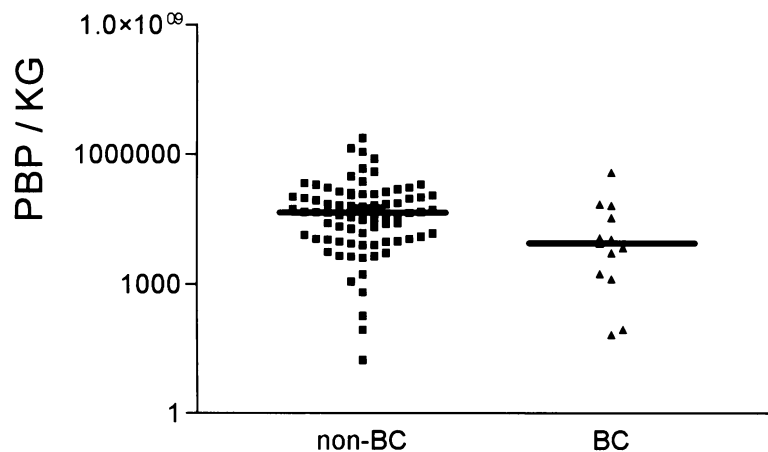
Expresse genu *PBP* klesala v BC. V rámci všech vzorků ve všech typech odpovědí nešlo o signifikantní změnu (obr. 21, $p=0,2261$, Kruskal-Wallis), nicméně v porovnání BC k ostatním vzorkům ano ($p=0,016$, Mann Whitney). PCR v reálném čase potvrdila pokles exprese *PBP* v BC pacientů s CML.



Obr. 19. Množství transkriptu genu *AHI1* ve vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu CML. Na ose y je v logaritmickém měřítku vyneseno množství templátu v poměru ke kontrolním genům *B2M* a *TBP* (KG). Expresse *AHI1* není signifikantně rozdílná v různých odpovědích na léčbu ($p=0,0767$, Kruskal-Wallis). CCR, pCR a mCR-kompletní, částečná a minor cytogenetická odpověď; HR–hematologická odpověď; NonR-bez odpovědi; BC-blastická krize.



Obr. 20. Množství transkriptu genu *MMP8* ve vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu CML. Na ose y je v logaritmickém měřítku vyneseno množství templátu v poměru ke kontrolním genům *B2M* a *TBP* (KG). Expresse *MMP8* je signifikantně rozdílná v různých odpovědích na léčbu ($p<0,0001$, Kruskal-Wallis). CCR, pCR a mCR-kompletní, částečná a minor cytogenetická odpověď; HR–hematologická odpověď; NonR-bez odpovědi; BC-blastická krize.

A**B**

Obr. 21. Množství transkriptu genu *PBP* ve vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu CML a porovnání BC s ostatními vzorky. Na ose y je v logaritmickém měřítku vyneseno množství templátu v poměru ke kontrolním genům *B2M* a *TBP* (KG). **A** - Expres *PBP* není signifikantně rozdílná v různých odpovědích na léčbu ($p=0,2261$, Kruskal-Wallis). **B** - Expres *PBP* je signifikantně rozdílná v BC a ostatních vzorcích ($p=0,016$, Mann Whitney). CCR, pCR a mCR-kompletní, částečná a minor cytogenetická odpověď; HR–hematologická odpověď; NonR-bez odpovědi; BC-blastická krize, non-BC-všechny vzorky mimo blastické krize.

Stanovení nestability genomu v CML

Pro testování změn v genomu na molekulární úrovni a ve větším množství míst v genomu v jednom experimentu byl použit jediný dostupný systém GenoSensor™ Array 300 systém firmy Vysis. Tento systém obsahuje 287 úseků DNA, reprezentujících chromozo-

mální lokusy tak, aby byl pokryt celý genom s důrazem na významná místa chromozomálních aberací.

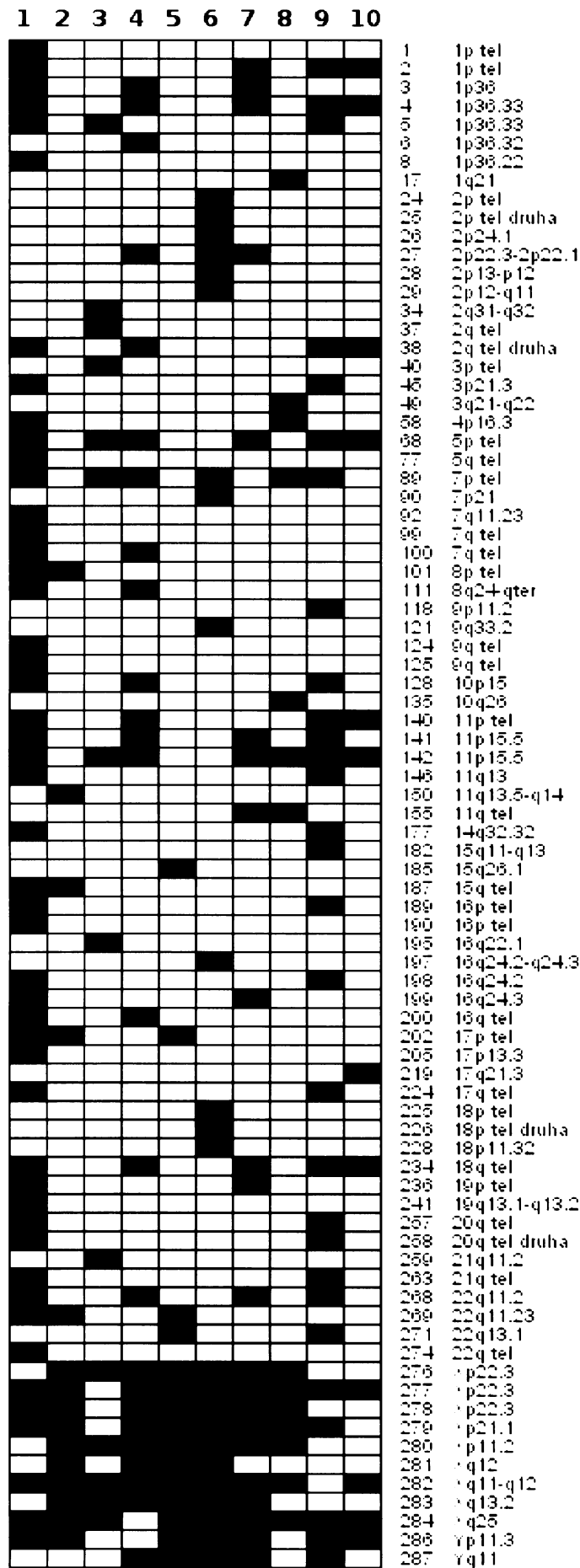
Metodou GenoSensor™ Array 300 bylo testováno 10 vzorků pacientů s CML, z nichž 7 bylo rezistentních k léčbě. Z těchto 7 pak v 5 případech došlo k diskrepanci mezi hladinou BCR-ABL a stavem pacienta. Výsledky ukázaly několik potenciálně zajímavých míst v genomu, která by mohla souviset s onemocněním a jeho průběhem v konkrétních případech (tab. 7).

Číslo pacienta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Věk	50	38	37	51	51	60	49	51	51	72
Měsíce od diagnózy	21	13	8	8	75	20	35	16	17	73
Léčba	IFN	IFN	IFN	IFN/HU	HU	IM	HU	IFN/HU	IFN/HU	BU
Odpověď na léčbu	CR	CR	HR	NonR	NonR	NonR	NonR	NonR	NonR	NonR
Hladina BCR-ABL	n	n	v	v	v	v*	n	n	n	n

ID	Lokus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	1p36.33	■			■			■		■	
5	1p36.33	■		■					■	■	
89	7p tel	■		■	■		■		■	■	
141	11p15.5	■		■	■			■		■	
142	11p15.5	■		■	■			■	■	■	■

Tab. 7. Tabulka nejčastějších aberací zjištěných pomocí CGH Arrayí. Červená políčka označují amplifikaci, zelená políčka označují delecce. Hodnoty jsou dekadický logaritmus mediánu tří poměrů signálu testované ku kontrolní DNA fluorescenci odpovídající třem paralelním bodům jednoho lokusu na sklíčku. HU-hydroxyurea, IFN-interferon, IM-imatinib, BU-busulfan, CR-cytogenetická odpověď, HR-hematologická odpověď, NonR-bez odpovědi, n-nízká, v-vysoká * pacient s poměrně vysokou hladinou BCR-ABL, jejíž kinetika nekorelovala se stavem onemocnění.

Obr. 22. Nalezené změny v genomu pacientů s CML. Řádky odpovídají jednotlivým chromosomálním lokusům podle identifikačních čísel firmy Vysis a podle standardního označení. Jednotlivé sloupce reprezentují deset vzorečků: 1,2- cytogenetická odpověď, 3 – hematologická odpověď, 4-5- bez odpovědi, s korelující a 6-10- bez odpovědi s nekorelující hladinou BCR-ABL. Amplifikace v daném lokusu je znázorněna červenou barvou, delecce zelenou barvou. Všechny znázorněné změny jsou na nebo nad úroveň signifikance dle výrobce. Jasnější barvy odpovídají nižším hladinám významnosti, na kterých bychom chybně zamítali nulovou hypotézu o nerozdílnosti v daných lokusech.



Obr. 22. Nalezené změny v genomu pacientů s CML.

Jedná se jednak o oblast na dlouhém raménku prvního chromozomu (1p36), dále subtelomérovou oblast sedmého chromozomu (7p tel) a lokus chromozomu jedenáctého (11p15.5).

V oblasti 1p36 byly deletovány či amplifikovány některé z úseků u pěti vzorků, včetně tří vzorků s nekorelující hladinou *BCR-ABL*. V této oblasti leží např. gen *p58CDC2L1* (cell division cycle 2 like), který je negativním regulátorem normálního průběhu buněčného cyklu. Delece v tomto lokusu byla popsána u nehodkinovských lymfomů [Dave, et al, 1999].

V subtelomérové oblasti 7p tel byly zjištěny změny u 5 z 10 analyzovaných vzorků, včetně 1 vzorku s nekorelující hladinou *BCR-ABL*.

Pětkrát byly také detekované změny v genomu v lokusu 11p15.5 a jeho okolí, včetně všech tří vzorků s nekorelující hladinou *BCR-ABL*. Tato oblast obsahuje mimo jiné i známý proto-onkogen *H-RAS*, jehož delece byly popsány v řadě případů maligních onemocnění včetně pozdních stadií CML [Gougopoulou, et al, 1996].

Přestože metodou CGH byly zjištěny změny v některých oblastech genomu, nebyly nalezeny žádné korelace mezi výskytem konkrétních změn a stavem onemocnění, dobou od diagnózy, léčbou či věkem pacienta. Jedná se tedy spíše o změny, které jsou obecně typické pro pacienty s CML.

Celkový přehled změn v genomu pacientů s CML nalezených pomocí CGH Array je na obr. 22.

DISKUZE

Hlavním cílem této práce byla analýza profilů genové exprese v průběhu CML pomocí cDNA arrayí. Jako statistický nástroj byly zvoleny metody hierarchického shlukování a analýza hlavních komponent.

Shluky genů s podobnou expresí ve všech vzorcích CML

Pomocí analýzy expresních profilů byly nalezeny geny, jejichž exprese byla ve všech vzorcích CML snižená nebo zvýšená oproti hodnotám z normálu. Tyto geny jsou potenciálními markery CML obecně.

Mezi downregulované patří například geny *JunB* a *FOS*, které jsou jednou z možných dvojic proteinů tvořících dimerní transkripční faktor AP-1 [Hess, et al., 2004]. Funkce transkripčního faktoru AP-1 je silně závislá na poměrném zastoupení tří proteinů, které di-

merní AP-1 mohou tvořit (*Jun*, *FOS* a *ATF*), na buněčném typu, ve kterém AP-1 působí a na okolí a signálech, které z něj do buňky přicházejí. Existují tři izoformy genu *Jun* a čtyři izoformy genu *FOS*. V CML snížená izoforma genu *Jun*, *JunB*, funguje jako tumor supresor. Lymfoidní buňky s transgenním *JunB* byly méně citlivé k transformačním aktivitám genu *ABL* [Szremska, et al., 2003]. Downregulace *JunB* v CML je tedy logická a umožňuje pravděpodobně působení jiných kombinací dimerů tvořících AP-1 v CML. Vzhledem k tomu, že nahrazení genu *Jun* genem *JunB* pomocí techniky knock-in zrušilo poruchy v regulaci způsobené *Jun* v transgenních fibroblastech, lze soudit, že *JunB* inhibuje funkci *Jun* tvorbou heterodimerů *Jun-JunB*. Tím je omezena možnost tvorby AP-1 za účasti *Jun*.

JNK fosforyluje (a tím aktivuje) *Jun*, jednu ze tří možných podjednotek dimerního transkripčního faktoru AP-1. *JNK* má tři izoformy, které mají podle HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) názvy *MAPK8*, *9* a *10* (mitogen-activated protein kinase 8-10). Z nich je *MAPK8* upregulovaná u většiny vzorků, kromě vzorků ze shluků *II* a *IV*, *MAPK9* je upregulovaná (podle PCA, UP) ve většině sledovaných vzorků CML a *MAPK10* je také často upregulovaná, i když ne tak výrazně.

ERK fosforyluje jak *Jun*, tak i *FOS*. Je známo 7 izoform ERK (1-6, 7/8), které jsou podle HGNC označovány jako *MAPK3*, *1*, *6*, *4*, *7*, *12* a *15*. Z šesti izoform přítomných na arrayi nebyla výrazně deregulovaná ani jedna.

Dalším genem se sníženou expresí ve většině vzorků CML je paxillin. Protein p210^{BCR-ABL} váže protein paxillin prostřednictvím interakce s adaptorovým proteinem *GRB2*. To, v souvislosti s faktem že paxillin je přítomen ve fokálních adhezích, naznačuje mechanismus deregulace adheze leukocytů pacientů s CML [Salgia, et al., 1995].

Zvýšená exprese survivinu ve všech sledovaných případech CML koreluje s informacemi v literatuře [Hernandez-Boluda, et al., 2005; Carter, et al., 2006]. Nicméně zde je třeba vzít v úvahu, že ve zde prezentovaném systému byla exprese survivinu velmi nízká v kontrole a tedy podléhá potencionálním vlivům fluktuace v hodnotách pozadí.

Pomocí shlukových analýz nebyly nalezeny rozdíly v expresi genů mezi pacienty s přestavbami b3a2 a b2a2, ani rozdíly mezi expresí genů mužů a žen s CML. To dále potvrzuje přijímaný názor, že rozdíl v přítomnosti jednoho exonu v p210^{BCR-ABL} nemá na průběh onemocnění vliv, stejně tak, jako geny přítomné na Y chromozomu.

Vzorky CML s hladinou *BCR-ABL* nekorelující s klinickým stavem pacientů

Při rutinním monitorování hladiny *BCR-ABL* a při sledování poměru *BCR-ABL/BCR* (R) byla nalezena skupina pacientů, jejichž relativně nízká hladina transkriptů *BCR-ABL* nekorelovala s jejich špatným klinickým stavem. Bylo popsáno, že v těchto případech je sledování R, který nikdy u těchto pacientů neklesl pod 1, významným prognostickým faktorem progresu onemocnění [Moravcová, et al., 2005]. Zajímavé je, že taková skupina pacientů byla nezávisle nalezena i pomocí shlukových analýz (PCA i hierarchické shlukování) cDNA arrayí. V tomto shluku je 7 z 10 vzorků pacientů, u nichž se taková diskrepance objevila. Tento objev má dva molekulární aspekty. Jednak zde prezentované výsledky ukazují na možnou roli *BCR* v patogenezi CML, neboť R byl lepším ukazatelem stavu onemocnění. Druhým aspektem je možnost vydělení vzorků CML, která je patrně nezávislá na *BCR-ABL*. Tady jsou pak o to zajímavější zjištění upregulace a downregulace konkrétních genů u těchto vzorků. Tyto geny jsou kandidáty na objasnění těchto nových molekulárních mechanismů v CML.

Mezi geny upregulované u vzorků s hladinou *BCR-ABL* nekorelující se stavem pacienta (skupina vzorků *II*) patří i proapoptotický gen *BAD*. *BAD* tvořící heterodiméry s *BclX*, represorem apoptózy. Tím *BAD* tlumí účinky *BclX*, což může vést k apoptóze [Yang, et al., 1995]. *BAD* je ovšem inhibován proteinem *Raf1*, jehož exprese je v těchto vzorcích také zvýšena (*Raf1* není ve skupině *II up*) [Wang, et al., 1996]. Další geny ovlivňující apoptózu jsou proteolytické kaspázy, které jsou kromě regulace odpovědné také za samotné provedení apoptózy. U těchto vzorků byly tři zástupci kaspáz downregulovány. Byly to: kaspáza 1, 3 a 4. To by mohlo způsobovat odolnost buněk z této skupiny k apoptóze. Posledními geny, které mají souvislost s apoptózou jsou zde upregulované dvě izoformy *TNFSF* (tumor necrosis factor (ligand) superfamily), *TNFSF5* a 8. Tyto molekuly jsou ligandy *CD30* (tumor necrosis factor receptor) a jejich signál může být pravděpodobně jak proapoptický, tak apoptózu inhibující. Je tedy vidět, že ve skupině vzorků shluku *II*, je silně deregulovaná apoptóza.

Z genů ovlivňujících buněčný cyklus byly u této skupiny vzorků deregulovány tři. Všechny tři geny mají vztah k regulaci buněčného cyklu na úrovni střední až pozdní G_1 fáze.

Jedná se o downregulovanou cyklin-dependentní kinázu 6 (*CDK6*) a dva inhibitory cyklin-dependentních kináz, downregulovaný *CDKN2D* (resp. *INK4d*) a upregulovaný *CDKN2A* (resp. *INK4a*). Inhibitory cyklin-dependentních kináz z rodiny *INK* váží

CDK4/6. Tím zamezují interakci CDK4/6 s cyklinem D a jejich kinázové aktivitě. To dále vede k nižší fosforylaci proteinu Rb, což znemožňuje aktivaci transkripčních faktorů E2F a tedy vstupu do S fáze buněčného cyklu. Down regulace CDK6 a upregulace INK4a by tedy znamenala tendenci k zastavení buněčného cyklu v pozdní G₁ fázi. Naopak downregulace *INK4d* by měla podpořit přechod do S fáze. Ve shlucích genů souvisejících se skupinou vzorků II není *CDK4*. Její exprese je ale u těchto vzorků rovněž spíše snižena. Celkový obraz cyklin-dependentních kináz G₁ fáze a jejich inhibitorů ukazuje u vzorků této skupiny spíše na zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi. To by ovšem mohlo být zvráceno overexpresí některého z cyklinů D (cyklin D1-3), z nichž u některých byl popsán vztah mezi jejich zvýšenou expresí a genem *BCR-ABL* [Deininger, et al., 2001]. Takové zvýšení u cyklinů D pomocí cDNA arrayí nebylo nalezeno, nicméně ani v uvedené práci Deiningera nebyla zvýšená exprese cyklinu D2 ve všech typech CML vzorků. Je tedy možné, že v CML existují ještě jiné mechanismy deregulace buněčného cyklu.

Za povšimnutí stojí i geny stejně deregulované (v tomto případě jde o sníženou expresi oproti normálu, shluk *II+IV_down*) ve skupině vzorků pacientů s hladinou *BCR-ABL* nekorelující se špatným stavem pacienta (shluk vzorků II), jako ve skupině tří dalších vzorků pacientů s rozvinutou CML (shluk vzorků IV, čítající i jednu ze 3 BC) a ještě jedním případem BC (vzorek F-6). Tyto geny (např. *NOTCH2*, *B-Raf* a *CASP8*) pak mohou ukazovat na průnik dvou cest progresu onemocnění. Takže by pak například snížení exprese proapoptotické iniciační kaspázy 8 (*CASP8*) bylo markerem progresu onemocnění obecně, tedy i u vzorků, které mají i v progresi onemocnění nízkou hladinu *BCR-ABL*. Tak by se mohla snižovat citlivost leukocytů z progredující CML k apoptotickým signálům.

Genová exprese v době dobrých odpovědí na léčbu a při léčbě imatinibem

U vzorků ze shluku I (účinná léčba IM a relativně dobré odpovědi na léčbu obecně) byly upregulovány angiopoietin 1 a *KDR* (kinase insert domain receptor, receptor VEGF). Oba geny se účastní regulace angiogeneze. Také *THBS1* (thrombospondin 1), který zde byl upregulován, hraje roli v angiogenezi a to v souvislosti se signální drahou obsahující p38 a *ERK1/2*. *THBS1* působí na angiogenezi inhibičně [Addison, et al., 2005; Nakagawa, et al., 2005]. Tyto výsledky naznačují deregulaci angiogeneze u buněk pacientů s CML,

kteřá je ještě terapeuticky zvladnutelná. Nejedná se o časné fáze CML, ale o pacienty relativně dobře odpovídající na léčbu (často IM).

Kinázy inhibované IM (*c-KIT*, *PDGF-R β* a *c-RAF 1*) nevykazovaly míru exprese korelující s léčbou IM, ani se jejich exprese navzájem nepodobaly. Což ovšem není překvapující, neboť u těchto proteinů nebyl popsán pozitivní vliv jejich kinázové aktivity na jejich vlastní expresi.

V buňkách vzorků shluku *I* byla (podle obou shlukovacích metod) zvýšená hladina transkriptu genu quiescin Q6. Ten byl popsán jakožto gen se zvýšenou hladinou v embryonálních fibroblastech v klidovém stavu [Coppock, et al., 1993]. To ukazuje na možnost zvýšeného množství leukocytů v klidovém stavu u buněk pacientů CML, která je terapeuticky zvladatelná.

Genová exprese v blastické krizi CML

V několika případech byla detekována změna exprese genů v BC na rozdíl od ostatních fází CML. V těchto případech může jít o změnu biologických mechanismů onemocnění pokročilého do své terminální fáze. Nejen z molekulárních ukazatelů, ale i klinicky je zjevné, že takový přechod v CML je, ale jeho mechanismy nejsou známy. Je ovšem třeba mít na zřeteli také změnu v profilu buněčné populace v periferní krvi pacientů v BC. Část změn v genové expresi je třeba přisuzovat rozdílnému procentuálnímu zastoupení buněčných typů (nárůst blastů, promyelocytů). To ovšem neovlivňuje opodstatněnost sledování exprese v celkové populaci leukocytů, neboť změna v buněčném složení je pro BC charakteristická a v jednotlivých případech obdobná. Lze tedy uvažovat změny v celkové buněčné populaci.

Genová exprese u tří vybraných pacientů CML

U pacienta C se v 37 měsíci od diagnózy objevila chromozomální aberace *der(17)t(3;17)*, která v cytogenetickém nálezu již zůstala. Ve skupině genů, u nichž došlo k overexpresi před nálezem *der(17)t(3;17)* a k downregulaci po tomto nálezu patří například *NOTCH4* (obr. 15). V CML bylo popsáno zvýšení exprese tohoto genu [Vercauteren et Sutherland, 2004; Ye, et al., 2004]. To by v tomto případě mohlo znamenat, že po uvedené translokaci převzaly onkogenní funkce *NOTCH4* jiné geny.

U pacienta F byly nalezeny skupiny genů stabilně upregulovaných (obr.16 F-a), stabilně downregulovaných (F-b), genů s nárůstem exprese při léčbě IM (F-c) a skupina genů s expresí klesající v BC (F-d). Do skupiny genů, jejichž exprese stoupla v době léčby IM patří i kaspáza 8. Zvýšení exprese této iniciační kaspázy může znamenat zvýšenou míru citlivosti leukemických buněk k apoptotickým signálům v době relativně dobré odpovědi na léčbu.

Do skupiny genů, jejichž exprese klesala v BC, patří také *MMP8*. Zde je tedy vidět profil overexprese *MMP8* s poklesem v BC, který by později potvrzen i pomocí PCR v reálném čase.

Pacient I byl nejprve léčen IFN a HU a později imatinibem. U několika genů došlo u tohoto pacienta k poklesu exprese po přechodu na léčbu imatinibem. Mezi ně patří i *JunB* a *FOS*. Ty byly downregulované už od počátku sledování pacienta (a i v ostatních vzorcích pacientů) a pokles jejich exprese v období léčby IM ukazuje na nezávislost této downregulace na *BCR-ABL*. Mohlo by se tak jednat o další mechanismus působící v CML.

Expresce genů *MMP8*, *PBP* a *AH11*

V této studii byla pomocí PCR v reálném čase monitorována úroveň exprese tří, vybraných genů: *MMP8*, *PBP* a *AH11*.

Výsledky ukázaly zvýšenou expresi metaloproteázy *MMP8* v CML v porovnání se zdravými jedinci. Kromě její upregulace detekované pomocí cDNA arrayí v naprosté většině sledovaných vzorků CML (v 36 z 37), byla tato exprese potvrzena i pomocí PCR v reálném čase. Množství *MMP8* vzrůstalo se zhoršující se odpovědí na léčbu, kromě BC, kde došlo oproti NonR a HR k poklesu. Je zajímavé, že pokles exprese v BC sledovaný pomocí PCR byl patrný i u dvou ze tří BC ve skupině vzorků analyzovaných pomocí cDNA arrayí. To zpětně ukazuje na spolehlivost metody cDNA arrayí, která je ovšem mnohem méně citlivá, než PCR.

MMP8 je aktivována *MMP10* (stromelyzin 2), která je sama aktivována mimo jiné plazminem. Plazmin je aktivní produkt štěpení plazminogenu, které zprostředkovává urokináza [Knauper, et al., 1996; Saunders, et al., 2005]. *MMP10* je jedním z jedenácti genů zařazených do skupiny UP v rámci PCA analýzy, tedy mezi 11 genů upregulovaných ve většině testovaných vzorků. Také urokináza patří do této skupiny genů se zvýšenou expresí a to dokonce jak podle PCA, tak i podle hierarchické shlukové analýzy. A dále, plaz-

minogen byl upregulován u vzorků s nekorelující hladinou *BCR-ABL* se špatným klinickým stavem pacienta. Celkový obraz tedy vypovídá o aktivaci celé dráhy: urokináza -> plazminogen -> plazmin -> MMP10 -> MMP8 a to zvláště u pacientů se špatnou odpovědí na léčbu CML. Je třeba si ovšem uvědomit, že se zde jedná spíše o návrh hypotézy, neboť kromě *MMP8* nebyly upregulace těchto genů potvrzeny citlivějšími metodami a i v rámci cDNA arrayí se často jedná o upregulaci blízko hranici signifikance pro danou metodu. Přesto se jedná o zajímavý objev upregulací genů v jediné funkční kaskádě.

Gen *MMP8* lze použít jako marker progresu CML, i když je jeho použití omezeno na období před přechodem do BC.

Gen *PBP* byl zvolen na základě předběžných výsledků získaných pomocí metody cDNA arrayí, které ukázaly jeho downregulaci v BC vzhledem k jiným vzorkům CML. Tento trend byl potvrzen pomocí PCR v reálném čase ($p=0,016$, Mann Whitney). Expres *PBP* v různých odpovědích na léčbu však nebyla signifikantně rozdílná a navíc rozpětí uvnitř skupin jednotlivých odpovědí bylo relativně velké. Tento pokles, výlučně v BC, může být způsoben změnou charakteru a molekulárních mechanismů v CML v BC. Kromě toho zde opět může hrát roli i změna ve složení izolované leukocytární populace, případně změna léčby spojená s přechodem do BC. *PBP* zde sice za stávajících podmínek plní funkci markeru BC, ale jeho využití jako prognostického faktoru není možné.

AHII byl identifikován, jako pomocný gen pro virus A-MuLV (Abelson murine leukemia virus), který může indukovat leukemii podobná onemocnění v myších [Jiang, et al., 2002]. Stejný autor později popsal upregulaci *AHII* v buňkách CML pacientů [Jiang, et al., 2004]. V této práci Jiang používá ke stanovení koncentrace absolutní kvantifikaci, bez korekce pomocí kontrolních genů a tedy s možností zavedení chyby v případě různých účinností při zpracování vzorků (např. reverzní transkripce) a zároveň stanovuje koncentraci transkriptu *AHII* v relativně malém počtu vzorků. Na rozdíl od Jianga byla v této práci popsána hladina *AHII* nižší, než ve směsném normálu 12 zdravých jedinců (dále ověřeno s použitím dalšího normálu, data nejsou prezentována). Tento rozdíl může být způsoben jednak variabilitou exprese *AHII* a jednak výběrem pacientů (Jiang uvádí vysoké počty leukocytů ($75-640 \times 10^9/l$) i u pacientů v CP). Na druhou stranu shodně s uvedenou studií i v této práci je prezentován nárůst hladiny transkriptů *AHII* směrem od lepších k horším odpovědím na léčbu. Bylo by tedy zajímavé sledovat kinetiku tohoto genu dále, případně v konkrétních buněčných frakcích. *AHII* nelze použít jako marker progresu CML

a to jednak vzhledem k velké variabilitě jeho exprese, ale také proto, že jeho exprese v CML je nízká.

Použití kontrolních genů v PCR v reálném čase

Jeden z požadavků na kontrolní geny je stabilita jejich exprese v rámci sledovaných experimentálních podmínek, aby bylo možné eliminovat případné rozdíly vzniklé při zpracování vzorků. Na druhou stranu pro monitorování potenciálního markeru progresu onemocnění může být výhodnější požadavek na kontrolní gen, aby jeho exprese sledovala stejný vzorec pro každou z opakujících se situací, aniž by nutně musela být stabilní. Například gen GUS, který byl z kandidátů kontrolních genů vyloučen pro svoji nestabilitu vykazoval opakovaně sníženou expresi na přechodu z akcelerované fáze do BC (data zde nebyla prezentována). Pokud by tedy byl GUS použit jako kontrolní gen mohl by posílit nárůst (částečně zdánlivý) hladiny sledovaného genu v přechodu z AP do BC a tím zvýšit citlivost celého systému.

CGH Arraye

Pomocí metody CGH Array nebyly nalezeny žádné jednotící, nebo charakterizující genomové změny u sledovaných vzorků pacientů CML. To může být způsobeno heterogenitou onemocnění i na úrovni DNA aberací. I když jsou některé abrace v CML častější, nelze s jistotou určit zákonitost v jejich výskytu, ani přesný mechanismus důsledků, které pro onemocnění mají. Zároveň to ovšem může být způsobeno relativně malým množstvím sledovaných vzorků. I počet genomových lokusů (287) je relativně malý a navíc obsahuje několik subtelomérových oblastí (26 % všech lokusů) či lokusů, které jsou polymorfni, což oboje ztěžuje interpretaci výsledků.

Zde prezentované změny v genové expresi ukazují na možnost vazby progresu onemocnění na různé signální kaskády a funkční skupiny genů. To je zajímavé i proto, že dosud nebyl jasně popsán vliv samotného *BCR-ABL* přímo na progresi CML. A existuje předpoklad nutnosti další onkogenní/akcelerující události.

ZÁVĚRY

Chronická myeloidní leukemie je maligní hematopoetické onemocnění, jehož molekulární podstata úzce souvisí s fúzním genem *BCR-ABL*. I přes tento jednotící prvek v CML je toto onemocnění velice heterogenní a vztah *BCR-ABL* k ostatním genům exprimovaným v leukocytech pacientů s CML není uspokojivě popsán. Stejně tak nejsou dobře popsány další onkogenní události a situace, kdy je CML na *BCR-ABL* částečně nezávislá.

Při studiu mechanismů CML byla pomocí PCR sledována kinetika fúzního genu *BCR-ABL* v poměru k normálnímu genu *BCR*. Tento poměr nejen dobře koreluje s rozvojem CML, ale je jejím lepším prognostickým faktorem, než samotná hladina *BCR-ABL*.

O vývoji a mechanismu maligního onemocnění vypovídá také stabilita genomu. Hledání změn v genomu 10-ti vzorků CML bylo provedeno pomocí CGH Arrayí. Tato metoda potvrdila variabilitu CML, nicméně nebyla detekována žádná změna, která by byla jednotně přítomna ve všech sledovaných případech CML.

Důležitou oblastí ve studiu molekulárních mechanismů maligních onemocnění je analýza genové exprese. K analýze exprese velkého množství genů byla použita metoda expresních arrayí. Pomocí této metody byly nalezeny geny, jejichž exprese je stejná ve všech sledovaných případech CML (37 vzorků CML). Tato exprese, uniformní ve všech vzorcích CML s různou dobou od diagnózy, různou léčbou, různou odpovědí na léčbu, různým typem přestavby *BCR-ABL* a různým věkem a pohlavím pacientů, je odlišná od exprese těchto genů v leukocytech zdravých jedinců. V CML bylo nalezeno 17 genů, se sníženou expresí. Mezi nimi byly *JunB*, *FOS* a *PBP*. Bylo nalezeno také 11 genů se zvýšenou expresí v CML v porovnání s expresí v leukocytech zdravých jedinců. Patří k nim urokináza, *IL1A* a *MMP8*.

Kinázová aktivita *BCR-ABL* je specificky inhibována imatinibem, látkou, která je úspěšně používána k léčbě CML. Mezi pacienty s různými léčebnými přístupy byla pomocí hierarchického shlukování nalezena skupina vzorků, ve které byla většina z imatinibem léčených a dále většina z vzorků pacientů s dobrou odpovědí na léčbu obecně. Tuto skupinu vzorků charakterizovala řada genů se zvýšenou expresí nejen oproti zdravým jedincům, ale také oproti ostatním vzorkům CML. Tyto geny (n=58) jsou možnými kandidáty pro objasnění mechanismů v CML, v době dobré odpovědi na léčbu, kdy je kinázová aktivita *BCR-ABL* inhibována imatinibem nebo jiným, nezávislým mechanismem. Mezi tyto geny patří *EGF*, plazminogen, angiopoietin 1 a *KDR*.

Mezi pacienty s CML jsou případy, ve kterých nízká hladina *BCR-ABL* nekoreluje se špatným klinickým stavem a s neuspokojivou odpovědí na léčbu. Je možné, že v těchto případech je CML částečně, nebo úplně nezávislá na *BCR-ABL*. Je zajímavé, že shluková analýza vzorků pacientů jasně vydělila skupinu sedmi vzorků (z celkového počtu 10-ti) pacientů, u kterých došlo alespoň v některé fázi vývoje CML k této diskrepanci mezi hladinou *BCR-ABL* transkriptů a klinickým stavem pacienta. U těchto vzorků byly popsány skupiny genů se zvýšenou, nebo sníženou expresí oproti ostatním vzorkům CML. Mezi geny se zvýšenou expresí (n=49) patří například *RCF2* a *IL12B*. Ke genům (n=17) se sníženou expresí u těchto vzorků patří například kaspáza 4. Tyto geny by snad mohly sloužit jako biologické markery pro případy CML ve kterých *BCR-ABL* bude mít snížený prognostický význam.

Zajímavým výsledkem je i vydělení tří vzorků pacienta s PCML (Periodic Chronic myeloid leukemia). Geny charakterizující tyto vzorky by opět mohly ukazovat na mechanismy vzniku periodicity v CML.

Pro potvrzení platnosti metody expresních arrayí a zároveň testování míry exprese a kinetiky zvolených genů, byla použita metoda PCR v reálném čase. Ke sledování byly zvoleny tři geny, z nichž dva na základě našich výsledků z expresních profilů. Jedná se o gen *PBP*, patřící do skupiny s uniformně sníženou expresí a *MMP8*, patřící do skupiny genů s expresí uniformně zvýšenou v CML. Výsledky PCR v reálném čase (normalizované na expresi 2 stabilně exprimovaných kontrolních genů) dále posílily domněnku o disregulaci *MMP8* a *PBP* v CML. Navíc v případě *MMP8* došlo k signifikantnímu nárůstu exprese korelujícímu se špatnou odpovědí na léčbu, kromě BC, kde došlo k mírnému poklesu.

Prezentované výsledky ukazují, že se analýzou profilů genové exprese podařilo nalézt geny charakterizující související skupiny vzorků CML a potenciální markery progresse onemocnění. Kvantifikace exprese vybraných genů potvrdila v některých případech korelaci s progresí CML, nebo s přechodem do blastického zvratu onemocnění.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A LÉKAŘSKÝCH TERMÍNŮ

Seznam použitých zkratek:

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
BC	blastická krize
b, kb	páry bází, tisíce párů bází (kilobaze)
CCR	kompletní cytogenetická odpověď (complet cytogenetic response)
cDNA	komplementární DNA
CML	chronická myeloidní leukémie
Ct	cycle number treshold
Cy	cyanine
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
ECM	extracellular matrix
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease)
GvL efekt	reakce štěpu proti leukemii (graft-versus-leukemia efekt)
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HR	hematologická odpověď
HU	hydroxyurea
IFN	interferon
ITG	guanidiumisothiokyanát
mCR	malá cytogenetická odpověď (minor cytogenetic remission)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger RNA)
NR/NonR	bez odpovědi na léčbu
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pCR	částečná cytogenetická odpověď (partial cytogenetic response)
Ph	Philadelphský chromozom
PLT	počet trombocytů (platelets)
R	poměr BCR-ABL/BCR
relaps	opětné propuknutí onemocnění
remise	vymizení onemocnění
RNA	ribonukleotidová kyselina
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
SDS	sodium dodecyl sulfát
SSC	salt – sodium citrát
TKB	transplantace hematopoetických kmenových buněk
UV	ultrafialové záření
WBC	počet bílých krvinek (white blood cell count)

Použité lékařské termíny:

alopecie	vypadávání vlasů
bazofilie	zvýšené množství bazofilů v krvi
hemoragická diatéza	(Diathesis haemorrhagica) krvácivost, sklon ke spontánnímu krvácení
hepatomegalie	zvětšení jater
chlorom	granulocytární sarkom, nádor obsahující zelenavý pigment
koagulopatie	porucha koagulačních faktorů způsobující zvýšenou krvácivost
leukocytopenie	nedostatek leukocytů (normální hodnoty jsou: $2 - 10 \times 10^9/l$)
lymfadenopatie	obecně onemocnění lymfatických uzlin, provázené jejich zvětšením
splenomegalie	chorobné zvětšení sleziny
stomatitida	zánět sliznice ústní dutiny
trombocytopenie	nedostatek trombocytů (normální hodnoty jsou: $150 - 450 \times 10^9/l$)
trombopatie	zvýšená tvorba krevních sraženin
trombóza	krevní sraženina
vazookluzivní poruchy	uzavírání cév

Terminologická poznámka:

V případě nejistého úzu názvu, nebo zkratky názvu genu se tato práce odkazuje na HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) nomenklaturu. Případně je uveden i kód databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) RefSeq (Reference Sequence) a Entrez Gene ID pro snadné dohledání sekvence zmiňovaných genů.

Příslušné URL adresy jsou:

HGNC: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>

Entrez Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>

RefSeq: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

Terminologickým problémem je v současnosti pojmenování systémů sledujících expresi velkého množství genů v jediném experimentu. V angličtině jsou zažité termíny chip (resp. biochip) a array. Rozdíl mezi nimi je v tom, že jako chip bývají označovány systémy vznikající syntézou přímo na podkladu. Naopak array je systém vznikající přenesením separátně vzniklých úseků nukleových kyselin na nosič.

Nesnáz je ovšem s překladem těchto termínů do českého jazyka. Používání slova biočip by bylo zavádějící, proto byla zvolena varianta použít termín array.

REFERENCE

1. Addison CL, Nor JE, Zhao H, Linn SA, Polverini PJ, Delaney CE. The response of VEGF-stimulated endothelial cells to angiostatic molecules is substrate-dependent. *BMC Cell Biol.* 2005 Oct 31;6:38.
2. Agami R, Shaul Y. The kinase activity of c-Abl but not v-Abl is potentiated by direct interaction with RFXI, a protein that binds the enhancers of several viruses and cell-cycle regulated genes. *Oncogene.* 1998 Apr 9;16(14):1779.
3. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004 Jul 23;118(2):149.
4. Arlinghaus RB. The involvement of Bcr in leukemias with the chromosome. *Critic Rev Oncog.* 1998, 9, 1.
5. Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature.* 1997 May 29;387(6632):516.
6. Baskaran R, Chiang GC, Wang JY. Identification of binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology.* 1996, 16, 3361.
7. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003 Dec;17(12):2474.
8. Ben-Neriah Y, Bernards A, Paskin M, Daley GQ, Baltimore D. Alternative 5'exons in c-abl mRNA. *Cell.* 1986, 44, 577.
9. Bennett M, Grunwald AJ. Hydroxyurea and periodicity in myeloproliferative disease. *Eur J Haematol.* 2001 May;66(5):317.
10. Bernards A, Rubin CM, Westbrook CA, Paskin M, Baltimore D. The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cell Biol.* 1987 Sep;7(9):3231.
11. Bernstein R. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. *Seminars in Hematology.* 1988, 25, 20.
12. Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, Hehlmann R, Hochhaus A, Shepherd PC, Steegmann JL, Kluin-Nelemans HC, Thaler J, Simonsson B, Louwagie A, Reiffers J, Mahon FX, Montefusco E, Alimena G, Hasford J, Richards S, Saglio G, Testoni N, Martinelli G, Tura S, Baccarani M. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood.* 2001 Nov 15;98(10):3074.
13. Bruchova H, Borovanova T, Klamova H, Brdicka R. Gene expression profiling in chronic myeloid leukemia patients treated with hydroxyurea. *Leuk Lymphoma.* 2002 Jun;43(6):1289.
14. Bruchova H, Klamova H, Brdicka R. Gene expression in white blood cells in chronic myeloid leukemia *Cas Lek Cesk.* 2000 Oct 25;139(21):655.
15. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):100.
16. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Cabreira-Hansen M, Beran M, McQueen T, Chen W, Andreeff M. Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. *Blood.* 2006 Feb 15;107(4):1555.

17. Castor CW, Miller JW, Walz DA. Structural and biological characteristics of connective tissue activating peptide (CTAP-III), a major human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Feb;80(3):765.
18. Cerione RA, Zheng Y. The Dbl family of oncogenes. *Current Opinion Cell Biology*, 1996, 8, 216.
19. Claverie JM. Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet*. 1999;8(10):1821.
20. Colombat M, Fort MP, Chollet C, Marit G, Roche C, Preudhomme C, Reiffers J, Praloran V, Mahon FX. Molecular remission in chronic myeloid leukemia patients with sustained complete cytogenetic remission after imatinib mesylate treatment. *Haematologica*. 2006 Feb;91(2):162.
21. Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ*. 1993 Jun;4(6):483.
22. Croce CM, Huebner K, Isobe M, Fainstain E, Lifshitz B, Shtivelman E, Canaani E. Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Oct;84(20):7174.
23. Curry TE Jr, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):428.
24. Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H, Marsh DJ, Ritz J, Freedman A, Stiles C, Eng C. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet*. 1999 Feb;8(2):185.
25. Dai Z, Pendergast AM. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev*. 1995 Nov 1;9(21):2569.
26. Danial NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2523.
27. Dave BJ, Hess MM, Pickering DL, Zaleski DH, Pfeifer AL, Weisenburger DD, Armitage JO, Sanger WG. Rearrangements of chromosome band 1p36 in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1401.
28. de Jong R, ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene*. 1997 Feb 6;14(5):507.
29. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2640.
30. Deininger MW, Vieira SA, Parada Y, Banerji L, Lam EW, Peters G, Mahon FX, Kohler T, Goldman JM, Melo JV. Direct relation between BCR-ABL tyrosine kinase activity and cyclin D2 expression in lymphoblasts. *Cancer Res*. 2001 Nov 1;61(21):8005.
31. Demehri S, Paschka P, Schultheis B, Lange T, Koizumi T, Sugimoto T, Branford S, Lim LC, Kegel T, Martinelli G, Hochhaus A, Druker BJ, Deininger MW. e8a2 BCR-ABL: more frequent than other atypical BCR-ABL variants? *Leukemia*. 2005 Apr;19(4):681.
32. Dhut S, Dorey EL, Horton MA, Ganesan TS, Young BD. Identification of two normal bcr gene products in the cytoplasm. *Oncogene*. 1988 Nov;3(5):561.
33. Di Raimondo F, Palumbo GA, Molica S, Giustolisi R. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases. *Acta Haematol*. 2001;106(4):177.
34. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):400.
35. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Lin H, Arlinghaus R, Aggarwal BB, Shishodia S, Albitar M, Hayes K, Kantarjian H, Talpaz M. Imatinib mesylate resistance through BCR-ABL independence in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2004 Jan 15;64(2):672.
36. Duyster J, Baskaran R, Wang JY. Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyterminal repeated domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995, 92, 1555.

37. Ebos JM, Tran J, Master Z, Dumont D, Melo JV, Buchdunger E, Kerbel RS. Imatinib mesylate (STI-571) reduces Bcr-Abl-mediated vascular endothelial growth factor secretion in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cancer Res.* 2002 Dec;1(2):89.
38. Estrov Z, Kurzrock R, Talpaz M. Role of interleukin-1 inhibitory molecules in therapy of acute and chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma.* 1993 Aug;10(6):407.
39. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology.* 1999 Feb;13(2):169.
40. *Oncology (Williston Park).* 1999 Feb;13(2):169-80
41. Fioretos T, Voncken JW, Baram TZ, Kamme F, Groffen J, Heisterkamp N. Regional localization and developmental expression of the BCR gene in rodent brain. *Cell Mol Biol Res.* 1995;41(2):97.
42. Fish EN, Uddin S, Korkmaz M, Majchrzak B, Druker BJ, Platanias LC. Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):571.
43. Fortin P, Mackey MC. Periodic chronic myelogenous leukaemia: spectral analysis of blood cell counts and aetiological implications. *Br J Haematol.* 1999 Feb;104(2):336.
44. Franz WM, Berger P, Wang JYJ. Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO Journal,* 1989, 8, 137.
45. Galton DA. Myleran in chronic myeloid leukaemia; results of treatment. *Lancet.* 1953 Jan 31;264(6753):208.
46. Gambacorti-Passerini C, Piazza R, D'Incalci M. Bcr-Abl mutations, resistance to imatinib, and imatinib plasma levels. *Blood.* 2003 Sep 1;102(5):1933.
47. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001 Aug 3;293(5531):876.
48. Gougopoulou DM, Kiaris H, Ergazaki M, Anagnostopoulos NI, Grigoraki V, Spandidos DA. Mutations and expression of the ras family genes in leukemias. *Stem Cells.* 1996 Nov;14(6):725.
49. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wormann B, Haase D, Bohlander SK. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005 Nov;44(3):329.
50. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984 Jan;36(1):93.
51. Haas OA, Argyriou-Tirita A, Lion T. Parental origin of chromosomes involved in the translocation t(9;22). *Nature,* 1992, 369, 414.
52. Haferlach T, Winkemann M, Nickening C, Meeder M, Ramm-Petersen L, Schoch R, Nickelsen M, Weber-Matthiesen K, Schlegeberger B, Schoch C, Gassmann W, Löffler H. Which compartments are involved in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia? An answer at the single cell level combining May-Grunwald-Giemsa and fluorescence in situ hybridization. *British Journal of Haematology,* 1997, 97, 99.
53. Hagemeijer A. Chromosome abnormalities in CML. *Bailliere's Clinical Haematology,* 1987, 1, 963.
54. Hantschel O, Wiesner S, Guttler T, Mackereth CD, Rix LL, Mikes Z, Dehne J, Gorlich D, Sattler M, Superti-Furga G. Structural basis for the cytoskeletal association of Bcr-Abl/c-Abl. *Mol Cell.* 2005 Aug 19;19(4):461.
55. Hariharan IK, Adams JM. cDNA sequence for human bcr, the gene that translocates to the abl oncogene in chronic myeloid leukaemia. *EMBO J.* 1987 Jan;6(1):115.
56. He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE. The intermediate filament protein kinase 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 277: 10767-10774, 2002.

57. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Löffler H, Heinze B, Georgii A, et al. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood*. 1993 Jul 15;82(2):398.
58. Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR, Spurr NK, Goodfellow PN, Solomon E, Carritt B, Bodmer WF. Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature*. 1982 Oct 21;299(5885):747.
59. Heisterkamp N, Jenkins R, Thibodeau S, Testa JR, Weinberg K, Groffen J. The bcr gene in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1989, 73, 1307.
60. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. *Nature*, 1985, 315, 758.
61. Henkemeyer MJ, Bennett RL, Gertler FB, Hoffmann FM. DNA sequence, structure, and tyrosine kinase activity of the *Drosophila melanogaster* Abelson proto-oncogene homolog. *Molecular and Cellular Biology*, 1988, 8, 843.
62. Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B, Vela MC, Colomer D, Alvarez-Larran A, Cervantes F. Survivin expression in the progression of chronic myeloid leukemia: a sequential study in 16 patients. *Leuk Lymphoma*. 2005 May;46(5):717.
63. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*. 2004 Dec 1;117(Pt 25):5965.
64. Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Cumutte JT, Bokoch GM. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*. 1993 Nov;4(11):1217.
65. Hirsch-Ginsberg C, Le Maistre AC, Kantarjian H, Talpaz M, Cork A, Freireich EJ, Trujillo JM, Lee MS, Stass SA. RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 1990, 76, 1214.
66. Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia*. 2004 Aug;18(8):1321.
67. Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Melo JV, Sick C, Berger U, Guo JQ, Arlinghaus RB, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):2236.
68. Holland GD, Henkemeyer MJ, Kaehler DA, Hoffman FM, Risser R. Conservation of function of *Drosophila melanogaster* abl and murine v-abl proteins transformation of mammalian cells. *Journal of Virology*, 1990, 64, 2226.
69. Huntly BJ, Bench A, Green AR. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1160.
70. Huntly BJ, Bench AJ, Delabesse E, Reid AG, Li J, Scott MA, Campbell L, Byrne J, Pinto E, Brizard A, Niedermeiser D, Nacheva EP, Guilhot F, Deininger M, Green AR. Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia: poor prognosis is not associated with loss of ABL-BCR expression, elevated BCR-ABL levels, or karyotypic instability. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4547.
71. Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*. 1995 May 1;27(1):67.
72. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156.
73. Chuang TH, Xu X, Kaartinen V, Heisterkamp N, Groffen J, Bokoch GM. Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995, 92, 10282.

74. Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31704.
75. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res.* 1987 Oct;7(5):429.
76. Izraeli S, Lion T. Multiprimer-PCR for screening of genetic abnormalities in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1991 Dec;79(4):645.
77. *Br J Haematol.* 1991 Dec;79(4):645-7.
78. Jiang X, Hanna Z, Kaouass M, Girard L, Jolicoeur P. Ahi-1, a novel gene encoding a modular protein with WD40-repeat and SH3 domains, is targeted by the Ahi-1 and Mis-2 provirus integrations. *J Virol.* 2002 Sep;76(18):9046.
79. Jiang X, Zhao Y, Chan WY, Vercauteren S, Pang E, Kennedy S, Nicolini F, Eaves A, Eaves C. Deregulated expression in Ph⁺ human leukemias of AHI-1, a gene activated by insertional mutagenesis in mouse models of leukemia. *Blood.* 2004 May 15;103(10):3897.
80. Jin A, Kurosu T, Tsuji K, Mizuchi D, Arai A, Fujita H, Hattori M, Minato N, Miura O. BCR/ABL and IL-3 activate Rap1 to stimulate the B-Raf/MEK/Erk and Akt signaling pathways and to regulate proliferation, apoptosis, and adhesion. *Oncogene.* 2006 Mar 6
81. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Luthra R, Giles F, Verstovsek S, Faderl S, Thomas D, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Jones D, Talpaz M. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood.* 2004 Oct 1;104(7):1979.
82. Karlin S, Chen C, Gentles AJ, Cleary M. Associations between human disease genes and overlapping gene groups and multiple amino acid runs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 24;99(26):17008.
83. Keeshan K, Cotter TG, McKenna SL. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia.* 2002 Sep;16(9):1725.
84. Kennedy BJ, Yarbro JW. Metabolic and therapeutic effects of hydroxyurea in chronic myeloid leukemia. *JAMA.* 1966 Mar 21;195(12):1038.
85. Kharbanda S, Bharti A, Peidagger D, Wangdagger J, Pandey P, RenDagger R, Weichselbaum R, Walshdagger CT, Kufe D. The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1. *PNAS,* 1996, 93, 6898.
86. Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, Stevens T, Carius B, Gschaidmeier H, Huber C, Fischer T. In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia.* 2003 Jun;17(6):999.
87. Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science,* 1992, 256, 382.
88. Knauper V, Murphy G, Tschesche H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *Eur J Biochem.* 1996 Jan 15;235(1-2):187.
89. Kurzrock R, Kantarjian HM, Shtarid M, Gutterman JV, Talpaz M. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood,* 1989, 75, 445.
90. Lacronique V, Boureux A, Monni R, Dumon S, Mauchauffe M, Mayeux P, Gouilleux F, Berger R, Gisselbrecht S, Ghysdael J, Bernard OA. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood.* 2000 Mar 15;95(6):2076.
91. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science.* 1997 Nov 14;278(5341):1309.

92. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2343.
93. Leibundgut EO, Jotterand M, Rigamonti V, Parlier V, Muhlematter D, Tobler A, Solenthaler M. A novel BCR-ABL transcript e2a2 in a chronic myelogenous leukaemia patient with a duplicated Ph-chromosome and monosomy 7. *Br J Haematol.* 1999 Sep;106(4):1041.
94. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2223.
95. Lewis JM, Baksaran M, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JYJ. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1996, 93, 15174.
96. Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J.* 2001 Dec 3;20(23):6793.
97. Lu D, Liu J, Cambell M, Guo JQ, Heistercamp N, Groffen J, Canaani E, Arlinghaus RB. Tyrosine phosphorylation of P160 BCR by P210 BCR-ABL. *Blood*, 1993, 82, 1257.
98. Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood.* 2003 Mar 15;101(6):2368.
99. Marin D, Markt S, Bua M, Armstrong L, Goldman JM, Apperley JF, Olavarria E. The use of imatinib (STI571) in chronic myeloid leukemia: some practical considerations. *Haematologica.* 2002 Sep;87(9):979.
100. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, 1991, 67, 459.
101. Mayer BJ, Baltimore D. Mutagenic analysis of the role of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14, 2883.
102. Mayer IA, Verma A, Grumbach IM, Uddin S, Lekmine F, Ravandi F, Majchrzak B, Fujita S, Fish EN, Plataniotis LC. The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):28570.
103. Mayer J, Starý J, et al.: *Leukemie*, GRADA Publishing, spol. s.r.o., 2002
104. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13, 7587.
105. McWhirter JR, Wang JY. Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr-abl fusion proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11, 1553.
106. McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J.* 1993 Apr;12(4):1533.
107. Melo JV, Goldman JM. Reply to Haas: Are ABL and BCR imprinted? *Leukemia*, 1995, 9, 1407.
108. Melo JV. BCR-ABL gene variants. *Baillieres Clin Haematol.* 1997 Jun;10(2):203.
109. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood.* 1996 Oct 1;88(7):2375.
110. Miao YJ, Wang JY. Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22823.
111. Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, Leonard WJ. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science.* 1995 Jul 7;269(5220):79.

112. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988 16:1215.
113. Mizuchi D, Kurosu T, Kida A, Jin ZH, Jin A, Arai A, Miura O. BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the MEK/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jan 21;326(3):645.
114. Moravcova J, Lukasova M, Sary J, Haskovec C. Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia*. 1998 Aug;12(8):1303.
115. Moravcova J, Muchova S, Kalbacova R, Haskovec C. Single-tube quantitative RT-PCR for monitoring of the response to IFN treatment in CML patients. *Leukemia*. 1998 Aug;12(8):1326.
116. Moravcova J, Nadvornikova S, Zmekova V, Michalova K, Brezinova J, Lukasova M, Vitek A, Hrabanek J, Gasova Z, Sedlacek P, Sary J. Molecular monitoring of responses to DLI and DLI + IFN treatment of post-SCT relapses in patients with CML. *Leuk Res*. 2003 Aug;27(8):719.
117. Moravcova J, Regner J, Mouckova D, Fiser K, Zmekova V, Malacova R, Michalova K, Klamova H. Disease status in patients with chronic myeloid leukemia is better characterized by BCR-ABL/BCR transcript ratio than by BCR-ABL transcript level, which may suggest a role of normal BCR gene in the disease pathogenesis. *Neoplasma*. 2005;52(2):119.
118. Moravcova J, Rulcova J, Polak J, Zemanova Z, Klamova H, Haskovec C. CML patient with rare b2a3 (e13a3) variant of BCR-ABL transcript: complete molecular response to imatinib. *Leuk Res*. 2005 Nov;29(11):1365.
119. Morris CM, Heisterkamp N, Groffen J, Fitzgerald PH. Entire ABL gene is joined with 5'-BCR in some patients with Philadelphia-positive leukemia. *Blood*. 1991 Aug 15;78(4):1078.
120. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, Witte ON. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol*. 1991 Apr;11(4):1785.
121. Murphy G, Ward R, Cavrilovic J, Atkinson S. Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix Suppl*. 1992;1:224.
122. Musacchio A, Cantley LC, Harrison SC. Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14373.
123. Nagar B, Bormann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002 Aug 1;62(15):4
124. Nakagawa T, Lan HY, Glushakova O, Zhu HJ, Kang DH, Schreiner GF, Bottinger EP, Johnson RJ, Sautin YY. Role of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases in the regulation of thrombospondin-1 by TGF-beta1 in rat proximal tubular cells and mouse fibroblasts. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Apr;16(4):899.
125. Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol*. 2000 Feb;20(4):1179.
126. Nichols GL, Raines MA, Vera JC, Lacomis L, Tempst P, Golde DW. Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*. 1994 Nov 1;84(9):2912.
127. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960, 132, 1497.
128. Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene*. 2003 Jun 19;22(25):3952.
129. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem*. 1994 Sep 16;269(37):22925.

130. Ohmine K, Ota J, Ueda M, Ueno S, Yoshida K, Yamashita Y, Kirito K, Imagawa S, Nakamura Y, Saito K, Akutsu M, Mitani K, Kano Y, Komatsu N, Ozawa K, Mano H. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2001 Dec 13;20(57):8249.
131. Overbeck AF, Brtva TR, Cox AD, Graham SM, Huff SY, Khosravi-Far R, Quilliam LA, Solski PA, Der CJ. Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev*. 1995 Dec;42(4):468.
132. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P. Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Dec;26(4):355.
133. Pear WS, Aster JC. T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a human cancer commonly associated with aberrant NOTCH1 signaling. *Curr Opin Hematol*. 2004 Nov;11(6):426.
134. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, Van Rompaey L, Baens M, Van den Berghe H, Marynen P. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7):2535.
135. Pendergast AM. Nuclear tyrosine kinases: From Abl to WEE1. *Current Opinion Cell Biology*, 1996, 8, 174.
136. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*. 1991 Jul 12;66(1):161.
137. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:727.
138. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res*. 1998 Jun 15;58(12):2489.
139. Plataniias LC, Uddin S, Bruno E, Korkmaz M, Ahmad S, Alsayed Y, Van Den Berg D, Druker BJ, Wickrema A, Hoffman R. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 1999 Aug;27(8):1315.
140. Plattner R, Irvin BJ, Guo S, Blackburn K, Kazlauskas A, Abraham RT, York JD, Pendergast AM. A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC-gamma1. *Nat Cell Biol*. 2003 Apr;5(4):309.
141. Potter AM, Watmore A. Cytogenetics in myeloid leukemia. In: Rooney D. E., Czepulkowski B. H. (edit.). *Human Cytogenetics*, vol. II., Oxford University Press: Oxford, 1992, 27 – 66.
142. Prakash O, Yunis JJ. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer genet cytogenet*, 1984, 11, 361.
143. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J*. 1994 Feb 15;13(4):764.
144. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman CL, Friend S, Linsley PS. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2794.
145. Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM, Sawyers CL. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11746.
146. Ravandi F, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Giles FJ, Thomas D, Cortes J, Andreeff M, Estrov Z, Rios MB, Albitar M. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. *Cancer*. 2001 Jun 1;91(11):1964.
147. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):172.

148. Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast A. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science*, 1994, 266, 129.
149. Robertson MJ, Tantravahi R, Griffin JD, Canellos GP, Cannistra SA. Hematologic remission and cytogenetic improvement after treatment of stable-phase chronic myelogenous leukemia with continuous infusion of low-dose cytarabine. *Am J Hematol*. 1993 Jun;43(2):95.
150. Ron D, Zannini M, Lewis M, Wickner RB, Hunt LT, Graziani G, Tronick SR, Aaronson SA, Eva A. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol*. 1991 Apr;3(4):372.
151. Rosc D, Krempleska-Nalezzyta E, Gadomska G, Zastawna E, Michalski A, Drewniak W. Plasminogen activators (t-PA and u-PA) and plasminogen activators inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in some myeloproliferative syndromes. *Med Sci Monit*. 2000 Jul-Aug;6(4):684.
152. Rowley JD, Testa JR. Chromosome abnormalities in malignant hematologic disease. *Advances in Cancer Research*, 1982, 36, 103.
153. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973, 243, 290.
154. Salgia R, Uemura N, Okuda K, Li JL, Pisick E, Sattler M, de Jong R, Druker B, Heisterkamp N, Chen LB, et al. CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8;270(49):29145-50.
155. Salomoni P, Condorelli F, Sweeney SM, Calabretta B. Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):676.
156. Salomoni P, Wasik MA, Riedel RF, Reiss K, Choi JK, Skorski T, Calabretta B. Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/ABL mutant. *J Exp Med*. 1998 Jun 15;187(12):1995.
157. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li S, Van Etten RA, Gu H, Griffin JD, Neel BG. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*. 2002 Jun;1(5):479.
158. Sattler M, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Winkler T, Algate PA, Rohrschneider LR, Griffin JD. BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 1999 Nov;19(11):7473.
159. Saunders WB, Bayless KJ, Davis GE. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. *J Cell Sci*. 2005 May 15;118(Pt 10):2325.
160. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol*. 1997 Jan;96(1):111.
161. Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*. 1997 May 29;387(6632):520.
162. Shah NP, Witte ON, Denny CT. Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines. *Mol Cell Biol*. 1991 Apr;11(4):1854.
163. Shepherd PCA, Canesan TS, Galton DAG. Haematological classification of the chronic myeloid leukemias. *Bailliere's Clinical Haematology*, 1987, 1, 887.
164. Shi Y, Alin K, Goff SP. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev*. 1995 Nov 1;9(21):2583.
165. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcripts of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, 1985, 315, 550.

166. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell*. 1986, 47, 277.
167. Sini P, Cannas A, Koleske AJ, Di Fiore PP, Scita G. Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. *Nat Cell Biol*. 2004 Mar;6(3):268.
168. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J*. 1997 Oct 15;16(20):6151.
169. Skorski T, Kanakaraj P, Ku DH, Nieborowska-Skorska M, Canaani E, Zon G, Perussia B, Calabretta B. Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210*bcr/abl*: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med*. 1994 Jun 1;179(6):1855.
170. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 7;11(9):1251.
171. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984 Apr;63(4):789.
172. Stam K, Heisterkamp N, Reynolds FH, Groffen J. Evidence that the *Ph1* gene encodes a 160 000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7, 1955
173. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004 Feb;18(2):189-218.
174. Stum A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*. 2002 Jan;18(1):207.
175. Szremka AP, Kenner L, Weisz E, Ott RG, Passegue E, Artwohl M, Freissmuth M, Stoxreiter R, Theussl HC, Parzer SB, Moriggl R, Wagner EF, Sexl V. JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4159.
176. ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1731.
177. Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janney PA. The COOH terminus of the *c-Abl* tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol*. 1994 Feb;124(3):325.
178. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):34.
179. Vercauteren SM, Sutherland HJ. Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2315.
180. Verstovsek S, Lunin S, Kantarjian H, Manshour T, Faderl S, Cortes J, Giles F, Albitar M. Clinical relevance of VEGF receptors 1 and 2 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2003 Jul;27(7):661.
181. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*. 1996 Nov 15;87(4):629.
182. Wang JY, Ledley F, Goff S, Lee R, Groner Y, Baltimore D. The mouse *c-abl* locus: molecular cloning and characterization. *Cell*. 1984 Feb;36(2):349.
183. Wang JY. Abl tyrosine kinase signal transduction and cell-cycle regulation. *Current Opinion Genetics and Development*, 1993, 3, 35.

184. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):927.
185. Welch PJ, Wang JY. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*, 1993, 75, 779.
186. Welch PJ, Wang JY. Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15, 5542.
187. Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.* 1996 Apr 1;15(7):1583.
188. Wen ST, Van Etten RA. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev.* 1997 Oct 1;11(19):2456.
189. Wiedemann LM, Kahri KK, Shivji MKK, Rayter SI, Pegram SM, Dowden G, Bevan D, Will A, Galton DAG, Chan Lch. The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and P210 ph1/abl expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative diseases. *Blood*, 1988, 71, 349.
190. Yaku H, Sasaki T, Takai Y. The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: Its properties in comparison with those of Smg GDS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 198, 811.
191. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):285.
192. Ye Q, Shieh JH, Morrone G, Moore MA. Expression of constitutively active Notch4 (Int-3) modulates myeloid proliferation and differentiation and promotes expansion of hematopoietic progenitors. *Leukemia*. 2004 Apr;18(4):777.
193. Yong AS, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF, Melo JV. Molecular profiling of CD34+ cells identifies low expression of CD7, along with high expression of proteinase 3 or elastase, as predictors of longer survival in patients with CML. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):205.
194. Zhu QS, Heisterkamp N, Groffen J. Unique organization of the human BCR gene promoter. *Nucleic Acids Res.* 1990 Dec 11;18(23):7119.

PREZENTACE VÝSLEDKŮ

Publikace

Moravcova J, Regner J, Mouckova D, Fiser K, Zmekova V, Malacova R, Michalova K, Klamova H.

Disease status in patients with chronic myeloid leukemia is better characterized by BCR-ABL/BCR transcript ratio than by BCR-ABL transcript level, which may suggest a role of normal BCR gene in the disease pathogenesis.

Neoplasma. 2005;52(2):119.

Fiser K, Klamova H, Moravcova J.

Gene expression profiles of two accelerations in a CML patient.

Leuk Res. 2006 Jun;30(6):751.

Prezentace na konferencích

Moravcová J, Moučková D, Fišer K, Regner J, Březinová J, Klamová H.

Disease status is better characterized by BCR-ABL/BCR transcript ratio than by BCR-ABL transcript level in patients with CML.

7th Congress of the European Haematology Association, June 2002, Florence, Italy

Fišer K, Regner J, Klamová H, Moravcová J.

Charakterizace expresních profilů genů u pacientů s CML pomocí metody cDNA Microarray.

XIII. Český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí, 22.-25. září 2002, Praha

Moravcová J, Regner J, Moučková D, Fišer K, Březinová J, Klamová H.

Poměr transkriptů BCR-ABL/BCR charakterizuje stav pacientů s CML lépe než hladina transkriptů BCR-ABL.

XIII. Český a slovenský hematologický a transfuziologický kongres s mezinárodní účastí, 22.-25. září, 2002, Praha

Fišer K, Regner J, Klamová H, Moravcová J.

Gene expression profiling in two CML accelerations in one patient.

XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 2.-5. 6. 2004

Moravcová J, Polák J, Moučková D, Zmeková R, Maláčová R, Fišer K, Klamová H.

BCR-ABL/BCR transcript ratio > 1 and p21Cip overexpression as markers of CML acceleration and progression to blast crisis. Hematol J 2004, 5 (Suppl 2): S245

9th Congress of European Hematology Association, Geneva Palexpo, Switzerland, 10-13 June 2004

Fišer K, Moučková D a Moravcová J.

Charakterizace pacientů s CML s nízkou hladinou transkriptu BCR-ABL neodpovídajících na léčbu.

XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 31.5.-3. 6. 2006 (přijato k prezentaci)

Fišer K, Moučková D, Otáhalová E and Moravcová J.

Gene expression profiling in cml patients resistant to treatment – specific profiles in non-responders with low BCR – ABL transcript levels.

11th Congress of European Hematology Association, Amsterdam, The Netherlands, 15-18 June 2006. (přijato k prezentaci)

PŘÍLOHA PUBLIKACÍ

Disease status in patients with chronic myeloid leukemia is better characterized by BCR-ABL/BCR transcript ratio than by BCR-ABL transcript level, which may suggest a role of normal BCR gene in the disease pathogenesis*

J. MORAVCOVÁ, J. REGNER, D. MOUČKOVÁ, K. FIŠER, V. ZMEKOVÁ, R. MALÁČOVÁ, K. MICHALOVÁ, H. KLAMO VÁ

Institute of Hematology and Blood Transfusion, e-mail: jana.moravcova@uhkt.cz, 128 20 Prague, Czech Republic

Received August 23, 2004

Monitoring of BCR-ABL transcript level is widely used in chronic myeloid leukemia (CML) to follow up response to therapy. In this study we compare abilities of two quantitative RT-PCR assays to characterize the disease status in CML patients: RT-PCR quantifying the BCR-ABL transcript concentration and RT-PCR determining the BCR-ABL/BCR transcript ratio (R). We demonstrate that in non-responders only R, but not BCR-ABL, unambiguously characterizes the state of disease. Moreover, R values >1 found in all poor responders indicate lower BCR expression compared to BCR-ABL in these patients. Our results demonstrate the importance of BCR-ABL/BCR transcript ratio for the disease status and the disease prognosis characterization and suggest a possible role of the normal BCR gene expression in CML pathogenesis.

Key words: CML, BCR-ABL, BCR-ABL/BCR, quantitative RT-PCR, disease status, disease prognosis

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the reciprocal translocation $t(9;22)$ resulting in a shortened chromosome 22, known as the Ph chromosome. At molecular level, proto-oncogene ABL is juxtaposed to the BCR gene and under its regulatory sequences. The product of normal gene ABL, the ABL protein with nonreceptor tyrosine kinase activity, is localized predominantly in the cell nucleus and is involved in the regulation of the cell cycle and response to genotoxic stress [21, 23]; the role of normal BCR protein bearing serine-threonine kinase activity is still not well known. The fusion BCR-ABL gene codes BCR-ABL oncoprotein endowed with constitutively elevated tyrosine kinase activity relocated to cytoplasm. BCR-ABL protein was proved to play a crucial role in CML pathogenesis [5].

The intensity of BCR-ABL expression correlates with the disease status and the disease prognosis, being high and increasing in poor response to treatment and poor prognosis [8,

11]. The most sensitive method for monitoring of BCR-ABL expression is quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR). It is used for early detection of disease relapse in patients after stem cell transplantation (SCT) [4, 14] and generally for characterization of treatment efficacy in CML patients. Q-RT-PCR methods commonly used at present are: 1) real-time RT-PCR [3, 6, 7, 9, 12] and 2) more rarely, competitive quantitative RT-PCR [4, 16]. The competitive method is more labor intensive, however, more sensitive [9]. Numerous Q-RT-PCR assays have been published; their results might, depending e.g. on choice of internal control-gene, differ less or more. Therefore, at present BCR-ABL Q-RT-PCR monitoring, as a very important tool of assessment of response to therapy, is standardized to be worldwide comparable [2, 7].

In this study we evaluate two Q-RT-PCR assays in which results of long-term monitoring of BCR-ABL transcript level showed some differences in their abilities of characterizing the disease status in patients with CML. The aim of the study was 1) to compare values of both methods in different responses to treatment and, 2) to compare kinetics of both assay values during treatment in regard to disease status and disease prognosis characterization.

*This study was supported by the grant NC/7550-3 from the Internal Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic.

Patients and methods

Patients and sample processing. Forty-eight not-transplanted CML patients (25 men and 23 women; median age of 54 years; range 22–71) longitudinally investigated during treatment (median period of follow-up 42.8 months; range 14.3–112.4) and 9 CML patients in blast crisis were enrolled in this study. During the follow-up the patients were treated with hydroxyurea (HU), busulfan (BS), interferon- α (IFN), cytosine arabinoside (Ara-C) or combinations of drugs or recently with imatinib mesylate (ST1571, Glivec); blast crises were treated with combined intensive chemotherapy according to standard treatment protocols. Patient's samples were obtained with the consent of the Ethics Committee of the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague. Peripheral blood samples (PB) for molecular analyses were collected at 2–3 month intervals, where possible. Total leukocytes were isolated from 20 ml of PB in citrate anticoagulants by the method of hypotonic red cell lysis within 36 hours after collection and lysed in a guanidinium-thiocyanate (GTC) buffer in concentration 10^7 leukocytes per ml. Total RNA was extracted as mentioned previously [16]. cDNA synthesis was performed using random hexamer primers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Molecular monitoring

The BCR-ABL transcript concentrations in peripheral blood samples were determined by a simple competitive Q-RT-PCR as described earlier together with the assay validation [16]. The assay used natural competitors from cell lines K562 and BV173 added to samples prior to RNA isolation, which eliminated the problem with quantification of sample cDNA concentration and with checking for the RNA quality and quantity and reverse transcription efficiency and in consequence it obviated the necessity of housekeeping control-gene usage. The level of BCR-ABL transcripts was given by BCR-ABL transcript concentration per 10^6 leukocytes. In this study the BCR-ABL transcript concentration was expressed in percentage. 100 % BCR-ABL positivity was defined as the BCR-ABL transcript concentration per 10^6 leukocytes, detected in non-treated patients at the time of CML diagnosis, with 100 % of Ph-positive metaphases and the BCR-ABL/BCR transcript ratios equal to one [16]. This definition enables easy comparison of RT-PCR results with cytogenetic examinations. The BCR-ABL transcript concentration was calculated after densitometric analysis of electrophoretically separated bands (UVP, Cambridge, UK) by means of linear regression analysis.

The BCR-ABL/BCR transcript ratios in peripheral blood samples were determined by a duplex RT-PCR as described previously [17]. Primer design ensured the same amplification efficiency of both BCR-ABL and BCR templates, which enabled the precise BCR-ABL/BCR ratio determination. Evaluation was performed by capillary electrophoresis on ABI PRISM 310 System (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). Functional dependence of values determined by both methods enabled to indirectly estimate the BCR transcript level.

Cytogenetic analysis. For standard G-banding technique bone marrow cells were cultivated 24 hours in RPMI medium with 10 % fetal calf serum without stimulation. Mitoses were harvested after hypotonic treatment with 0.075 M KCl, and slides were prepared using conventional techniques. Karyotypes were prepared according to ISCN (1995) nomenclature. Only results derived from at least 20 metaphases were considered. Interphase fluorescence in situ hybridization (i-FISH) analyses using the extra signal LSI bcr-abl ES dual color translocation probe set from VYSIS were performed according to the recommendation of manufacturers. To identify the presence and localization of BCR-ABL fusion gene 200 interphase nuclei were screened. The cut-off level of FISH analyses was 2.5 %.

Response criteria. Cytogenetic response was defined as follows: complete remission (CCR): 0 % Ph+ metaphases; partial response (pCR): 1–34 % Ph+ metaphases; minor response (mCR): 35–94 % Ph+ metaphases. Hematological response (HR) was defined by WBC $<10 \times 10^9/l$, platelets $<450 \times 10^9/l$, presence of no immature forms in peripheral blood and disappearance of splenomegaly, without cytogenetic response. Patients who lost HR or did not achieve HR or any improvement of hematological and clinical status for more than two months, i.e. patients resistant to treatment, were considered as non-responders (NR). Blast crisis (BC) was defined by more than 30 % of blasts in peripheral blood or bone marrow.

Statistical analysis. Comparison of RT-PCR values in different response groups was made using Wilcoxon signed-rank test and by Analysis of variants for hierarchical model. To eliminate influence of different number of individual patient measurements, only 3 values of each patient (median, the second highest and the second lowest value) were included in Wilcoxon test, and a weighted least squares regression weighted by $1/N$ (N , number of measurements/patient) was used in the Analysis of variants. Comparison of the two RT-PCR methods to characterize the disease status was performed using McNemar paired value test. Only values measured within stable responses lasting six months or longer were included in statistical analyses. The points of equivalence in competitive Q-RT-PCR were calculated using linear regression.

Results

RT-PCR values in different response groups. A total of 401 peripheral blood samples of patients with CML during treatment were tested in pairs by both Q-RT-PCRs determining: a) BCR-ABL transcript concentration [16] and b) BCR-ABL/BCR ratio (R) [17]. The Q-RT-PCR results were compared with cytogenetic, hematologic and clinical data and the Q-RT-PCR values were divided into different re-

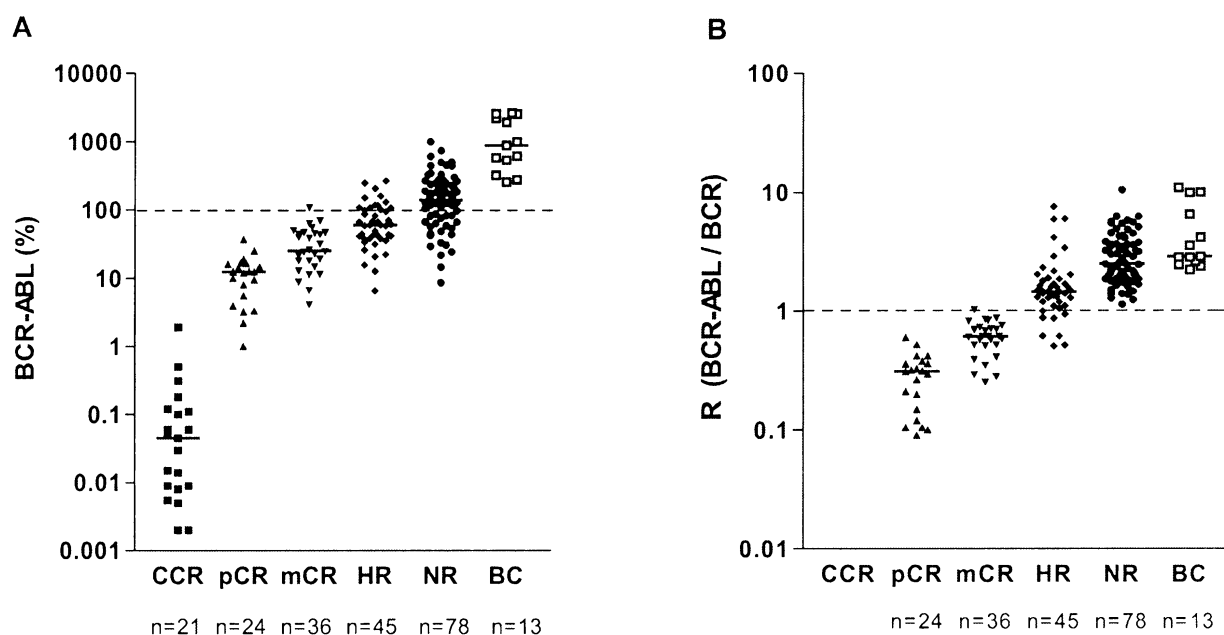


Figure 1. BCR-ABL transcript levels and BCR-ABL/BCR ratios (R) in different response groups (Wilcoxon signed-rank test).

(A) BCR-ABL transcript levels, (B) BCR-ABL/BCR transcript ratios (R). CCR, complete cytogenetic remission; pCR, partial cytogenetic response; mCR, minor cytogenetic response; HR, hematological response; NR, non-responders; BC, blast crisis. Definitions of response criteria see in Patients and methods. The median values of both RT-PCR assays in each response group were significantly different, $p < 0.0001$. The difference between R for non-responders and blast crisis was characterized by $p = 0.0003$. R values were not determinable in CCR; due to very low BCR-ABL transcript concentrations only BCR peak was detected.

sponse groups according to criteria given in Patients and methods (Fig. 1).

In patients with cytogenetic (CG) responses, BCR-ABL transcript levels were $< 100\%$ and $R < 1$, which corresponded to Ph⁺ cell reduction. The lowest BCR-ABL transcript values were found in patients in complete cytogenetic remission (CCR), however, PCR negativity was not achieved in patients enrolled in this study. In CCR, BCR-ABL median was 0.045% (range 0.002 – 1.9). R values in CCR were mostly indeterminate; due to very low BCR-ABL transcript concentrations only BCR peak was detected. With decreasing quality of CG response the values of both assays increased, however, the values of 100% for BCR-ABL and 1 for R were not significantly exceeded in any of CG responders. The values of BCR-ABL $< 100\%$ and $R < 1$ were found to be typical for patients with CG response. In partial response (pCR) BCR-ABL median was 12.4% (range 0.99 – 37.0), R median was 0.31 (range 0.09 – 0.61); in minor response (mCR) BCR-ABL median was 25.2% (range 4.1 – 103.6), R median was 0.61 (range 0.25 – 1.02).

Only with the loss of CG response we could find BCR-ABL $> 100\%$ and $R > 1$ (Fig. 1). In hematologic responses (HR) BCR-ABL median was 60.0% (range 6.5 – 265.5), R median was 1.46 (range 0.51 – 7.59); in non-responders (NR) BCR-ABL median was 138.8% (range 8.4 – 1001.4), R median was 2.52 (range 1.14 – 10.50). The highest values were measured in blast crisis with BCR-ABL

median 883.2% (range 257.4 – 2606.1) and R median 2.87 (range 2.25 – 10.70). The median values of both methods statistically significantly correlated with responses to treatment (both Wilcoxon test and Analysis of variants: $p < 0.0001$).

Poor correlation of BCR-ABL transcript levels with disease status in some of non-responders. R values clearly differentiated between groups of good responders with CG response (CCR, pCR, mCR) and group of non-responders, being < 1 in CG responders and > 1 in non-responders. On the contrary, BCR-ABL values did not show such unambiguous difference. In CG responders BCR-ABL values were always $< 100\%$ but in non-responders we found values ranging from 8% to 100% . Thus a part of the BCR-ABL values in patients without response to treatment fell in the area typical for CG responders. After focusing on individual patients, we found that the group of non-responders, with regard to BCR-ABL level, was in fact composed of three subgroups: 1) patients with the BCR-ABL transcript levels permanently $> 100\%$ ($15/26$), 2) patients with a great fluctuation of BCR-ABL levels, with values both $> 100\%$ and $< 100\%$ ($5/26$) and 3) patients with transcript levels permanently $< 100\%$ ($6/26$), however, in some of them with BCR-ABL increase in the terminal stage of disease. The low BCR-ABL transcript levels were not caused by the type of therapy; the therapy did not differ between the three groups. Non-responders of all groups were treated with hydroxyurea, busulfan, interferon- α , cyto-

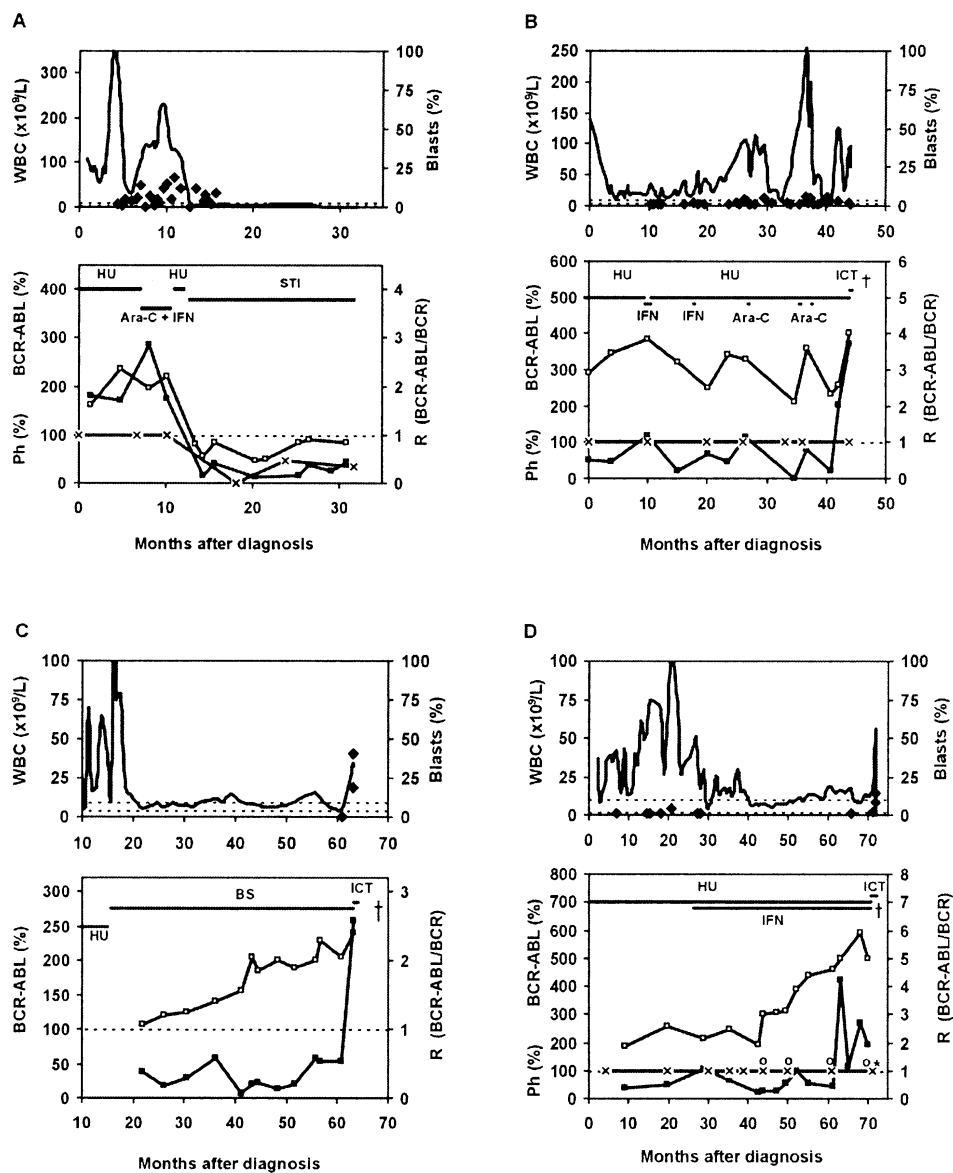


Figure 2. Kinetics of BCR-ABL transcript levels and BCR-ABL/BCR transcript ratios (R) in CML patients during treatment.

Values of both Q-RT-PCR assays in four illustrative patients were compared with white blood cell (WBC) count, percentage of peripheral blood blasts and with cytogenetic data. Upper panels: WBC counts (lines) and percentage of blasts (diamonds), normal WBC values ($4-10 \times 10^9/L$; dotted lines). Lower panels: percentage of Ph⁺ metaphases (lines with crosses), percentage of BCR-ABL transcripts (lines with full squares) and R (BCR-ABL/BCR transcript ratios) (lines with empty squares). Horizontal lines represent type of treatment: HU, hydroxyurea; BS, busulfan; IFN, interferon- α ; Ara-C, cytosine arabinoside; STI, imatinib mesylate; ICT, intensive chemotherapy. (A) Good correlation of both BCR-ABL transcript levels and R with response to treatment. During poor response to therapy BCR-ABL transcript values were $>100\%$ and $R > 1$. BCR-ABL $< 100\%$ and $R < 1$ were detected only after the patient had achieved cytogenetic response (here to imatinib therapy). (B, C, D) Good correlation only of R but not BCR-ABL transcript levels with the response to treatment. BCR-ABL transcript concentrations were usually low in these patients although response to ther-

apy was poor. Only in the terminal stage of the disease BCR-ABL level increased. However, in all these patients R values were always > 1 and further increased in patients C and D. In all patients B, C and D the disease progressed and the patients died. (B) Patient B was treated with HU due to his intolerance to IFN. (C) Patient C was treated with BS because of relatively high age (72 years) at the time of diagnosis and poor response to HU. In this patient, cytogenetic analysis at the time of diagnosis showed 100% of Ph⁺ metaphases; further analyses were not available because of patient's disagreement with this examination, therefore this patient's data are not included in statistic analyses. Although the patient achieved HR, R values were permanently high and increasing. (D) Patient D exhibited BCR-ABL transcript values $< 100\%$ even after the appearance of an additional Ph chromosome (empty circles). R values were stably > 1 and further increased after the second Ph chromosome appearance. Interestingly, the additional Ph chromosome and increase of R were found shortly after WBC count normalization, 10 months before hematologic relapse. Asterisk denotes appearance of chromosome-8 trisomy. At the time of treatment of patients B, C and D imatinib was not available (years 1995–2001).

sine arabinoside or their combinations. Only one patient in the second group was treated with imatinib. Where samples were available, the low BCR-ABL values in the third group had been already detected at the time of diagnosis. The third group was fully beyond any assumption and low values of BCR-ABL transcript levels could be misleading. Although the BCR-ABL transcript levels were low, the patients did not achieve cytogenetic response, hematologic response was exceptional and all but one, successfully treated with transplantation, died due to disease progression 37–72 months after diagnosis. In other two groups only 3 patients (3/20) died of disease related complications during follow-up (29, 81 and 89 months after diagnosis).

The BCR-ABL/BCR transcript ratio statistically significantly better characterized the disease status than the BCR-ABL transcript concentration itself (McNemar test: $p < 0.0001$)

Kinetics of BCR-ABL levels and BCR-ABL/BCR ratios during treatment. In all patients of our study group the kinetics of BCR-ABL transcript levels and R values were followed up during treatment. The median period of follow-up was 42.8 months (range 14.3–112.4 months). In most cases the kinetics of both assay values well characterized the course of disease (Fig. 2A). Increase of values always indicated bad prognosis. However, in some non-responders or patients with poor outcome only R but not BCR-ABL values correlated with the response to therapy (Fig. 2B–D). Although the response was poor and the disease progressed later, BCR-ABL levels were permanently low, except the terminal stage of disease in some of them. On the contrary, R values were always >1 , in patients C and D with increasing trend (Fig. 2 C, D). In our patients, $R > 1$ always indicated CML not-responding to treatment, R permanently >2 or increasing signaled disease progression later confirmed by worsening of patient's status.

Discussion

Two quantitative RT-PCR assays for BCR-ABL, in which preliminary results showed some discrepancies in BCR-ABL monitoring, were tested in regard to their ability of determining the disease status and prognosis in CML patients. The first method was a simple competitive Q-RT-PCR determining the BCR-ABL transcript concentration [16]. One of the advantages of this method was a very wide detection scope ranging from 0.001 % to unlimited values of BCR-ABL overexpression. The preciseness and reproducibility of the method was verified [16]. Figure 1A shows statistically significant differences of measured values in different response groups. This Q-RT-PCR has been used in clinical practice at the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague since 1994 and 10 years' practice confirmed the great importance of sensitive monitoring of BCR-ABL transcript levels for early detection of relapses after SCT [18, 19] and for

monitoring responses to treatment in general. BCR-ABL overexpression (BCR-ABL >100 %) was highly predictive for the loss of hematological response in patients treated with imatinib mesylate. The increase of BCR-ABL above 100 % preceded the hematological relapse 4–16 weeks [20].

We have compared this competitive method with real-time RT-PCR using TaqMan chemistry as designed in the Protocol of Europe Against Cancer Program [2, 7]. We have found close correlation between competitive method and real-time RT-PCR with B2M (beta-2-microglobulin) as the control gene. However, using total ABL control gene, concordance was found only when low BCR-ABL levels were present; higher BCR-ABL values were underestimated and differences increased with the rising number of the BCR-ABL transcripts, overexpression could not be detected. In our opinion, the total ABL transcript is not convenient to be used as an internal standard for BCR-ABL monitoring. The relation BCR-ABL/(ABL+BCR-ABL), i.e. BCR-ABL to total ABL, does not express linear dependence of real and measured BCR-ABL values. As the upper limit of this expression is 1 (100 %), higher BCR-ABL transcript levels are underestimated and BCR-ABL overexpression cannot be detected. Although the advantage of Q-RT-PCR is mainly in its high sensitivity to monitor patients in CCR, also the advantage of precise monitoring of high BCR-ABL levels in 100 % Ph positive patients and early detection of BCR-ABL overexpression should not be omitted.

The second method used in this study was duplex RT-PCR determining BCR-ABL to normal BCR transcript ratio [17]. The preciseness of the BCR-ABL/BCR ratio determination was ensured by the primer design that enabled the same amplification efficiency of both templates throughout PCR. This method was not sensitive enough to be used for early detection of relapses in post-SCT patients but it was found to be very important for monitoring patients without CCR. The advantages of this method were small laboriousness similar to that of qualitative RT-PCR and high preciseness.

We found that BCR-ABL/BCR transcript ratio (R) better characterized the disease status and disease prognosis than BCR-ABL transcript concentration. Although the statistical analysis confirmed that values measured by both methods statistically significantly correlated with response to therapy (Wilcoxon test and Analysis of Variants, both: $p < 0.0001$), it was only R that really unambiguously denoted all poor responders. Permanently high ($R > 1$) or further increasing R values characterized poor response and bad prognosis, while permanently low ($R < 1$) or decreasing R values characterized good response and good prognosis. We did not find any exception. On the contrary, BCR-ABL transcript levels did not unambiguously distinguish between cytogenetic responders and patient resistant to therapy. BCR-ABL values <100 % were found to be typical for good responders with cytogenetic response, however, values <100 % were also detected in some non-responders. These atypically low levels of BCR-ABL transcripts in patients without response to ther-

apy may indicate that the disease became BCR-ABL independent. This possibility has been under study.

However, at the same time our results showing $R > 1$ in non-responders and $R < 1$ in cytogenetic responders indicate that in non-responders expression of BCR is always lower, while in good response higher than that of BCR-ABL. $R < 1$ in good responders corresponded with low leukemic burden in these patients. $R > 1$ in poor responders with 100 % Ph positivity could be caused by 1) BCR-ABL gene amplification or overexpression, 2) blocking of BCR expression or 3) both. Results showing increase in R, while stable trend was found in BCR-ABL level (Fig. 2 C,D), suggest different regulation of BCR-ABL and BCR genes expression, although both genes are controlled by an identical promoter. The results indicate that in poor responders expression of BCR is always lower than that of BCR-ABL and can further decrease in disease development. It suggests that the disease status may depend on the relation of BCR-ABL and BCR expression. Although speculative, this may indicate that not only BCR-ABL but also normal BCR gene may play a role in CML and the role of BCR is antagonistic to that of BCR-ABL. This fact has never been described in patients yet, however, the ability of normal BCR protein to inhibit the tyrosine kinase activity of BCR-ABL oncoprotein has been reported and studied in detail [1, 10, 15]. Increased expression of BCR gene, measured at protein level, in cell cultures [22] as well as in a mouse model [13] interfered with oncogenic effect of BCR-ABL. To test this hypothesis in human CML, comprehensive experiments on patients' samples should be done.

In conclusion, this study shows that different results may be obtained by different approaches to BCR-ABL transcript monitoring. In this study we report that in poor responders only BCR-ABL/BCR transcript ratios but not BCR-ABL transcript levels unambiguously characterize the disease status. It shows not only the importance of BCR-ABL/BCR transcript ratio in CML monitoring but may also suggest a role of normal BCR as BCR-ABL antagonist in human CML. To verify this suggestion future experiments on patients' samples should investigate the relation between the two proteins in patients' cells and study the mechanism of regulation of the two gene expression in CML pathogenesis.

We would like to thank MSc. Z. ROTH, PhD. for his help with statistical analysis.

References

- [1] ARLINGHAUS RB. Bcr: a negative regulator of the Bcr-Abl oncoprotein in leukemia. *Oncogene* 2002; 21: 8560–8567.
- [2] BEILLARD E, PALLISGAARD N, VAN DER VELDEN VH, BI W, DEE R et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003; 17: 2474–2486.
- [3] BRANFORD S, HUGHES TP, RUDZKI Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol* 1999; 107: 587–599.
- [4] CROSS NCP, FENG L, CHASE A, BUNGEY J, HUGHES TP et al. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood* 1993; 82: 1929–1936.
- [5] DALEY GQ, VAN ETEN RA, BALTIMORE D. Induction of chronic myeloid leukemia by the P210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824–830.
- [6] EMIG M, SAUSSELE S, WITTOR H, WEISSER A, REITER A et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real-time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 1999; 13: 1825–1832.
- [7] GABERT J, BEILLARD E, VAN DER VELDEN VH, BI W, GRIMWADE D et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2318–2357.
- [8] GAIGER A, HENN T, HÖRTH E, GEISSLER K, MITTERBAUER G et al. Increase of BCR-ABL chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood* 1995; 86: 2371–2378.
- [9] GUO JQ, LIN H, KANTARJIAN H, TALPAZ M, CHAMPLIN R et al. Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2002; 16: 2447–2453.
- [10] HAWK N, LIU J, SUN T, WANG Y, WU Y et al. Inhibition of the Bcr-Abl oncoprotein by Bcr requires phosphoserine 354. *Blood* 2001; 98b: 167.
- [11] HOCHHAUS A, LIN F, REITER A, SKLADNY H, MASON PJ et al. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon- therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1996; 87: 1549–1555.
- [12] JONES CD, YEUNG C, ZEHNDER JL. Comprehensive validation of real-time quantitative bcr-abl assay for clinical laboratory use. *Am J Clin Pathol* 2003; 20: 42–48.
- [13] LIN F, MONACO G, SUN T, LIU J, LIN H et al. BCR gene expression blocks Bcr-Abl induced pathogenicity in a mouse model. *Oncogene* 2001; 20: 1873–1881.
- [14] LION T, HENN T, GAIGER A, KALHS P, GADNER H. Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Lancet* 1993; 341: 275–276.
- [15] LIU J, WU Y, ARLINGHAUS RB. Sequences within the first exon of BCR inhibit the activated tyrosine kinases of c-Abl and the Bcr-Abl oncoprotein. *Cancer Res* 1996; 56: 5120–5124.
- [16] MORAVCOVÁ J, LUKÁŠOVÁ M, STARÝ J, HAŠKOVEC C. Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* 1998; 12: 1303–1312.

- [17] MORAVCOVÁ J, MUCHOVÁ S, KALBÁČOVÁ R, HAŠKOVEC C. Single-tube quantitative RT-PCR for monitoring of the response to IFN treatment in CML patients. *Leukemia* 1998; 12: 1326–1327.
- [18] MORAVCOVÁ J, MUCHOVÁ S, LUKÁŠOVÁ M, KLAMO VÁ H, BŘEZINOVÁ J et al. Late molecular relapse in two CML patients in molecular remission after donor lymphocyte transfusion for post-BMT relapse. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 857–859.
- [19] MORAVCOVÁ J, NÁDVORNÍKOVÁ S, LUKÁŠOVÁ M, KLAMO VÁ H. Polymerase chain reaction analyses should be used as a basis for clinical decision making in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1999; 94: 3609–3611.
- [20] MORAVCOVÁ J, ZMEKOVÁ V, KLAMO VÁ H, VOGLOVÁ J, FABER E et al. Differences and similarities in kinetics of BCR-ABL transcript levels in CML patients treated with imatinib mesylate for chronic or accelerated disease phase. *Leukemia Res* 2004; 28: 415–419.
- [21] SAWYERS CL, MC LAUGHLIN J, GOGA A, HAVLIK M, WITTE O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; 77: 121–131.
- [22] WU Y, MA G, LU D, LIN F, XU HJ et al. Bcr: a negative regulator of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 1999; 18: 4416–4424.
- [23] YUAN ZM, SHIOYA H, ISHIKO T, SUN X, GU J et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999; 399: 814–817.

Brief communication

Gene expression profiles of two accelerations in a CML patient

Karel Fišer*, Hana Klamová, Jana Moravcová

Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Molecular Genetics, U Nemocnice 1, 12820 Prague, Czech Republic

Received 5 September 2005

Available online 14 November 2005

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by chromosomal translocation $t(9; 22)$, producing fusion gene BCR-ABL which plays a key role in CML development through its influence on signal transduction pathways. Here we compare changes in gene expression during two accelerations in one CML patient.

Patient, a 21-year-old man, diagnosed with CML was initially treated with hydroxyurea (HU) and interferon alpha (IFN). Response to treatment was poor and in the 21st month after diagnosis the disease accelerated. Intensive chemotherapy with the FLAM/FLAG regimen (fludarabine, cytosine arabinoside and mitoxantrone/G-CSF) was started followed with crossover to imatinib (IM). After initial complete hematologic response to IM, lasting for 7 weeks, the patient relapsed again and the disease rapidly progressed to blast crisis.

Gene expression profiling in the course of the disease was performed using 5 DB Biosciencase's AtlasTM Human Cancer cDNA Expression Arrays with a set of 588 genes. Raw data obtained with Clontech's Atlas ImageTM 15 software were log transformed and hierarchical clustering was performed with average linking clustering and Euclidian distance measurement using Genesis software [1]. Disease characteristics at the time of array analyses are given in Table 1.

The results show that three types of gene clusters can be recognized in the two CML accelerations in this patient (Fig. 1). First, genes with expression remaining up-regulated (22 genes, Fig. 1A1) or down-regulated (9 genes, Fig. 1A2), compared to the standard, throughout the whole course of the disease. Among up-regulated genes were, e.g., collagens and insulin-like growth factor 1 (IGF1). IGF1 is known to stimulate AML and ALL blast colony growth [2]. Among down-regulated genes were, e.g., extracellular signal-regulated

kinases (ERK4, ERK5/BMK1), keratins (KRT5, 6, 7) and cyclin D2. Cyclin D2, playing a role in exiting G1 cell cycle phase, was described as both down- and up-regulated in CML derived cell lines [3]. These genes may be characteristic for CML.

Second, genes of two clusters clearly show up-regulations of expression in both accelerations (17 genes, Fig. 1B1; 16 genes, Fig. 1B2). The expression patterns of these two accelerations resemble each other; however, one must bear in mind that the analysis of the second acceleration was performed not from chronic phase, but from the early accelerated phase following complete hematological response. Examples of products of genes in these two clusters are members of ECM molecules, collagens and procollagens (COL11A1, 11A2, 4A2, 16A1, 8A1, 3A1, 1A2 and 2A1) and laminins (LAMC1, A4, B1 and B2). Also ECM binding integrins (ITGA1, A3, B1, B4, B5 and B6), with ITGA3 already described to be up-regulated in CML cells [4], belong to this group. Other members of these clusters are vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR2 and 3), known to play a role in leukemias including CML [5]. Also cyclin C and cyclin D1 were up-regulated in both accelerations. The results suggest that the genes from the second group may be typical for the disease acceleration.

The third set of genes included groups of genes expressed differently in the first and second acceleration. The expression of these genes was changed in the first acceleration but remained stable through the second. Among genes which went up in the first acceleration, but then kept a zero difference from the standard and remained so through the second acceleration to blast crisis (30 genes, Fig. 1C1) were genes for several matrix metalloproteinases (MMP3, 7, 13 and 15) and angiopoietin 1, which plays a role in angiogenesis and is known to stimulate up-regulation of VEGFR3 in mice [6]. These genes were also described as up-regulated in CML by Muller et al. [7]. Also C-jun N-terminal kinase 3 alpha 2

* Corresponding author. Tel.: +420 221977181.

E-mail address: Karel.Fiser@uhkt.cz (K. Fišer).

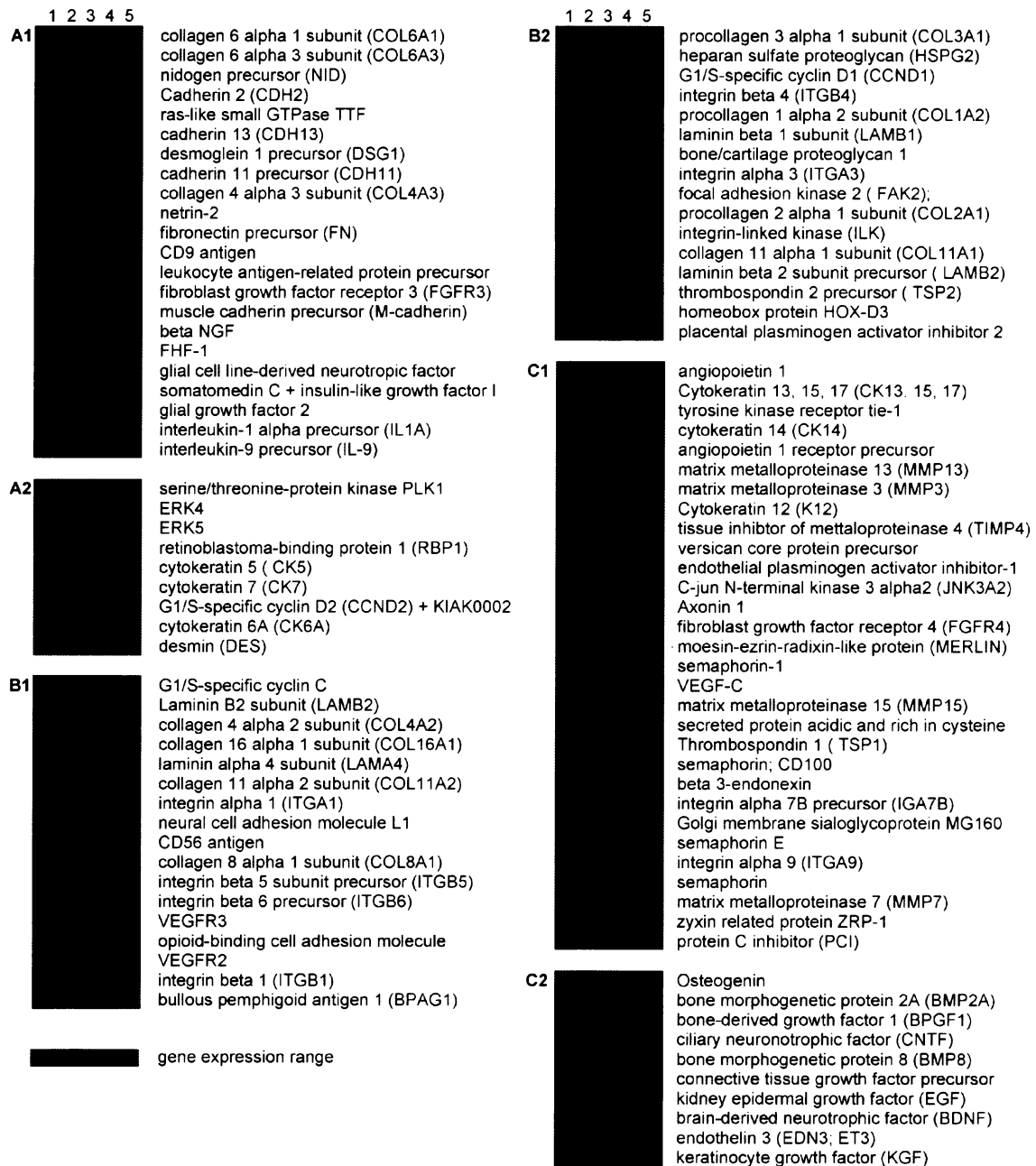


Fig. 1. Gene clusters given by hierarchical clustering of five macroarrays data. (A1 and A2) Clusters of genes with up- or down-regulated expression throughout the whole course of the disease; (B1 and B2) genes similarly expressed in both accelerations; (C1 and C2) genes differently expressed in the two accelerations. Numbers above the clusters denote the arrays: 1 and 2—first acceleration; 3, 4 and 5—second acceleration. Color bar indicates expression value compared to the standard, with maximum up-regulation in red (4,5 log) and maximum down-regulation in light blue (−4,5 log). Dark blue corresponds to zero difference between the sample and the standard. Total RNA was isolated with phenol–chloroform extraction from total leukocytes of the patient and labeled and hybridized according to manufacturer’s manual (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA). Membranes were exposed to Kodak Bio Max MS-1 films for 12–72 h and scanned or recorded using digital camera and evaluated with Atlas Image™ software (BD Biosciences). Patient’s gene expression was standardized using a mixture of lysates of leukocytes of twelve healthy individuals. This group consisted of six male and six female subgroups, further divided to three age-based doublets. The data were log transformed and hierarchical clustering with average linking clustering and Euclidian distance measurement using Genesis software was performed.

(JNK3A2) and semaphorins were in this group. Semaphorins were reported to have both pro- and antioncogenic roles and to interact with VEGF signaling [8]. In another cluster, where after initial up-regulation the genes fell down to zero difference from the standard in the first acceleration, but went up and remained so further on (10 genes, Fig. 1C2) were, e.g.,

the gene for bone morphogenetic proteins (BMP2A, 3 and 8) and kidney epidermal growth factor.

The differences in the expression of genes in the two accelerations may be caused by either (i) different type of treatment, (ii) different interval from the diagnosis to each of both acceleration, as destabilization of the genome usually

Table 1
Description of samples

Array #	Months from diagnosis	WBC ($\times 10^9 l^{-1}$)	PLT ($\times 10^9 l^{-1}$)	Blasts (%)	Ph+ (%)	Additional aberrations	BCR-ABL (%) ^a	Treatment	Disease phase
1	9	80	209	1	100	0	47	IFN/HU	CP
2	22	62	93	2	100	der7t(7; ?)	208	IFN/HU	AP
3	33	67	117	24	100	der7t(7; ?)	635	FLAM after IM	AP
4	35	11	78	24	100	der7t(7; ?)	390	FLAM	BC ^b
5	37	8	21	76	100	ND	1000	FLAM	BC

WBC, white blood cells count; PLT, platelets count; IFN/HU, interferon alpha plus hydroxyurea; FLAM, fludarabine, cytarabine and mitoxantrone; IM, imatinib mesylate; CP, chronic phase; AP, accelerated phase; BC, blast crisis.

^a Percentage of BCR-ABL is based on expression in 100% Ph+ leukocyte standard as described [9].

^b Blasts reached 45% in a week's span already.

appears over time (der7t(7; ?) in this case) or (iii) different type of acceleration itself, in the second case with disease very resistant to therapy and rapidly progressing to blast crisis.

In conclusion, we demonstrate here that two accelerations of CML in a patient involved genes with both similar and different gene expression changes, which points to different underlying molecular mechanisms of these two accelerations. The genes reported here may serve for gaining a better understanding of the molecular mechanisms of CML acceleration and can become markers of acceleration or point out to new targets of therapy.

Acknowledgements

We are very grateful to Prof. K. Michalova's group for cytogenetic information. This work was funded by grant NC/7550-3 from the Internal Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- [1] Sturm A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2002;18:207–8.

- [2] Estrov Z, Meir R, Barak Y, Zaizov R, Zadik Z. Human growth-hormone and insulin-like growth factor-I enhance the proliferation of human leukemic blasts. *J Clin Oncol* 1991;9:394–9.
- [3] Deininger MW, Veiira SAD, Parada Y, Banerji L, Lam FWF, Peters G, et al. Direct relation between BCR-ABL tyrosine kinase activity and cyclin D2 expression in lymphoblasts. *Cancer Res* 2001;61:8005–13.
- [4] Kaneta Y, Kagami Y, Tsunoda T, Ohno R, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray. *Int J Oncol* 2003;23:681–91.
- [5] Verstovsek S, Kantarjian H, Manshour T, Cortes J, Giles FJ, Rogers A, et al. Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor expression in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:2265–7.
- [6] Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tomberg J, Normen C, et al. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood* 2005;105:4642–8.
- [7] Muller A, Lange K, Gaiser T, Hofmann M, Bartels H, Feller AC, et al. Expression of angiopoietin-1 and its receptor TEK in hematopoietic cells from patients with myeloid leukemia. *Leuk Res* 2002;26:163–8.
- [8] Bielenberg DR, Flida Y, Shimizu A, Kaipainen A, Kreuter M, Kim CC, et al. Semaphorin 3F, a chemorepellant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest* 2004;114:1260–71.
- [9] Moravcova J, Lukasova M, Stary J, Haskovec C. Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* 1998;12:1303–12.