

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie

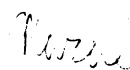
**Změna exprese Tel/Aml1 regulovaných genů účinkem  
inhibitorů deacetyláz histonů**

Oldřich Mazal

Praha, 2008

Vedoucím práce byl prof. MUDr. Jan Trka PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Trka', is written to the right of the declaration text.

Rád bych poděkoval MUDr. Michalovi Zápotockému za pomoc při kultivaci buněčných linií.

Dále bych chtěl poděkovat MUDr. Markétě Žaliové za technické konzultace ohledně metodiky PCR.

Také bych chtěl poděkovat Bc. Kateřině Mužíkové za zaškolení v metodice izolace RNA a technické konzultace pro PCR.

Zároveň bych chtěl poděkovat celému kolektivu Laboratoře Molekulární Genetiky za podporu při vypracování této práce. Tato práce byla vypracována s podporou výzkumného záměru MSM0021620813

## **Change of expression of the Tel/Aml1 regulated genes by the effect of histon deacetylases inhibitors.**

Background: Acute lymphoblastic leukaemia is one of the most frequent leukaemias in children. It has in most cases very good prognosis and about 80% patients will be cured by chemotherapy or stem cells transplantation. ALL is caused by various genetic aberrations, one of them, translocation 12;21 is the matter of interest in this work. By our hypothesis the fusion protein Tel/Aml1 causes changes in the regulation of several genes important for the maturation of B lymphocytes. The mechanism is supposed to be based on change of chromatin state due to recruitment of complex of histon deacetylases.

The use of inhibitors of histon deacetylases, like Valproic acid, could lead to reinduction of expression of the repressed genes and thus to promotion of differentiation. If that hypothesis would prove to be correct, Valproic acid could be considered as the potential cure for this type of leukaemia.

Material and methods: we have identified 21 genes downregulated by Tel/Aml1 using array technology. 9 of them, CD40, ANTXR2, PDGFRB, WDR7, ACK1, HRMT1L1, PAK1, MGMT and ARD1, we tested by RT-PCR on cell lines REH and NALM6. We used two series of samples for every line, one influenced by VPA and the second as control, each serie had ten samples. We measured the amount of transcripts of the selected genes in these series and counted, if there was increase of expression in VPA samples in comparison with control. Statistical analysis was done by Mann-Whitney test.

Results and conclusion: in five of our genes we found increase of expression induced by VPA – CD40, ANTXR2, PDGFRB, WDR7 and ACK1. But only for WDR7 and ACK1 wasn't found increase of expression in NALM6 line. For the other four genes – HRMT1L1, PAK1, MGMT and ARD1 – we haven't detected any increase in expression in any of our two cell lines. Genes ACK1 and WDR7 are thus potential targets for further studies.

Klíčová slova: leukémie, TEL/AML1, HDAC, PCR, změna exprese, B lymfocyt  
Keywords: leukemia, TEL/AML1, HDAC, PCR, change of expression, B lymphocyte

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Přehled literatury</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Rozdělení leukémií</b>	<b>11</b>
2.1.1	Podle rychlosti progresu onemocnění	11
2.1.2	Podle buněčné linie	11
2.1.2.1	Akutní lymfoblastická leukémie	11
2.1.2.2	Akutní myeloblastická leukémie	11
2.1.2.3	Myelodysplastický syndrom	12
<b>2.2</b>	<b>Klinické a laboratorní nálezy</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Diagnostika leukémií</b>	<b>13</b>
2.3.1	Morfologická diagnostika	13
2.3.2	Cytogenetická a molekulárně cytogenetická diagnostika	13
2.3.3	Imunologická diagnostika	14
2.3.3.1	Metody imunofenotypizace	15
<b>2.4</b>	<b>Imunofenotypy leukémií</b>	<b>15</b>
2.4.1	Imunofenotyp B lymfocytů	15
2.4.2	Imunofenotyp T lymfocytů	16
2.4.3	Charakteristiky leukemických buněk	16
2.4.3.1	Časný pre-B ALL (pro-B)	16
2.4.3.2	Pre-B ALL (c-ALL)	17
2.4.3.3	Zralý B-ALL	17
2.4.3.4	T-ALL	17
<b>2.5</b>	<b>Chromozomální a genové aberace u leukémií</b>	<b>18</b>
2.5.1	Numerické aberace	18
2.5.2	Strukturní aberace	20
2.5.2.1	Strukturní aberace vyskytující se u dětské B-ALL	20
2.5.2.2	Přestavby vyskytující se u dětské T-ALL	22
<b>2.6</b>	<b>Rizikové faktory vzniku leukémií</b>	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Léčba leukémie</b>	<b>27</b>
2.7.1	Stratifikace podle rizika a významné prognostické faktory	27
2.7.2	Struktura léčebného protokolu	27
2.7.3	Transplantace hematopoetických buněk	28

2.7.4	CNS terapie	29
2.7.5	Používaná chemoterapeutika a jiné léčebné metody	29
<b>2.8</b>	<b>Minimální reziduální nemoc</b>	<b>31</b>
2.8.1	Význam měření minimální reziduální nemoci	31
2.8.2	Metody měření MRN	32
<b>3</b>	<b>Charakterizace fúzního genu TEL/AML1</b>	<b>33</b>
3.1	Cíle práce	38
3.2	Hypotéza	38
3.3	Identifikace TEL/AML1 regulovaných genů	40
3.4	Plán současné studie	45
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>46</b>
4.1	Kultivace buněk	46
4.2	Izolace RNA a reverzní transkripce	46
4.3	RT-PCR	48
4.4	Statistické hodnocení	51
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>51</b>
5.1	Optimalizace PCR systémů	51
5.2	Volba kontrolního genu	51
5.3	Měření hladiny mRNA testovaných vzorků	52
5.4	Naměřené hodnoty exprese sledovaných genů	54
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Souhrn</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Seznam citované literatury</b>	<b>80</b>

## Seznam zkratek

(zkratky, jež nemají odpovídající český ekvivalent a názvy některých genů byly ponechány v originále a jsou psány kurzívou)

ABL	<i>Abelson murine leukemia viral (v-abl) oncogene homolog 1</i>
ACK1	<i>activated Cdc42-associated kinase 1</i>
ALL	akutní lymfoblastické leukémie
AML	akutní myeloblastická leukémie
AML1	<i>acute myeloid leukemia 1</i>
ANTXR2	<i>anthrax toxin receptor 2</i>
APC	antigen prezentující buňky
ARD1/	
PPP1R8	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8</i>
ATRA	kyselina all trans retinová
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCR	B buněčný receptor
CBF	<i>core binding factor</i>
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
CDC42	<i>cell division cycle 42</i>
C/Ebpa	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
CNS	centrální nervová soustava
CRKL	<i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i>
Cy3	cyanin 3
Cy5	cyanin 5
Dic	dicentrický chromozom
EAP	<i>Epstein-Barr-encoded RNA-associated protein</i>
ETO	<i>eight twenty one</i>
EFS	přežití bez události
E2A	<i>transcription factor E2-alpha</i>
EsPhALL	<i>European intergroup study on post-induction treatment of Ph positive ALL</i>
EVI1	<i>ecotropic viral integration site 1</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FADD	<i>Fas-associated via death domain</i>
FAS	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
FASL	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6</i>
FISH	fluorescenční in situ hybridizace



G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>
GSTM1	<i>glutathione S-transferase M1</i>
GSTP1	<i>glutathione S-transferase pi 1</i>
GSTT1	<i>glutathione S-transferase theta 1</i>
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
GVL	reakce štěpu proti leukémii
Gy	Grey
HDAC	histon deacetyláza
HDACi	inhibitor histon deacetyláz
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HLF	<i>hepatic leukemia factor</i>
HOX	<i>homeobox gene</i>
HRMT1L1	<i>hnRNP methyltransferase-like 1</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HSR	<i>homogenously staining region</i>
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
Inv	inverze
JunD	<i>jun D proto-oncogene</i>
KDE	<i>kappa deleting element</i>
Ku70	<i>Ku autoantigen p70 subunit</i>
LOH	ztráta heterozygosity
LMO1	<i>LIM domain only 1</i>
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
MAX	<i>MYC associated factor X</i>
MAD	<i>MAX dimerization protein 1</i>
MDS	myelodysplastický syndrom
MDS	<i>Miller-Dieker syndrome chromosome region</i>
m-FISH	vícibarevná fluorescenční in situ hybridizace
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MHC gp	<i>major histocompatibility komplex glycoprotein</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>

MPO	myeloperoxidáza
MRN	minimální reziduální nemoc
mSin3A	<i>SIN3 homolog A, transcription regulator (yeast)</i>
MYC	<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYH11	<i>myosin, heavy chain 11, smooth muscle</i>
N-CoR	<i>nuclear receptor co-repressor 1</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa beta</i>
NQO1	NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza
PAK1	<i>p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGFRB	<i>platelet derived growth factor receptor beta</i>
PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
PBX1	<i>Pre-B cell leukemic homeobox1</i>
RALS	<i>right-angle light scatter</i>
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
SAHA	<i>suberoyl anilide hydroxamic acid</i>
SCE	výměna sesterských chromatid
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SCT	transplantace kmenových buněk
SIL	<i>SCL interrupting locus</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5B</i>
TAL	<i>transaldolase 1</i>
TCF4	<i>transcription factor 4</i>
TCR	T buněčný receptor
TdT	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TEL	<i>translocation-ets-leukemia</i>
TNFRSF5	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 5</i>
TRAIL	tumor necrosis factor
TSA	trichostatin A
TXN	thioredoxin
VPA	valproová kyselina
WDR7	<i>WD repeat domain 7</i>
WHO	světová zdravotnická organizace
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>

## 1 Úvod

Akutní leukémie je onemocnění, kterým v České republice ročně onemocní kolem 80 dětí. Zároveň je také ze všech maligních onemocnění nejlépe prostudována a má nejlepší výsledky léčby, ačkoliv ne všechny typy leukémie mají stejnou úspěšnost vyléčení. Jako u jiných typů nádorů hraje ve vzniku leukémie roli porucha na úrovni jediné buňky, která má za následek její transformaci v buňku leukemickou. Tato transformace vede ke ztrátě kontroly diferenciaci a perzistenci klonu této buňky v organismu. Další změny na úrovni DNA vedou k rezistenci k apoptóze, vyřazení tumor supresorových genů, aktivaci telomerázy apod.

Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastější dětskou leukémií, v současné době má naději na úspěšné vyléčení až 80% těchto pacientů. V současné době se stále častěji objevuje názor, že účinnost nynější chemoterapie dosáhla svého vrcholu a další intenzifikace léčby by již nebyla účelná v důsledku vysoké toxicity pro pacienta. Proto se pozornost obrací k hledání nových léčebných přístupů, které by byly zaměřeny specificky proti leukemickým buňkám a nepoškozovaly zdravé buňky pacienta. Jedním z příkladů může být objev inhibitorů tyrozinových kináz, které se nyní používají k léčbě chronické myeloidní leukémie, donedávna nezvládnutelné jinak než pomocí transplantace hematopoetických kmenových buněk.

V této práci se věnujeme využití nového potenciálního léčiva – valproové kyseliny. Produkty chromozomálních aberací (translokace, delece apod.) se mohou projevit specifickými změnami v expresi genů. U akutní lymfoblastické a myeloblastické leukémie jsou určité aberantní proteiny, vznikající translokacemi na chromozomech, schopny vázat komplex histon deacetyláz, což může vést ke snížení exprese genů prostřednictvím remodelace chromatinu. Inhibitory histon deacetyláz by mohly vést k opětovnému nárůstu exprese těchto genů.

## **2 Přehled literatury**

### **2.1 Rozdělení leukémií**

#### **2.1.1 Podle rychlosti progresu onemocnění**

Základním dělením leukémií je rozdělení na leukémie chronické a akutní. Při akutní leukémii dochází k velice rychlému dělení buněk v nižším stádiu jejich zralosti. Při chronické leukémii se zralejší buňky dělí pomaleji, což má za následek pomalejší nástup choroby. Tento chronický stav však může přerůst v blastickou krizi, kdy dochází k rapidnímu množení blastů v těle pacienta.

#### **2.1.2 Podle buněčné linie**

##### **2.1.2.1 Akutní lymfoblastická leukémie**

Je odvozena od T a B lymfocytů a jejich prekurzorů, rozlišuje se několik stádií: pro-B, pre-B, a zralé B, pro-T, pre-T, kortikální-T a zralé-T. Zahrnuje až 75% všech dětských leukémií. Její nejvyšší výskyt je u dětí mezi 2. a 5. rokem, přičemž převládají B prekurzorové leukémie. V současné době až 80% dětských ALL pacientů dosahuje kompletní remise.

##### **2.1.2.2 Akutní myeloblastická leukémie**

Je odvozena od prekurzorů a zralých granulocytů, monocytů, erytroidních prekurzorů a megakaryoblastů. Zahrnuje asi 20% dětských leukémií. V současné době se používají dvě hlavní klasifikace:

FAB (French-American-British) klasifikace je založena na morfologické diagnostice. Rozděluje AML do podskupin M0-M7:

M0 – blasty s min. diferenciací

M1 – blasty bez maturace

M2 – blasty s maturací

- M3 – promyelocytická
- M4 – myelomonocytická
- M5 – monocytická
- M6 – erytroleukemie
- M7 – megakaryoblastická

### 2.1.2.3 Myelodysplastický syndrom

Jedná se o heterogenní skupinu poruch, odvozených od myeloidní buněčné linie, jež se nedají zařadit do žádné ze skupin M0-M7. Jsou charakterizované periferní cytopenií, normo- nebo hypercelulární kostní dřeví a dysmorfni maturaci hematopoetických prekurzorů. Později se mohou rozvinout do některé z forem AML.

## 2.2 Klinické a laboratorní nálezy

Leukemické buňky se dělí pomaleji než normální hematopoetické buňky, neboť jim trvá déle syntéza DNA. Na rozdíl od normálních buněk však trvale přetrvávají v oběhu a vytlačují normální buňky. Onemocnění se projevuje horečkou, neutropenií, únavou a letargií – což jsou příznaky anemie. Dále jsou pozorovány bolesti kostí a krvácivost. V séru je v důsledku nekrózy kostní dřevě vyšší koncentrace laktát dehydrogenázy. Dochází k zvětšení jater, sleziny a lymfatických uzlin, což je důsledek extramedulární infiltrace, může dojít až k selhání těchto orgánů. Také dochází k infiltraci retiny, očního nervu, čočky, což má za následek bolesti očí, fotofobii a rozmazané vidění. Méně časté příznaky jsou zvracení, bolesti hlavy, potíže s dýcháním, oligonurie a anurie.

Mezi hlavní laboratorní nálezy patří anemie (až u 75% pacientů), abnormální počty leukocytů, trombocytopenie. Hyperleukocytóza (více než  $100 \times 10^9/l$ ) se vyskytuje u 10 až 15% pacientů. Granulocytopenie (méně než  $0,5 \times 10^9/l$ ) je zjištěna u 40% pacientů. Vzácněji se vyskytuje hypereosinofilie a snížený počet trombocytů ( $50 \times 10^9/l$ ). U T-ALL se vyskytuje koagulopatie, naproti tomu anemie a trombocytopenie jsou zde mírné, jen vzácně dochází ke krvácivosti.

V séru je vyšší hladina kys. močové a laktát dehydrogenázy. Pacienti s poškozením ledvin mají zvýšenou koncentraci kreatininu, kys. močové a fosforu. Sérové Ig jsou nízké (hlavně IgA a IgM) u třetiny pacientů. U 10-20% pacientů dochází k poruše

funkce jater, následkem infiltrace leukemických buněk. U T-ALL dochází ke zvětšení thymu.

U třetiny pacientů mohou být blasty nalezeny v mozkomíšním moku, ačkoliv nemají žádné neurologické příznaky. CNS leukémie je definována počtem pěti leukocytů na mikrolitr mozkomíšního moku. Léčba těchto pacientů dříve zahrnovala převážně ozařování, což však vede k dalším komplikacím a může vyústit ve vznik sekundární malignity.

## **2.3 Diagnostika leukémií**

Stanovení správné diagnózy je klíčovým krokem pro zahájení adekvátní léčby. Diagnostika zahrnuje jak analýzu pomocí buněčného barvení a pozorování pod mikroskopem, tak techniky cytogenetické, imunologické a molekulárně biologické.

### **2.3.1 Morfologická diagnostika**

Prvním krokem je odebrání vzorku kostní dřeně punkcí ze sternu při lokální anestézii, pouze pokud by tento postup nebyl možný, odebere se kostní dřeň z přední lopaty kyčelní kosti. Dále je možné vyšetřovat i periferní krev, ale u určitého procenta pacientů se zde nevyskytují leukemické blasty, jejich morfologie se také může lišit od blastů přítomných ve dřeni. Buňky kostní dřeně jsou barveny a hodnoceny morfologicky pro hrubé rozlišení buněčné linie (lymfoidní od myeloidní). K obarvení se používá barvivo Giemsa-Romanowski. ALL se dělí do tří subtypů L1-L3.

### **2.3.2 Cytogenetická a molekulárně cytogenetická diagnostika**

Analýza karyotypu a molekulárně cytogenetické vyšetření je základním krokem při diagnostikování chromozomálních aberací a stanovení diagnózy onemocnění. Identifikace genů zodpovědných za vznik leukémií a rozpoznání jejich funkce je klíčovým mezníkem při zkoumání potenciální terapie. Zahrnuje jak klasickou cytogenetiku – stanovení karyotypu pomocí pruhovacích technik (G pruhování), při níž se analyzují pouze metafázní jádra, tak i molekulárně-cytogenetické vyšetření, která zahrnují metafázní i interfázní FISH.

FISH a její modifikace: podstatou metody je použití krátkých (300-600 bází) nukleotidových fragmentů, specifických pro určitý úsek chromozomu nebo konkrétního genu. Sondy jsou značeny fluorescenčně, jejich značení probíhá např. pomocí nick translace. Výhodou oproti klasickému cytogenetickému vyšetření je možnost vyšetřovat také interfázni jádra. Rozlišují se sondy centromerické, které jsou specifické pro každý chromozom (s výjimkou chromozomů 13/21 a 14/22, jejichž centromery jsou si natolik podobné, že nejsou touto sondou od sebe rozlišitelné), využívají se k detekci trizomií, monozomií apod. Pro detekci translokací se využívá M-FISH, každý chromozom je obarven určitou kombinací fluoroforů, které je při vyhodnocování přidělena pseudobarva, tímto způsobem je možné přesně lokalizovat translokovaný úsek DNA. Lokus specifické sondy jsou specifické pro určitý gen nebo kritický region určitých poruch, využívají se k detekci menších delecí nebo duplikací.

Metoda FISH nám dovoluje detekovat jak strukturní tak numerické aberace, proto je velice vhodná k diagnostice nádorových onemocnění obecně a leukémie nevyjímaje. Další využití má metoda pro kontrolu hematopoézy po transplantaci kostní dřeně. Pokud byla transplantována dřeň od dárce odlišeného pohlaví než příjemce, zjišťuje se konstituce pohlavních chromozomů v nových hematopoetických buňkách. K tomu se využijí sondy specifické pro X a Y chromozomy, buď centromerické, nebo v případě Y chromozomu Y heterochromatinové.

### 2.3.3 Imunologická diagnostika

Použitím panelů monoklonálních protilátek specifických pro markery jednotlivých buněčných linií a jejich vývojových stádií je možno dosáhnout přesnější diagnózy. Bohužel jen několik markerů je čistě liniově specifických: CD79a, cytoplasmatický CD22 a Ig pro B lymfocyty, cytoplasmatický CD3 pro T lymfocyty, MPO pro myeloblasty, cytoplasmatický CD41 pro megakaryoblasty. CD2 je exprimován u poloviny AML typu M3 a také u M4 s inv(16). CD4, ačkoliv je markerem T linie, je exprimován také u dvou třetin M4 a M5 AML. CD19, antigen B linie, je také exprimován u většiny AML s t(8;21). Myeloidní antigen CD15 je naopak exprimován u ALL s t(4;11).

Z hlediska diagnózy a léčby je třeba rozlišovat mezi ALL s expresí myeloidních antigenů a AML s expresí lymfoidní antigenů. Existují vzácné případy, kdy dojde k přepnutí mezi liniemi – z ALL do AML nebo naopak, a to beze změny cytogenetického nálezu – často se jedná o pacienty s přestavbami MLL genu.

### **2.3.3.1 Metody imunofenotypizace:**

Hlavní výhodou imunohistochemických metod je jejich vysoká senzitivita, specificita a nízká spotřeba vzorků. Protilátky jsou konjugovány s fluorescenčními značkami – fykoerytrin (PE), konjugáty PE-Cy5, nebo fluorescein izothiokyanát (FITC). Multiparametrická průtoková cytometrie má výhodu v rychlé kvantitativní analýze antigenní exprese a možnosti analyzovat velký počet buněk ve vzorku. Nevýhodou této metody je obtížnější rozlišení normálních a leukemických buněk, zejména pokud je buněk ve vzorku málo. Metody využívající RALS a měření CD45 dokáží tyto nevýhody překonat. Normální lymfocyty mají nízké RALS, ale vysokou expresi CD45. Naproti tomu pozdní myeloidní buňky mají vysoké RALS, ale nízkou expresi CD45.

Navzdory tomu, že jen málo antigenů je specifických pro konkrétní jedinou linii, je možné identifikovat buňky použitím panelu monoklonálních protilátek, zaměřených proti sadě antigenů specifických pro určité stádium vývoje buněk. Pro měření určitých intracelulárních antigenů je třeba buňky permeabilizovat. TdT a CD34 nejsou využitelné pro identifikaci určité buněčné linie, ale jejich měření je užitečné pro rozlišení normálních a maligních buněk.

## **2.4 Imunofenotypy leukémií**

### **2.4.1 Imunofenotyp B lymfocytů**

Nejvýznamnějším znakem zralosti B lymfocytů je přítomnost membránové molekuly imunoglobulinu. Skládá se z alfa a beta řetězce, jež formují B buněčný receptor. V průběhu maturace dochází nejprve k D-J přestavbám genu pro těžký řetězec Ig, ale nedochází k expresi proteinu. Tyto časné pre-B lymfocyty exprimují povrchový CD10, CD19, CD24, CD34, HLA-DR a cytoplasmatický CD22, CD79a a CD79b, v jádře pak TdT. S vyžíváním pak roste exprese CD45.

Přechod do stadia pre-B je charakterizován přítomností těžkého řetězce Ig u v cytoplasmě, na povrchu se exprimuje CD22 a CD20.

Přestavby lehkých řetězců Ig a jejich exprese jsou znakem přechodu do stadia zralého B lymfocytu, jež exprimuje IgM. Buňky neschopné exprese funkční molekuly IgM jsou odstraňovány cestou apoptózy v kostní dřeni. Zralé buňky zformují receptorový



komplex, k němuž se váže také heterodimer CD79a/CD79b, které jsou svými cytoplasmatickými konci spojeny se sarkovými kinázami a zprostředkovávají přenos signalizace z BCR do buňky. Zralé B lymfocyty migrují z kostní dřeně do sleziny, lymfatických uzlin a Peyerových plaků. V těchto sekundárních lymfatických orgánech je dokončena přestavba molekuly Ig, vznikají další subtypy protilátek IgG, IgD, IgA a IgE.

## **2.4.2 Imunofenotyp T lymfocytů**

Nejméně zralé T lymfocyty se nacházejí v thymu, exprimují CD34, cytoplasmatický CD3 a TdT. Následně se složka TCR řetězce beta spojí s pre-TCR řetězcem alfa a takto zformovaný pre-TCRbeta je transportován na povrch buňky. S expresí TCR se buňka dostává do stádia common thymocyty s expresí CD34, CD4, CD7, CD5, CD2 a CD8, které se také nazývají dvojité pozitivní, neboť u nich dochází ke koexpresi CD4 a CD8. Také dochází ke slabé expresi CD3 společně s TCR alfa a beta, méně často TCR gamma, delta. Tyto buňky jsou podrobovány pozitivní selekci, kdy je testována schopnost jejich TCR rozpoznávat komplexy MHC gp s antigenem. Buňky, jež dostatečně reagují na antigen, zvyšují expresi CD3 a přestávají exprimovat CD1, CD10, CD21 a TdT a jeden z dvojice CD4/CD8. Tyto pozdní thymocyty (také nazývané single pozitivní) podstupují následně negativní selekci, kdy buňky, jež příliš silně vážou organismu vlastní antigeny umírají apoptózou. Přeživší buňky exprimující CD3, CD4 nebo CD3 a CD8 jsou uvolňovány z thymu a putují krevním řečištěm do lymfatických tkání.

## **2.4.3 Charakteristiky leukemických buněk**

### **2.4.3.1 Časně pre-B ALL (pro-B)**

Leukemické blasty vznikají z normálního prekurzoru, který neobsahuje Ig. Geny pro těžký řetězec Ig jsou často přestavěny, avšak k expresi molekuly nedochází. Leukemické buňky exprimují CD19 a HLA-DR, CD22 a cytoplasmatický CD22 a CD79a. Ve většině případů je také detekovatelný CD10, TdT a CD34. Naproti tomu CD45 je většinou nepřítomen.

Tento typ leukémie velice často obsahuje přestavby t(4;11), t(11;19) a t(9;11). Pro blasty s t(4;11), ALL1/AF4, je charakteristická exprese CD19, CD22, CD24, CD10-, CD15, CD65. Vyskytuje se vysoký počet leukocytů (přes 100 000/ul). Dříve měli tyto pacienti velice nepříznivou prognózu, dnes je úspěšnější léčba s využitím cytarabinu a

SCT. Většina ostatních typů B-ALL nemá expresi CD24. Více než polovina buněk exprimuje také myeloidní antigeny CD15 a CD65. Mohou být přítomny i T-buněčný antigen CD7 a myeloidní antigeny CD13 a CD33. Buňky s přestavbami t(11;19) a t(9;11) mají často velice podobný imunofenotyp jako buňky s t(4;11). Téměř všechny skupiny B-ALL a také polovina AML exprimují povrchový chondroitin sulfát.

#### **2.4.3.2 Pre-B ALL (c-ALL)**

Představují asi 25% případů B-ALL. Exprimují CD19 a HLA-DR, CD22 a CD79a, v cytoplasmě je detekovatelný Ig řetězec  $\mu$ . U některých leukémií dochází k přestavbám lehkých řetězců lambda a kappa, ale ne k expresi jejich proteinů. Většina exprimuje CD10 a TdT, dvě třetiny také CD34.

Leukémie nesoucí přestavbu t(1,19) mají antigenní profil CD19, CD22, CD20, CD34, CD45, Ig $\mu$ . Jsou dostupné monoklonální protilátky proti chimérickému proteinu, což umožňuje rychlou diagnostiku leukémií s touto translokací. Častá je incidence BCR/ABL, léčba zahrnuje vysoké dávky metotrexátu. CD19, CD22, CD20 antigeny jsou potenciálními cíli pro protilátkovou terapii.

#### **2.4.3.3 Zralé B-ALL**

Tento typ leukémie se rozděluje na dvě skupiny:

L3 subtyp - exprimuje CD19, CD22, CD10, naopak neexprimuje TdT a CD34. Oproti jiným subtypům má silnou expresi CD20 a CD23.

L1/L2 subtyp – mohou exprimovat TdT a CD34, naproti tomu CD 20 exprimují jen slabě. U tohoto subtypu se nevyskytují přestavby t(8;14), t(8;22) a t(2;8) ani přestavby genu MYC, což vede k vysoké účinnosti intenzivní terapie. Je zde častá infiltrace vnitřních orgánů a CNS. K léčbě se používá ifosfamid, metotrexát a cytarabin.

#### **2.4.3.4 T-ALL**

Blasty exprimují povrchový CD7 a cytoplasmatický CD3, kolem 90% exprimuje CD2, CD5 a TdT. Méně než polovina pak exprimuje CD1a, povrchový CD3, CD4 a CD8. HLA-DR není téměř exprimován. Vzácněji je exprimován také CD10, CD21 a CD56.

T ALL se rozděluje do tří stádií:

- raná (CD7, CD3, povrchový CD3-, CD4-, CD8-)
- common (CD3, povrchový CD3-, CD4, CD8, CD1)
- pozdní (povrchový CD3, CD1-, CD4 nebo CD8)

Dosud se neprokázalo, že exprese určitých antigenů by měla vliv na prognózu onemocnění. Na rozdíl od B prekurzorové ALL mohou mít někteří pacienti normální hladiny RBC a trombocytů. Zahrnuje přibližně 15% případů ALL. Je spojena se horší prognózou, vyskytuje se hyperleukocytóza, často zasahuje CNS.

## **2.5 Chromozomální a genové aberace u leukémií**

### **2.5.1 Numerické aberace**

Numerické aberace představují změny počtu chromozomů v karyotypu. Změny je možné rozdělit do několika skupin, neboť se ukazuje, že určité změny karyotypu jsou prognosticky významné.

- hyperdiploidní s více než 50 chromozomy - zahrnují asi 25-30% případů, včetně téměř triploidních a téměř tetraploidních
- hyperdiploidní s 47 – 50 chromozomy – asi 10-15%
- pseudodiploidní – 46 chromozomů se strukturálními abnormalitami (40% případů)
- diploidní – 46 chromozomů, 10-15%
- hypodiploidní – méně než 46 chromozomů včetně téměř haploidních, kolem 8% případů

Téměř tetraploidie:

Téměř tetraploidní buňky mají kolem 82-94 chromozomů a zahrnují kolem 1% pacientů, třetina onemocnění je L2 morfologie, téměř polovina je odvozená od T lymfocytů, jsou také asociována s vyšším věkem. Téměř triploidní pacienti mají 69-81 chromozomů, představují jen velmi malé procento případů (kolem 0,3%). Jejich konstituce se neliší od ostatních typů B ALL.

#### Hyperdiploidie >50:

Pacienti s hyperdiploidií více než 50 (v rozsahu 51-68) chromozomy mají dobrou prognózu. U většiny těchto pacientů se jedná o B prekurzorovou leukémii. Naopak je zde velmi málo případů s T-ALL. Věk těchto pacientů se pohybuje kolem 2-10 let. Množství DNA na buňku se stanovuje metodou průtokové cytometrie, která však není schopna identifikovat případné strukturní abnormality, proto je třeba doplnit ji o cytogenetické vyšetření. Často jsou přítomny navíc chromozomy 21, 6, X, 14, 4, 18, 17, 10, 8 a 5. (RAIMONDI et al. 1996) Dosud nebylo prokázáno, že by přítomnost nebo nepřítomnost strukturních abnormalit ovlivňovalo EFS. Velký počet chromozomů může ztěžovat analýzu pomocí klasické cytogenetiky, proto je lepší použít metodu FISH. Pacienti s trizomií chromozomů 4 a 10 mají zvláště dobrou prognózu a mohou být léčeni méně agresivní chemoterapií (MARTIN et al. 1996) Také trizomie chromozomů 17 a 18 mají příznivou prognózu.

#### Hyperdiploidie 47-50:

Tyto případy často obsahují navíc chromozomy 8, X, 10 a často 21. Prognóza těchto pacientů je dobrá (WILLIAMS et al. 1982). Trizomie 8 je často asociována s T ALL, její prognostický význam je dosud nejasný. Trizomie 21 je pozitivním prognostickým faktorem a je asociována s B-ALL. Chromozom 21 obsahuje gen pro transportér folátu (MOSCOW et al. 1995), který může být zodpovědný za vysokou akumulaci polyglutamovaného metotrexátu v buňce, což vede k vyšší účinnosti léčby antimetabolity.

#### Pseudodiploidie:

Jedná se o největší a zároveň nejheterogennější skupinu případů. Jsou asociovány s vyšším počtem leukocytů a zvýšenou hodnotou laktát dehydrogenázy v séru. Pacienti vyžadují intenzivnější terapii, jejich prognóza se liší v závislosti na strukturních aberacích, které jsou u nich přítomny.

#### Diploidie:

Jedná se o pacienty, u nichž nebyla cytogeneticky zjištěna žádná chromozomová aberace. Např. u T ALL může být až třetina případů s normálním karyotypem. Mohou u nich být přítomny submikroskopické poruchy, kryptické aberace, delece, které nejsou klasickou cytogenetikou detekovatelné.

Hypodiploidie a „téměř haploidie“:

Kolem 80% těchto případů má 45 chromozomů, dochází ke ztrátám celých chromozomů, nebalancovaným translokacím, vzniku dicentrických chromozomů, malých marker chromozomů, HSR, double minutes apod. Rozlišují se tři kategorie: 41-45, 30-40, méně než 30 chromozomů. Ačkoliv tito pacienti mají relativně nízký počet leukocytů v krvi, jejich prognóza je špatná. Zvláštností jsou případy s dic(9;20), které mají velice dobrou prognózu (CARROLL et al. 1987b). Téměř haploidní leukémie jsou velice vzácné, většinou obsahují po jedné kopii každého chromozomu a pouze u několika z nich má i druhou kopii. Někdy může být téměř haploidní klon doprovázen hyperdiploidním klonem, který vznikl polyploidizací genomu téměř haploidního klonu. Protože hyperdiploidní klon bývá zastoupen ve velké převaze, může někdy téměř haploidní klon uniknout pozornosti. Z toho důvodu je účinné změřit DNA index pomocí průtokové cytometrie.

## 2.5.2 Strukturní aberace

### 2.5.2.1 Strukturní aberace vyskytující se u dětské B-ALL

- t(1;19) – E2A/PBX1 – asi 6% pacientů s ALL, E2A je transkripčním faktorem s helix-loop-helix DNA vazebnou doménou (ARONHEIM et al. 1993), reguluje maturaci B lymfocytů, včetně rekombinace Ig. Protein PBX1 se dokáže vázat na HOX geny, ve formě fúzního proteinu získává schopnost aktivovat jejich transkripci (LU et al. 1994).
- t(9;22) – BCR/ABL – vyskytuje se u 3-5% dětských pacientů, je charakteristický pro CML, vlivem fúze dochází k indukci neregulovatelné tyrozin kinázové aktivity proteinu ABL, který následně aktivuje několik genů důležitých pro proliferaci a přežívání buňky jako je CRKL, STAT5, MYC a cyklin D1. (GOGA et al. 1995, AFAR et al. 1994, 1995, SHUAI et al. 1996) Pacienti s touto translokací mají velmi špatnou prognózu.

- t(12;21) – TEL/AML1 – 25% pacientů. Mechanismus působení je diskutován v kapitole 3.
- přestavby genu MLL – zahrnují 5% pacientů, častá je translokace (4;11) - MLL/AF4, která se vyskytuje u 50% kojeneckých ALL a u pacientů do 6 let věku. Přestavby genu MLL obecně zahrnují až 80% veškerých ALL u kojenců (NAGAYAMA et al. 2006). Obecně má extrémně špatnou prognózu, šance na vyléčení je pouze asi 5-10%, u T-ALL je tato translokace velice vzácná, avšak má velmi dobrou prognózu (RUBNITZ et al. 1999). Buňky často nesou myeloidní povrchové antigeny. Celkem bylo nalezeno kolem 60 fúzních partnerů genu MLL (DASER a RABBITS 2005). Také představuje přibližně 25% sekundárních leukémií vyvolaných léčbou (PEDERSEN-BJERGAARD et al. 1998).
- t(17;19) – E2A/HLF – u 1% pacientů. Vzniká fúzí transkripční domény genu E2A s DNA vazebnou doménou genu HLF, jedná se o leucitový zip (INABA et al. 1992). Vazebná specifita HLF je fúzí změněna, často dochází k delecii druhé alely genu E2A. Fúzní protein aktivuje expresi genu SLUG (INUKAI et al. 1999), který působí proti apoptotické dráze mitochondrií, neboť suprimuje expresi některých genů zodpovědných za aktivaci komplexu kaspázy 9.
- deregulace protoonkogenu c-MYC, většinou způsobené jeho translokací před silný promotor jiného genu, např. těžký řetězec Ig. (TRUJILO et al. 1979). V dalších případech je lehký řetězec Ig lambda nebo kappa translokován před gen MYC na chromozom 8. (ERIKSON et al. 1983). Myc tvoří heterodimer s proteinem Max, protein Max tvoří heterodimery také se svým antagonistou Mad (BLACKWOOD et al. 1991). Komplex Mac:Max aktivuje transkripci genů podporujících buněčnou proliferaci, zatímco komplex Max:Mad má opačný účinek, umlčuje jejich transkripci prostřednictvím vazby komplexu histon deacetyláz (AYER et al. 1995). Proteiny Mac a Mad tudíž kompetují o vazbu s Max. Overexprese genu MYC tudíž působí zvýšenou tvorbu komplexů Mac:Max a zvyšují proliferační potenciál buňky.
- přestavby genů pro Ig a TCR, mají silné promotory, jež mohou způsobit změny v expresi protoonkogenů.
- t(8;14) – zahrnuje většinu zralých ALL, je typu L3. Má velmi dobrou prognózu, šance na vyléčení dosahuje 70-80%.

Další změny na úrovni DNA zahrnují menší delece genů (například nefúzovaných alel) a bodové mutace.

### 2.5.2.2 Přestavby vyskytující se u dětské T-ALL

U T-ALL je mnohem méně hyperdiploidních pacientů s více než 50 chromozomy než u B-ALL. Kolem 40% případů má přestavby v genech TCRA/D, TCRB a TCRG, následky těchto přestaveb jsou stejné jako přestavby molekul Ig u B-ALL, neboť mají také silné promotory.

Chromozomové abnormality:

- t(11;14) – na chromozomu 14 se nachází A/D lokus TCR, zahrnuje asi 1% případů. Oblast zlomu se nachází v genu pro rhombotin (BOEHM et al. 1991), což je patrně transkripční faktor
- t(10;14) - opět přestavba TCR v A/D lokusu, dochází k deregulaci genu HOX11 touto nelegitimní rekombinací (LU et al. 1990), 5-10% případů T-ALL
- t(8;4) – translokace protoonkogenu MYC do oblasti TCR
- t(8;14) – většinou obsahuje další abnormality, např. na chromozomu 1, tvoří asi 2% případů. Vyskytuje se i v jiných typech leukémie (LANGE et al. 1992). Zahrnuje přestavby genu TCR A/D, jedná se také o deregulaci protoonkogenu MYC (ERIKSON et al. 1986).
- Abnormality 7q – jedná se o oblast genu TCRB, dochází k reciprokým translokacím s různými chromozomy – 9, 19, 10 (RAIMONDI et al. 1987). Častá deregulace důležitých transkripčních faktorů RBNT2 a HOX11 (SANCHEZ-GARCIA et al. 1991, KENNEDY et al. 1991)
- abnormality 6q – z 85% delece, zahrnuje 4-13% případů. Přítomnost abnormality není samostatným prognostickým faktorem, není dosud jasné, jakým mechanismem přispívá k leukemogenezi
- abnormality 9p – objevují se v 7-12% případů všech dětských ALL (CARROLL et al. 1987a). Delece, translokace, zvýšené riziko CNS relapsu, obsahuje klastr IFN genů a také tumor supresory p16, p15 a p19

- abnormality 12p – 8-11% případů (RAIMONDI et al. 1986). Zahrnují dic(9;12), dic(7;12), t(12;13), t(2;12), t(12;17), dalece. dic(9;12) má skvělou prognózu, jiné přestavby nemají na prognózu větší vliv. Proces leukemické transformace může být spuštěn ztrátou heterozygosity (LOH), k níž dochází při vzniku dicentrických chromozomů. Důležitým genem na chromozomu 12 je gen TEL, který se uplatňuje v několika reciprokových translokacích, jež vedou k leukemogenezi – TEL/PDGFRB, TEL/AML, TEL/ABL atd. Dalším kandidátním genem, nacházejícím se na chromozomu 12 je gen CDKN1B (PITIENPOL et al. 1995)
- BCR/ABL – u dětí tvoří jen minimum případů
- t(4;11) – 6% případů

## 2.6 Rizikové faktory vzniku leukémií

Na vzniku leukémie se může spolupodílet celá řada faktorů od genetických predispozic pacienta až po celou řadu vnějších vlivů.

Genetické faktory:

95% leukémií vzniká de novo, pouze 5% případů vzniká v důsledku dědičnosti, tyto jsou většinou asociovány s určitými dědičnými syndromy, jež jsou způsobeny většinou poruchami genů zodpovědných za reparaci DNA nebo kódujících enzymy, jež metabolizují karcinogeny.

Asociované syndromy:

Downův syndrom má asi deseti až dvacetinásobně vyšší riziko vzniku leukémie (zejména AML M7). Důvodem může být výskyt tří kopií genu AML1, jež se nachází na 21. chromozomu a také mutace v genu GATA1. Další syndromy jsou Bloomův s., neurofibromatóza, Schwachmanův s., ataxia teleangiectasia, Kostmannova granulocytická leukemie a Fanconiho anémie (spojená s AML). Také existuje familiární monozomie chromozomu 7. Řada těchto syndromů spadá pod tzv. syndrom chromozomové instability, kdy dochází k častým zlomům na chromatidách a následným translokacím, u Fanconiho anémie dochází k časté výměně sesterských chromatid (SCE).



Ionizující záření: jedná se zejména rentgenové záření, zvyšuje riziko vzniku jak ALL tak AML. Riziko vzniku poruchy je závislé na dávce, která je kumulativní. Také radioterapie (např. při Hodgkinově chorobě) mírně zvyšuje riziko leukémie. Přírodní výskyt ionizujícího záření (kosmické záření, radon) je zodpovědný za přibližně 5% leukémií dětí i dospělých.

Chemické látky: Jedná se např. o organické látky jako je benzen, fenol, jež mohou působit alkylační poškození DNA, zlomy chromozomů. Pesticidy mohou zvyšovat riziko vzniku AML M4 a M5.

Další rizikové faktory:

Věk matky (Downův syndrom), užívání marihuany, porodní váha dítěte, užívání chloramfenikolu v dětství.

Účinky léčby:

Některé chemoterapeutika mohou být příčinou vzniku sekundární leukemie. Jedná se zejména o alkylační látky (antracykliny), léky etoposid a teniposid, které jsou asociovány se vznikem M4 a M5 AML, především prostřednictvím přestaveb MLL genu (SMITH et al. 1994). Přestavby genu MLL mohou vznikat také důsledkem užívání antracyklinů (daunorubicin, doxorubicin), což jsou inhibitory topoisomerázy II. Většina případů jsou AML, pouze 10% těchto sekundárních leukémií je ALL. Topoisomeráza II katalyzuje tvorbu dvouřetězcových zlomů DNA, čímž uvolňuje kladné nadšroubovicové vinutí. Antracykliny zachovávají její štěpící aktivitu, avšak inhibují následnou ligaci volných konců molekuly DNA. V důsledku toho mohou vznikat nové sekundární změny na chromozomech.

Prognóza pacientů se sekundární leukémií je velice špatná, přibližně pouze 10% těchto pacientů přežije po léčbě chemoterapií, 20% přežívá po transplantaci hematopoetických buněk. Alkylační látky způsobují propojování vláken DNA, což vede k nerovnoměrnému rozchodu chromozomů při mitóze a následné ztrátě genetického materiálu.

Ozařování:

Použití ozařování při léčbě zvyšuje riziko vzniku nádoru ve tkáních v okolí ozařovaného místa. Riziko závisí na použité dávce záření, mladší věk pacienta jej zvyšuje. Podávání růstových hormonů zvyšuje riziko vzniku solidních tumorů po ozařování (nádory mozku a osteosarkomu) a pacientů s ALL.

Enzymové polymorfismy:

Polymorfismy u enzymů zodpovědných za metabolizaci některých chemoterapeutik mohou být zodpovědné za vznik sekundárních onemocnění. Jako příklad lze uvést glutathion *S*-transferázy (GSTM1, GSTT1 a GSTP1), které detoxikují mutagenní elektrofilny, NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza (NQO1) redukuje karcinogenní benzochinon na méně toxické hydroxylované metabolity. Cytochrom P450 3A4 metabolizuje několik chemoterapeutik, včetně epipodophyllotoxinů a přetváří je na chinonové metabolity poškozující DNA. Polymorfismus v enzymu thymidylát syntáze vede k zvýšení exprese tohoto enzymu a tím snížení účinnosti léčby metotrexátem, který na něj specificky působí. Pacienti s tímto polymorfismem vyžadují vyšší dávky metotrexátu, aby bylo dosaženo odpovídajícího účinku.

Vliv nezralého imunitního systému:

Zhruba na počátku 80. let minulého století vyvstala otázka, z jakého důvodu dojde z rozvoji leukémie již u dětí kolem 2 let věku. První hypotéza předpokládala, že k prvnímu „zásahu“ do hematopoézy dochází již v průběhu prenatálního vývoje, postnatálně pak dojde k dalšímu zásahu buď vlivem infekce nebo dalších chromozomálních změn. To bylo potvrzeno jednak výskytem leukémie u dvojčat, jednak záchytem fúzního genu TEL/AML1 pomocí PCR na Guthrieho kartičkách. Avšak ani u jednovaječných dvojčat nedochází k rozvoji leukémie ve stejnou dobu, což potvrzuje hypotézu, že samotný fúzní gen TEL/AML není dostatečný pro rozvoj leukémie (MORROW et al. 2004) a je nutné, aby došlo k „druhému“ zásahu, k němuž však u dvojčat dojde v různém věku. Druhý zásah může představovat např. delece druhé kopie genu AML nebo TEL. Následně bylo zformulováno několik hypotéz o příčině druhého zásahu.

Infekční hypotéza předpokládala, že nástup infekce může ve svém důsledku vést k aberantní imunitní odpovědi. Později byla tato teorie oživena objevem retroviru HTLV1, který způsoboval vznik T-leukémií u dospělých (ESSEX et al. 1984).

Hygienická hypotéza byla zformulována mimo jiné v souvislosti s hledáním příčin různých civilizačních chorob jako je alergie, astma, diabetes prvního typu a autoimunitních onemocnění. Podobně jako infekční hypotéza spatřovala příčinu těchto poruch v neadekvátní imunitní odpovědi, ale příčinu tohoto stavu hledala spíše pomocí evolučních úvah. Imunitní systém je složitá kaskáda regulací nejrozličnějšími cytokiny, vzájemně provázanými drahami a také různými antagonistickými větvemi (Th1 vs. Th2 odpověď). Rovnováha tohoto systému se může ustavit až postnatálně, neboť prenatálně není plod vystaven kontaktu s patogeny. Pokud v rané fázi postnatálního vývoje nedojde ke kontaktu s běžnými patogeny, nemůže dojít ke správnému nastavení systému, pozdější infekce pak může vést k patologické imunitní reakci, vedoucí např. k vzniku alergie, ale i leukémie.

Při kontaktu s patogenem dochází k množení buněk imunitního systému, avšak špatně nastavené regulátory mohou vést k příliš vysoké stimulaci dělení, což zvyšuje pravděpodobnost vzniku chyb na genetické úrovni a progrese leukemogeneze preleukemického klonu. Ve vyspělých společnostech může při přemíře hygieny dojít k omezení kontaktu dětí s běžnými patogeny, což přispívá ke vzniku civilizačních onemocnění. Podle studií dětí, které navštěvovaly dětská zařízení jako školky, jesle atd., mají mnohonásobně nižší riziko, že budou trpět alergiemi, diabetem typu I nebo leukémií, v porovnání s dětmi, které tato zařízení nenavštěvují (KRAMER et al. 1998, MCKINLEY et al. 2000, GILHAM et al. 2005). Také jedináčci mají vyšší riziko těchto chorob ve srovnání s dětmi s více sourozenci.

Nestabilita mikrosatelitů:

Mikrosatelity jsou tvořeny tandemovým opakováním krátké 2-5 bázové sekvence. Počet těchto opakování se u každého jedince liší. Instabilita mikrosatelitů se projevuje mutacemi vznikajícími chybami při replikaci, je asociována s několika typy lidských karcinomů jako je dědičná nepolypózní karcinom tlustého střeva, karcinom plic atd. Mohou být zodpovědné také za vznik leukémie, místa mikrosatelitové instability se nacházejí např. na 12. chromozomu v blízkosti genu Tel nebo poblíž genu p16 na chromozomu 9.

## 2.7 Léčba leukémie

### 2.7.1 Stratifikace podle rizika a významné prognostické faktory

Prognózu pacienta ovlivňuje několik hlavních kritérií, zejména věk pacienta, imunofenotyp, počet leukocytů, genetické abnormality, a také odpověď pacienta na indukční terapii. Na základě těchto parametrů je pacient zařazen do některé z rizikových skupin – skupina standardního, vysokého a velmi vysokého rizika. Některé věkové skupiny dětských pacientů mohou mít velmi odlišnou prognózu.

Odpověď na indukční fázi terapie je jedním z klíčových prognostických faktorů, sleduje se prostřednictvím kvantifikace minimální reziduální nemoci. Pacienti s vyšší hladinou MRN mají horší prognózu a vyšší pravděpodobnost relapsu.

V určitých věkových skupinách dominují různé genetické aberace (např. TEL/AML1 u skupiny 1-5 let, MLL přestavby u novorozenců), proto může být samotná stratifikace podle věku zavádějící.

### 2.7.2 Struktura léčebného protokolu

Indukční terapie:

V indukční fázi léčby se využívá prednizon, vincristin, antracykliny (převážně daunorubicin), dále L-asparagináza, cyklofosfamid, cytarabin a merkaptopurin. Prednizon bývá v moderních protokolech nahrazován dexometazonem, který má vyšší účinek, a také dosahuje vyšší koncentrace v mozkomíšním moku. Jeho nevýhodou je vyšší toxicita. Indukce slouží k navození remise onemocnění a trvá zhruba 1 měsíc.

L-asparagináza je častou součástí indukční léčby, existuje několik variant s různým poločasem života v séru – Erwinia, E.coli a PEG-A-L.

Konsolidace: je podáván cytosinarabinozid, merkaptopurin, cyklofosfamid a vysokodávkovaný metotrexát.

Intenzifikace: přibližně po 6 měsících od zahájení terapie následuje pozdní intenzifikace, kdy je zopakována obdoba indukční fáze. Nedílnou součástí terapie je i intratékální

podávání metotrexátu k prevenci a léčbě leukemické infiltrace mozku, pro některé rizikové pacienty

je zařazeno i ozařování neurokrania. Po skončení intenzivní chemoterapie následuje udržovací léčba merkaptopurinem a metotrexátem do celkové délky terapie 2 roky.

Transplantace kostní dřeně od HLA-identického sourozence v první remisi ALL je využívána pouze přesně definovanou skupinu dětí vysokého rizika. Aktuálně používaným protokolem pro děti s ALL v České republice je protokol ALL Interim 2008.

Pro skupinu dětí pod 1 rok, vzhledem k odlišnému typu ALL (nejčastěji velmi nezralé prekursorů s přestavbou genu MLL) a velmi špatné odpovědi na standardní chemoterapii, je používán mezinárodní protokol Interfant, který v sobě spojuje léčebné prvky z terapie jak akutní lymfoblastické, tak i akutní myeloidní leukémie. Další specifickou skupinou jsou pacienti s BCR/ABL pozitivní ALL, pro které je nově používán mezinárodní protokol EsPhALL (European intergroup study on post-induction treatment of Ph positive ALL).

Použití růstových faktorů:

Pro zmírnění toxických účinků chemoterapie se nyní běžně používají růstové faktory hematopoetických buněk, např. G-CSF, který vede ke snížení neutropenie a lepší toleranci chemoterapie.

### **2.7.3 Transplantace hematopoetických buněk**

Transplantace kmenových hematopoetických buněk přichází v úvahu jednak u pacientů s vysokým rizikem (BCR/ABL), pak u pacientů u kterých došlo k selhání indukční fáze terapie, což je vyhodnocováno sledováním hladiny minimální reziduální nemoci, a pak u pacientů, u nichž došlo k relapsu. V případě izolovaného CNS relapsu u dětských pacientů je stále účinná reindukční léčba chemoterapií, transplantace není nutná.

Kmenové buňky pro transplantaci je možné získat od příbuzného či nepříbuzného dárce, základním kritériem pro výběr je pak kompatibilita v HLA systému, především v MHC I. a II. třídy. V případě nižší kompatibility hrozí především GVHD, avšak může se projevit také jako GVL.

Původním a tradičním zdrojem kmenových buněk pro transplantaci byla kostní dřeň. Avšak na počátku 90. let se začalo rozšiřovat použití periferní krve, kdy byly buňky mobilizovány ze dřeně pomocí G-CSF, navíc se prokázalo, že využití periferní krve vede k rychlejšímu engraftmentu a zvyšuje šanci na přežití. Další alternativou k nepříbuzným dárčům je využití zamražené pupečnickové krve, výhodou je rychlá dostupnost materiálu a díky nízkému zastoupení T lymfocytů v pupečnickové krvi je možné, že i vyšší rozdíly mezi antigeny dárce a příjemce budou tolerovány. Na druhou stranu pupečnicková krev má pomalejší engraftment a vyšší riziko odhojení štěpu a infekcí.

#### **2.7.4 CNS terapie**

Terapie zaměřená na CNS je důležitá pro prevenci relapsu. Ozařování je na jednu stranu nejefektivnější metodou eradikace blastů, které infiltrovaly CNS, ale na druhou stranu má vážné vedlejší účinky, jako je endokrinopatie nebo vznik sekundárních malignit. Pacienti, kteří ozařování podstoupili, mají o 20% vyšší riziko sekundárního neoplasmu ještě třicet let po zákroku. Jejich úmrtnost je také zvýšena ve srovnání a průměrnou populací. Většina lékařských zařízení se nyní pokouší snížit používání ozařování jen na 10-20% pacientů s nejvyšším rizikem, a zároveň snížit dávku ozáření na 12-18 Gy, což je méně škodlivé než dříve užívaná 24 Gy.

Vyšší riziko CNS relapsu představují některé genetické faktory (fúzní gen BCR/ABL), velká zátěž leukemických blastů (počet leukocytů > 100 000/mL), T-ALL, mužské pohlaví a přítomnost leukemických buněk v mozkomíšním moku.

#### **2.7.5 Používaná chemoterapeutika a jiné léčebné metody**

Používaná léčiva se dělí do několika kategorií:

Antimetabolity:

metotrexát – pro jeho aktivitu je nutná metabolizace v buňkách, B-ALL buňky akumulují více než T-ALL, akumulace je větší také v hyperdiploidních buňkách. U pacientů s Downovým syndromem je delší perzistence v plazmě –tato metabolické změna zřejmě souvisí s nadpočetným 21. chromozomem.

6-merkaptopurin – také je nutná metabolizace v buňce.

Dále se využívá cytarabin, což je analog pyrimidinu, používá se při indukci remise a konsolidační léčbě při AML. Podáváný intratekálně je účinný jako profylaxe a léčba CNS leukemií. Intracelulárně se fosforyluje, inhibuje DNA polymerázu tím, že se interkaluje do DNA. Pacienti s Downovým syndromem mají sníženou frekvenci relapsů, jejich myeloblasty jsou asi 10x citlivější k ara-C.

Alkylační látky:

Antracykliny – daunorubicin a doxorubicin – mají dlouhý poločas života v plasmě. Váží se na DNA. Používají se k léčbě AML. Jejich hlavní nevýhodou je vysoká kardiotoxicita.

Jiné:

Etoposid a teniposid – využívají se k léčbě ALL i AML, jedná se o inhibitory topoizomerázy II.

ATRA – používá se k léčbě akutní promyelocytické leukémie (AML M3).

Asparagináza – léčba ALL. Normální buňky mohou syntetizovat asparagin, leukemické jej ale musí přijímat zvnějšku. Asparagináza ničí volný asparagin v extracelulárním prostoru a tím znemožňuje leukemickým buňkám proteosyntézu. Někteří pacienti si proti asparagináze mohou vyvinout protilátky, často dochází k hypersenzitivní reakci. Zdrojem enzymu mohou být bakterie jako E. coli. Výrazně citlivé vůči asparagináze jsou buňky s fúzním genem Tel/Aml1.

Glukokortikoidy – prednison a dexametazon – léčba ALL

Cyklofosamid – součást konsolidační fáze léčby u ALL.

Nechemoterapeutická léčba:

Využití inhibitorů protein kináz:

Při léčbě pacientů s t(9;22) je možná využít selektivní inhibitor kinázy ABL STI571 (Imatinib, Gleevec), který brání v proliferaci pouze leukemickým buňkám. Jeho použití bylo účinné také u pacientů s relapsem po SCT. Vedlejší účinky Imatinibu jsou mírné – žaludeční nevolnost, zvracení. V současné době je ovšem častým jevem vznik rezistence proti Imatinibu, což vede k selektování rezistentních klonů a nutnosti hledání modifikovaných léčiv jako je Dasatinib.

Využití protilátek – pokud mají leukemické buňky na svém povrchu neobvyklé antigeny, je možné využít protilátky specifické proti těmto antigenům. ALL blasty exprimují zejména CD20, CD19, CD22, CD33 a CD52. Aby byla terapie účinná, musí být antigen exprimován alespoň na 20-30% blastů. CD20, který se nachází u více než 20% blastů, je exprimován u více než třetiny B-prekurzorových ALL blastů, zejména u starších pacientů (40-50%), a také na většině zralých B-ALL blastů (80-90%).

Využití graft-versus-leukemia efektu – infuze lymfocytů dárce může vést k eliminaci leukemických buněk příjemce.

Využití čipových technologií:

Metody expresního profilování neslouží k léčbě ani přímé diagnostice, mohou nám však prozradit více o podstatě leukemogeneze. Molekulární přestavby jako E2A/PBX1, TEL/AML1, přestavby genu MLL, BCR/ABL, vysoce hyperdiploidní ALL, mohou vyvolávat vysoce specifické změny v expresi různých genů. Díky microarrayové technice je možné tyto geny identifikovat a zkoumat jejich funkci, což může mít významný dopad na stanovení prognózy, ale také vést k novým léčebným přístupům. Exprese T buněčných onkogenů (HOX11, TAL1, LYL1, LMO1 a LMO2) může korelovat s různými stádii vývoje T řady a může být příčinou rozdílných léčebných výsledků těchto skupin pacientů.

## **2.8 Minimální reziduální nemoc**

### **2.8.1 Význam měření minimální reziduální nemoci**



I když pacient dosáhne kompletní remise, nemusí to znamenat eradikaci veškerých leukemických buněk v jeho organismu. Jako hranice detekovatelnosti je nyní uznávána  $10^4$ , tj. detekce jedné leukemické buňky mezi 10 000 normálními. Sledování hladiny minimální reziduální nemoci má velký význam pro hodnocení účinnosti léčby, a zejména v indukční fázi je velmi přesná při predikci relapsů. Nízká hladina nebo úplná absence MRN v kostní dřeni po skončení indukční fáze léčby předznamenává dobrý výsledek léčby. V případě negativního výsledku dochází k relapsu jen u 2-10% pacientů. Naproti tomu u pozitivních pacientů dochází k relapsu v 70-100%, v závislosti na další dynamice zbytkového leukemického klonu. Hladina MRN je tudíž velice důležitým prognostickým faktorem.

Důležité je sledovat hladinu MRN také před transplantací kostní dřeně. U pacientů, kteří přijímají štěp zbavený T lymfocytů, znamená pozitivní PCR výsledek MRN před transplantací vysoké riziko posttransplantačního relapsu. 2 letý EFS u pacientů se slabou pozitivitou je 35-50%. U pacientů MRN negativních je 2 letý EFS vyšší než 70%, proto u MRN vysoce pozitivních pacientů je nutné před transplantací provést další léčbu, která by snížila leukemickou zátěž (chemoterapie, imunoterapie).

## 2.8.2 Metody měření MRN

V případě dosažení remise nejsou morfologická kritéria dostačující pro rozlišení pacientů s dobrou a rizikovou prognózou. Proto je třeba využít citlivějších detekčních technik.

1. imunofenotypizace průtokovou cytometrií – testování výskytu aberantního nebo leukemického fenotypu
2. PCR – detekce fúzních genů nebo změn v expresi určitých transkriptů
3. detekce přestaveb molekul Ig a TCR pomocí RT-PCR

Metoda detekce MRN pomocí průtokové cytometrie:

Hlavní pozornost této metody se soustředí na neobvyklé imunofenotypy, které se nevyskytují nebo jen vzácně v normální kostní dřeni a periferní krvi. V současné době však tato metoda neposkytuje dostatečně senzitivní výsledky, aby bylo možné ji považovat za standardizovanou.

Analýza chromozomálních aberací pomocí RT-PCR:

Strukturní chromozomové aberace se pomocí metody PCR dají snadno detekovat, jejich exprese je v průběhu onemocnění stabilní. V úvahu tato metoda připadá u pacientů s definovanými translokacemi (TEL-AML1, BCR-ABL, SIL-TAL1 atd.) nebo aberantními hladinami exprese specifických transkriptů (HOX1, IL-2, WT1). Tato metoda má dvě hlavní nevýhody – je aplikovatelná jen u menší skupiny pacientů a nedosahuje zatím potřebné senzitivity a/nebo specifity.

Analýza přestaveb Ig a TCR metodou PCR:

V oblastech přestavěných genů Ig a TCR jsou přítomny specifické sekvence, které se liší mezi jednotlivými klony lymfocytů, liší se tedy i mezi maligními a zdravými buňkami. Tyto klonální přestavby mohou proto sloužit jako marker pro detekci MRN prostřednictvím PCR u většiny prekurzorových B-ALL a T-ALL s vysokou senzitivitou. Aby jí bylo možné dosáhnout, je třeba znát sekvenci těchto specifických úseků u každého pacienta, aby bylo možné navrhnout specifické primery pro PCR.

V případě prekurzorové B-ALL mohou být pozorovány změny u pacientů s více leukemickými klony (oligoklonalita) při diagnóze. Frekvence oligoklonality se liší podle typu přestavby, např. přestavby Ig řetězce kappa, které zahrnují KDE (kappa deleting element) jsou stabilnější než přestavby IgH, TCRG a TCRD. Tato vyšší stabilita je patrně způsobena tím, že je deletována nejen konstantní část řetězce kappa, ale i dva enhancery, což napovídá, že přestavba KDE je konečným stádiem přestaveb Ig a nemůže už podstoupit další.

U T-ALL je frekvence dalších přestaveb nižší, protože zřídka obsahuje oligoklonální přestavby TCR. Přesto se v současné době doporučuje vyšetřovat u pacientů vždy dva různé cíle.

### **3 Charakterizace fúzního genu TEL/AML1:**

TEL/AML1 vzniká fúzí genu TEL na 12. chromozomu s částí genu AML na 21. chromozomu. Ke vzniku této translokace jsou nutné dvouřetězcové zlomy v obou těchto genech, které jsou chybným postupem reparačních mechanismů buňky spojeny dohromady. Ke zlomům dochází v intronech obou genů, u každého pacienta na jiném

místě (s výjimkou jednovaječných dvojčat, u nichž je zlomové místo vždy stejné). Tento fúzní gen se vyskytuje jen u přibližně 2% dospělých pacientů s ALL, ale u dětských ALL je přítomen ve 25% případů. Jeho předpokládaný vliv na vznik leukémie představuje zablokování diferenciaci B lymfocytů, protože aberantní protein může změnit funkci obou složek.

Gen Tel působí jako transkripční represor, aby mohl tuto funkci plnit, vyžaduje vazbu dvou kofaktorů N-CoR a mSin3A. Po vazbě těchto dvou korepresorů je schopen zprostředkovat vazbu histon deacetyláz 9 a 3, což vede k represi jím regulovaných genů. LOPEZ et al. (1999) zjistili, že gen Tel obsahuje dvě represorové domény bohaté na prolin. Pro účinnost represe musí protein TEL oligomerizovat, KIM et al. (2001) identifikovali N-terminální SAM doménu, která oligomerizaci umožňuje. GUIDEZ et al. (2000) prokázali interakci mezi TEL a N-CoR represorovou doménou. Spoluúčast mSin3A na represorovém komplexu zesiluje účinnost represe, přičemž každý z korepresorů se patrně váže na nezávislou doménu TEL. Zatímco N-CoR byl schopen způsobit represi nezávisle na účasti mSin3A, samotný mSin3A není schopen represi způsobit. N-CoR je proto zřejmě nepostradatelný pro tvorbu represorového komplexu. Účast N-CoR se předpokládá jak u fúzního proteinu TEL/AML1, tak u translokace (8;21), kdy vzniká fúzní gen AML1/ETO. Z toho důvodu je pravděpodobné, že N-CoR a mSin3A zprostředkovávají vazbu komplexu histon deacetyláz ve více případech.

V hematopoéze je Tel nutný pro kolonizaci kostní dřeně progernitorovými buňkami. Při leukemogenezi je také často deletována normální kopie, nejméně jedna represorová doména (B doména) je ve fúzním proteinu zachována a i oligomerizace fúzního proteinu je možná.

Gen Tel se kromě ALL podílí i na vzniku jedné ze vzácných forem CML – t(9;12) – čímž vzniká fúzní gen TEL/ABL a také translokaci t(5;12), kdy fúzuje s genem PDGFRB. U fúze s genem PDGFRB se však předpokládá jiný mechanismus rozvoje leukémie, neboť gen PDGFRB má funkci receptorové tyrozinové kinázy, zprostředkovávající signál růstových faktorů, a pravděpodobně vlivem translokace dochází k deregulaci této jeho aktivity.

Gen AML1 působí v hematopoéze a osteogenezi, reguluje funkci CD4 silenceru v thymocytech, je vyžadován pro maturaci megakaryocytů a diferenciaci T a B buněk. Má aktivitu jak transkripčního aktivátoru, tak represoru. Jako aktivátor působí prostřednictvím

vazby komplexu histon acetyláz, který způsobí remodelaci chromatinu a zpřístupní DNA komplexu RNA polymerázy II. Jako aktivátor je slabý, ale jeho aktivita je zesílena vazbou C/EBPa nebo Ets-1. Zároveň je AML1 schopen vázat jeden z korepresorových proteinů mSin3A a může tak fungovat i jako represor, například pro promotor genu p21 (LUTTERBACH et al. 2000). Je možná také účast NcoR a komplexu histon deacetyláz, avšak na protein AML1 se přímo neváží. To, zda bude mít aktivační nebo represivní funkci na expresi určitých genů, je tkáňově specifické.

AML1 rozpoznává na DNA důležitou regulační sekvenci TGTGGT (enhancer core motiv), na niž se váže. Enhancer core motiv je nutný pro tkáňově specifickou transkripci různých genů, včetně genu pro TCR, alfa, beta, gama a delta enhancerů, MPO, GM-SCF a IL-3. Ale samotná enhancerová sekvence ve spojení s jiným promotorem není schopna navodit tkáňově specifickou expresi, ani AML1 nedokáže aktivovat umělý promotor, který by obsahoval tuto enhancerovou sekvenci. Kromě toho AML1 není sám tkáňově specificky exprimován, je možné, že pouze zprostředkovává vazbu dalších tkáňově specifických transkripčních faktorů.

AML1 se podílí i na dalších translokacích, např. t(8;21) – AML1/ETO – vyskytuje se u 10-15% případů akutní myeloidní leukémie, především klasifikace M2, fúze vede k zvýšené sebeobnově buněk a zástavě diferenciaci. Opět se zde uplatňuje vazba komplexu HDAC pomocí mSin3A, ale mechanismus účinku se liší, neboť zatímco TEL je translokován k N konci AML, ETO se váže na jeho C konec, což patrně mění místo vazby komplexu HDAC. AML1/ETO se vyskytuje u akutní myeloidní leukémie a tudíž je možné předpokládat, že reprimuje jiné geny než fúzní gen TEL/AML1.

Podstata leukemického účinku fúzního genu TEL/AML1 může podle naší hypotézy spočívat v represi genů, které jsou v normálních buňkách aktivovány genem AML1. Ve fúzním proteinu si AML1 zachovává svou DNA vazebnou doménu, zatímco TEL si ponechává jak represorovou tak dimerizační doménu, pomocí které zprostředkovává pomocí korepresorů vazbu komplexu histon deacetyláz (HDAC) a tím zastavuje expresi těchto genů. Chimérický protein se skládá ze 333 aminokyselin z proteinu Tel obsahující helix-loop-helix doménu, ale nikoliv jeho DNA vazebnou doménu. Protein má hmotnost 93 kDa. Je schopen interagovat také s normálním AML1 a tím jej inaktivuje, tento kontakt zprostředkovává helix-loop-helix doména.

Translokace (3;21) byla nalezena při blastické krizi u CML a u terapií vyvolanou sekundární AML. Touto translokací vznikají vzácné fúzní proteiny AML1/EAP, AML1/MDS, nebo AML1/EVI1. AML1 je také nepřímo ovlivněn inverzí chromozomu 16, která ovlivňuje gen CBFbeta, se kterým protein AML1 tvoří heterodimery. CBFbeta je inverzí fúzován se silným promotorem genu MYH11, který kóduje těžký řetězec myozinu, což dereguluje jeho transkripci.

Význam inhibitorů histon deacetyláz:

Acetylace a deacetylace proteinů má v buňce několik funkcí, některé mohou být významné pro vznik leukémie. Pomocí acetylace a deacetylace histonů je regulována přístupnost DNA pro transkripční faktory, aberantní modifikace histonů může hrát roli ve změnách exprese důležitých genů. Tato modifikace probíhá na lysinech volných N a C konců histonů H2A, H2B, H3 a H4. Acetylová skupina zakrývá kladný náboj lysinových zbytků a tím zeslabuje vazbu histonů na DNA, záporně nabitou díky fosfátovým skupinám. Avšak histony nejsou jediným cílem acetylace, přidáním acetylové skupiny na lysin mohou být modifikovány i cytoplasmatické proteiny. Acetylace/deacetylace může mít významný vliv na regulaci stability proteinů, neboť ubiquitinace probíhá také na lysinových zbytcích, tyto dvě modifikace tudíž mohou mít antagonistický účinek. Dále může tato modifikace ovlivnit protein-proteinové interakce – příkladem je proapoptický protein Bax, který je vyvazován neacetylovanou formou proteinu Ku70, pokud je však buňka poškozena, je protein Ku70 acetylován a uvolněný Bax je transportován do mitochondrie, kde spouští apoptotický program.

Možnost ovlivnit poměr acetylace/deacetylace proteinů nabízí nový potenciální terapeutický přístup. Pokud jsou některé geny důležité pro diferenciaci B lymfocytů umlčovány remodelací chromatinu účinkem histon deacetylázového komplexu, bylo by možné použitím inhibitorů histon deacetyláz (HDACi) obnovit jejich expresi.

Inhibitory histon deacetyláz zahrnují chemicky heterogenní skupinu látek, jak přirozených (např. trichostatin A, butyrát sodný, ampicidin), tak čistě syntetických (SAHA, valproová kyselina, tubacin).

Zároveň však HDACi mohou mít také účinky, které by mohly být nežádoucí. Příkladem může být retinoblastomový gen (RB), který využívá vazby histon deacetyláz k regulaci pro-proliferčního transkripčního faktoru E2F. Efekt histon deacetyláz by mohl

způsobit podporu proliferační dráhy, ačkoliv acetylace/deacetylace histonů není jediným mechanismem, který reguluje progresi buněčného cyklu (Siddiqui et al. 2003).

Odhaduje se, že účinku HDACi podléhá zhruba 20% známých genů (GLASER et al. 2003), neznamená to ovšem, že všechny tyto geny jsou upregulované, poměr up a downregulovaných genů je přibližně 1:1. Zároveň u některých buněčných linií došlo k inhibici DNA reparačních mechanismů, což by mohlo vést k vyšší citlivosti nádorů vůči chemoterapii poškozující strukturu DNA.

HDACi mají velký vliv na apoptózu, působí například hyperacetylaci chaperonu HSP90, což vede k degradaci poškozených proteinů, včetně onkoproteinů (RAHMANI et al. 2005). Tubacin selektivně inhibuje HDAC6, což vede k buněčné smrti způsobenou akumulací ubiquitinilovaných proteinů (HIDESHIMA et al. 2005). Významnou dráhou apoptózy, kde se HDACi uplatňují, je TRAIL (NAKATA et al. 2004) a FAS/FASL.

VPA se ale již využívá a to v léčbě epilepsie, nikoliv ovšem jako inhibitor histon deacetyláz. Zároveň v současné době probíhají klinické zkoušky VPA v léčbě akutní myeloidní leukémie. VPA se chemicky řadí mezi mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, short chain fatty acids).

Publikovaná data ukazují, že VPA je účinnější spíše u HDAC I. třídy než u HDAC II. třídy (GOTTLIECHER et al. 2001). Studie monitorující pomocí expresního profilování procento genů ovlivněných v eukaryotickém organismu působením HDACi se výrazně liší, udávají se hodnoty >5-20% (PEART et al. 2006, GLASSER et al. 2003). Funkční in vitro analýzy potvrdily, že HDACi růst a přežívání normálních buněk neovlivňují. Při studiu indukce apoptózy bylo popsáno, že nádorové buňky na rozdíl od buněk normálních po podání HDACi podstupují apoptózu. Klíčovou roli pravděpodobně sehrávají reaktivní formy kyslíku (ROS), které jsou v normálních buňkách neutralizovány thioredoxinem (TXN). Jeho exprese je v těchto buňkách po podání HDACi zvýšena. Protože v nádorových buňkách není TXN exprimován, ROS se v nich akumulují a dochází ke zvýšení procenta buněk podléhajících buněčné smrti (UNGERSTEDT et al. 2005).

Jednou z hlavních výhod VPA je selektivnost jejího působení. LAGNEAUX et al. (2007) zjistili, že v případě chronické lymfoblastické leukémie zvyšuje selektivně citlivost leukemických blastů k apoptóze indukovanou dráhou TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), jejíž součástí je proapoptotický protein Bax, její antagonistou pak antiapoptotický protein Bcl. Senzitivitu k TRAIL signalizaci ovlivňuje

také úroveň exprese death receptorů 4 a 5 (DR4, DR5). Tato dráha vede k degradaci antiapoptotického proteinu c-FLIP a následně k apoptóze skrze dráhu kaspázy 8. Protein FLIP obsahuje dvě tandemové death-efektorové domény, které po vazbě na signalizační komplex FADD mimikují strukturu prokaspázy 8 a tím komplexu zabraňují aktivovat skutečnou prokaspázu 8. U nádorových buněk často dochází k represí TRAIL prostřednictvím změn struktury chromatinu. VPA může obnovit expresi TRAIL a tím i citlivost nádorových buněk k apoptóze. Zároveň bylo zjištěno, že na normálních hematopoetických buňkách je exprimován receptor R1, R2 a R4, nikoliv R3, zatímco u některých pacientů s CML dochází ke ztrátě exprese R4 a částečně i R1 (DELIGEZER a DALAY 2007).

VPA také inhibuje transkripci onkogenu c-MYC a zastavuje buněčný cyklus ve fázi G1 a indukuje buněčnou diferenciaci

### **3.1 Cíle práce**

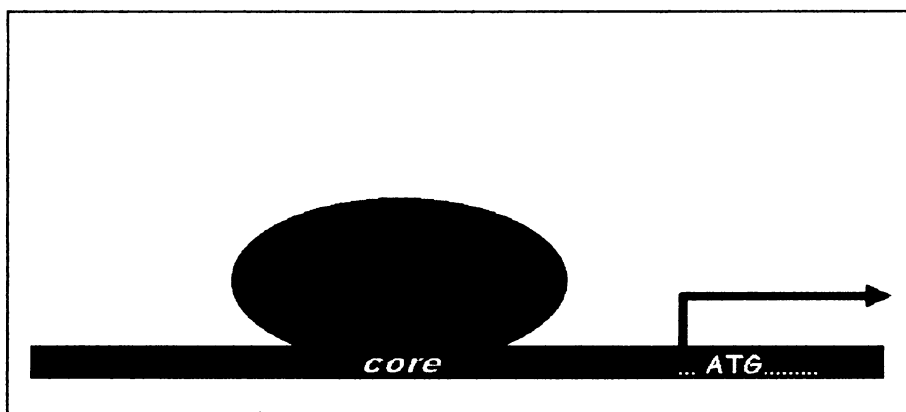
### **3.2 Hypotéza**

Chimérický protein TEL/AML1 si zachovává funkční DNA vazebnou doménu proteinu AML1 a represorovou doménu proteinu TEL, jež je schopná vázat korepresory N-coR a mSin3A, které zprostředkovávají vazbu deacetyláz histonů. Takto se chimérický protein může vázat na promotorové oblasti genů, regulovaných genem AML1 a bránit jejich transkripci změnou struktury chromatinu. Některé z těchto genů mohou být důležité pro maturaci a diferenciaci B lymfocytů, jejich represe (místo aktivace, kterou provádí samotný protein AML1) by mohla vést k zástavě jejich diferenciaci a ke hromadění nezralých progenitorů, což postupně může vést až ke vzniku leukémie.

Účinkem valproové kyseliny, inhibitoru histon deacetyláz, by bylo možné tuto represí příslušných genů odstranit a obnovit jejich transkripci. Tím by mohlo dojít k obnově diferenciaci B lymfocytů.

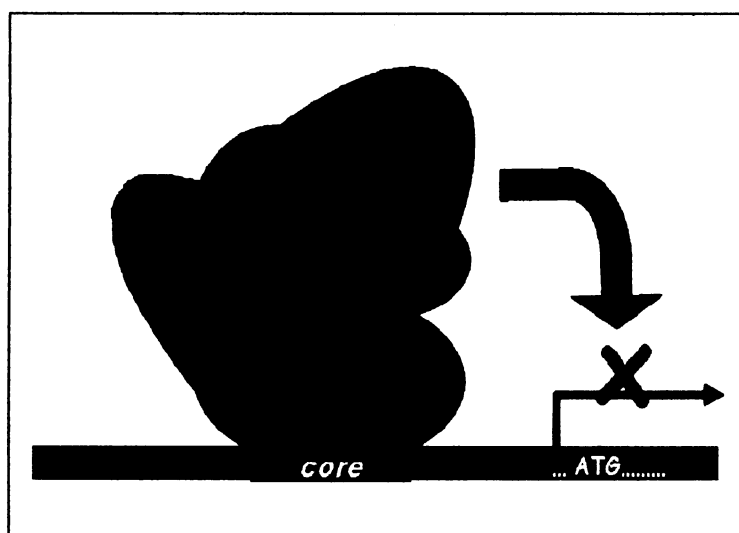
Obrázek č. 1 ukazuje normální stav – protein AML1 je navázán do promotorové oblasti a aktivuje transkripci:

**Obr. 1**



Obrázek 2 ukazuje změnu vyvolanou fúzním proteinem Tel/Aml1. Dochází k vazbě korepresorů a histon deacetyláz, což působí blok transkripce:

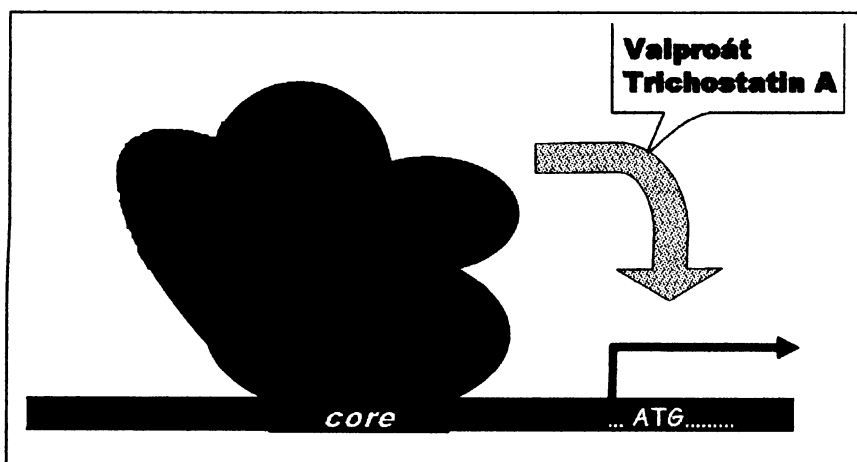
**Obr. 2**





Po působení inhibitorů deacetyláz histonů dojde k opětovnému obnovení transkripce, jak ukazuje obr. 3.

Obr. 3



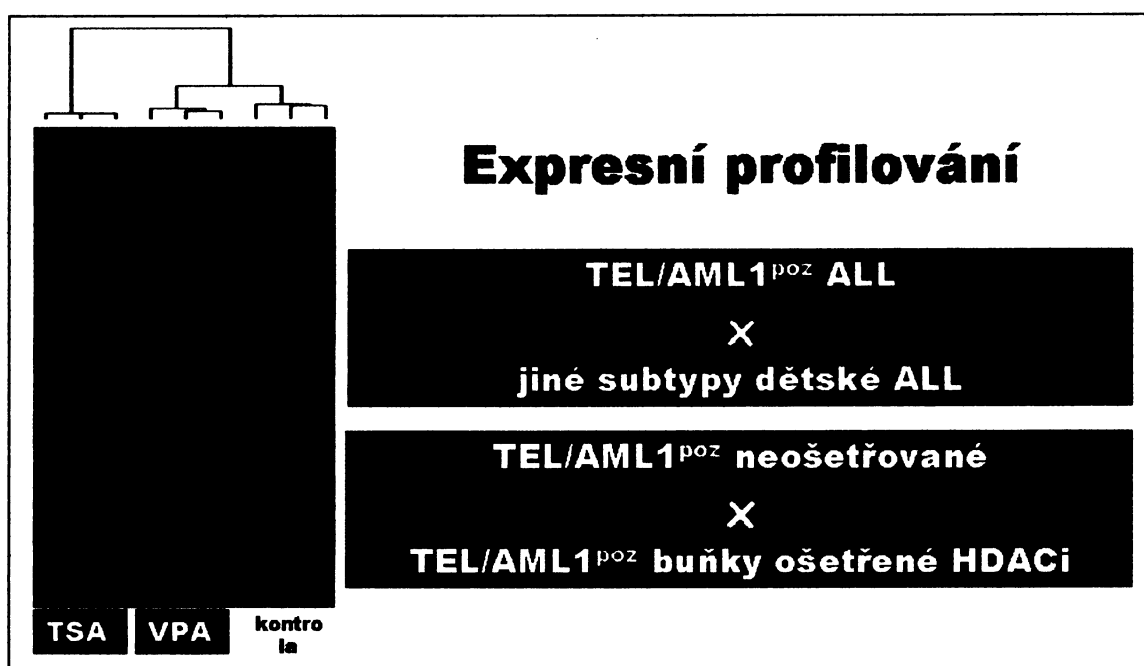
### 3.3 Identifikace TEL/AML1 regulovaných genů

Prvním krokem k ověření účinku VPA bylo identifikovat geny, které jsou downregulované účinkem fúzního genu TEL/AML1. STARKOVÁ et al. (2005) provedli několik experimentů na leukemických liniích s fúzním genem TEL/AML1.

Zprvė pomocí průtokové cytometrie zjistili, že leukemické buňky po ošetření HDACi prodělávají změny v imunofenotypu, které jsou typické pro zralejší B lymfocyty. Při analýze buněčného cyklu zjistili, že ošetřené buňky se akumulovaly v G1/G0 fázi a také došlo ke zvýšení apoptotické frakce buněk. V průtokové cytometrii byly použity antigeny CD10, CD20, CD71, DAPI a intracelulární iTdT, iIgM a iRAG.

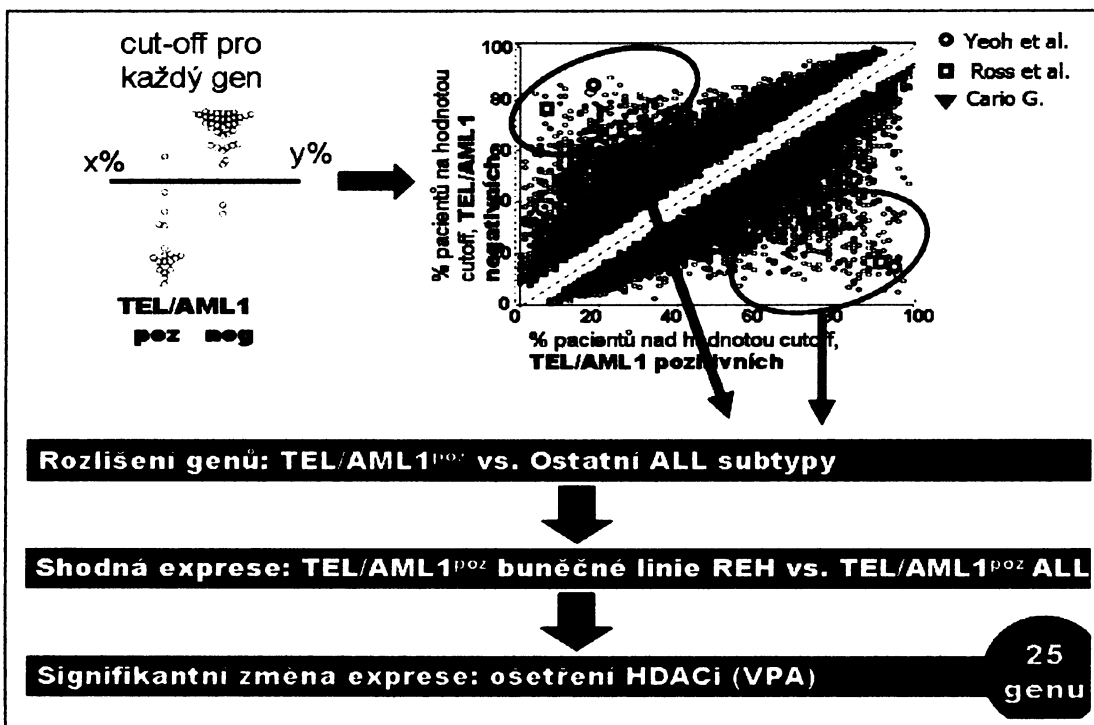
Druhým krokem bylo provedení expresního profilování na buněčné linii REH, která je odvozena od B prekurzorové leukémie a nese fúzní gen TEL/AML1. Čipovou analýzou byly porovnávány vzorky RNA ze dvou sérií – kontrolních buněk a buněk kultivovaných s přidavkem VPA. Byla použita cDNA microarray obsahující 43 000 fragmentů, které představovaly zhruba 30 000 genů. Testovaná RNA byla značena červenou fluorescenční barvou Cy5, kontrolní RNA zelenou fluorescenční barvou Cy3. Statistickou analýzou byly následně identifikovány ty geny, jejichž exprese byla v buňkách ovlivněných VPA vyšší než v buňkách kontrolních. Obr. 4 ukazuje stručné schéma experimentu:

Obr. 4



V původní analýze byly testovány jak TEL/AML1 pozitivní leukémie, tak i další typy dětských ALL a to jak kontrolní, tak ošetřené VPA a TSA (výsledkům s TSA se dále věnovat nebudeme). Dále byla stanovena hodnota cutoff (neboli hodnota nejlépe diskriminující mezi sledovanými skupinami: TEL/AML1 pozitivní vs negativní; ošetřené VPA vs neošetřené) pro změnu exprese každého genu, a to jak pro zvýšení tak pro snížení exprese. Nejprve byly z výběru vyloučeny ty geny, které měly jiný vzorec exprese u ostatních dětských ALL v porovnání s TEL/AML1 leukémiemi. Ve druhém kroku byly vyloučeny ty geny, které neměly shodný vzorec exprese u linie REH a patientských vzorků. Na závěr pak byly vybrány ty geny, u nichž došlo účinkem VPA k nárůstu exprese - což odpovídá hypotetickému mechanismu funkce. Strčné schéma této druhé fáze ukazuje obr. 5:

Obr. 5



Dále provedli qRT-PCR u dvou vybraných genů – JunD a TCF4. Hladina exprese JunD byla v leukemických buňkách nízká a po ošetření HDACi došlo k nárůstu exprese ( $p=0,0008$ ), zatímco exprese TCF4 byla v leukemických buňkách vysoká a po ošetření HDACi došlo k poklesu ( $p=0,0002$ ).

Tabulka č. 1 obsahuje geny, u nichž byla expresním profilováním zjištěna nejvyšší změna exprese:

**Tab. 1**

<b>Jméno</b>
<b>PAK1</b>
<b>Similar to peptidylprolyl isomerase A (LOC402673), mRNA</b>
<b>NID67</b>
<b>FLJ00012</b>
<b>HRMT1L1</b>
<b>AA252394</b>
<b>ACK1</b>
<b>CXXC5</b>
<b>BSPRY</b>
<b>TNFRSF5</b>
<b>RNF144</b>
<b>AHI1</b>
<b>C14orf101</b>
<b>CDNA FLJ45905 fis, klon OCBBF3026576</b>
<b>CDNA FLJ10641 fis, klon NT2RP2005748</b>
<b>PDGFRB</b>
<b>ARD1</b>
<b>AI302216</b>
<b>MGMT</b>
<b>N24645</b>
<b>ANTXR2</b>
<b>ITM2C</b>
<b>WDR7</b>
<b>STARD9</b>
<b>LOC125893</b>

Změnu exprese těchto genů jsme se rozhodli ověřit pomocí RT-PCR. Z těchto genů jsme si zvolili ty, u nichž bylo známo něco o jejich funkci: PAK1, HRMT1L1, ACK1, TNFRSF5 (CD40), PDGFRB, ARD1, MGMT, ANTXR2 a WDR7.

Funkce vybraných genů:

MGMT: jeho funkcí je reparace alkylačního poškození DNA, kdy odstraňuje alkylovou skupinu z guaninu a přenáší ji na pozici O-6 cysteinového zbytku enzymu (PEGG 2000). Modifikovaný guanin vyčnívá z povrchu helixu, čímž je enzymem rozpoznáván. Enzym se svou činností zároveň zničí. V tumorogenezi dochází často k vyřazení tohoto genu z funkce (FENG et al. 2008). Zároveň ale může způsobovat resistenci na léky (alkylační

činidla) (CASORELLI et al. 2008). Reguluje i buněčný cyklus – účastní se v regulaci v G2/M kontrolním bodě.

ANTXR2 – tento gen kóduje transmembránový protein, jehož první zjištěnou funkcí byl podíl na internalizaci toxinu bakterie *Bacillus subtilis*. Jeho fyziologická funkce v organismu je dosud jen málo prostudovaná, bylo zjištěno, že se podílí na morfogenezi kapilár, je exprimován na endoteliálních buňkách v průběhu angiogeneze.

HRMT1L1 – účinkuje v buňce jako arginin metyltransferáza. Zároveň přímo interaguje s proteinem retinoblastomového genu. RB je hlavním negativním regulátorem proliferativního transkripčního faktoru E2F, za tím účelem váže nejrůznější faktory jako je komplex histon deacetyláz, DNA metyl transferázy atd. YOSHIMOTO et al. (2006) prokázali, že knockout genu PRMT2 u myši vede k zvýšení aktivity E2F. GANESH et al. (2006) zjistili, že PRMT2 také blokuje export inhibitoru komplexu NFkB z jádra, čímž brání aktivaci NFkB dependentní exprese genů, důsledkem čehož dojde v buňce k apoptóze. Podílí se zřejmě také na regulaci buněčné odpovědi na hypoxii (YILDIRIM et al. 2006)

PAK1– interaguje s Cdc 42, je aktivován RAC (DERMARDIROSSIAN et al. 2004) a podílí se na organizaci aktinového cytoskeletu a smrtící kaskádě NK buněk. Je aktivován růstovými faktory, tyrozinovými kinázami, G proteiny a estrogenem. U některých nádorů je overexprimován (LI et al. 2008). Je regulován signalizací přes PDGFR kaskádou RHO – PAK – cofilin – reguluje syntézu extracelulární matrix a migraci fibroblastů (DELORME et al. 2007).

WDR7 – členové této genové rodiny se účastní regulace BC, vstupu buněk do apoptózy, exprese a signální transdukce. Podílí se na regulaci Ca nezávislé exocytózy neurotransmiterů – tvoří B podjednotku komplex s RAB 3a, asociují se synaptickými vezikuly (Kawabe et al. 2003). Je to patrně periferní membránový protein. Nachází se na chromozomu 18 (SANDERS et al. 2000).

ARD1 – hraje roli v organizaci chromatinu. Má funkci N-acetyltransferázy (ARNESEN et al. 2006). Podílí se na regulaci hypoxie, kdy se aktivuje protein HIF, což vede k produkci VEGF, který stimuluje angiogenezi. ARD1 acetyluje HIF a reguluje jeho stabilitu,

pravděpodobně jej označuje k degradaci (CHOI et al. 2003). Za hypoxie je ARD1 suprimován. Patrně má také vliv na dělení neuronů, po jejich diferenciaci syntéza ARD1 klesá (SUGIURA et al. 2003).

ACK1 – kóduje tyrozin kinázu, jež se váže na protein Cdc42Hs vážící GTP a inhibuje jak jeho aktivitu, tak jeho GTPázovou aktivitu. Tuto vazbu zprostředkovává sekvence 47 aminokyselin v SH3 doméně. Hraje úlohu v přenosu signálu CDC42 do jádra. Účastní se také integrinové signalizace indukované extracelulární matrix.

PDGFRB – kóduje povrchový membránový tyrozin kinázový receptor. Funguje jako hetero- nebo homodimer složený z alfa a beta polypeptidů. Gen se nachází na chromozomu 5 v blízkosti genů granulocyte-macrophage colony-stimulating factor a macrophage-colony stimulating factor receptor, jejich delece vede ke vzniku syndromu 5q. Podílí se na translokaci s genem TEL na 12. chromozomu, což vede ke vzniku jedné z forem AML (GOLUB et al. 1994), bylo také identifikováno několik dalších fúzních partnerů u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (WALZ et al. 2007). Jakožto receptor pro růstový faktor je potenciálním okogenem (CHIARA et al. 2004), je proti němu vyvinuta i protilátková terapie s cílem znemožnit jeho aktivaci ligandem (SHEN et al. 2007).

CD40 – jedná se o důležitou signalizační molekulu, které se podílí na regulaci buněčného přežívání a modulaci imunitní odpovědi. Jeho aktivace vede k aktivaci komplexu NFκB a rychlé indukci antiapoptotického proteinu c-FLIP, působí tudíž antagonisticky k signalizaci přes CD95 (FAS). Zároveň se společně se svým ligandem CD154 podílí na aktivaci APC, signalizaci přes B receptor a aktivaci T lymfocytů.

### **3.4 Plán současné studie**

Cílem naší studie, která navazovala na předchozí výsledky laboratoře, bylo potvrdit či vyvrátit změny exprese vybraných genů pomocí kvantitativní RT-PCR. Exprese na úrovni mRNA byla testována na buněčné linii REH ve třech sériích vzorků. První série se skládala ze dvou triplikátů buněk A, B a C, kultivovaných za identických podmínek. Jeden triplikát byl kultivován s přidavkem 1mM VPA, druhý sloužil jako neovlivněná kontrola. Druhá a třetí série vzorků se sestávaly ze dvou multiplikátů o deseti vzorcích kultivovaných za

identických podmínek. Jedna desetivzorkové série byla kultivována s přidavkem 1 $\mu$ M VPA, druhá sloužila jako neovlivněná kontrola.

Pro porovnání množství mRNA každého genu v obou sériích vzorků byly použity housekeepingové geny ABL a Beta2 mikroglobulin. Naším cílem bylo zjistit, zda došlo u vzorků ovlivněných VPA ke zvýšení exprese jednotlivých genů v porovnání s kontrolou. Pro tvorbu standardní křivky byla využita cDNA, vytvořená reverzní transkripcí RNA izolované z nezávisle kultivovaných neovlivněných buněk linie REH ve čtyřech ředěních – neředěná cDNA, desetkrát, stokrát a tisíckrát ředěná v pufované vodě o pH 8,5.

## **4 Materiál a metody:**

### **4.1 Kultivace buněk**

K experimentům byla použita buněčná line REH, která je odvozena od B-prekurzorových leukemických buněk s translokací (12;21). Laskavě nám ji poskytl R. Pieters z Erasmus Medical Center v Rotterdamu. Kultivaci buněk jsme provedli společně s MUDr. Michalem Zápotockým. Buňky byly pěstovány v médiu 1640, obsahuje RPMI 1640, 2mM glutamin, 10% fetální sérum a 10ml/l antibiotický roztok (1000U/ml penicilinu, 100  $\mu$ g/ml streptomycinu). Kultivace probíhala při 37°C v 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Buňky byly sklizeny pomocí centrifugace při 240g po deset minut a resuspendovány v počtu 5 milionů buněk 24 hodin před experimentem. Při experimentu byly buňky kultivovány na 6jamičkových destičkách ve dvou sériích. První série byla kultivována s přidavkem 1mM VPA, druhá jako kontrola. V prvním experimentu byly kultivovány dva triplikáty, v dalších dvou experimentech dvě dvojice multiplikátů o deseti vzorcích.

Dále jsme kultivovali buňky B-prekurzorové linie NALM6, nesoucí fúzní gen TEL/PDGFRB. Kultivace těchto buněk probíhala za stejných podmínek jako u linie REH. Byly kultivovány dva desetivzorkové multiplikáty, jeden s přidavkem 1mM VPA, druhý jako neovlivněná kontrola.

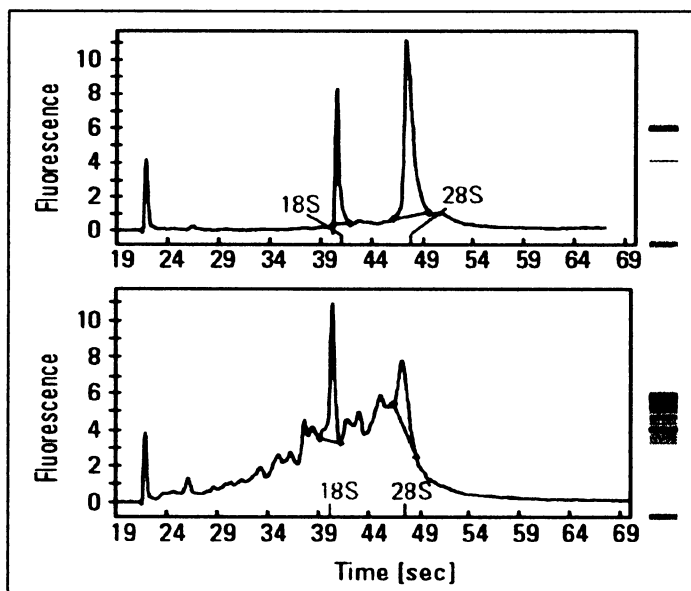
### **4.2 Izolace RNA a reverzní transkripce**

Extrakce celkové RNA z buněk byla provedena pomocí RNAeasy mini kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle manuálu výrobce. Metoda je založena na lýze pelety buněk lyzačním pufrům s přidavkem merkaptoetanolu, následné precipitaci RNA přidáním 70% etanolu. RNA je pak pomocí centrifugace při 10 000g zachycena na silikátové membráně

kolony. Membrána je poté promývána pufrý o různé iontové síle, aby se odstranily zbytky buněk a proteinů, součástí postupu je také použití DNázy, aby se odstranila případná kontaminace DNA. RNA je eluována z membrány vodou zbavenou RNáz a je poté skladována při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Kvalita RNA byla testována pomocí Agilentu (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Jeho základem je gelová elektroforéza na čipu dodaném výrobcem. K tekutému gelu je přidán marker, který vizualizuje frakce 18S a 28S rRNA. Pomocí Agilentu je možné zjistit, není-li RNA ve vzorku fragmentovaná, a to pomocí parametru RIN, který se pohybuje v rozmezí 0-10 bodů, 10 bodů odpovídá intaktní RNA, 0 bodů zcela fragmentované. Agilent zároveň umožňuje měření koncentrace RNA. Přepis do cDNA byl proveden pomocí iScript reverzní transkriptázy (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) podle manuálu výrobce. cDNA byla skladována při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Následující dvojice obrázků (obr. č. 6) ilustruje výstup Agilentu, horní obrázek ukazuje kvalitní, nefragmentovanou RNA, již představují dva peaky odpovídající 18S a 28S rRNA. Tyto dvě frakce jsou přístrojem převedeny do podoby gelu, jehož obrázek je vpravo. Dva pruhy odpovídají dvěma frakcím rRNA. Dolní obrázek představuje degradovanou RNA, což se na gelu projeví jako smír.

**Obr. 6**



*Na ose x je znázorněn čas v sekundách, na ose y je hodnota fluorescence.*



### 4.3 RT-PCR

Kvantitativní RT-PCR bylo provedeno na přístroji LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland) a iCyclerIQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a vyhodnocováno pomocí softwaru výrobce. Primery a sondy byly navrženy pomocí programu Vector NTI (Informax, Frederick, USA). Sekvence primerů a sond viz tabulka, primery se užívaly v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci, sonda ve 4  $\mu\text{M}$  koncentraci. PCR systémy byly optimalizovány na koncentraci  $\text{MgCl}_2$  a anelingovou teplotu, při optimalizaci byly použity 2mmol, 3mmol, 4mmol a 5mmol koncentrace  $\text{MgCl}_2$ . Pro PCR reakci byla použita polymeráza AmpliTaq Gold, 10x PCR Buffer II., 25mM roztok  $\text{MgCl}_2$ , dNTP (Applied Biosystems, Foster City, USA) a bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Pro měření genu ABL, CD40, ACK1, PDGFRB, ANTXR2, MGMT, WDR7 a ARD1 byly použity hydrolyzační sondy, pro měření genů PAK1 a HRMT1L1 bylo použito interkalární barvivo SYBR Green. Sondy byly značeny fluoroforem 6FAM. Všechny vzorky byly nasazovány v duplikátech, pětkrát ředěné kvůli úspoře materiálu.

Tabulka č. 2 obsahuje seznam a sekvence všech použitých sond a primerů použitých pro PCR reakce. Tabulka č. 3 shrnuje použité teplotní profily pro PCR reakce. Tabulka č. 3 shrnuje použité koncentrace  $\text{MgCl}_2$  pro každý PCR systém.

Primery byly navrhovány tak, aby vždy ležely na okrajích dvou sousedících exonů, nikoliv oba v jednom exonu. Tyto dva exony byly zvoleny tak, aby mezi nimi ležel pokud možno co nejdelší intron. Tento postup byl zvolen proto, aby nedocházelo amplifikaci genomické DNA, která by mohla kontaminovat vzorek díky nedokonalé izolaci RNA. Příklad jednoho z takto navržených systémů ukazuje obr. č. 7.

**Tab. č. 2**

Název	sekvence 5' - 3'	Délka (pb)
MGMT probe	6FAM – CACCgTTTgCgACTTgCCC	20
MGMT fw	GCCCCTAgAACgCTTTgC	18
MGMT rew	TtTCCATTTTTCCAAgTACCA	22
ARD1 probe	6FAM – AAgAggACCCAgATgATgTgCCCC	24
ARD1 fw	GCTgAggACgAgAATgggAA	20
ARD1 rew	AgCCAATgAggTgATATgTCCA	22
PAK1 fw	GACCgATTTACCgATCCATT	21
PAK1 rew	TgAAgggAgAgAAATCTCTggC	22
HRMT1L1 fw	GCTgCTgTgggTACATTCCg	20
HRMT1L1 rew	GTCTgCCAACATCTCCAAGTgg	22
WDR7 fw	ATCACTCTggCTCTgACCCTC	21
WDR7 rew	GtGCATAgCAgCTAACTgACTCC	23
WDR7 probe	CTgCTCCTgCTTTACATACCTgTTTCTTAgTAA	33
ACK1 proba	6FAM-CCGACCTCTGAGCGTGGAAGTGAAGxtp	25
ACK1 fw	CCGGACAGGATTGACGAACT	20
ACK1 rev	TCGCTCACAGGGTCATAGGTT	21
PDGFRB proba	6FAM-CACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATxtp	28
PDGFRB fw	CCCAGTGCCGAGTTAGAAGACT	22
PDGFRB rev	ACGTAGCCGCTCTCAACCA	19
CD40 probe	6FAM-CTCTggggCTgCTTgCTgAC	20
CD40 fw	CgCTATggTTCgTCTgCCTCT	21
CD40 rew	gCAgTgggTggTTCTgATg	20
ANTHR2 probe	6FAM-AgCggTTgAgTCTgTgAggAg	22
ANTHR2 fw	gCCAgTgCAgCgAgggAACT	20
ANTHR2 rew	gCTgCgATCCCGTTAgAACA	20
ABL proba	6FAM-CCATTTTggTTTgggCTTCACACCATT-TMR	28
ABL fw	TggAgATAACACTCTAAgCATAACTAAAggT	31
ABL rev	gATgTAgTTgCTTgggACCCA	21

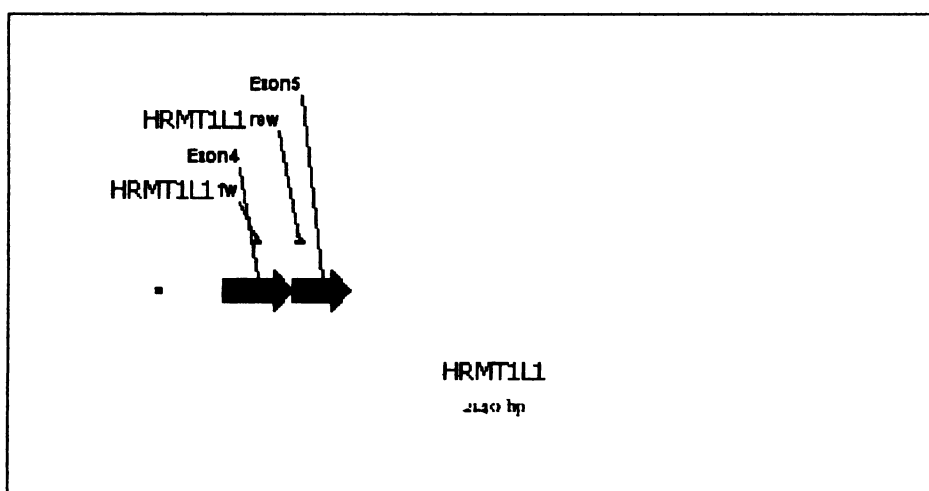
**Tab. č. 3**

System	predenaturace	Amplifikace	chlazení
ABL	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling a extenze 60°C 60s	40oC 15s
CD40	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 56°C 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
ANTXR2	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 56°C 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
MGMT	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 58°C 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
HRMT1L1	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 60°C 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
ARD1	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 58°C 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
WDR7	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 56°C 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
PAK1	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling 58 <sup>oC</sup> 20s a extenze 72°C 15s	40oC 15s
ACK1	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling a extenze 62°C 30s	40oC 15s
PDGFRB	95°C 10 min	45 cyklů denaturace 95°C 15s, aneling a extenze 60°C 30s	40oC 15s

**Tab. 4**

Systém	mmol MgCl <sub>2</sub>
MGMT	5
ARD1	5
CD40	3
ANTXR2	3
MGMT	5
WDR7	2
PDGFRB	5
ACK1	2
PAK1	4
ABL	2
HRMT1L1	3

**Obr. 7.**

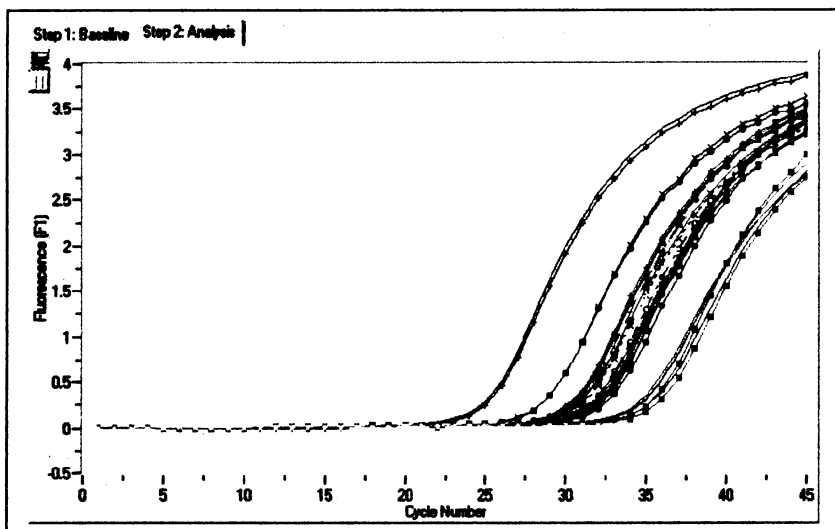


Žlutě je znázorněna DNA, zeleně jsou označené primery. Oranžové šipky představují exony. Dole je uvedena délka cDNA sekvence v párech bází.



Na obrázku 8 je ukázková standardní křivka společně s měřenými vzorky a vodou jako negativní kontrolou.

**Obr. 8**



Osa y představuje hodnotu fluorescence, na ose x jsou znázorněny cykly PCR reakce. Červená a zelená křivka s vyznačenými body představují ředící řadu, modrá křivka představuje vodu jako neg. kontrolu. Zbylé křivky představují vzorky.

#### 4.4 Statistické hodnocení

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí Mann-Whitney neparametrického testu pomocí programu StatView (SAS Intitute, Cary, North Carolina, USA).

### 5 Výsledky

#### 5.1 Optimalizace PCR systémů

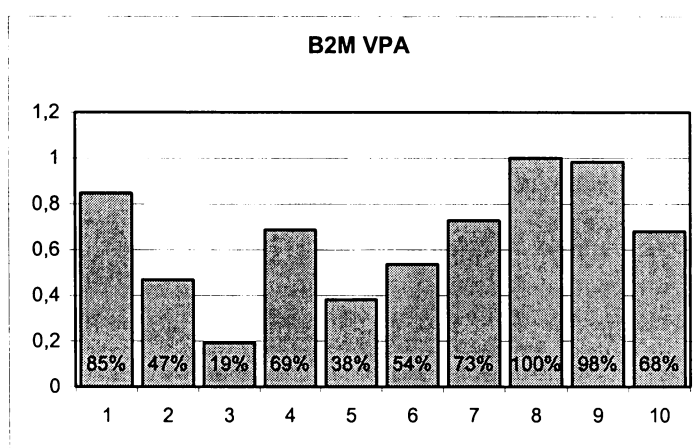
Prvním krokem byla optimalizace PCR systémů pro devět vybraných genů. Při optimalizaci byly testovány čtyři koncentrace  $MgCl_2$ , annealingová teplota byla optimalizována pomocí teplotního gradientu na přístroji iCyclerIQ, teplotní gradient měl rozsah  $54^{\circ}C$ - $62^{\circ}C$ . Systémy byly primárně navrženy s použitím hydrolyzační sondy, avšak u některých genů nebylo vhodné hydrolyzační sondu používat, neboť sekvence genů obsahovaly např. palindromy, nebo v důsledku vysokého obsahu AT párů by sonda musela být příliš dlouhá. V takovém případě jsem použil jako zdroj fluorescence interkalační

barvivo SYBR Green. Jeho výhodou je univerzálnost použití, ale nevýhodou nižší specifita, proto je nutné u každého pokusu dělat analýzu křivky tání, zda nedochází k tvorbě nespecifických produktů. Všechny optimalizace byly provedeny na cDNA ze zvlášť kultivovaných neovlivněných buněk linie REH.

## 5.2 Volba kontrolního genu

Druhým krokem byl výběr vhodného housekeepingového genu pro kvantitativní analýzu vzorků. Porovnali jsme stabilitu exprese dvou housekeepingových genů – B2mikroglobulinu a genu ABL. Využili jsme primery a teplotní profily PCR reakce používané rutinně v naší laboratoři. Porovnali jsme stabilitu jejich exprese na linii REH, nejprve na dvou triplikátech buněk – kontrolním a ovlivněném VPA pro oba geny. U obou genů se exprese lišila jak mezi triplikáty tak v rámci triplikátů, což mohlo být způsobeno náhodným výkyvem. Proto jsme se rozhodli použít větší počet vzorků, kultivovali jsme dva multiplikáty po deseti vzorcích buněk REH, jeden ovlivněný VPA, druhý neovlivněný. Opět byly změřeny hladiny obou genů u všech vzorků. V porovnání s genem ABL se ukázala exprese B2M méně stabilní. U ovlivněných vzorků při normalizaci na vzorek s nejvyšší hladinou exprese byl mezi nejvyšším a nejnižším vzorkem pětinašobný rozdíl (graf 1).

**Graf 1**



*Na ose x jsou uvedena čísla vzorků, na ose y je vyjádřen poměr hodnoty vzorku v porovnání s hodnotou nejvyššího vzorku, hodnota 1 odpovídá 100%.*

Z toho důvodu jsme se rozhodli použít jako referenční gen pro kvantitativní analýzu vybraných genů gen ABL.

### 5.3 Měření hladiny mRNA testovaných vzorků

Třetím krokem byla kvantifikace cDNA devíti vybraných genů na dvou multiplikátech REH (ovlivněný VPA a kontrolní) a dvou multiplikátech NALM6 (ovlivněný VPA a kontrolní), opět po 10 vzorcích. Hladiny exprese všech genů byly následně zprůměrovány a normalizovány na expresi genu ABL, změřenou na těchto vzorcích. Poté byl průměr ovlivněných a kontrolních vzorků porovnán a spočítán rozdíl mezi nimi, statistická významnost tohoto rozdílu byla vypočítána pomocí Mann-Whitney neparametrického testu. Pokud by došlo k signifikantnímu nárůstu exprese u VPA vzorků v porovnání s kontrolou, znamenalo by to, že takový gen je skutečně v leukemické buňce reprimován pomocí komplexu histon deacetyláz. Ze všech měření na linii REH nebyl do konečného průměru započítán vzorek 7, u kterého došlo k technické chybě.

Linie NALM6 nám sloužila jako jiný typ kontroly. Vzhledem k tomu, že nenese fúzní gen TEL/AML1, nemělo by u této linie účinkem VPA dojít k žádné signifikantní změně exprese. Pokud by však k takovému nárůstu došlo, znamenalo by to, že tento gen může být v leukemické buňce reprimován pomocí komplexu histon deacetyláz, avšak nikoliv prostřednictvím fúzního genu TEL/AML1, ale nějakého jiného mechanismu.

Výsledky byly počítány tak, že každý z duplikátů daného genu byl vydělen oběma duplikáty kontrolního genu ABL. Z těchto čtyř podílů byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka a z těchto deseti průměrů byl poté spočítán celkový průměr a celková směrodatná odchylka. Poté byl vydělen celkový průměr vzorků s VPA celkovým průměrem kontrolních vzorků, což udává poměr exprese daného genu v obou sériích vzorků.

## 5.4 Naměřené hodnoty exprese sledovaných genů

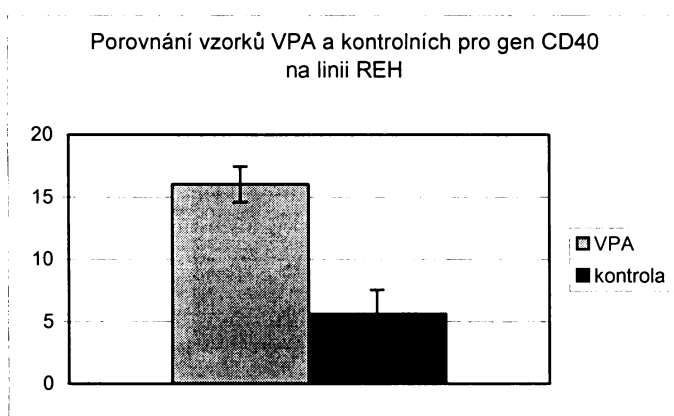
Gen CD40:

Na linii REH byl u genu CD40 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Hladina genu CD40 byla u buněk s VPA celkem 2,85krát vyšší než u kontroly (tab. 5, graf 2),  $p=0,0002$ .

**Tab. 5**

vzorek	ABL	ABL	CD40 a	CD40 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,162	0,167	14,692	0,345	16,029	1,421	2,857
2	0,011	0,011	0,171	0,161	15,300	0,466			
3	0,009	0,010	0,159	0,149	16,045	0,771			
4	0,010	0,010	0,174	0,159	16,861	0,765			
5	0,010	0,010	0,148	0,160	15,288	0,625			
6	0,009	0,010	0,157	0,156	16,724	0,256			
7	0,011	0,012	0,163	0,133	12,938	1,370			
8	0,005	0,006	0,096	0,095	17,541	0,451			
9	0,006	0,007	0,113	0,119	17,821	0,705			
10	0,007	0,007	0,128	0,120	17,080	0,551			
K1	0,010	0,009	0,037	0,037	3,914	0,201	5,610	1,936	
2	0,009	0,009	0,033	0,042	4,167	0,557			
3	0,008	0,010	0,036	0,039	4,110	0,507			
4	0,003	0,004	0,018	0,019	5,244	0,236			
5	0,005	0,005	0,023	0,026	4,473	0,290			
6	0,004	0,004	0,023	0,022	6,283	0,057			
7	0,000	0,000	0,006	0,003	9,158	3,060			
8	0,001	0,001	0,008	0,006	7,683	1,465			
9	0,007	0,006	0,038	0,037	5,504	0,286			
10	0,001	0,001	0,013	0,013	9,115	0,316			

**Graf 2**



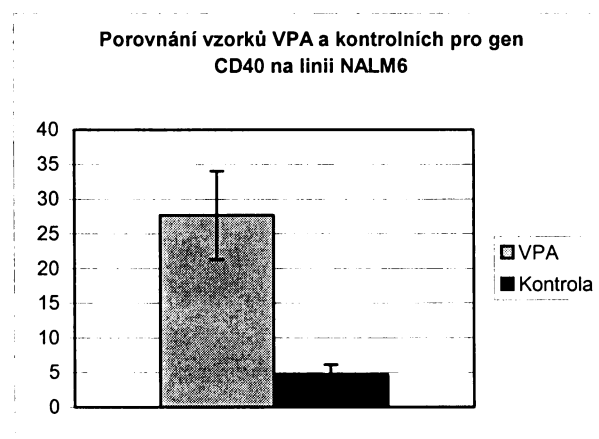
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 byl u genu CD40 také zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Hladina genu CD40 byla u buněk s VPA celkem 5,9krát vyšší než u kontroly (tab. 6, graf 3),  $p=0,002$ .

**Tab.6**

vzorek	ABL	ABL	CD40 a	CD40 b	průměr	Směrodatná odchylna	celkový průměr	Celková směrodatná odchylna	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,039	0,036	27,993	2,019	27,689	6,340	5,901
2	0,013	0,012	0,237	0,209	18,081	1,313			
3	0,009	0,010	0,255	0,299	28,948	2,416			
4	0,010	0,012	0,277	0,298	27,274	2,484			
5	0,012	0,011	0,276	0,265	23,955	0,801			
6	0,010	0,011	0,170	0,193	17,052	1,152			
7	0,009	0,009	0,245	0,280	29,219	2,407			
8	0,009	0,009	0,275	0,273	30,826	1,114			
9	0,007	0,007	0,246	0,259	35,443	0,986			
10	0,006	0,006	0,217	0,236	38,103	1,637			
K1	0,010	0,010	0,026	0,022	2,402	0,166	4,692	1,452	
2	0,004	0,004	0,015	0,020	4,489	0,755			
3	0,003	0,003	0,008	0,007	2,934	0,104			
4	0,005	0,005	0,023	0,025	4,995	0,166			
5	0,003	0,003	0,014	0,010	4,393	0,715			
6	0,008	0,009	0,031	0,037	4,094	0,460			
7	0,007	0,009	0,043	0,041	5,539	0,589			
8	0,008	0,008	0,032	0,032	4,021	0,242			
9	0,005	0,005	0,032	0,035	6,851	0,347			
10	0,004	0,004	0,032	0,025	7,206	0,939			

**Graf 3**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.



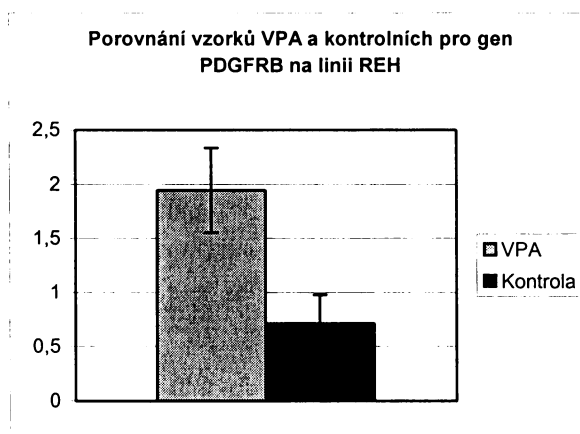
Gen PDGFRB:

Na linii REH byl u genu PDGFRB zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Hladina genu PDGFRB byla u buněk s VPA celkem 2,73krát vyšší než u kontroly (tab. 7, graf 4),  $p=0,0003$ .

**Tab. 7**

vzorek	ABL	ABL	PDGFRB a	PDGFRB b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,024	0,023	2,117	0,066	1,944	0,391	2,733
2	0,011	0,011	0,022	0,021	1,972	0,047			
3	0,009	0,010	0,017	0,000	0,865	0,866			
4	0,010	0,010	0,018	0,021	1,954	0,142			
5	0,010	0,010	0,018	0,020	1,911	0,088			
6	0,009	0,010	0,020	0,019	2,094	0,053			
7	0,011	0,012	0,020	0,023	1,858	0,155			
8	0,005	0,006	0,013	0,013	2,334	0,058			
9	0,006	0,007	0,015	0,016	2,327	0,110			
10	0,007	0,007	0,013	0,016	2,011	0,207			
K1	0,010	0,009	0,004	0,005	0,488	0,035	0,711	0,267	
2	0,009	0,009	0,004	0,005	0,518	0,062			
3	0,008	0,010	0,004	0,005	0,501	0,064			
4	0,003	0,004	0,002	0,002	0,540	0,015			
5	0,005	0,005	0,003	0,005	0,766	0,127			
6	0,004	0,004	0,002	0,002	0,696	0,003			
7	0,000	0,000	0,001	0,000	0,985	0,381			
8	0,001	0,001	0,001	0,001	0,777	0,147			
9	0,007	0,006	0,005	0,004	0,720	0,080			
10	0,001	0,001	0,002	0,002	1,398	0,187			

**Graf 4**



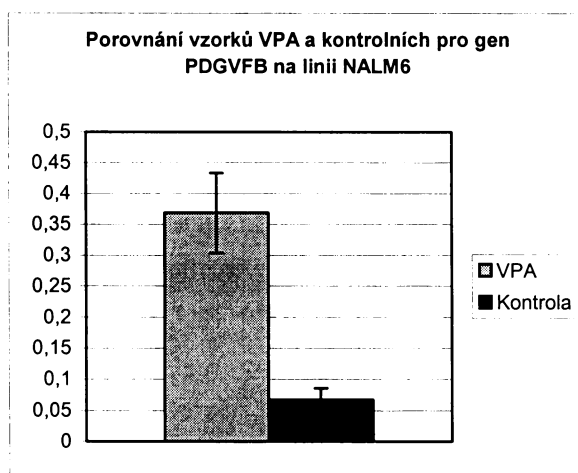
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 byl u genu PDGFRB také zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Hladina genu PDGFRB byla u buněk s VPA celkem 5,5krát vyšší než u kontroly (tab. 8, graf 5),  $p=0,002$ .

**Tab. 8**

vzorek	ABL	ABL	PDGFRB a	PDGFRB b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,000	0,001	0,381	0,030	0,369	0,065	5,457
2	0,013	0,012	0,003	0,004	0,283	0,033			
3	0,009	0,010	0,004	0,004	0,406	0,011			
4	0,010	0,012	0,004	0,003	0,354	0,061			
5	0,012	0,011	0,003	0,003	0,299	0,008			
6	0,010	0,011	0,003	0,003	0,270	0,028			
7	0,009	0,009	0,003	0,004	0,415	0,051			
8	0,009	0,009	0,004	0,003	0,364	0,066			
9	0,007	0,007	0,003	0,004	0,469	0,024			
10	0,006	0,006	0,003	0,003	0,447	0,014			
K1	0,010	0,010	0,001	0,000	0,053	0,003	0,068	0,018	
2	0,004	0,004	0,000	0,000	0,051	0,004			
3	0,003	0,003	0,000	0,000	0,090	0,019			
4	0,005	0,005	0,000	0,000	0,081	0,003			
5	0,003	0,003	0,000	0,000	0,046	0,008			
6	0,008	0,009	0,000	0,001	0,063	0,013			
7	0,007	0,009	0,001	0,001	0,083	0,014			
8	0,008	0,008	0,000	0,001	0,049	0,018			
9	0,005	0,005	0,000	0,000	0,100	0,004			
10	0,004	0,004	0,000	0,000	0,060	0,016			

**Graf 5**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

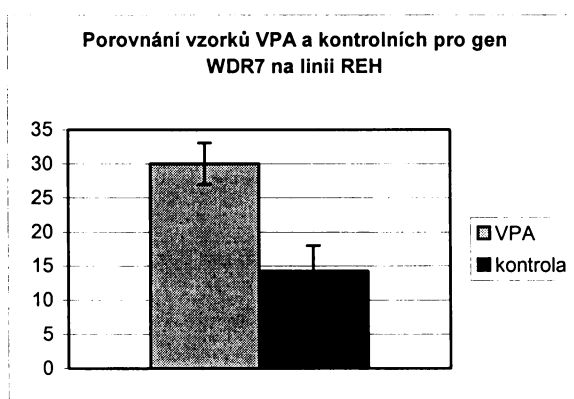
Gen WDR7:

Na linii REH byl u genu WDR7 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Hladina genu WDR7 byla u buněk s VPA celkem 2,1krát vyšší než u kontroly (tab. 9, graf 6),  $p=0,0002$ . Duplikát b kontrolního vzorku 10 byl poškozen.

**Tab. 9**

vzorek	ABL	ABL	WDR7 a	WDR7 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,349	0,334	30,501	0,863	30,032	3,079	2,103
2	0,011	0,011	0,290	0,295	26,959	0,262			
3	0,009	0,010	0,302	0,314	32,090	1,296			
4	0,010	0,010	0,303	0,307	30,887	0,266			
5	0,010	0,010	0,289	0,298	29,136	0,575			
6	0,009	0,010	0,268	0,285	29,547	1,010			
7	0,011	0,012	0,284	0,241	22,947	2,007			
8	0,005	0,006	0,162	0,183	31,700	2,084			
9	0,006	0,007	0,246	0,208	34,874	3,101			
10	0,007	0,007	0,232	0,228	31,680	0,275			
K1	0,010	0,009	0,097	0,099	10,392	0,547	14,277	3,706	
2	0,009	0,009	0,120	0,158	15,590	2,253			
3	0,008	0,010	0,142	0,116	14,196	2,207			
4	0,003	0,004	0,035	0,037	10,220	0,414			
5	0,005	0,005	0,074	0,071	13,473	0,296			
6	0,004	0,004	0,062	0,073	18,920	1,473			
7	0,000	0,000	0,004	0,003	7,331	0,616			
8	0,001	0,001	0,007	0,009	8,716	1,184			
9	0,007	0,006	0,122	0,141	19,402	1,715			
10	0,001	0,001	0,025	0	17,586	0,502			

**Graf 6**



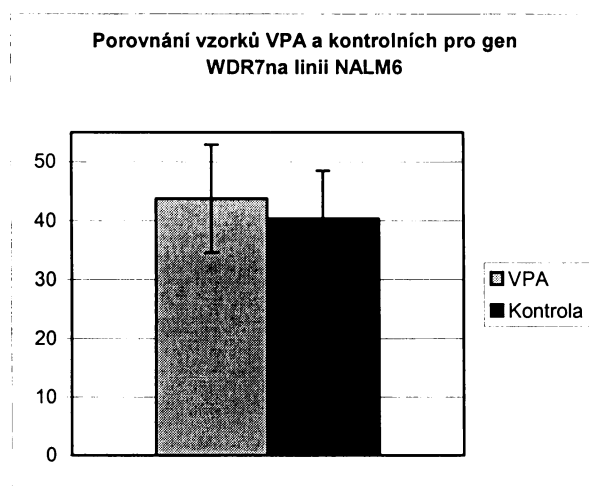
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 u genu WDR7 nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu WDR7 byla u buněk s VPA v porovnání s kontrolními 1,083 (tab. 10, graf 7),  $p=0,4497$ .

**Tab. 10**

vzorek	ABL	ABL	WDR7 a	WDR7 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,042	0,042	31,576	1,997	43,758	9,167	1,084
2	0,013	0,012	0,397	0,364	30,851	1,748			
3	0,009	0,010	0,373	0,442	42,587	3,768			
4	0,010	0,012	0,566	0,580	54,358	4,581			
5	0,012	0,011	0,479	0,504	43,526	1,600			
6	0,010	0,011	0,363	0,395	35,606	1,720			
7	0,009	0,009	0,416	0,424	46,750	2,302			
8	0,009	0,009	0,359	0,347	39,714	1,580			
9	0,007	0,007	0,367	0,413	54,743	3,280			
10	0,006	0,006	0,347	0,341	57,869	0,736			
K1	0,010	0,010	0,264	0,277	27,011	0,688	40,369	8,145	
2	0,004	0,004	0,143	0,147	38,066	3,171			
3	0,003	0,003	0,098	0,096	37,012	0,671			
4	0,005	0,005	0,237	0,246	50,162	1,096			
5	0,003	0,003	0,089	0,093	32,822	2,355			
6	0,008	0,009	0,291	0,306	35,786	2,596			
7	0,007	0,009	0,347	0,346	45,371	4,702			
8	0,008	0,008	0,277	0,280	34,938	2,105			
9	0,005	0,005	0,243	0,241	50,091	1,414			
10	0,004	0,004	0,199	0,215	52,432	2,353			

**Graf 7**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

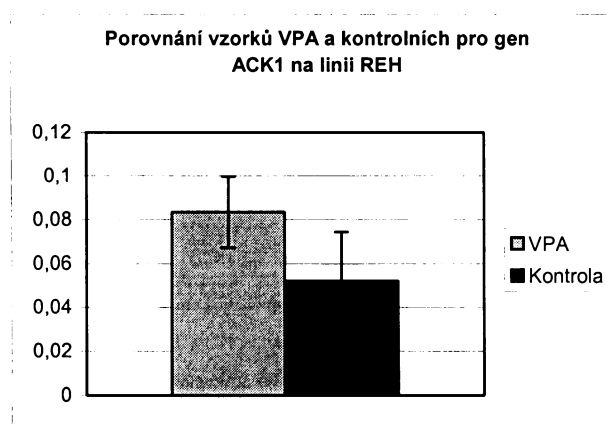
Gen ACK1:

Na linii REH byl u genu ACK1 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Hladina genu ACK1 byla u buněk s VPA celkem 1,59krát vyšší než u kontroly (tab. 11, graf 8),  $p=0,0043$ . U vzorků 7 a 8 kontroly došlo k technické chybě.

**Tab. 11**

vzorek	ABL	ABL	ACK1 a	ACK1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,001	0,001	0,097	0,026	0,083	0,016	1,599
2	0,011	0,011	0,001	0,001	0,092	0,004			
3	0,009	0,010	0,001	0,001	0,080	0,005			
4	0,010	0,010	0,001	0,001	0,097	0,004			
5	0,010	0,010	0,001	0,001	0,100	0,010			
6	0,009	0,010	0,001	0,001	0,107	0,015			
7	0,011	0,012	0,001	0,001	0,066	0,004			
8	0,005	0,006	0,000	0,000	0,064	0,004			
9	0,006	0,007	0,000	0,001	0,073	0,012			
10	0,007	0,007	0,000	0,000	0,059	0,001			
K1	0,010	0,009	0,001	0,001	0,066	0,009	0,052	0,022	
2	0,009	0,009	0,000	0,001	0,050	0,008			
3	0,008	0,010	0,000	0,001	0,052	0,015			
4	0,003	0,004	0,000	0,000	0,051	0,003			
5	0,005	0,005	0,000	0,000	0,058	0,013			
6	0,004	0,004	0,000	0,000	0,041	0,000			
7	0,000	0,000	0	0	0,000	0,000			
8	0,001	0,001	0	0	0,000	0,000			
9	0,007	0,006	0,001	0,001	0,087	0,004			
10	0,001	0,001	0,000	0,000	0,064	0,002			

**Graf 8**



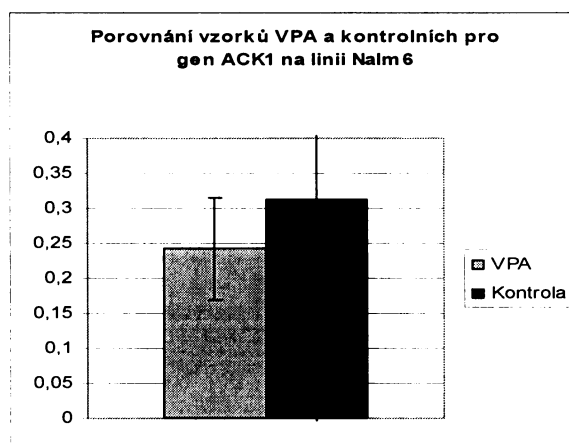
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 u genu ACK1 nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu ACK1 byl u buněk s VPA v porovnání s kontrolou 0,77 (tab. 12, graf 9),  $p=0,1988$ .

**Tab. 12**

vzorek	ABL	ABL	ACK1 a	ACK1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,00006	0,00006	0,047	0,003	0,243	0,072	0,777
2	0,013	0,012	0,003	0,003	0,266	0,019			
3	0,009	0,010	0,003	0,003	0,274	0,014			
4	0,010	0,012	0,003	0,003	0,309	0,029			
5	0,012	0,011	0,003	0,003	0,259	0,011			
6	0,010	0,011	0,003	0,003	0,310	0,010			
7	0,009	0,009	0,003	0,002	0,267	0,027			
8	0,009	0,009	0,002	0,002	0,201	0,018			
9	0,007	0,007	0,002	0,001	0,228	0,033			
10	0,006	0,006	0,002	0,002	0,264	0,004			
K1	0,010	0,010	0,002	0,003	0,249	0,029	0,312	0,355	
2	0,004	0,004	0,001	0,001	0,166	0,015			
3	0,003	0,003	0,000	0,000	0,116	0,045			
4	0,005	0,005	0,001	0,001	0,164	0,009			
5	0,003	0,003	0,000	0,000	0,108	0,008			
6	0,008	0,009	0,003	0,000	0,203	0,167			
7	0,007	0,009	0,002	0,002	0,239	0,042			
8	0,008	0,008	0,002	0,002	0,237	0,027			
9	0,005	0,005	0,001	0,001	0,274	0,015			
10	0,004	0,004	0,010	0,001	1,367	1,109			

**Graf 9**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

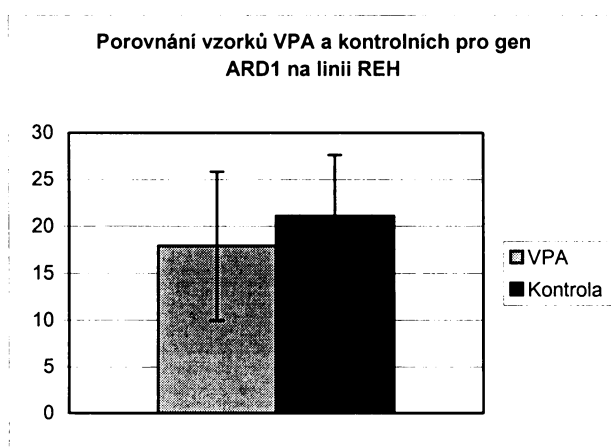
Gen ARD1:

Na linii REH nebyl u genu ARD1 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Poměr hladin genu ARD1 u vzorků s VPA a kontrolou byl 0,84 (tab. 13, graf 10),  $p=0,1914$ .

**Tab. 13**

vzorek	ABL	ABL	ARD1 a	ARD1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,114	0,107	9,869	0,359	17,921	7,924	0,848
2	0,011	0,011	0,130	0,110	11,060	0,923			
3	0,009	0,010	0,121	0,103	11,669	1,025			
4	0,010	0,010	0,142	0,134	13,975	0,412			
5	0,010	0,010	0,139	0,145	14,096	0,345			
6	0,009	0,010	0,133	0,219	18,808	4,604			
7	0,011	0,012	0,193	0,130	14,118	2,789			
8	0,005	0,006	0,184	0,171	32,619	1,443			
9	0,006	0,007	0,242	0,179	32,339	4,937			
10	0,007	0,007	0,157	0,143	20,661	0,964			
K1	0,010	0,009	0,132	0,123	13,506	0,841	21,125	6,493	
2	0,009	0,009	0,138	0,131	15,086	0,803			
3	0,008	0,010	0,167	0,165	18,267	2,154			
4	0,003	0,004	0,069	0,066	19,041	0,660			
5	0,005	0,005	0,112	0,117	21,206	0,503			
6	0,004	0,004	0,104	0,111	30,154	0,983			
7	0,000	0,000	0,006	0,005	10,862	0,616			
8	0,001	0,001	0,014	0,013	14,735	1,553			
9	0,007	0,006	0,162	0,185	25,599	2,139			
10	0,001	0,001	0,045	0,046	32,527	0,996			

**Graf 10**



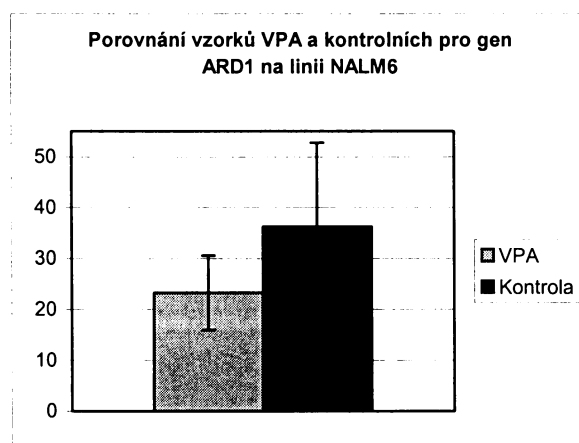
*Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.*

Na linii NALM6 u genu ARD1 nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu ARD1 mezi vzorky s VPA a kontrolou byl 0,641 (tab. 14, graf 11),  $p=0,0963$ . Duplikát b u kontrolního vzorku 3 byl poškozen.

**Tab. 14**

vzorek	ABL	ABL	ARD1 a	ARD1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,027	0,028	20,453	1,295	23,252	7,304	0,641
2	0,013	0,012	0,197	0,203	16,216	0,639			
3	0,009	0,010	0,192	0,190	19,961	0,521			
4	0,010	0,012	0,225	0,233	21,724	1,851			
5	0,012	0,011	0,236	0,228	20,545	0,650			
6	0,010	0,011	0,130	0,125	11,978	0,366			
7	0,009	0,009	0,220	0,210	23,931	1,283			
8	0,009	0,009	0,239	0,236	26,720	0,975			
9	0,007	0,007	0,229	0,236	32,635	0,599			
10	0,006	0,006	0,221	0,235	38,355	1,230			
K1	0,010	0,010	0,137	0,144	14,030	0,369	36,271	16,487	
2	0,004	0,004	0,164	0,155	41,873	3,638			
3	0,003	0,003	0,120	0	22,906	22,911			
4	0,005	0,005	0,265	0,038	31,437	23,611			
5	0,003	0,003	0,163	0,197	64,817	7,559			
6	0,008	0,009	0,149	0,160	18,522	1,423			
7	0,007	0,009	0,258	0,288	35,747	4,198			
8	0,008	0,008	0,201	0,179	23,836	1,989			
9	0,005	0,005	0,252	0,246	51,540	1,567			
10	0,004	0,004	0,233	0,225	58,005	1,665			

**Graf 11**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.



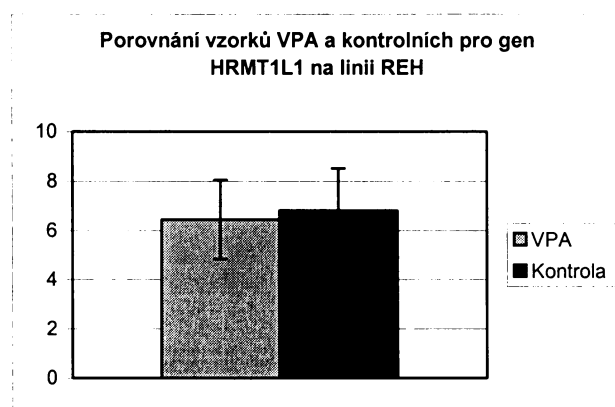
Gen HRMT1L1:

Na linii REH nebyl u genu HRMT1L1 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Poměr hladin genu HRMT1L1 u vzorků s VPA a kontrolou byl 0,945 (tab. 15, graf 12),  $p=0,5136$ .

Tab. 15

vzorek	ABL	ABL	HRMT1L1 a	HRMT1L1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,066	0,044	4,912	0,969	6,447	1,606	0,946
2	0,011	0,011	0,056	0,059	5,281	0,131			
3	0,009	0,010	0,046	0,043	4,647	0,234			
4	0,010	0,010	0,073	0,080	7,752	0,332			
5	0,010	0,010	0,051	0,052	5,127	0,078			
6	0,009	0,010	0,044	0,059	5,509	0,843			
7	0,011	0,012	0,070	0,067	5,966	0,213			
8	0,005	0,006	0,042	0,038	7,360	0,370			
9	0,006	0,007	0,059	0,066	9,602	0,596			
10	0,007	0,007	0,060	0,061	8,313	0,090			
K1	0,010	0,009	0,038	0,048	4,529	0,564	6,816	1,706	
2	0,009	0,009	0,053	0,044	5,473	0,556			
3	0,008	0,010	0,051	0,059	6,030	0,820			
4	0,003	0,004	0,020	0,019	5,499	0,156			
5	0,005	0,005	0,033	0,035	6,251	0,221			
6	0,004	0,004	0,034	0,033	9,299	0,127			
7	0,000	0,000	0,003	0,003	6,088	0,154			
8	0,001	0,001	0,006	0,006	6,188	0,575			
9	0,007	0,006	0,071	0,053	9,177	1,409			
10	0,001	0,001	0,013	0,012	8,900	0,725			

Graf 12



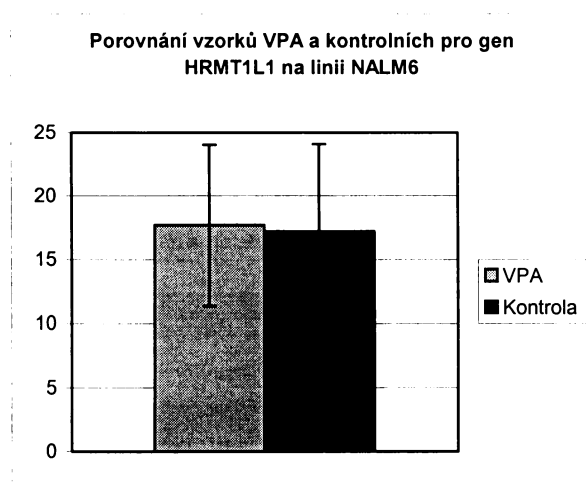
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 u genu HRMT1L1 nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu HRMT1L1 mezi vzorky s VPA a kontrolou byl 1,029 (tab. 16, graf 13),  $p=0,7624$ . Duplikát a u kontrolního vzorku 3 byl poškozen.

**Tab. 16**

vzorek	ABL	ABL	HRMT1L1 a	HRMT1L1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,008	0,008	5,957	0,389	17,707	6,331	1,029
2	0,013	0,012	0,133	0,131	10,702	0,398			
3	0,009	0,010	0,161	0,172	17,400	0,727			
4	0,010	0,012	0,206	0,233	20,823	2,160			
5	0,012	0,011	0,186	0,190	16,649	0,476			
6	0,010	0,011	0,116	0,120	11,086	0,321			
7	0,009	0,009	0,190	0,214	22,484	1,723			
8	0,009	0,009	0,174	0,194	20,701	1,350			
9	0,007	0,007	0,175	0,178	24,775	0,335			
10	0,006	0,006	0,158	0,157	26,495	0,259			
K1	0,010	0,010	0,090	0,095	9,202	0,276	17,201	6,869	
2	0,004	0,004	0,058	0,064	16,001	1,514			
3	0,003	0,003	0	0,028	5,402	5,403			
4	0,005	0,005	0,104	0,122	23,471	1,889			
5	0,003	0,003	0,039	0,031	12,621	1,758			
6	0,008	0,009	0,119	0,138	15,405	1,550			
7	0,007	0,009	0,169	0,165	21,867	2,281			
8	0,008	0,008	0,121	0,121	15,180	0,911			
9	0,005	0,005	0,158	0,116	28,357	4,420			
10	0,004	0,004	0,094	0,099	24,506	0,835			

**Graf 13**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

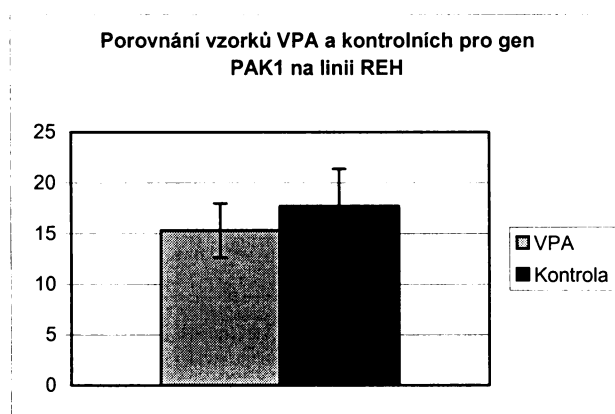
Gen PAK1:

Na linii REH nebyl u genu PAK1 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Poměr hladin genu PAK1 u vzorků s VPA a kontrolou byl 0,86 (tab. 17, graf 14),  $p=0,1651$ .

**Tab. 17**

vzorek	ABL	ABL	PAK1 a	PAK1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,119	0,123	10,807	0,263	15,322	2,686	0,863
2	0,011	0,011	0,148	0,126	12,627	1,016			
3	0,009	0,010	0,149	0,105	13,232	2,341			
4	0,010	0,010	0,155	0,147	15,292	0,414			
5	0,010	0,010	0,154	0,182	16,678	1,405			
6	0,009	0,010	0,133	0,137	14,426	0,304			
7	0,011	0,012	0,154	0,167	14,031	0,712			
8	0,005	0,006	0,094	0,120	19,636	2,466			
9	0,006	0,007	0,108	0,133	18,512	2,000			
10	0,007	0,007	0,120	0,141	17,975	1,446			
K1	0,010	0,009	0,130	0,108	12,606	1,334	17,750	3,624	
2	0,009	0,009	0,149	0,149	16,712	0,776			
3	0,008	0,010	0,136	0,144	15,406	1,867			
4	0,003	0,004	0,049	0,050	13,952	0,462			
5	0,005	0,005	0,083	0,084	15,483	0,161			
6	0,004	0,004	0,083	0,074	21,978	1,221			
7	0,000	0,000	0,008	0,008	15,965	0,483			
8	0,001	0,001	0,018	0,017	18,813	1,850			
9	0,007	0,006	0,143	0,143	21,099	1,071			
10	0,001	0,001	0,034	0,032	23,698	1,121			

**Graf 14**



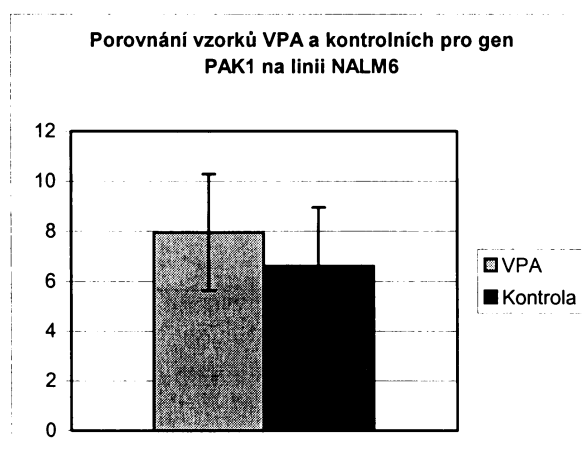
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 u genu PAK1 nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu PAK1 mezi vzorky s VPA a kontrolou byl 1,20 (tab. 18, graf 15),  $p=0,1988$ . U duplikátu b u kontrolního vzorku 5 došlo k technické chybě.

**Tab. 18**

vzorek	ABL	ABL	PAK1 a	PAK1 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,015	0,017	11,869	1,170	7,958	2,333	1,203
2	0,013	0,012	0,057	0,059	4,686	0,193			
3	0,009	0,010	0,060	0,077	7,159	0,948			
4	0,010	0,012	0,092	0,096	8,936	0,774			
5	0,012	0,011	0,074	0,076	6,629	0,208			
6	0,010	0,011	0,046	0,050	4,505	0,203			
7	0,009	0,009	0,066	0,070	7,563	0,404			
8	0,009	0,009	0,068	0,064	7,420	0,325			
9	0,007	0,007	0,070	0,071	9,833	0,121			
10	0,006	0,006	0,065	0,066	10,985	0,132			
K1	0,010	0,010	0,050	0,030	4,024	0,999	6,615	2,336	
2	0,004	0,004	0,020	0,022	5,447	0,556			
3	0,003	0,003	0,015	0,019	6,566	0,770			
4	0,005	0,005	0,046	0,045	9,368	0,164			
5	0,003	0,003	0,025	0	4,555	4,576			
6	0,008	0,009	0,042	0,033	4,490	0,637			
7	0,007	0,009	0,054	0,061	7,542	0,907			
8	0,008	0,008	0,044	0,031	4,667	0,887			
9	0,005	0,005	0,041	0,036	8,031	0,564			
10	0,004	0,004	0,044	0,046	11,462	0,373			

**Graf 15**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

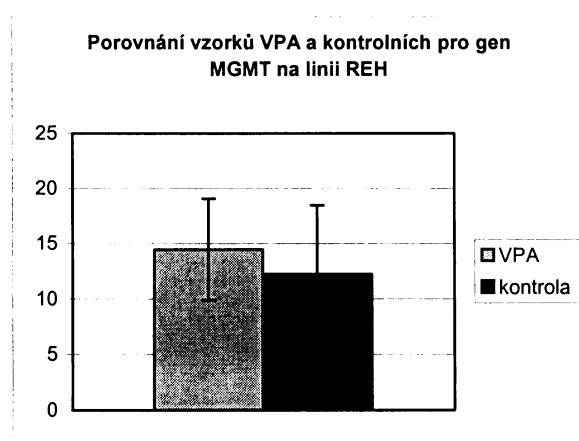
Gen MGMT:

Na linii REH nebyl u genu MGMT zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Poměr hladin genu MGMT u vzorků s VPA a kontrolou byl 1,184 (tab. 19, graf 16),  $p=0,2530$ .

**Tab. 19**

vzorek	ABL	ABL	MGMT a	MGMT b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,107	0,082	8,427	1,140	14,471	4,579	1,184
2	0,011	0,011	0,157	0,135	13,457	1,016			
3	0,009	0,010	0,115	0,112	11,825	0,447			
4	0,010	0,010	0,132	0,118	12,659	0,712			
5	0,010	0,010	0,135	0,143	13,799	0,432			
6	0,009	0,010	0,144	0,137	15,014	0,436			
7	0,011	0,012	0,119	0,124	10,621	0,391			
8	0,005	0,006	0,093	0,082	16,043	1,069			
9	0,006	0,007	0,166	0,176	26,271	1,099			
10	0,007	0,007	0,123	0,118	16,598	0,344			
K1	0,010	0,009	0,065	0,071	7,214	0,468	12,221	6,236	
2	0,009	0,009	0,093	0,076	9,472	1,005			
3	0,008	0,010	0,076	0,080	8,611	1,034			
4	0,003	0,004	0,050	0,054	14,758	0,703			
5	0,005	0,005	0,073	0,086	14,705	1,285			
6	0,004	0,004	0,047	0,046	13,100	0,086			
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,852	0,142			
8	0,001	0,001	0,003	0,003	2,985	0,311			
9	0,007	0,006	0,091	0,080	12,586	0,999			
10	0,001	0,001	0,039	0,035	26,557	1,715			

**Graf 16**



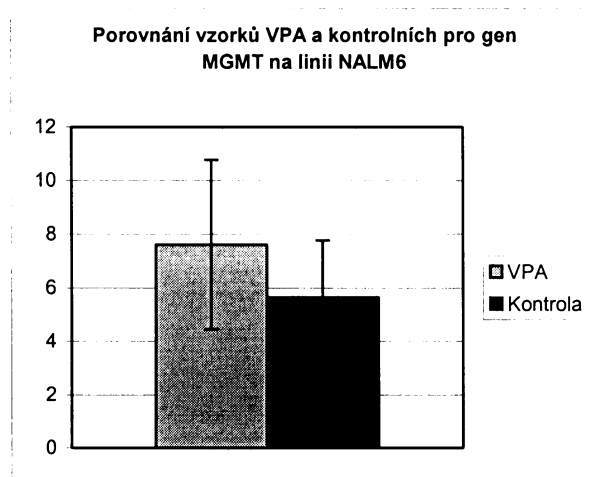
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 u genu MGMT nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu MGMT mezi vzorky s VPA a kontrolou byl 1,345 (tab. 20, graf 17),  $p=0,0963$ .

**Tab. 20**

vzorek	ABL	ABL	MGMT a	MGMT b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,001	0,001	0,002	0,002	1,284	0,110	7,611	3,161	1,345
2	0,013	0,012	0,069	0,058	5,173	0,492			
3	0,009	0,010	0,071	0,065	7,101	0,385			
4	0,010	0,012	0,098	0,114	10,070	1,124			
5	0,012	0,011	0,099	0,097	8,643	0,243			
6	0,010	0,011	0,050	0,048	4,608	0,124			
7	0,009	0,009	0,065	0,065	7,230	0,353			
8	0,009	0,009	0,077	0,080	8,860	0,353			
9	0,007	0,007	0,076	0,067	10,071	0,647			
10	0,006	0,006	0,076	0,080	13,071	0,326			
K1	0,010	0,010	0,026	0,027	2,636	0,073	5,657	2,121	
2	0,004	0,004	0,022	0,022	5,828	0,479			
3	0,003	0,003	0,012	0,009	4,001	0,508			
4	0,005	0,005	0,035	0,038	7,623	0,324			
5	0,003	0,003	0,011	0,012	4,015	0,338			
6	0,008	0,009	0,036	0,033	4,118	0,318			
7	0,007	0,009	0,044	0,045	5,866	0,613			
8	0,008	0,008	0,029	0,043	4,566	0,921			
9	0,005	0,005	0,049	0,045	9,708	0,461			
10	0,004	0,004	0,034	0,031	8,207	0,493			

**Graf 17**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

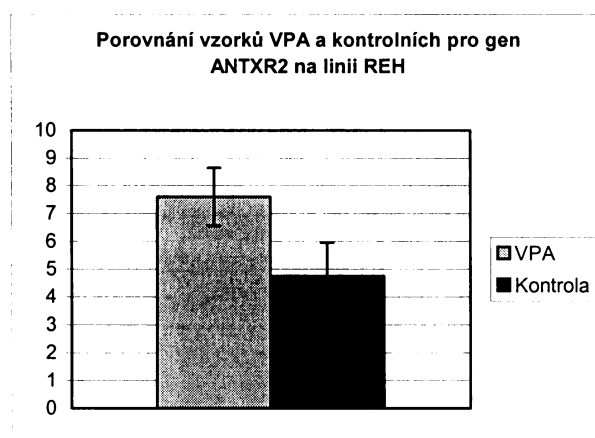
Gen ANTXR2:

Na linii REH byl u genu ANTXR2 zjištěn statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk ošetřených VPA v porovnání s kontrolou. Poměr hladin genu ANTXR2 u vzorků s VPA a kontrolou byl 1,59 (tab. 21, graf 18),  $p=0,0008$ .

**Tab. 21**

vzorek	ABL	ABL	ANTXR2 a	ANTXR2 b	průměr	Směrodatná odchylka	celkový průměr	Celková směrodatná odchylka	Celkový průměr VPA/K
V1	0,011	0,011	0,087	0,074	7,163	0,577	7,605	1,044	1,598
2	0,011	0,011	0,068	0,058	5,807	0,434			
3	0,009	0,010	0,068	0,069	7,127	0,262			
4	0,010	0,010	0,075	0,082	7,955	0,322			
5	0,010	0,010	0,067	0,092	7,877	1,220			
6	0,009	0,010	0,066	0,069	7,218	0,198			
7	0,011	0,012	0,067	0,075	6,224	0,391			
8	0,005	0,006	0,050	0,046	8,802	0,381			
9	0,006	0,007	0,061	0,057	9,010	0,403			
10	0,007	0,007	0,063	0,065	8,864	0,131			
K1	0,010	0,009	0,034	0,039	3,866	0,340	4,760	1,195	
2	0,009	0,009	0,037	0,038	4,195	0,210			
3	0,008	0,010	0,043	0,039	4,523	0,590			
4	0,003	0,004	0,014	0,011	3,520	0,560			
5	0,005	0,005	0,018	0,024	3,871	0,557			
6	0,004	0,004	0,015	0,016	4,334	0,070			
7	0,000	0,000	0,002	0,002	3,922	0,452			
8	0,001	0,001	0,004	0,005	4,736	0,917			
9	0,007	0,006	0,053	0,039	6,787	1,104			
10	0,001	0,001	0,012	0,008	7,009	1,441			

**Graf 18**



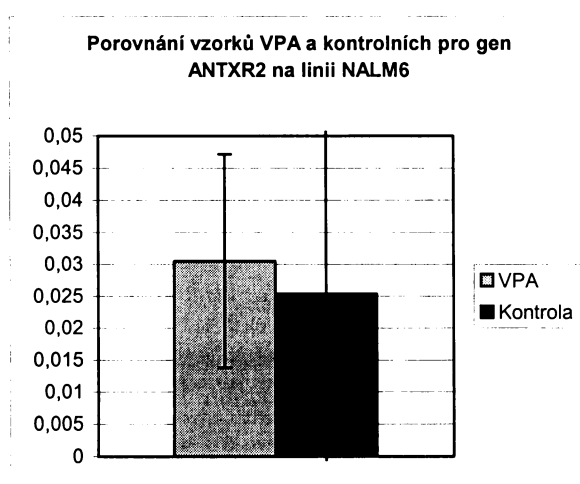
Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.

Na linii NALM6 u genu ANTXR2 nebyl zaznamenán statisticky signifikantní nárůst exprese u buněk s VPA oproti kontrole. Poměr hladin genu ANTXR2 mezi vzorky s VPA a kontrolou byl 1,20 (tab. 22, graf 19),  $p=0,029$ . Expres tohoto genu se však u této linie pohybovala na spodní hranici detekovatelnosti.

**Tab. 22**

vzorek	ABL	ABL	ANTXR2 a	ANTXR2 b	průměr	Směrodatná odchylna	celkový průměr	Celková směrodatná odchylna	Celkový průměr VPA/K
V1	0,0013	0,0014	0	0,0001	0,0377	0,0378	0,0305	0,0167	1,2027
2	0,0128	0,0119	0,0002	0,0004	0,0244	0,0065			
3	0,0093	0,0098	0,0004	0	0,0186	0,0186			
4	0,0097	0,0115	0,0004	0,0004	0,0389	0,0035			
5	0,0116	0,0110	0,0003	0,0002	0,0202	0,0041			
6	0,0104	0,0109	0	0	0,0000	0,0000			
7	0,0094	0,0086	0,0003	0,0008	0,0562	0,0277			
8	0,0092	0,0086	0,0005	0	0,0285	0,0286			
9	0,0071	0,0072	0,0005	0,0004	0,0574	0,0059			
10	0,0060	0,0059	0,0003	0	0,0232	0,0232			
K1	0,0099	0,0101	0	0	0,0000	0,0000	0,0254	0,0506	
2	0,0035	0,0042	0	0	0,0000	0,0000			
3	0,0027	0,0026	0,0009	0	0,1737	0,1737			
4	0,0049	0,0048	0	0,0003	0,0329	0,0329			
5	0,0030	0,0026	0	0	0,0000	0,0000			
6	0,0078	0,0090	0,0002	0	0,0141	0,0142			
7	0,0069	0,0085	0	0,0003	0,0179	0,0181			
8	0,0085	0,0075	0,0002	0	0,0151	0,0151			
9	0,0047	0,0050	0	0	0,0000	0,0000			
10	0,0040	0,0039	0	0	0,0000	0,0000			

**Graf 19**



Na ose y je znázorněna relativní hodnota fluorescence. Na ose x představuje levý sloupec vzorky ovlivněné VPA, pravý představuje kontrolní vzorky.



## 6 Diskuze

Na linii REH jsme pomocí RT-PCR kvantifikovali hladiny transkriptů devíti genů, abychom ověřili, zda dochází ke změně jejich exprese účinkem valproové kyseliny tak, jak naznačovala data z expresního profilování.

Abychom výsledky expresního profilování ověřili, vybrali jsme linii REH charakterizované genem TEL/AML1 jako kontrolu velmi blízkou linii NALM6. Linie NALM6 je stejně jako linie REH odvozena od B prekurzorové leukémie, ale zatímco linie REH obsahuje fúzní gen TEL/AML1, linie NALM6 nese chimérický gen TEL/PDGFRB. Tato translokace působí transformaci buněk jiným mechanismem než TEL/AML1. Produkt genu PDGFRB působí jako membránová tyrozinová kináza, je receptorem pro růstové faktory. Fúze s genem TEL má za následek nekontrolovatelnou stálou aktivaci tohoto receptoru (mechanismus analogický s translokací BCR/ABL). Z toho důvodu, pokud jsou námi vybrané geny skutečně specificky regulované fúzním genem TEL/AML1, nemělo by na linii NALM6 dojít k žádné změně jejich exprese účinkem VPA.

U genu CD40 došlo k nárůstu exprese u vzorků REH ovlivněných VPA, hladina jeho cDNA byla 2,58krát vyšší než u kontrolních vzorků. Tento nárůst je statisticky signifikantní a potvrdil nám výsledek, který nám poskytla čipová analýza – totiž, že gen CD40 je regulován mechanismem, který vyžaduje účast komplexu histon deacetyláz.

Avšak měření na linii NALM6 také ukázalo signifikantní nárůst exprese u vzorků ovlivněných VPA, a to dokonce více než dvojnásobný ve srovnání s linií REH – poměr ovlivněných a kontrolních vzorků je 5,9. Efekt HDACi tedy u tohoto genu není zcela specifický pro leukemii charakterizovanou TEL/AML1. Jeho „downregulaci“ nemůžeme vyloučit ani u buněk NALM6, přestože zde by musel být ovlivňován jinou cestou. Zajímavé je, že u solidních nádorů je někdy tento gen naopak overexprimován. U genu CD40 byla několika autory pozorována zvýšená exprese u několika typů solidních nádorů (ISHIKAWA et al. 2008, WU et al.2008). Podle HIRAI et al. (2004) má signalizace přes tento receptor antiapoptotické účinky na B lymfocyty. Signál přes CD40 vede k aktivaci komplexu NFκB a zvýšení exprese proteinu c-FLIP, který blokuje apoptózu indukovanou signalizací pomocí Fas/FasL. Je zablokována také apoptotická dráha TRAIL aktivací NFκB (TRAVERT et al.2008)

Avšak v případě leukémie odvozené od B lymfocytů je jeho úloha složitější. Protein CD40 je kostimulační molekulou, která se podílí na signalizaci mezi T a B lymfocytem při indukci imunitní odpovědi, jeho partnerem je CD154 na T lymfocytu.

Signalizace pouze přes B receptor leukemické buňky má za následek anergii T lymfocytu. Pokud se však signalizace účastní také protein CD40, došlo by k aktivaci T lymfocytu a stimulaci imunitní odpovědi proti leukémii. (MOLDENAUER et al. 2004)

Ke zvýšení exprese CD40 účinkem VPA došlo jak na linii REH, tak na linii NALM6. Obě tyto buněčné linie jsou odvozeny od B lymfocytárních leukemických buněk. Je možné, že represi transkripce genu CD40 nepůsobí specificky fúzní gen TEL/AML1, ale jedná se o obecnější mechanismus B leukémií, který slouží k potlačení specifické imunitní odpovědi, který je také založen na účinku histon deacetyláz. Zároveň je zjištěno, že VPA má za následek snížení exprese antiapoptotického proteinu c-FLIP, tím by jednak byl umožněn vznik imunitní odpovědi pomocí signalizace CD40 T lymfocytům, a zároveň by byl v B lymfocytech potlačen antiapoptotický účinek CD40. V současném stavu znalostí však nelze žádnou takovouto hypotézu potvrdit.

Gen PDGFRB: na linii REH byl u tohoto genu zjištěn signifikantní nárůst exprese u buněk ovlivněných VPA oproti kontrole, vzorky s VPA měly 2,73krát vyšší hladinu cDNA tohoto genu. Na linii NALM6 byl pozorován ještě výraznější nárůst – exprese ve vzorcích s VPA byla 5,4krát vyšší než u kontrol. Na linii REH se tím potvrdila data z čipové analýzy, ale v důsledku toho, že na linii NALM6 došlo také k nárůstu exprese, nemůžeme potvrdit hypotézu, že tento gen je specificky regulován genem TEL/AML1. Pravděpodobně se může jednat o nějaký obecnější mechanismus genové regulace využívající komplex histon deacetyláz.

Najít vysvětlení pro to, proč by měl být tento gen u leukémie reprimován, není při současných znalostech možný. Dosud publikované údaje ukazují, že naopak zvýšení exprese tohoto genu může mít pronádorový účinek. PDGFRB se také podílí na již výše zmíněné translokaci zodpovědné za vznik jednoho typu leukémie.

Gen WDR7: u tohoto genu došlo na linii REH k signifikantnímu nárůstu exprese, exprese u vzorků s VPA byla 2,1krát vyšší než u kontrol. To potvrdilo dřívější údaje z čipové analýzy, kde jeho exprese byla zvýšena. Na linii NALM6 však k žádnému nárůstu exprese u vzorků ovlivněných VPA nedošlo – vzájemný poměr byl 1,08. Tento gen by tudíž vyhovoval naší hypotéze, neboť na linii nesoucí fúzní gen TEL/AML1 došlo k nárůstu exprese WDR7 účinkem VPA, avšak na linii neobsahující tento fúzní gen k žádné změně jeho exprese nedošlo. Proto můžeme tvrdit, že gen WDR7 je specificky reprimován genem TEL/AML1.

Bohužel gen WDR7 je v současné době téměř neprostudován a jeho fyziologická funkce není známa. To z genu WDR7 dělá zajímavý cíl pro další biologické studie.

Gen ACK1: také u genu ACK1 došlo na linii REH k signifikantnímu nárůstu exprese, ačkoliv zde byl tento nárůst menší než u předchozích genů – byla pouze 1,6krát zvýšena. Tím se nám také potvrdila data získaná čipovou analýzou. Na linii NALM6 nedošlo k nárůstu exprese účinkem VPA, dokonce došlo k jejímu poklesu – poměr ovlivněných a kontrolních vzorků je pouze 0,77. I gen ACK1 by tudíž také vyhovoval naší hypotéze a je možné o něm prohlásit, že je specificky reprimován účinkem komplexu histon deacetyláz vázaným na fúzní protein Tel/Aml1.

Gen ACK1 kóduje cytoplazmatickou tyrozinovou kinázu, interagující s proteinem Cdc42, jež je zodpovědná za aktivaci malé GTPázy Rac a napomáhá tím buněčnému dělení. Je aktivovaná extracelulárními signály – prostřednictvím integrinů. Kromě své kinázové aktivity je také schopna regulovat stabilitu některých proteinů pomocí ubiquitinace a jejich následné degradace. MAHAJAN et al (2005) zjistili, že polyubiquitinací tumor supresoru Wwox je ACK1 zodpovědná za vznik rakoviny prostaty. Amplifikace genu ACK1 v tumorech zvyšuje jejich invazivitu a schopnosti metastazovat (VAN DER HORST et al. 2005). Tato zjištění by znamenala, že gen ACK1 má pronádorové účinky.

Gen ACK1 se však účastní i dalších procesů – jako například klathrin dependentní endocytózy. Jedním z proteinů, který je tímto způsobem odstraňován z membrány, je EGFR, receptor pro epidermální růstový faktor (GROVDAL et al. 2008). Také bylo zjištěno, že po endocytóze je prostřednictvím ubiquitinační aktivity proteinu ACK1 následně protein EGFR degradován v proteazomu (SHEN et al. 2007).

EGFR je membránová receptorová tyrozinová kináza, jejíž aktivace podporuje buněčnou proliferaci a má tak i pronádorové účinky, je zodpovědná zejména za vznik rakoviny plic, prsu, glioblastomy, astrocytomy, ale i hematologických onemocnění jako je mnohočetný myelom. V současné době probíhají klinické zkoušky inhibitorů signalizační kaskády EGFR (JOHNSTON et al. 2006, RUBIN a DUENSIG 2006, SHELTON et al. 2005). Buňky akutní leukémie odvozené od B lymfocytů vyžadují pro své přežití signály od stromálních buněk, kontakt se stromálními buňkami také může navodit chemorezistenci. Avšak aktivaci dráhy MEK prostřednictvím signálu EGFR dovoluje buňkám přežít i v nepřítomnosti stromálních buněk. (SPENGEMAN et al. 2005)

Z těchto údajů vyplývá, že gen ACK1 může mít v leukemických buňkách i antileukemický efekt, jelikož jeho overexprese může vést ke zvýšené endocytóze a degradaci EGFR, který je důležitý pro přežití leukemických blastů. Antileukemický efekt ACK1 tak může převážit jeho pronádorový účinek, který má jako tyrozinová kináza. I gen ACK1 je tedy vhodným cílem pro další zkoumání u dětských leukemií.

Gen ARD1: u tohoto genu nedošlo při PCR kvantifikaci k žádnému nárůstu exprese u buněk ovlivněných VPA, a to ani u linie REH ani u linie NALM6. V obou liniích došlo navíc de facto k poklesu hladiny transkriptu – u linie REH činil poměr mezi VPA ovlivněnými a neovlivněnými vzorky 0,84, u linie NALM6 to bylo dokonce pouze 0,64. Tento výsledek je v rozporu s výsledkem čipové analýzy, která zjistila zvýšení exprese tohoto genu.

Gen HRMT1L1: u genu HRMT1L1 nedošlo podle PCR analýzy ani u jedné linie k jakékoliv změně exprese, poměr VPA ovlivněných buněk a kontrolních buněk byl v obou případech téměř roven 1, u linie REH činil 0,945, u linie NALM6 1,02. Také u tohoto genu se nepotvrdila zjištění z čipové analýzy, podle které byla jeho exprese zvýšena.

Gen PAK1: u tohoto genu nebyl na linii REH pomocí PCR zjištěn nárůst exprese u buněk ovlivněných VPA, dokonce došlo k mírnému poklesu, poměr VPA a kontroly byl 0,86. Gen PAK1 tedy nevyhověl naší hypotéze, neboť se nám touto metodou nepotvrdil výsledek z čipové analýzy. Na linii NALM6 došlo k mírnému nárůstu exprese u ovlivněných vzorků, který však není signifikantní, hladina PAK1 byla pouze 1,2krát zvýšena.

Gen MGMT: u genu MGMT nebyl ani na jedné linii zjištěn pomocí PCR signifikantní nárůst exprese. Na linii REH byl poměr mezi ovlivněnými a kontrolními vzorky 1,18, na linii NALM6 byl tento poměr 1,34. U genu MGMT se nám nepotvrdila dřívější zjištění z čipové analýzy.

Gen ANTXR2: Gen ANTXR2 zaznamenal na linii REH signifikantní nárůst exprese účinkem VPA, byla přibližně 1,6krát vyšší než u kontrolních buněk. Na linii NALM6 k tak výraznému zvýšení exprese nedošlo, poměr mezi ovlivněnými vzorky a kontrolami byl 1,2, avšak i ten byl signifikantní. Takovýto výsledek nepotvrzuje naši hypotézu, že gen

ANTXR2 je specificky reprimován fúzním proteinem Tel/Aml1, avšak vypovídá o tom, že je přesto regulován mechanismem na bázi histon deacetyláz.

Interpretace výsledku však není tak jednoznačná. U vzorků linie NALM6 byl transkript genu ANTXR2 na hranici citlivosti PCR systému, tedy  $10^{-3}$ . Na této úrovni citlivosti systému qRT-PCR se tedy v podstatě nemůžeme vyjádřit ke změnám exprese po podání VPA v buňkách NALM6. Je však možné říci, že ani tento výsledek příliš neodpovídá čipové analýze. Změny exprese u buněk REH jsou relativně malé a je velmi nepravděpodobné, že by – třebaže v qRT-PCR experimentu je rozdíl před a po podání signifikantní – analýza expresního profilování odhalila tak malé zvýšení, resp. zařadila tento gen mezi vybrané.

Gen ANTXR2 je poměrně málo prozkoumán, byl popsán v souvislosti s účinkem antraxového toxinu, čemuž se věnuje převážná většina prací (YOUNG a COLLIER 2007, LIU et al. 2007). Další články jej dávají do souvislosti se vznikem infantilní systemické hyalinózy (LINDVALL et al. 2006, SHIEH et al. 2006) a juvenilní hyalinní fibromatózy (HAKKI et al. 2005). Pouze jedna práce popisuje jeho normální funkci v organismu (ROGERS et al. 2007).

U čtyř genů - MGMT, PAK1, HRMT1L1 a ARD1 – se nepotvrdila zjištění, která byla získána v čipové analýze - tedy že se po podání VPA významně mění exprese těchto genů v buněčné linii REH. Příčin, proč bylo dosaženo těchto protichůdných výsledků, může být několik.

Při čipové analýze byly použity vzorky linie REH, ale také patientské vzorky leukémií nesoucích fúzní gen TEL/AML1. Výsledné geny sice byly vybírány s ohledem na to, aby výsledek u buněčné linie a patientských vzorků byl co nejpodobnější, přesto zde vzniká určitá variabilita. Experimenty s VPA, provedené v naší laboratoři na AML u patientských vzorků, vykazují velkou variabilitu v expresi jednotlivých genů, ačkoliv experimenty na buněčné linii vykazovaly homogenní výsledky. Z toho je možné usuzovat, že vždy nemusí být reprimovány všechny geny současně, ale postačí pouze některé, což může být u každého pacienta individuální.

V případě buněčných linií je možné očekávat podobný efekt. Vzorky, na nichž jsem prováděl měření, pocházely z jiné pasáže buněčné linie než původní materiál použitý pro čipovou analýzu (původní materiál byl již zcela vyčerpán pro předchozí experimenty), a proto je možné, že se například proliferační stav buněk linie změnil a na to citlivě reagovala i exprese některých genů.

Další okolností, která mohla hrát v našem případě roli, je fakt, že v průběhu pasážování může docházet na buněčných liniích k dalším genetickým změnám. Jednou z pravidelně pozorovaných změn je také jejich dediferenciace. Naše hypotéza předpokládá, že vlivem VPA dojde k obnově exprese genů, které jsou podstatné pro diferenciaci (zástava diferenciaci je jednou z příčin vzniku leukémie). Pokud by však došlo k ještě hlubší dediferenciaci vlivem pasážování, je možné, že některé geny by nemusely být exprimovány, neboť by byla vypnuta i jejich přirozená aktivační dráha.

Účinek VPA na leukemické buňky může být založen i na jiném mechanismu než je změna v regulaci exprese genů. Jak již bylo výše zmíněno, VPA vyvolává v buňkách tvorbu ROS, což vede k jejich poškození a následné buněčné smrti. Toto působení je selektivní, neboť normální buňky mají k dispozici ochranné mechanismy proti ROS, které jsou u leukemických buněk neaktivní. U buněk REH byla při sledování buněčného cyklu pozorována velká frakce apoptotických buněk u vzorků s VPA. Proto je možné, že hlavní účinek VPA je právě v indukci apoptózy, a jeho aktivita jakožto HDACi je pouze „vedlejším efektem“, který nemá hlavní význam. Pokud je tudíž neselektivní, mohou se jeho účinky na konkrétní geny lišit vzorek od vzorku.

## 7 Souhrn

V této práci jsem se zabýval studiem akutní lymfoblastické leukémie, což je nejčastější a zároveň nejlépe prostudovaná malignita dětského věku. Ačkoliv v souhrnu dosahuje léčba úspěšnosti více než 80%, při podrobnějším pohledu je zřejmé, že jednotlivé subtypy onemocnění se mohou ve své prognóze a úspěšnosti vyléčení výrazně lišit. Dříve se pro stanovení prognózy považovaly za klíčové různé faktory jako věk pacienta, počet blastů při diagnóze, postupem času se však ukázalo, že některé tyto ukazatele mohou být pouze zástupné – ve skutečnost věk nemusí rozhodovat o pacientově prognóze, klíčové je, že v určitém věku se u pacientů dominantně vyskytují určité typy chromozomálních aberací – a právě typ aberace je jedním z nejvýznamnějších prognostických faktorů.

V této práci jsem se věnoval jedné z nejběžnějších chromozomálních aberací u B-prekurzorové leukémie dětských pacientů – translokaci mezi chromozomy 12 a 21, která dává vznik fúznímu genu TEL/AML1. V současné době nabývá na významu hledání léčby specifické pro určitý typ leukémie, v ideálním případě dokonce proti typu leukémie způsobené konkrétní genetickou poruchou. Současná chemoterapie je necílená a má často výrazné vedlejší účinky, včetně kardiotoxicity a vzniku sekundárních malignit. Pokud by bylo možné prozkoumat mechanismus působení jednotlivých aberací, byla by zde možnost vyvinout účinnou a především specifickou léčbu.

U fúzního genu TEL/AML1 se předpokládalo několik možných mechanismů, kterými by mohl vyvolat leukémii. Jako nejpravděpodobnější se v současné době jeví změna v regulaci transkripce genů důležitých pro maturaci B lymfocytů prostřednictvím fúzního proteinu v porovnání se samostatnými proteiny Tel a Aml1. Gen AML1 funguje jako pozitivní a negativní regulátor transkripce, gen TEL je pouze negativním regulátorem. Tato represní aktivita je uskutečňována vazbou komplexu histon deacetyláz pomocí dvou korepresorů NcoR a mSin3A. Ve fúzním proteinu si Aml1 zachovává svou DNA vazebnou aktivitu, ale ztrácí aktivitu aktivátoru transkripce, zatímco Tel si zachovává svou aktivitu represoru. Represe namísto aktivace u určitých genů by mohla být příčinou leukemogeneze. Účinkem inhibitorů histon deacetyláz by následně mělo dojít k obnově exprese.

Abychom dokázali tuto hypotézu, bylo nutné identifikovat geny, u nichž došlo na leukemické linii REH k nárůstu exprese účinkem VPA. K tomuto účelu nám sloužila čipová analýza hodnotící asi 30 000 genů. Na základě určitých kritérií bylo vybráno 21

genů, u nichž došlo k nejvyššímu nárůstu exprese. Z těchto genů jsem si poté vybral 9, u nichž jsem se pokusil ověřit tyto výsledky jinou kvantifikační metodou, pomocí RT-PCR.

Všechny tyto pokusy proběhly na buněčné linii REH. Leukemickou linii NALM6 jsem využil jako další negativní kontrolu, neboť nenese fúzní gen TEL/AML1, a tudíž by u ní nemělo docházet k represi genů jako u linie REH. Pokud by tedy u linie REH k nárůstu exprese určitého genu účinkem VPA došlo, avšak u line NALM6 nedošlo, znamenalo by to potvrzení naší hypotézy.

Geny WDR7 a ACK1 vyhověly naší hypotéze, neboť u nich byl na linii REH změřen signifikantní nárůst exprese, zatímco jejich hladina na linii NALM6 zůstala stejná. Zároveň se nám tak potvrdila zjištění z čipové analýzy. U genů CD40, ANTXR2 a PDGFRB se rovněž potvrdilo zjištění z čipové analýzy, neboť jejich exprese u line REH byla účinkem VPA rovněž zvýšena. Druhé části hypotézy však nevyhověly, neboť u linie NALM6 byl také zjištěn nárůst exprese. Dá se proto předpokládat, že kromě specifické represe genem TEL/AML1 existují i další nespécifické mechanismy, které leukemické buňky používají k omezení exprese některých genů. U zbylých čtyř genů MGMT, PAK1, HRMT1L1 a ARD1 pak nebyla potvrzena ani zjištění z čipové analýzy, neboť z nárůstu exprese nedošlo ani u jedné leukemické linie.

Ačkoliv měření u všech genů nepotvrdilo výsledky z čipové analýzy a naší hypotézu, můžeme tvrdit, že některé geny jsou specificky regulované fúzním proteinem Tel/Aml1 a podléhají vlivu valproové kyseliny. Podařilo se nám vytipovat menší skupinu genů, které reagují na léčbu VPA – tyto geny a jejich roli v leukemogenezi bude možno dále zkoumat. Cíle diplomové práce se tudíž podařilo splnit.



## 8 Seznam citované literatury

1. Afar D.E., Goga A., McLaughlin J., Witte O.N., Sawyers C.L. (1994): Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science*. 264: 424-6.
2. Afar D.E., McLaughlin J., Sherr C.J., Witte O.N., Roussel M.F. (1995): Signaling by ABL oncogenes through cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 9540-4.
3. Arnesen T., Gromyko D., Pendino F., Rynningen A., Varhaug J.E., Lillehaug J.R. (2006): Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Oncogene*. 25: 4350-60.
4. Aronheim A., Shiran R., Rosen A., Walker M.D. (1993): The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 8063-7.
5. Ayer D.E., Lawrence Q.A., Eisenman R.N. (1995): Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell*. 80: 767-76.
6. Blackwood E.M., Eisenman R.N. (1991): Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 251: 1211-7.
7. Boehm T., Feroni L., Kaneko Y., Perutz M.F., Rabbitts T.H. (1991): The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 4367-71.
8. Carroll A.J., Castleberry R.P., Crist W.M. (1987a): Lack of association between abnormalities of the chromosome 9 short arm and either "lymphomatous" features or T cell phenotype in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 69: 735-8.

9. Carroll A.J., Raimondi S.C., Williams D.L., Behm F.G., Borowitz M., Castleberry R.P., Harris M.B., Patterson R.B., Pullen D.J., Crist W.M. (1987b): t(9;12): a nonrandom chromosome abnormality in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 70: 1962-5.
10. Casorelli I., Russo M.T., Bignami M. (2008): Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem*. 8: 368-80.
11. Daser A., Rabbitts T.H. (2005): The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol*. 15: 175–188.
12. Deligezer U., Dalay N. (2007): Expression of the TRAIL receptors in blood mononuclear cells in leukemia. *Pathol Oncol Res*. 13: 290-4.
13. Delorme V., Machacek M., DerMardirossian C., Anderson K.L., Wittmann T., Hanein D., Waterman-Storer C., Danuser G., Bokoch G.M. (2007): Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. *Dev Cell*. 13: 646-62.
14. DerMardirossian C., Schnelzer A., Bokoch G.M. (2004): Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell*. 15: 117-27.
15. Erikson J., Finger L., Sun L., ar-Rushdi A., Nishikura K., Minowada J., Finan J., Emanuel B.S., Nowell P.C., Croce C.M. (1986): Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science*. 232: 884-6.
16. Erikson J., Nishikura K., ar-Rushdi A., Finan J., Emanuel B., Lenoir G., Nowell P.C., Croce C.M. (1983): Translocation of an immunoglobulin kappa locus to a region 3' of an unrearranged c-myc oncogene enhances c-myc transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80: 7581-5.
17. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., Wiens L., Lu H., Dong Z.M., Jordan C.D., Kiviat N.B., Vesselle H. (2008): DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17: 645-54.

18. Ganesh L., Yoshimoto T., Moorthy N.C., Akahata W., Boehm M., Nabel E.G., Nabel G.J. (2006): Protein methyltransferase 2 inhibits NF-kappaB function and promotes apoptosis. *Mol Cell Biol.* 26: 3864-74.
19. Gilham C., Peto J., Simpson J., Roman E., Eden T.O., Greaves M.F., Alexander F.E.; UKCCS Investigators. (2005): Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study. *BMJ.* 330: 1294.
20. Glaser K.B., Staver M.J., Waring J.F., Stender J., Ulrich R.G., Davidsen S.K. (2003): Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2: 151-163
21. Goga A., McLaughlin J., Afar D.E., Saffran D.C., Witte O.N. (1995): Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell.* 82: 981-8.
22. Golub T.R., Barker G.F., Lovett M., Gilliland D.G. (1994): Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell.* 77: 307-16.
23. Gottlicher M., Minucci S., Zhu P. (2001): Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J.* 20: 6969-6978
24. Grøvdal L.M., Johannessen L.E., Rødland M.S., Madshus I.H., Stang E. (2008): Dysregulation of Ack1 inhibits down-regulation of the EGF receptor. *Exp Cell Res.* 314: 1292-300.
25. Guidez F., Petrie K., Ford A.M. (2000): Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TELAML1 oncoprotein. *Blood.* 96: 2557-61.

26. Hakki S.S., Ataoglu T., Avunduk M.C., Erdemli E., Gunhan O., Rahman N. (2005): Periodontal treatment of two siblings with juvenile hyaline fibromatosis. *J Clin Periodontol.* 32: 1016-21.
27. Hideshima T., Bradner J.E., Wong J., Chauhan D., Richardson P., Schreiber S.L., Anderson K.C. (2005): Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 8567-72.
28. Hirai H., Adachi T., Tsubata T. (2004): Involvement of cell cycle progression in survival signaling through CD40 in the B-lymphocyte line WEHI-231. *Cell Death Differ.* 11: 261-9.
29. Choi K.S., Bae M.K., Jeong J.W., Moon H.E., Kim K.W. (2003): Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 36: 120-7.
30. Inaba T., Roberts W.M., Shapiro L.H., Jolly K.W., Raimondi S.C., Smith S.D., Look A.T. (1992): Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science.* 257: 531-4.
31. Inukai T., Inoue A., Kurosawa H., Goi K., Shinjyo T., Ozawa K., Mao M., Inaba T., Look A.T. (1999): SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell.* 4: 343-52.
32. Ishikawa K., Miyamoto M., Yoshioka T., Kato T., Kaji M., Ohbuchi T., Hirano S., Itoh T., Dosaka-Akita H., Kondo S. (2008): Up-regulation of CD40 with juxtacrine activity in human nonsmall lung cancer cells correlates with poor prognosis. *Cancer.* 113: 530-41.
33. Johnston J.B., Navaratnam S., Pitz M.W., Maniate J.M., Wiechec E., Baust H., Gingerich J., Skliris G.P., Murphy L.C., Los M. (2006): Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. *Curr Med Chem.* 13: 3483-92.

34. Kawabe H., Sakisaka T., Yasumi M., Shingai T., Izumi G., Nagano F., Deguchi-Tawarada M., Takeuchi M., Nakanishi H., Takai Y. (2003): A novel rabconnectin-3-binding protein that directly binds a GDP/GTP exchange protein for Rab3A small G protein implicated in Ca(2+)-dependent exocytosis of neurotransmitter. *Genes Cells*. 8: 537-46.
35. Kennedy M.A., Gonzalez-Sarmiento R., Kees U.R., Lampert F., Dear N., Boehm T., Rabbitts T.H. (1991): HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 8900-4.
36. Kim C.A., Phillips M.L., Kim W., Gingery M., Tran H.H., Robinson M.A., Faham S., Bowie J.U. (2001): Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J*. 20: 4173-82.
37. Lagneaux L., Gillet N., Stamatopoulos B., Delforge A., Dejeneffe M., Massy M., Meuleman N., Kentos A., Martiat P., Willems L., Bron D. (2007): Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Exp Hematol*. 35: 1527-37.
38. Lange B.J., Raimondi S.C., Heerema N., Nowell P.C., Minowada J., Steinherz P.E., Arenson E.B., O'Connor R., Santoli D. (1992): Pediatric leukemia/lymphoma with t(8;14)(q24;q11). *Leukemia*. 6: 613-8.
39. Li Q., Mullins S.R., Sloane B.F., Mattingly R.R. (2008): p21-Activated kinase 1 coordinates aberrant cell survival and pericellular proteolysis in a three-dimensional culture model for premalignant progression of human breast cancer. *Neoplasia*. 10: 314-29.
40. Lindvall L.E., Kormeili T., Chen E., Ramirez M.C., Grum-Tokars V., Glucksman M.J., Martignetti J.A., Zaragoza M.V., Dyson S.W. (2008): Infantile systemic hyalinosis: Case report and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 58: 303-7.
41. Liu S., Leung H.J., Leppla S.H. (2007): Characterization of the interaction between anthrax toxin and its cellular receptors. *Cell Microbiol*. 9: 977-87.

42. Lopez R.G., Carron C., Oury C., Gardellin P., Bernard O., Ghysdael J. (1999): TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *JBiol Chem.* 274: 30132-8.
43. Lu M., Dubé I., Raimondi S., Carroll A., Zhao Y., Minden M., Sutherland P. (1990): Molecular characterization of the t(10;14) translocation breakpoints in T-cell acute lymphoblastic leukemia: further evidence for illegitimate physiological recombination. *Genes Chromosomes Cancer.* 2: 217-22.
44. Lu Q., Wright D.D., Kamps M.P. (1994): Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the t(1;19) translocation. *Mol Cell Biol.* 14: 3938-48.
45. Lutterbach B., Westendorf J.J., Linggi B., Isaac S., Seto E., Hiebert S.W. (2000): A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem.* 275: 651-6.
46. Mahajan N.P., Whang Y.E., Mohler J.L., Earp H.S. (2005): Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Res.* 65: 10514-23
47. Martin P.L., Look A.T., Schnell S., Harris M.B., Pullen J., Shuster J.J., Carroll A.J., Pettenati M.J., Rao P.N. (1996): Comparison of fluorescence in situ hybridization, cytogenetic analysis, and DNA index analysis to detect chromosomes 4 and 10 aneuploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 18: 113-21.
48. McKinney P.A., Okasha M., Parslow R.C., Law G.R., Gurney K.A., Williams R., Bodansky H.J. (2000): Early social mixing and childhood Type 1 diabetes mellitus: a case-control study in Yorkshire, UK. *Diabet Med.* 17: 236-42.
49. Moldenhauer A., Frank R.C., Pinilla-Ibarz J., Holland G., Boccuni P., Scheinberg D.A., Salama A., Seeger K., Moore M.A., Nimer S.D. (2004): Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol.* 76: 623-33.

50. Morrow M., Horton S., Kioussis D., Brady H.J., Williams O. (2004): TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood*. 103: 3890-6.
51. Moscow J.A., Gong M., He R., Sgagias M.K., Dixon K.H., Anzick S.L., Meltzer P.S., Cowan K.H. (1995): Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res*. 55: 3790-4.
52. Nagayama J., Tomizawa D., Koh K., Nagatoshi Y., Hotta N., Kishimoto T., Takahashi Y., Kuno T., Sugita K., Sato T., Kato K., Ogawa A., Nakahata T., Mizutani S., Horibe K., Ishii E. (2006): Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood*. 107: 4663-5.
53. Nakata S., Yoshida T., Horinaka M., Shiraishi T., Wakada M., Sakai T. (2004): Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene*. 23: 6261-71.
54. Peart M.J., Smyth G.K., van Laar R.K. (2005): Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 3697-3702
55. Pedersen-Bjergaard J., Andersen M.K., Johansson B. (1998): Balanced chromosome aberrations in leukemias following chemotherapy with DNA-topoisomerase II inhibitors. *J Clin Oncol*. 16: 1897-1898.
56. Pegg A.E. (2000): Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res*. 462: 83-100.

57. Pietenpol J.A., Bohlander S.K., Sato Y., Papadopoulos N., Liu B., Friedman C., Trask B.J., Roberts J.M., Kinzler K.W., Rowley J.D. (1995): Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res.* 55: 1206-10.
58. Rahmani M., Reese E., Dai Y., Bauer C., Kramer L.B., Huang M., Jove R., Dent P., Grant S. (2005): Cotreatment with suberanoylanilide hydroxamic acid and 17-allylamino 17-demethoxygeldanamycin synergistically induces apoptosis in Bcr-Abl<sup>+</sup> Cells sensitive and resistant to STI571 (imatinib mesylate) in association with down-regulation of Bcr-Abl, abrogation of signal transducer and activator of transcription 5 activity, and Bax conformational change. *Mol Pharmacol.* 67: 1166-76.
59. Raimondi S.C., Pui C.H., Behm F.G., Williams D.L. (1987): 7q32-q36 translocations in childhood T cell leukemia: cytogenetic evidence for involvement of the T cell receptor beta-chain gene. *Blood.* 69: 131-4.
60. Raimondi S.C., Pui C.H., Hancock M.L., Behm F.G., Filatov L., Rivera G.K. (1996): Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 10: 213-24.
61. Raimondi S.C., Williams D.L., Callihan T., Peiper S., Rivera G.K., Murphy S.B. (1986): Nonrandom involvement of the 12p12 breakpoint in chromosome abnormalities of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 68: 69-75.
62. Rogers M.S., Christensen K.A., Birsner A.E., Short S.M., Wigelsworth D.J., Collier R.J., D'Amato R.J. (2007): Mutant anthrax toxin B moiety (protective antigen) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 67: 9980-5.
63. Rubin B.P., Duensing A. (2006): Mechanisms of resistance to small molecule kinase inhibition in the treatment of solid tumors. *Lab Invest.* 86: 981-6.
64. Rubnitz J.E., Camitta B.M., Mahmoud H., Raimondi S.C., Carroll A.J., Borowitz M.J., Shuster J.J., Link M.P., Pullen D.J., Downing J.R., Behm F.G., Pui C.H. (1999): Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. *J Clin Oncol.* 17: 191-196.



65. Sanders S., Keck-Waggoner C.L., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Thorgeirsson S.S. (2000): Assignment of WDR7 (alias TRAG, TGF-beta resistance associated gene) to orthologous regions of human chromosome 18q21.1-->q22 and mouse chromosome 18D.1-E.3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 88: 324-5.
66. Shelton J.G., Steelman L.S., Abrams S.L., Bertrand F.E., Franklin R.A., McMahon M., McCubrey J.A. (2005): The epidermal growth factor receptor gene family as a target for therapeutic intervention in numerous cancers: what's genetics got to do with it? *Expert Opin Ther Targets.* 9: 1009-30.
67. Shen F., Lin Q., Gu Y., Childress C., Yang W. (2007) Activated Cdc42-associated kinase 1 is a component of EGF receptor signaling complex and regulates EGF receptor degradation. *Mol Biol Cell.* 18: 732-42.
68. Shieh J.T., Swidler P., Martignetti J.A., Ramirez M.C., Balboni I., Kaplan J., Kennedy J., Abdul-Rahman O., Enns G.M., Sandborg C., Slavotinek A., Hoyme H.E. (2006): Systemic hyalinosis: a distinctive early childhood-onset disorder characterized by mutations in the anthrax toxin receptor 2 gene (ANTRX2). *Pediatrics.* 118: e1485-92.
69. Shuai K., Halpern J., ten Hoeve J., Rao X., Sawyers C.L. (1996): Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene.* 13: 247-54.
70. Siddiqui H., Solomon D.A., Gunawardena R.W., Wang Y., Knudsen E.S. (2003): Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition. *Mol Cell Biol.* 23: 7719-31.
71. Smith M.A., Rubinstein L., Ungerleider R.S. (1994): Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins: estimating the risks. *Medical & Pediatric Oncology.* 23: 86-98.

72. Spengeman J.D., Green T.D., McCubrey J.A., Bertrand F.E. (2005): Activated EGFR promotes the survival of B-lineage acute leukemia in the absence of stromal cells. *Cell Cycle*. 4: 483-7.
73. Starkova J., Madzo J., Cario G., Kalina T., Ford A., Taliová M., Hrušák O., Trka J. (2007): The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 13: 1726-35.
74. Sugiura N., Adams S.M., Corriveau R.A. (2003): An evolutionarily conserved N-terminal acetyltransferase complex associated with neuronal development. *J Biol Chem*. 278: 40113-20.
75. Travert M., Ame-Thomas P., Pangault C., Morizot A., Micheau O., Semana G., Lamy T., Fest T., Tarte K., Guillaudeux T. (2008): CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *J Immunol*. 181: 1001-11.
76. Trujillo J.M., Cork A., Ahearn M.J., Youness E.L., McCredie K.B. (1979): Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia. *Blood*. 53: 695-706.
77. Ungerstedt J.S., Sowa Y., Xu W.S. (2005): Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 673-678
78. van der Horst E.H., Degenhardt Y.Y., Strelow A., Slavin A., Chinn L., Orf J., Rong M., Li S., See L.H., Nguyen K.Q., Hoey T., Wesche H., Powers S. (2005): Metastatic properties and genomic amplification of the tyrosine kinase gene ACK1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2102: 15901-6.
79. Williams D.L., Tsiatis A., Brodeur G.M., Look A.T., Melvin S.L., Bowman W.P., Kalwinsky D.K., Rivera G., Dahl G.V. (1982): Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 60: 864-71.

80. Wu Y., Wang L., He X., Xu H., Zhou L., Zhao F., Zhang Y. Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in colon cancer ex vivo. (2008): *Cell Immunol.*
81. Yildirim A.O., Bulau P., Zakrzewicz D., Kitowska K.E., Weissmann N., Grimminger F., Morty R.E., Eickelberg O. (2006): Increased protein arginine methylation in chronic hypoxia: role of protein arginine methyltransferases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 35: 436-43.
82. Yoshimoto T., Boehm M., Olive M., Crook M.F., San H., Langenickel T., Nabel E.G. (2006): The arginine methyltransferase PRMT2 binds RB and regulates E2F function. *Exp Cell Res.* 312: 2040-53.
83. Young J.A., Collier R.J. (2007): Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem.* 76: 243-65.