

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Mgr. Karolina Kramarzová**

Role genu *WT1* a jeho izoforem v hematopoéze a leukemogenezi

The role of *WT1* and its isoforms in normal hematopoiesis  
and leukemogenesis

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Ludmila Boublíková, Ph.D.

Praha, 2013

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s využíváním práce ke studijním účelům a jejím citováním dle platných norem. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 19. 07. 2013

KAROLINA KRAMARZOVÁ

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za odborné vedení a přátelský přístup v průběhu celého postgraduálního studia. Poděkování patří také MUDr. Ludmile Boublíkové, Ph.D. za cenné rady, stoický klid a nadhled při řešení projektu. Dále děkuji všem svým kolegům z pracovní skupiny CLIP za příjemnou atmosféru v týmu a neocenitelnou zpětnou vazbu. Prof. MUDr. Janu Starému, DrSc. děkuji za dlouhotrvající podporu laboratorního výzkumu v LMG CLIP. Velký dík patří také mému snoubenci Lukáši Škvárovi a celé mé rodině za podporu a trpělivost v průběhu studia.

## **Identifikační záznam**

KRAMARZOVÁ, Karolina. *Role genu WT1 a jeho izoformem v hematopoéze a leukemogenezi [The role of WT1 gene and its isoforms in normal hematopoiesis and leukemogenesis]*. Praha, 2013. 106 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Vedoucí závěrečné práce Trka, Jan.

**Klíčová slova:** *akutní myeloidní leukémie (AML), myelodysplastický syndrom (MDS), gen Wilmsova tumoru 1 (WT1), izoformy, minimální reziduální nemoc (MRN)*

**Keywords:** *acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), Wilms' tumor gene 1 (WT1), isoforms, minimal residual disease (MRD)*

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
1.1. AKUTNÍ LEUKÉMIE A MYELOYDYPASTICKÝ SYNDROM .....	9
1.1.1. AKUTNÍ LYMFOLASTICKÉ LEUKÉMIE.....	9
1.1.2. AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE .....	11
1.1.3. MYELOYDYPASTICKÝ SYNDROM .....	12
1.2. GEN WILMSOVA TUMORU 1 .....	14
1.2.1. STRUKTURA A FUNKCE WT1.....	14
1.2.2. IZOFORMY WT1 .....	17
1.2.3. ROLE WT1 A JEHO IZOFOREM V EMBRYOGENEZI .....	19
1.2.4. ROLE WT1 A JEHO IZOFOREM V HEMATOPOÉZE.....	20
1.2.5. ROLE WT1 A JEHO IZOFOREM V LEUKEMOGENEZI .....	21
1.2.6. VYUŽITÍ WT1 A JEHO IZOFOREM V LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ .....	22
<b>2. VYMEZENÍ CÍLŮ A ZÁKLADNÍ HYPOTÉZY PRÁCE</b> .....	<b>26</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>28</b>
3.1. VZORKY PACIENTŮ S LEUKÉMIEMI A ZDRAVÝCH KONTROL .....	28
3.2. LEUKEMICKÉ LINIE.....	30
3.3. ZPRACOVÁNÍ VZORKU .....	30
3.3.1. IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK.....	30
3.3.2. IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	30
3.3.3. REVERZNÍ TRANSKRIPCE .....	31
3.3.4. PCR .....	31
3.3.5. QPCR.....	32
3.3.6. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA - GENESCAN.....	34
3.4. PĚSTOVÁNÍ LEUKEMICKÝCH LINÍÍ .....	34
3.5. KLONOVÁNÍ .....	35
3.6. MUTAČNÍ ANALÝZA .....	36
3.7. DETEKCE PROTEINU WT1 .....	36
3.8. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	38
3.9. SORTOVÁNÍ BUNĚK .....	39

3.10.	ANALÝZA DAT A STATISTICKÁ ANALÝZA .....	39
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
4.1.	DETEKCE A KVANTIFIKACE IZOFOREM GENU WT1 .....	41
4.1.1.	EXPRESE WT1 A JEHO IZOFOREM V LEUKEMICKÝCH LINÍCH .....	42
4.1.2.	EXPRESE WT1 A JEHO IZOFOREM V KONTROLNÍCH VZORCÍCH KD A PK A SORTOVANÝCH SUBPOPULACÍCH KONTROLNÍCH KD .....	42
4.1.3.	EXPRESE WT1 A JEHO IZOFOREM VE VZORCÍCH PACIENTŮ .....	43
4.2.	PROGNOSTICKÝ VÝZNAM EXPRESE CELKOVÉHO WT1 U DĚTSKÉ AML.....	45
4.3.	MUTAČNÍ ANALÝZA GENU WT1 U PACIENTŮ S AML.....	46
4.4.	SROVNÁNÍ EXPRESE GENU WT1 VE VZORCÍCH KD A PK PACIENTŮ S DĚTSKOU AML .....	46
4.5.	PROGNOSTICKÝ VÝZNAM PŘED- A POTRANSPLANTAČNÍ HLADINY EXPRESE GENU WT1 A JEHO MOŽNÉ VYUŽITÍ PRO SLEDOVÁNÍ MRN U DĚTÍ S AML.....	47
4.6.	SROVNÁNÍ HLADIN EXPRESE WT1 NA ÚROVNI MRNA A PROTEINU .....	48
4.7.	DIFERENCIÁLNĚ DIAGNOSTICKÝ ALGORITMUS PRO PACIENTY S RC MDS S POUŽITÍM KVANTIFIKACE MRNA WT1 .....	49
<b>5.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>50</b>
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>57</b>
	<b>ABSTRAKT.....</b>	<b>59</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>61</b>
	<b>OBRÁZKY .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>89</b>
	<b>CITOVANÁ LITERATURA .....</b>	<b>94</b>
	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>107</b>

## Úvod

Léčebné výsledky dětských hematologických malignit se v minulých desetiletích dramaticky zlepšily. V současné době lze dosáhnout dlouhodobého přežití u více než 60 % dětských pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Přesto však u části dětí dochází k relapsu či progresi onemocnění. Lze předpokládat, že léčebné protokoly založené na konvenční chemoterapii již nepovedou k dalším výraznějším zlepšením výsledků léčby. Cílem hematologů se proto stává spíše detailní poznání celého procesu leukemogeneze, jež by mohlo být využito pro lepší klasifikaci leukémií a také pro výzkum nových terapií specifických pro konkrétní subtypy této choroby.

Gen *WT1* (Wilms' tumor gene 1) je již delší dobu studován jako potenciální diagnostický a prognostický marker a také jako cíl pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN) a imunoterapii (zejména u AML). Tyto studie však doposud přinesly velmi kontroverzní výsledky a konkrétní role genu *WT1* v hematopoéze respektive leukemogenezi tak stále není objasněna.

Jednou z příčin těchto diskrepancí mohou být různě exprimované izoformy genu *WT1*, jejichž odlišné role byly popsány v recentních publikacích. Expresní vzorec základních variant genu *WT1* může mít proto zásadní význam pro maligní transformaci a je nezbytné interpretovat dosavadní publikované výsledky s ohledem na možný vliv těchto izoform. Podobný význam mohou mít také mutace v genu *WT1*, které byly nalezeny u cca 10 – 15 % pacientů s akutními leukémiemi. Přítomnost těchto mutací může ovlivňovat hladinu exprese celkového *WT1* i jeho izoform.

Základním cílem této práce bylo stanovení vztahu expresního vzorce izoform genu *WT1* s jednotlivými imunofenotypy, genotypy a klinickými podskupinami dětských respektive dospělých AML a myelodysplastického syndromu (MDS). Pro studium expresního profilu izoform *WT1* jsme navrhli unikátní metodiku detekce a kvantifikace variant genu *WT1*.

V rámci mezinárodní pracovní skupiny „European Study Group on *WT1* Expression in Childhood Acute Myeloid Leukemia“ jsme získali rozsáhlý soubor dětských pacientů s AML představující unikátní kohortu pro studium klinického významu genu *WT1* u těchto pacientů. V rámci této části práce bylo naším cílem definitivní stanovení prognostického významu genu *WT1* a jeho využití pro sledování reziduální nemoci u dětské AML.

Dalším úkolem této mezinárodní pracovní skupiny bylo vyšetření mutací genu *WT1* u dětské AML a jejich případného vlivu na detekci celkové exprese *WT1*, neboť většina doposud popsaných mutací se vyskytuje v oblastech lokalizace qPCR systémů kvantifikujících expresi *WT1*.

Studium významu genu *WT1* u dětské AML je v naprosté většině realizováno analýzou vzorků kostní dřeně (KD). Z některých publikovaných dat zejména v oboru dospělé AML však vyplývá, že periferní krev (PK) je pro tento účel vhodnější než KD. Další část práce je proto zaměřena na možné využití exprese genu *WT1* v PK pro sledování MRN u pacientů s dětskou AML.

Kromě prognostického významu iniciální hladiny genu *WT1* v době diagnózy se v poslední době poukazuje na možný význam před- a potransplantační hladiny *WT1*. Další část práce proto obsahuje pilotní analýzu prognostického významu těchto časových bodů léčby dětské AML včetně analýzy dynamiky exprese *WT1* vzhledem k jejímu možnému využití pro sledování MRN u této skupiny pacientů.

Na základě některých publikovaných výsledků lze spekulovat, zda je studium klinického významu exprese genu *WT1* v hematopoéze a leukemogenezi na úrovni mRNA (messenger ribonukleová kyselina) dostačující. Proto jsme se zabývali také detekcí proteinu WT1 a srovnáním jeho exprese s hladinou mRNA *WT1*.

Poslední část práce je zaměřena na refrakterní cytopenii (RC) a aplastickou anémii (AA). Diagnostika těchto dvou onemocnění je v současné době založena především na morfologickém a histopatologickém hodnocení KD, které může být v některých případech obtížné. Posledním cílem projektu proto bylo stanovení diferenciálně diagnostického algoritmu pro pacienty s RC s využitím průtokové cytometrie v kombinaci s kvantifikací hladiny exprese genu *WT1*.

Výsledky předkládané práce významným způsobem přispěly k objasnění role genu *WT1* a jeho izoform v hematopoéze a leukemogenezi. Pomohly také stanovit klinický význam *WT1* pro sledování MRN a rizikovou stratifikaci pacientů s dětskou AML. Námi vyvinutá unikátní metodika kvantifikace izoform *WT1* představuje významný nástroj pro studium a pochopení role genu *WT1* a jeho izoform v nejrůznějších tkáních ať již fyziologického či maligního původu. Z našich výsledků také vyplývá, že je nutné přehodnotit interpretaci některých dříve publikovaných prací zaměřených na toto téma.



## 1. Literární přehled

### 1.1. Akutní leukémie a myelodysplastický syndrom

Akutní leukémie patří mezi nejčastější maligní onemocnění v dětském věku, které postihuje celosvětově přibližně 30 – 45 dětí na 1 000 000 obyvatel/rok (Greaves 2006). V České republice je ročně diagnostikováno cca 80 – 90 dětí (Zdrahalova and Stary 2007). Nejčastěji se akutní leukémie vyskytuje ve věkové skupině 1 – 5 let, zatímco nejméně zastoupena je věková kategorie 6 – 9 let a kojenci (Pui, Schrappe et al. 2004; Stary, Mayer et al. 2002).

Akutní leukémie lze rozdělit na dvě základní skupiny podle typu hematopoetické linie, ze které je odvozena maligní leukemická buňka. Jedná se o akutní lymfoblastickou leukémii (ALL), jejíž buňky nesou znaky lymfoidní linie a akutní myeloidní leukémii, jejíž buňky odpovídají vývojovým stádiím myeloidní hematopoetické řady. ALL představují u dětí cca 80 % všech diagnostikovaných případů, zatímco zbylých cca 20 % odpovídá fenotypově AML (Stary, Mayer *et al.* 2002; Stiller 2004).

Léčebná schémata současných protokolů pro terapii akutních leukémií jsou výsledkem mnoha klinických randomizovaných studií, které umožnily vytvořit efektivní kombinaci chemoterapeutik, radioterapie a podpůrné léčby. Jedním z nejdůležitějších předpokladů pro úspěšnou terapii pacientů s leukémií je jejich adekvátní stratifikace do rizikových skupin, která umožňuje intenzifikaci léčby u pacientů s agresivnější formou leukémie bez zbytečného zatížení pacientů s mírnější formou této nemoci. Neméně důležitým faktorem, který ovlivňuje výsledky léčby leukémie, je sledování MRN a s tím související včasné odhalení blížícího se relapsu, jež umožňuje terapeutický zásah v jeho rané fázi (Campana and Pui 1995; Creutzig, Zimmermann *et al.* 2005; Kaspers and Zwaan 2007; Pui, Sandlund *et al.* 2003; Silverman, Gelber *et al.* 2001).

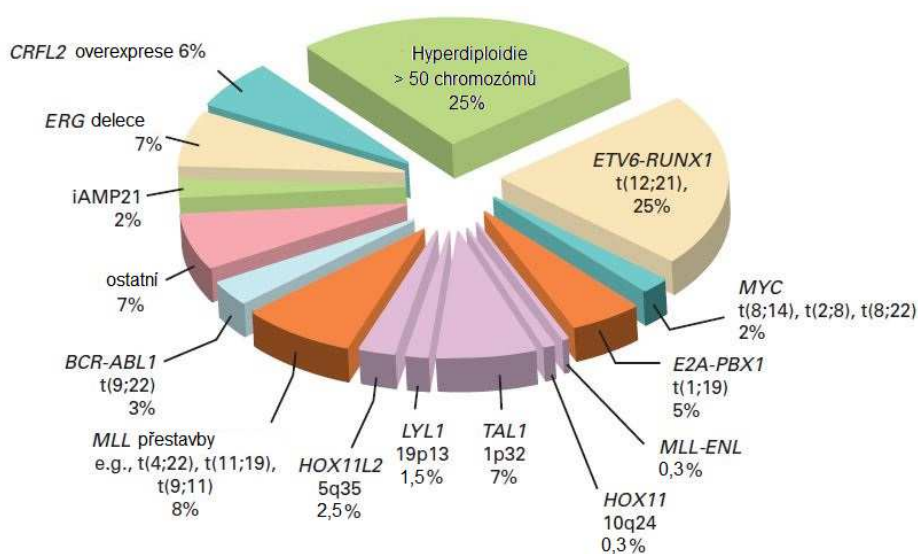
#### 1.1.1. Akutní lymfoblastické leukémie

ALL představují maligní onemocnění lymfoidních progenitorů. Postihuje-li progenitory B-lymfocytární řady, jedná se o tzv. BCP-ALL (B-cell precursor ALL). Z hlediska imunofenotypu v rámci BCP-ALL rozlišujeme tzv. cALL (common ALL), které představují nejpočetnější skupinu ALL (cca 75 %), dále tzv. preB ALL (cca 20 %) a proB ALL (zbylých 5 %). Pouze 1-2% odpovídá fenotypově zralým B-lymfocytům.

U naprosté většiny BCP-ALL lze identifikovat aneuploidii, specifické chromozomální aberace případně jiné genetické abnormality. Mezi nejlépe charakterizované aberace patří translokace t(12;21), která vede ke vzniku fúzního genu *TEL-AML1* (viz Obr. 1), či translokace t(9;22) s fúzním genem *BCR-ABL*, jenž vytváří tzv. filadelfský chromozóm. Přítomnost těchto aberací patří k nejdůležitějším stratifikačním kritériím. Některé z těchto aberací je možné postihnout tzv. cílenou léčbou, která koriguje aberantní funkci fúzního proteinu (např. tyrozinkinázové inhibitory u pacientů s *BCR-ABL* pozitivní ALL – přehled v (Arora and Scholar 2005)).

ALL vycházející z progenitorů T-lymfocytární řady (T-ALL) představují cca 15 % diagnostikovaných ALL. Nejčastěji se jedná o tzv. intermediate T-ALL (36 %) či zralou T-ALL (40 %), vzácnějším typem je tzv. early T-ALL (23 %). Ve srovnání s BCP-ALL dosahují pacienti s T-buněčnou ALL horších léčebných výsledků.

Klíčovou charakteristikou pacientů s lymfoblastickou leukémií je přítomnost specifické klonální přestavby genu pro imunoglobulinový nebo T-buněčný receptor (*Ig/TCR*). Tato unikátní sekvence vzniká v průběhu vývoje leukemické buňky přeskupováním genových segmentů, je přítomna na povrchu všech buněk leukemického klonu a je u každého pacienta specifická (Davis and Bjorkman 1988; van Dongen and Wolvers-Tettero 1991). Těto jedinečné charakteristiky lze využít k detekci zbytkové leukemické populace a následné kvantifikaci v rámci sledování reziduální nemoci (van Dongen, Breit *et al.* 1992).



Obr. 1 – Výskyt chromozomálních aberací u pacientů s ALL (Pui, Carroll *et al.* 2011)

### 1.1.2. Akutní myeloidní leukémie

Druhým, v dětském věku méně častým typem akutní leukémie je AML. Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, kterou můžeme klasifikovat do několika podskupin podle toho, která hematopoetická řada je leukémií postižena. Podle tzv. FAB klasifikace (French-American-British cooperative group) rozlišujeme z morfoloického a cytochemického hlediska podskupiny M0 – M7. Novější klasifikace světové zdravotnické organizace (WHO) vychází z morfoloických a také cytogenetických charakteristik a lépe zohledňuje heterogenní charakter AML (Bennett, Catovsky *et al.* 1976).

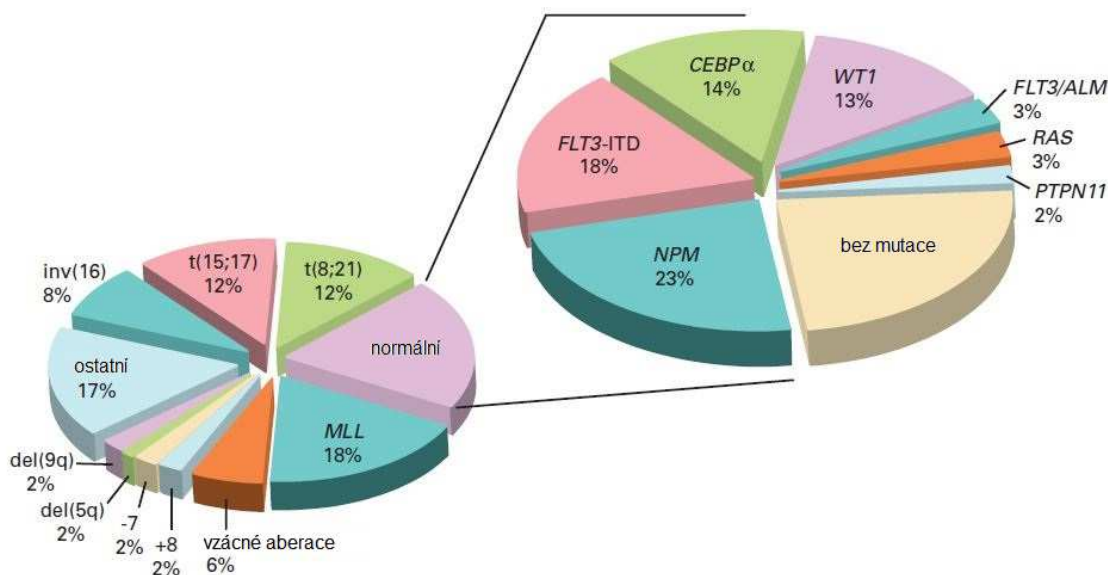
V leukemických blastech cca 55 – 60 % pacientů s AML lze identifikovat genetické aberace. Mezi nejčastější abnormality patří translokace t(15;17), která vede ke zniku fúzního genu *PML-RARα*. AML s touto aberací představují nejlépe charakterizovanou podskupinu tzv. akutní promyelocytární leukémii (APL). Další typickou aberací je t(8;21), která vede ke vzniku fúzního genu *AML1-ETO*, inv16 (fúzní gen *CBF-MYH11*), či translokace 9. chromozómu postihující gen *MLL* (viz Obr. 2) (Grimwade, Walker *et al.* 1998; Pui, Carroll *et al.* 2011; Raimondi, Chang *et al.* 1999).

Zajímavou skupinu tvoří tzv. AML s normálním karyotypem (NK-AML). Nedávné studie prokázaly u této skupiny přítomnost nejrůznějších mutací a jiných aberací, které nelze detekovat konvenčními cytogenetickými metodami. Jedná se např. o interní tandemovou duplikaci genu *FLT3 (FLT3/ITD)*, mutace postihující gen pro *CEBPA* (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) či mutace v genu *WT1*. Spektrum molekulárních aberací, které se neustále zvyšuje s rozvojem genomických technologií, představuje z klinického hlediska velmi zajímavou informaci, neboť mnohé z těchto aberací nesou prognostický význam (*FLT3/ITD*, *NPM1* a další) (Pui, Carroll *et al.* 2011; Ross, Mahfouz *et al.* 2004).

Pacienti s AML dosahují výrazně horších léčebných výsledků ve srovnání s ALL. Dlouhodobě přežívá pouze zhruba 65 % diagnostikovaných pacientů. Nejvýznamnější komplikací léčby je samozřejmě relaps neboli znovuobjevení leukémie. Ve srovnání s ALL se však u AML vyskytuje i více komplikací v časných fázích léčby případně v remisi, které bývají mnohdy fatální. Absence klonálně specifických aberací, heterogenita leukemické populace a nestabilita imunofenotypových znaků navíc komplikuje sledování MRN, které by umožnilo jasně definovat myeloidní leukemické buňky.

Detekci MRN lze proto aplikovat pouze maximálně u 40 % pacientů s AML, jejichž leukemické buňky nesou některé z typických molekulárně genetických aberací (*AML1-ETO*, *CBF-MYH11*, *PML-RAR $\alpha$* , *MLL* translokace). Zbývající NK-AML tyto dobře charakterizované aberace nenesou (van der Velden, Hochhaus *et al.* 2003).

V poslední době však i u tohoto typu leukemií byla objevena řada nových mutací (např. *CEBPA*, *NPM1*, *FLT3* a další), které umožňují navržení tzv. „patientspecifickým“ systémů pro sledování MRN. Jejich výskyt je však omezen na velmi malé procento pacientů (Hollink, Zwaan *et al.* 2009). Snaha některých pracovních skupin se proto upírá na nalezení univerzálnějšího markeru leukemických buněk, který by umožnil sledování MRN u většiny pacientů s AML (Yin and Grimwade 2002).



Obr. 2 – Výskyt chromozomálních aberací u pacientů s AML (Pui, Carroll *et al.* 2011)

### 1.1.3. Myelodysplastický syndrom

MDS je heterogenní skupina klonálních onemocnění postihujících hematopoetické kmenové buňky, jehož výsledkem je selhání krvetvorby a zvýšené riziko transformace do AML. Existuje několik klasifikací dětských MDS, přičemž nejčastěji se tato skupina onemocnění dělí na refrakterní cytopenii (RC), refrakterní anemii s excesem blastů (RAEB) a refrakterní anemii s excesem blastů v transformaci (RAEB-T) (Hasle, Niemeyer *et al.* 2003).

V současné době nelze jasně identifikovat molekulární mechanismy, které vedou ke vzniku MDS. Konvenční cytogenetikou lze detekovat klonální aberace pouze u zhruba poloviny pacientů (např. 5q-, 7/7q-, +8 a další). Odlišná citlivost myelodysplastických buněk na inhibitory DNA metyltransferáz (DNMTs) společně s výsledky metylačních studií vedly k hypotéze, podle které v patogenezi MDS hrají důležitou roli epigenetické alterace (Figueroa, Skrabanek *et al.* 2009; Jiang, Dunbar *et al.* 2009).

Se zavedením senzitivních molekulárně genetických metod bylo identifikováno mnoho genetických abnormalit u pacientů s MDS, které postihují proteiny, jež jsou součástí komplexů zajišťujících epigenetické modifikace (např. *TET2*, *DNMT3a*, *EZH2*, *ASXL1*). Recentní studie ukázaly také mutace v komponentech sestřihového aparátu (např. *SRSF2*, *U2AF1*). Všechny tyto aberace se výrazně častěji vyskytují u pacientů s MDS než u jiných myeloidních malignit (Bejar, Stevenson *et al.* 2011; Damm, Kosmider *et al.* 2012; Ko, Huang *et al.* 2010; Walter, Ding *et al.* 2011).

Identifikace molekulárních mechanismů, které přispívají ke vzniku MDS je základem pro vývoj terapeutických agens cílených na aberantní komponenty výše pospaných drah (např. inhibitory DNMTs či histondeacetyláz (HDACs) – přehled v (Griffiths and Gore 2008)). V současné době však stále zůstává jedinou efektivní léčbou pacientů s MDS transplantace hematopoetických kmenových buněk (TKD).

## 1.2. Gen Wilmsova tumoru 1

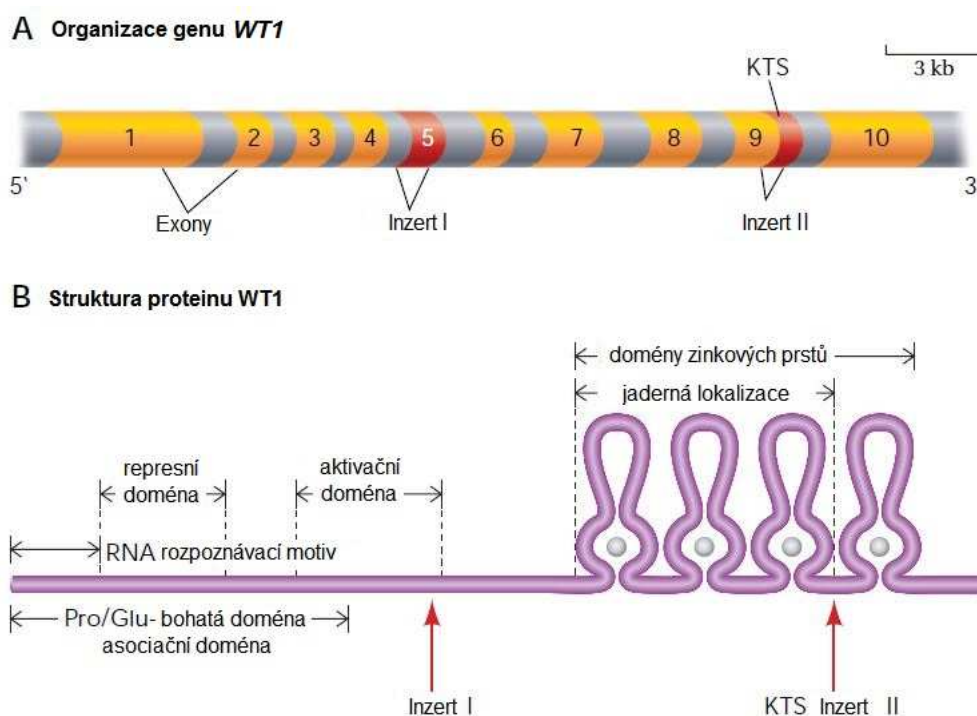
*WT1* byl objeven roku 1990 jako gen, odpovědný za vznik Wilmsova tumoru ledviny (Call, Glaser et al. 1990), který představuje nejčastější intraabdominální solidní nádor v dětském věku. Jedná se o velmi důležitý gen, který se účastní mnoha významných procesů jak na úrovni buněčné, tak i na úrovni celého organismu. *WT1* byl dlouho považován za tumorsupresorový gen vzhledem k mutacím, které byly nalezeny u různých typů maligních onemocnění či premaligních syndromů. Vzhledem k aberantní expresi *WT1*, kterou nacházíme u většiny hematologických a dalších malignit, je však v současné době akceptována spíše tzv. duální role genu *WT1*, jež předpokládá tkáňově specifický tumorsupresorový respektive onkogenní účinek tohoto genu (přehled v (Scharnhorst, van der Eb *et al.* 2001; Sugiyama 2001; Wagner, Wagner *et al.* 2003; Yang, Han *et al.* 2007)).

### 1.2.1. Struktura a funkce WT1

Gen *WT1* leží na krátkém raménku 11. chromozómu a pokrývá oblast cca 50 kbp. Skládá se z 10 exonů a kóduje výsledný protein o velikosti cca 57 kDa. Celý první exon kóduje N-terminální doménu bohatou na prolin a glutamin, která je odpovědná za interakci *WT1* s RNA a ostatními proteiny. C-terminální doména zajišťuje vazbu k DNA a skládá se ze 4 Cys2His2 zinkových prstů, z nichž každý je kódován jedním exonem odděleným krátkou intronovou sekvencí (Haber, Sohn et al. 1991) (viz Obr. 3). Tyto vazebné motivy vykazují vysoký stupeň homologie s doménami zinkových prstů transkripčních faktorů *EGR1*, *EGR2* (Early growth response 1 a 2) a *SP1* (Specificity Protein 1), s čímž souvisí i vazba *WT1* k podobným sekvencím v promotorech cílových genů, které obsahují specifický GC bohatý motiv (5'-GCGGGGCG-3') (Drummond, Madden *et al.* 1992; Rauscher, Morris *et al.* 1990).

*WT1* je transkripční faktor a účastní se regulace exprese mnoha cílových genů, které se podílejí na kontrole buněčného cyklu, apoptózy, proliferace, metabolismu a diferenciaci. Jedná se např. o *CSF-1* (colony stimulating factor 1) (Harrington, Konicek *et al.* 1993), *PDGF-A* (platelet derived growth factor A) (Gashler, Bonthron et al. 1992), *IR* (insulin receptor) (Menke, Shvarts et al. 1997), *RARα* (retinoic acid receptor alpha) (Goodyer, Dehbi et al. 1995), *C-MYC* (myelocytomatosis viral oncogene homolog) (Hewitt, Hamada et al. 1995), *PAX-2* (paired box gene 2) (Ryan, Steele-Perkins et al. 1995) či *BCL-2* (B-cell CLL/lymphoma 2) (Heckman, Mochon *et al.* 1997) (viz Tabulka 1). Neméně významným cílovým genem *WT1* je gen *SRY* (sex

determining region Y), jenž je odpovědný za určení pohlaví v časných fázích vývoje organismu (Hossain and Saunders 2001).



Obr. 3 – Struktura genu a proteinu WT1 (Scholz and Kirschner 2005)

Ve většině případů WT1 způsobuje represi genové exprese, pouze výjimečně její aktivaci (například *WNT-4* (wingless-type MMTV integration site family, member 4) či *IGF-2* (insulin-like growth factor 2)). Zajímavé je, že aktivace respektive represe je zprostředkována odlišnými doménami proteinu WT1 (Wang, Qiu *et al.* 1993). Kromě těchto cílových genů je WT1 schopen se vázat také ke svému promotoru a regulovat tak i vlastní expresi (autoregulace) (Hewitt, Fraizer *et al.* 1996).

Larsson *et al.* v buňkách prokázali *in vivo* kolokalizaci proteinu WT1 s komponenty sestříhového aparátu. Předpokládá se, že se jedná o přímou vazbu skrze N-terminální doménu a není pro ni důležitá interakce s DNA či RNA, ke které je WT1 schopen se vázat pomocí zinkových prstů podobně jako k DNA. WT1 se tedy účastní také posttranskripčních úprav primárního transkriptu cílových genů (Larsson, Charlieu *et al.* 1995) (Caricasole, Duarte *et al.* 1996).

Konkrétní role *WT1* pak závisí na buněčném typu, v němž je exprimován, a na prostředí, ve kterém se buňka nachází. Funkce *WT1* je také modulována skrze

posttranskripční modifikace a interakcí s ostatními proteiny – např. SF1 (splicing factor 1), p53 (tumor protein p53), PAR4 (protease-activated receptor 4) a CBP (CREB-binding protein) (Maheswaran, Park et al. 1993; Nachtigal, Hirokawa et al. 1998; Richard, Schumacher et al. 2001; Wang, Lee et al. 2001).

<b>Vybrané cílové geny transkripčního faktoru <i>WT1</i></b>	
<b>Růstové faktory</b>	
Amphiregulin ( <i>AREG</i> )	Colony stimulating factor-1 ( <i>CSF1</i> )
Insulin-like growth factor II ( <i>IGF-2</i> )	Platelet derived growth factor ( <i>PDGF</i> )
Transforming growth factor-beta ( <i>TGFb</i> )	
<b>Transkripční faktory</b>	
Myeloblastosis oncogene ( <i>c-Myb</i> )	Myelocytomatosis oncogene ( <i>c-Myc</i> )
Cyclin E ( <i>CCNE</i> )	Cyclin G1 ( <i>CCNG1</i> )
<i>P21</i>	Paired box gene 2 ( <i>PAX-2</i> )
Insulin-like growth factor-binding protein 4 ( <i>IGFBP-4</i> )	
<b>Receptory</b>	
Androgen receptor ( <i>AR</i> )	Epidermal growth factor receptor ( <i>EGFR</i> )
Insulin receptor ( <i>IR</i> )	Insulin-like growth factor 1 receptor ( <i>IGF1R</i> )
Retinoic acid receptor alpha ( <i>RARa</i> )	
<b>Enzymy</b>	
Human telomerase reverse transcriptase ( <i>hTERT</i> )	Ornithine decarboxylase ( <i>ODC</i> )
<b>Komponenty extracelulární matrix</b>	
E-cadherin ( <i>CDH1</i> )	Thrombospondin-1 ( <i>THBS1</i> )
Syndecan-1 ( <i>SCD1</i> )	
<b>Ostatní</b>	
Wingless-type MMTV integration site family, member 4 ( <i>WNT-4</i> )	B-cell CLL/lymphoma 2 ( <i>BCL-2</i> )
Erythropoietin ( <i>EPO</i> )	

Tabulka 1 – Vybrané cílové geny transkripčního faktoru *WT1* (Yang, Han et al. 2007)



### 1.2.2. Izoformy WT1

Již delší dobu je známo, že existuje více než 36 odlišných variant genu *WT1*. Tyto tzv. izoformy vznikají jako důsledek alternativního sestřihu primárního transkriptu, alternativního začátku transkripce případně translace a také editací RNA (Bruening and Pelletier 1996; Dallosso, Hancock *et al.* 2004; Haber, Sohn *et al.* 1991; Hossain, Nixon *et al.* 2006; Sharma, Bowman *et al.* 1994). Nejvýznamnější z těchto úprav – alternativní sestřih – vede ke vzniku 4 hlavních izoform, které se liší přítomností či absencí dvou sestřihových oblastí (viz Obr. 3). Předpokládá se, že ostatní izoformy již představují jen minoritní část všech variant genu *WT1*.

První sestřihová oblast postihuje celý exon 5 genu *WT1*. Jedná se o 51-nukleotidový úsek kódující 17 aminokyselin, lokalizovaný uprostřed polypeptidového řetězce výsledného proteinu. Druhá sestřihová oblast – tzv. KTS inzert - je dlouhá 9 nukleotidů a kóduje 3 aminokyseliny lyzin, threonin a serin (Haber, Sohn *et al.* 1991). Tento inzert se nachází mezi 9. a 10. exonem a jeho přítomnost výrazným způsobem ovlivňuje prostorovou orientaci dvou posledních motivů zinkového prstu v rámci C-terminální domény WT1. Předpokládá se, že tento 3-aminokyselinový úsek mění vazebnou specifitu proteinu WT1 k cílové DNA resp. RNA (Bickmore, Oghene *et al.* 1992; Larsson, Charlieu *et al.* 1995; Wang, Qiu *et al.* 1995). Výsledné izoformy mají odlišné, částečně se překrývající funkce a liší se i svou lokalizací v rámci buněčných kompartmentů (Davies, Calvio *et al.* 1998; Ito, Oji *et al.* 2006; Larsson, Charlieu *et al.* 1995; Mayo, Wang *et al.* 1999)

Ve zdravé tkáni nacházíme stabilní poměr 4 hlavních izoform WT1 (1 : 2,5 : 3,8 : 8,3 pro izoformy A[exon 5 - / KTS -], B[+/-], C[-/+], D[+/+] podle přítomnosti výše jmenovaných sestřihových inzertů) (Haber, Sohn *et al.* 1991). Nejvíce zastoupena je tedy izoforma D, která obsahuje oba inzerty, zatímco nejméně častou variantou je nejkratší izoforma A. Odlišnosti v poměru těchto 4 variant způsobené defektním sestřihem byly popsány u pacientů s Frasierovým syndromem (Barbaux, Niaudet *et al.* 1997), Denys-Drashovým syndromem (Pelletier, Bruening *et al.* 1991) a také u leukémií (Hossain, Nixon *et al.* 2006), karcinomů prsu (Silberstein, Van Horn *et al.* 1997) či Wilmsova tumoru (Liu, Wang *et al.* 1999). Tyto a další výsledky poukazují na význam správného poměru izoform WT1 pro jeho výslednou funkci.

### *Exon 5 +/- izoformy WT1*

Je zřejmé, že exon 5 představuje důležitou funkční doménu, která se účastní protein-proteinových interakcí (Wang, Qiu *et al.* 1995). Význam této sestřihové oblasti dokládají i mutace, které postihují exon 5, a které nacházíme u pacientů s Wilmsovým tumorem (Guan, Liu *et al.* 1998).

Podle některých předpokladů funguje exon 5 jako aktivátor transkripce. Jeho přesná role však ještě nebyla identifikovaná. Hewitt *et al.* prokázali, že varianty genu *WT1* obsahující exon 5 podporují proliferaci buněk, zatímco izoformy bez exonu 5 proliferaci snižují (Hewitt, Fraizer *et al.* 1996). Dále bylo zjištěno, že exon 5 pozitivní izoformy mají antiapoptotickou funkci (Mayo, Wang *et al.* 1999), nicméně v jiné studii byla prokázána proapoptotická a tudíž opačná role těchto izoform (Menke, Shvarts *et al.* 1997).

### *KTS +/- izoformy WT1*

KTS inzert lokalizovaný mezi 3. a 4. zinkovým prstem dramaticky ovlivňuje funkci vazebné domény. Tato prostorová změna zeslabuje vazbu *WT1* k DNA a naopak zvyšuje jeho vazebnou afinitu k RNA. (Caricasole, Duarte *et al.* 1996; Hossain, Nixon *et al.* 2006; Moorwood, Salpekar *et al.* 1999; Renshaw, King-Underwood *et al.* 1997). KTS pozitivní izoformy mají v jádře specifickou lokalizaci a předpokládá se, že asociují s proteiny sestřihového aparátu, kde se účastní posttranskripčních úprav RNA (např. sestřihový faktor U2AF65) (Davies, Calvio *et al.* 1998; Larsson, Charliou *et al.* 1995). *WT1* byl také detekován jako součást polyA<sup>+</sup> ribonukleoproteinových částic (Ladomery, Slight *et al.* 1999).

Izoformy, které postrádají KTS inzert, se vyznačují podobnou buněčnou distribucí jako klasické transkripční faktory (např. SP1 či TFIIB (transcription factor IIB)) a chovají se tedy spíše jako transkripční regulátory. Tyto izoformy jsou zodpovědné také za autoregulační funkci *WT1* ((Larsson, Charliou *et al.* 1995), přehled v (Menke, van der Eb *et al.* 1998)).

Správný poměr KTS pozitivních a negativních izoform je kontrolován pomocí specifické oblasti, která se nachází v 9. intronu. Tento tzv. cis-element zvyšuje využití alternativního sestřihového místa, jež vede ke vzniku variant obsahujících KTS inzert (Yang and Romaniuk 2008).

### *Minoritní izoformy WT1*

Kromě 4 výše zmíněných majoritních izoform WT1 byly popsány také další varianty genu WT1. Tyto izoformy jsou méně časté, nicméně mohou významným způsobem ovlivnit funkci výsledného proteinu WT1 - zejména pokud je jejich exprese oproti ostatním izoformám patologicky zvýšena.

Bruening a Pelletier objevili izoformy WT1, které jsou výrazně delší než výše popsané varianty genu WT1. Tyto izoformy vznikají použitím alternativního startovacího kodónu CUG, který se nachází tzv. „upstream“ a „inframe“ od klasického AUG kodónu. Takto vytvořené varianty WT1 jsou také schopny regulace genové exprese a lze je detekovat v normální i maligní tkáni (Bruening and Pelletier 1996).

Častěji jsou však zmiňované zkrácené varianty genu WT1. AWT1 (alternative WT1 transcript, neboli *sWT1*) má zachované exony 2 – 10 ale obsahuje odlišný první exon - tzv. exon 1a, který se nachází v oblasti prvního intronu WT1. Tato zkrácená varianta vede ke vzniku proteinu o velikosti 33 kDa, který postrádá represivní doménu. AWT1 byl detekován u pacientů s Wilmsovým tumorem či leukémiemi (Dallosso, Hancock *et al.* 2004), (Hossain, Nixon *et al.* 2006).

Dalším příkladem zkrácené varianty je izoforma, která postrádá prvních 5 exonů. Předpokládá se, že vzniká jako důsledek využití kryptického promotoru, jenž se nachází v oblasti 5. intronu. Dechsukhum *et al.* tuto izoformu detekovali v buněčných liniích nádorů prostaty, leukémií a také ve vzorcích pacientů s leukémiemi (Dechsukhum, Ware *et al.* 2000), (Dumur, Dechsukhum *et al.* 2002).

### **1.2.3. Role WT1 a jeho izoform v embryogenezi**

WT1 je exprimován během embryogeneze, kdy je naprosto nezbytný pro správný vývoj urogenitálního traktu. V prenatálním vývoji dále nacházíme expresi WT1 např. v hematopoetických buňkách, slezině, thymu, míše, bránici, epikardu, subepikardálním mezenchymu či mozkové tkáni (Armstrong, Pritchard-Jones *et al.* 1993; Moore, McInnes *et al.* 1999; Moore, Schedl *et al.* 1998). Studie zaměřené na cílenou inaktivaci WT1 prokázaly abnormality ve vývoji těchto tkání (Kreidberg, Sariola *et al.* 1993; Moore, McInnes *et al.* 1999).

Expresi WT1 nacházíme také v některých tkáních dospělého organismu a to zejména v hematopoetických progenitorech, glomerulárních podocytech, děloze, ovariích či Sertoliho buňkách (Buckler, Pelletier *et al.* 1991; Wagner, Wagner *et al.* 2003).

Přestože bylo popsáno mnoho cílových genů *WT1*, které se účastní vývoje urogenitálního traktu, konkrétní způsob, jakým *WT1* reguluje tento proces, není znám. Jedním z důvodů je nejspíše výše zmíněná existence izoform *WT1* a jejich odlišné funkce.

Přítomnost a správná funkce *WT1* je nezbytná v různých stádiích vývoje ledvin. Zajímavé je, že v závislosti na konkrétním stádiu, ve kterém je exprimován, je tato funkce pro- respektive antiapoptotická (Davies, Lodomery *et al.* 2004). Pro normální urogenitální vývoj je potřebný také adekvátní poměr variant *WT1* (Barboux, Niaudet *et al.* 1997; Englert, Maheswaran *et al.* 1997; Hewitt and Saunders 1996; Mayo, Wang *et al.* 1999).

Kromě vývoje ledvin je *WT1* nezbytný také při určení pohlaví plodu, neboť reguluje expresi mnoha genů odpovědných za tento proces - např. *SRY*, *MIS* (Müllerian inhibiting substance), či *AR* (androgenový receptor) (Hossain and Saunders 2001; Shimamura, Fraizer *et al.* 1997).

#### **1.2.4. Role WT1 a jeho izoform v hematopoéze**

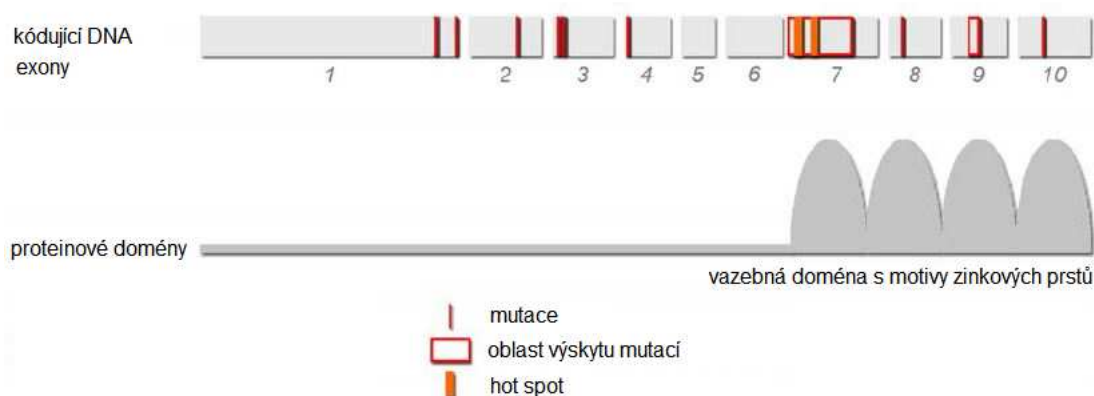
Vysokou expresi *WT1* nacházíme u nezralých CD34+ hematopoetických progenitorů. S jejich diferenciací do zralých krevních buněk dochází k poklesu exprese *WT1* (Hosen, Sonoda *et al.* 2002; Maurer, Brieger *et al.* 1997; Phelan, Lindberg *et al.* 1994). Podobně jako ve vývoji ledvin, i v hematopoéze se předpokládá specifický účinek *WT1* v závislosti na stádiu buňky, ve které je exprimován. U primitivních CD34+CD38- kmenových buněk navozuje *WT1* klidový stav, zatímco ve zralejších prekurzorech již navozuje zástavu buněčného cyklu a diferenciaci (Ellisen, Carlesso *et al.* 2001). Loeb *et al.* tuto teorii doplňuje a tvrdí, že v rámci CD34+ buněk lze identifikovat subpopulace, které se liší poměrem izoform genu *WT1*. Méně zralá stadia exprimují více KTS + variant, zatímco subpopulace, které již podstupují granulocytární diferenciaci, exprimují izoformy bez KTS inzertu (Loeb, Summers *et al.* 2003). Pravděpodobnou účast jednotlivých izoform na procesu hematopoetického vývoje potvrzují i studie, podle kterých *WT1* ovlivňuje proliferaci a diferenciaci myeloidních a erytroidních buněk skrze různé molekulární mechanismy (Keilholz, Menssen *et al.* 2005).

Konkrétní význam jednotlivých izoform genu *WT1* a jejich poměru pro vývoj hematopoetických prekurzorů byl však dosud velmi málo studován. Inoue *et al.* ukázali,

že aberantní exprese izoformy D (+/+) brání granulocytární diferenciaci. Několik dalších *in vitro* studií zaměřených na KTS +/- varianty prokázalo kooperaci těchto izoform v průběhu diferenciacie hematopoetických buněk. Vzhledem k nedostatku relevantních dat a absenci vhodné metodiky pro studium exprese izoform *WT1* zatím nelze definovat jejich konkrétní úlohu v hematopoéze (Ellisen, Carlesso *et al.* 2001; Inoue, Tamaki *et al.* 1998; Smith, Weil *et al.* 1998).

### 1.2.5. Role *WT1* a jeho izoform v leukemogenezi

Pritchard-Jones *et al.* jako první identifikovali vznik AML v souvislosti s inzerční mutací v genu *WT1* u pacienta s WAGR syndromem (Pritchard-Jones, Renshaw *et al.* 1994). Následovaly mutační studie, které prokázaly výskyt mutací v genu *WT1* u cca 10 – 15 % pacientů s AML a v některých případech také jejich asociaci s nepříznivou prognózou. Mutace byly nalezeny ve všech exonech genu *WT1*, nicméně naprostá většina se vyskytuje ve dvou tzv. „hot spot“ oblastech, které se nacházejí na 7. a 9. exonu (viz Obr. 4). Jedná se nejčastěji o malé inserce či tzv. „nonsense“ mutace, jejichž výsledkem je defektní protein *WT1* (Gaidzik and Dohner 2008; Hollink, van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2009; King-Underwood, Renshaw *et al.* 1996; Paschka, Marcucci *et al.* 2008; Virappane, Gale *et al.* 2008).



Obr. 4 - Výskyt mutací v genu *WT1* (Hollink, van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2009)

U většiny AML a dalších hematologických malignit nacházíme aberantní expresi genu *WT1* (80 – 90% AML a 70 – 90% ALL). Z hlediska kinetiky lze detekovat nejvyšší hladinu *WT1* při diagnóze. Po zahájení léčby tato hladina rapidně klesá a v hematologické remisi se pohybuje v rozmezí fyziologické exprese *WT1* (Boublikova, Kalinova et al. 2006; Cilloni, Messa et al. 2008; Trka, Kalinova et al. 2002). Předpokládá se, že zvýšení exprese *WT1* (případně jeho izoformem) v průběhu leukemogeneze poskytuje buňkám proliferační výhodu, která v kombinaci s dalšími aberacemi může vést k maligní transformaci (Nishida, Hosen et al. 2006).

U AML pacientů byla prokázána signifikantně vyšší hladina exon 5 + izoformem a KTS + izoformem a to jak při diagnóze tak i v relapsu (Gu, Hu et al. 2010; Renshaw, King-Underwood et al. 1997; Siehl, Reinwald et al. 2004). Renshaw *et al.* také poukázali na možnou variabilitu v poměru variant *WT1* mezi morfologickými podskupinami AML. Zajímavé je, že v leukemických vzorcích nacházíme zvýšenou expresi zkrácené izoformy *AWT1* (Hossain, Nixon *et al.* 2006; Ishikawa, Kiyoi *et al.*). Tyto studie však poskytly pouze orientační výsledky (díky již zmíněným metodickým nedostatkům) a detailní analýza významu expresního profilu izoformem *WT1* v leukemogenezi tak stále chybí.

### **1.2.6. Využití WT1 a jeho izoformem v léčbě nádorových onemocnění**

Již mnoho studií prokázalo, že *WT1* hraje významnou roli pro proliferaci nejrůznějších typů malignit. Tyto vlastnosti činí *WT1* atraktivní jako prognostický faktor, marker pro sledování MRN a také jako cíl pro imunoterapii (Keilholz, Menssen *et al.* 2005; Lapillonne, Renneville *et al.* 2006; Sugiyama 2001; Trka, Kalinova *et al.* 2002; Yang, Han *et al.* 2007).

#### *Prognostický význam*

Mnoho studií analyzujících hladinu exprese genu *WT1* u pacientů s nádorovými onemocněními poukázalo na možný význam této hladiny pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin. Tyto studie však přinesly kontroverzní a mnohdy protichůdné výsledky. (Barragan, Cervera *et al.* 2004; Cilloni and Saglio 2004; Coosemans, Van Calster *et al.* 2011; Hayashi, Oji *et al.* 2012; Lapillonne, Renneville *et al.* 2006; Miyoshi, Ando *et al.* 2002; Nomdedeu, Hoyos *et al.* 2013; Sotobori, Ueda *et al.* 2006; Weisser, Kern *et al.* 2005).

Přestože někteří autoři prokázali silnou korelaci diagnostické hladiny exprese genu *WT1* s prognózou AML pacientů (Barragan, Cervera *et al.* 2004; Cilloni, Gottardi *et al.* 2002; Cilloni, Gottardi *et al.* 2003; Inoue, Ogawa *et al.* 1996; Trka, Kalinova *et al.* 2002; Weisser, Kern *et al.* 2005), jiní tuto souvislost nepotvrdili (Hamalainen, Kairisto *et al.* 2008; Noronha, Farrar *et al.* 2009; Schmid, Heinze *et al.* 1997). Zajímavé je, že v některých případech byla prokázána korelace nepříznivé prognózy s vysokou expresí *WT1* (Lapillonne, Renneville *et al.* 2006; Nomdedeu, Hoyos *et al.* 2013; Weisser, Kern *et al.* 2005), zatímco v jiných studiích i s jeho nízkou expresí (Boublikova, Kalinova *et al.* 2006; Miglino, Colombo *et al.* 2011; Rodrigues, Oliveira *et al.* 2007).

Kromě diagnostické hladiny byl studován také prognostický význam exprese *WT1* v různých časových bodech léčby (např. konec indukční fáze terapie atd.) opět s podobně kontroverzními výsledky (Cilloni, Messa *et al.* 2008; Gaiger, Linnerth *et al.* 1999; Gianfaldoni, Mannelli *et al.* 2010; Nomdedeu, Hoyos *et al.* 2013).

V poslední době se objevily také studie, které se zabývaly prognostickým významem před- respektive potransplantační hladiny genu *WT1* u pacientů s AML. Zejména u této skupiny pacientů je *WT1* některými autory považován za slibný stratifikační marker (Jacobsohn, Tse *et al.* 2009; Zhao, Jin *et al.* 2012). Rozsáhlé studie potvrzující tento fenomén však chybí.

Prognostický význam izoforem genu *WT1* nebyl doposud detailněji studován.

### *Sledování MRN*

Sledování MRN čili zbytkové populace leukemických buněk, která zůstává v těle pacienta i přes intenzivní chemoterapii, umožňuje zhodnocení odpovědi na léčbu a také včasné odhalení blížícího se relapsu leukémie. Hladina MRN po zahájení léčby představuje nejvýznamnější prognostický faktor umožňující stratifikaci pacientů a případnou intenzifikaci jejich léčby.

Již prvotní studie zabývající se významem exprese *WT1* v průběhu léčby a jeho možným využitím jako markeru MRN ukázaly, že hladina exprese genu *WT1* koreluje s průběhem léčby pacientů s AML (Cilloni, Gottardi *et al.* 2002; Cilloni and Saglio 2004) (Kreuzer, Saborowski *et al.* 2001; Nomdedeu, Hoyos *et al.* 2013; Sugiyama 2002). Z hlediska potenciálu *WT1* pro sledování MRN u AML se výsledky těchto publikací opět liší, nicméně většina autorů i přesto považuje *WT1* za slibný marker MRN alespoň u vybraných podskupin pacientů. V problematice sledování MRN u

dětské AML navíc stále chybí rozsáhlé prospektivní studie, které by definitivně stanovily význam genu *WT1* pro tento účel.

### *Imunoterapie*

Vzhledem k vysoké expresi mRNA respektive proteinu WT1, kterou nacházíme u leukémií a solidních nádorů, lze předpokládat, že by WT1 mohl patřit mezi tzv. antigeny asociované s nádory (TAA - tumor associated antigen) a mohl tedy sloužit k navození protinádorové imunitní odpovědi. Již prvotní studie potvrdily schopnost krátkých polypeptidů odvozených z proteinu WT1 indukovat WT1-specifické cytotoxické T-lymfocyty (CTLs). Tyto CTLs navozují apoptózu v leukemických blastech bez negativního vedlejšího účinku na zdravé hematopoetické prekurzory, které exprimují WT1 (Gaiger, Reese *et al.* 2000; Oka, Elisseeva *et al.* 2000; Oka, Tsuboi *et al.* 2004; Oka, Udaka *et al.* 2000; Rezvani, Brenchley *et al.* 2005; Tsuboi, Oka *et al.* 2000).

Proti maligním buňkám exprimujícím WT1 lze navodit také humorální imunitní odpověď. Wu *et al.* prokázali existenci humorální Th1 lymfocyty zprostředkované odpovědi proti WT1, neboť detekovali WT1 specifické protilátky u pacientů s leukémiemi a MDS (Wu, Oka *et al.* 2005).

Z metodologického hlediska existuje několik přístupů, které lze ve WT1-specifické imunoterapii využít. *Ex vivo* můžeme připravit a expandovat WT1 specifické imunitní buňky pacienta (T-lymfocyty případně dendritické buňky) a poté je aplikovat zpět do jeho těla. Tento přístup však vyžaduje *ex vivo* manipulaci s hematopoetickými buňkami pacientů. Druhý přístup využívá *in vivo* stimulaci B a T lymfocytů pomocí syntetického polypeptidu WT1. Tato vakcinace má své limity, neboť po opakovaném podání už nedochází k expanzi WT1 specifických lymfocytů. Již pilotní studie však potvrdily, že i tato koncentrace je dostatečná pro *in vivo* navození antileukemického účinku. (Maslak, Dao *et al.* 2010; Oka, Tsuboi *et al.* 2006; Oka, Tsuboi *et al.* 2004; Sundarasetty, Singh *et al.* 2013).

Potenciál antileukemické terapie s využitím *WT1* není omezen jen na stimulaci imunitní odpovědi. Předpokládáme-li onkogenní účinek genu *WT1*, může cílené snížení jeho aberantní exprese vést k poklesu proliferace a tudíž redukci maligních buněk. Snížení exprese *WT1* lze dosáhnout několika různými přístupy. Použití siRNA se jeví jako nejvhodnější metoda, neboť bylo prokázáno, že tato krátká sekvence RNA je schopna štěpit mRNA *WT1* pouze v buňkách s aberantně vysokou expresí tohoto genu a



tedy bez negativního účinku na zdravé hematopoetické prekurzory (Davies, Ladomery *et al.* 2004; Elmaagacli, Koldehoff *et al.* 2005). Další metody cíleného snížení hladiny *WT1* zahrnují např. použití tzv. „antisense“ oligonukleotidů či „hammerhead“ ribozymů schopných štěpit mRNA *WT1*. Tyto přístupy však mají nižší účinnost a jsou tedy zatím omezeny pouze na experimenty *in vitro* (Hubinger, Schmid *et al.* 2001; Yamagami, Sugiyama *et al.* 1996).

V současné době se mnoho pracovních skupin zabývá vývojem vakcín proti maligním buňkám nejrůznějšího původu, které exprimují *WT1*. Stále však chybí rozsáhlejší klinické studie, které by definitivně zhodnotily potenciál *WT1* v protinádorové imunoterapii.

## **2. Vymezení cílů a základní hypotézy práce**

- 1. Navržení, optimalizace a verifikace unikátního qPCR systému umožňujícího detekci a kvantifikaci 4 hlavních izoforem genu *WT1*.**
- 2. Stanovení expresního profilu izoforem genu *WT1* ve vzorcích leukemických linií, diagnostických vzorcích dětských a dospělých AML, MDS a také zdravých kontrolních KD a PK.**
- 3. Definitivní stanovení prognostického významu iniciální hladiny genu *WT1* u dětské AML na základě analýzy rozsáhlého souboru pacientů v rámci mezinárodní pracovní skupiny „European Study Group on *WT1* Expression in Childhood Acute Myeloid Leukemia“.**
- 4. Korelace výsledků (body 2 a 3) s imunofenotypem, genotypem, FAB klasifikací, klinickým průběhem a výsledky léčby.**
- 5. Mutační analýza reprezentativního souboru pacientů s dětskou AML. Korelace mutačního stavu genu *WT1* s hladinou jeho exprese. Stanovení významu těchto mutací pro detekci mRNA *WT1* případně navržení alternativních detekčních systémů lokalizovaných mimo oblasti s častým výskytem mutací.**
- 6. Analýza párových diagnostických vzorků KD a PK dětských pacientů s AML. Stanovení významu PK pro sledování MRN u dětské AML pomocí kvantifikace genu *WT1*.**
- 7. Analýza prognostického významu před- a potransplantační hladiny exprese genu *WT1* a jeho význam pro sledování MRN u transplantovaných dětských pacientů s AML**
- 8. Srovnání hladin mRNA a proteinu WT1 v základních hematopoetických subpopulacích zdravé KD a vybraných buněčných liniích.**

- 9. Stanovení diferenciálně diagnostického algoritmu pro RC MDS s využitím kvantifikace genu *WT1*.**

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Vzorčky pacientů s leukémiemi a zdravých kontrol

V rámci analýzy expresního profilu izoformem *WT1* jsme zpracovali vzorky KD či PK pacientů s AML a dalšími hematologickými malignitami. V analyzovaném souboru bylo zahrnuto 73 pacientů s dětskou AML, léčených v centrech Pracovní skupiny pro dětskou hematologii (PSDH, ČR) a University Hospital Jena (Jena, Německo); 20 dětských MDS a 9 AA léčených na stejných pracovištích a také 30 dospělých AML a 29 dospělých MDS léčených v Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT, Praha, ČR). Materiál byl zpracován v souladu s informovaným souhlasem pacientů, jejichž základní charakteristika je shrnuta v Tabulce 2. Pro stanovení fyziologických hladin genu *WT1* a jeho izoformem jsme použili 23 kontrolních KD a PK zdravých dárců či pacientů s leukémií v dlouhodobé kompletní remisi.

Rozsáhlá kohorta pacientů s dětskou AML získaná v rámci mezinárodní spolupráce zahrnovala 211 pacientů léčených v centrech PSDH (ČR), University Hospital Jena (Jena, Německo), Hospital for Children and Adolescents III (Frankfurt, Německo) a Pediatric Clinic, University Milan Bicocca (Monza, Itálie). Kontrolní kohortu představoval soubor 47 vzorků zdravých KD. V rámci této části studie jsme provedli také analýzu mutačního stavu genu *WT1* na souboru 91 pacientů s AML léčených ve stejných centrech.

Potenciál PK v detekci MRN pomocí exprese *WT1* byl stanoven analýzou diagnostických párových vzorků KD a PK 90 pacientů s dětskou AML, léčených v centrech PSDH (viz Tabulka 1 Přílohy 2).

Klinický význam exprese genu *WT1* u transplantovaných pacientů s dětskou AML byl stanoven na souboru 20 pacientů léčených v centrech PSDH a na transplantační jednotce kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol (KDHO).

V části projektu, která se věnuje srovnání mRNA a proteinu WT1, byla provedena detekce proteinu WT1 v sortovaných subpopulacích KD respektive PK 18 zdravých kontrol.

Testování diferenciálně diagnostického algoritmu pro pacienty s RC MDS jsme provedli na souboru vzorků KD 67 dětských pacientů (31 AA, 29 RC, 6 RAEB a také 1 JMML).

<b>AML</b>	<b>Dětské</b>	<b>Dospělé</b>
Počet pacientů	73	30
M / Ž	35 / 38	13 / 17
Věk - medián (rozmezí) [roky]	11 (0 – 19)	50 (19 – 72)
Subtypy: M0	2	2
M1	10	2
M2	19	10
M3	8	3
M4	18	10
M5	14	2
M6	0	1
M7	2	0
Mol. aberace: t(15;17) PML-RARa	8	3
t(8;21) AML1-ETO	6	1
inv(16) MYH11-CBFb	11	2
t(11q23) MLL přestavby	13	0
FLT3-ITD	9	13
Léčebný protokol	AML-BFM 98 a 2004	národní protokol
Rizikové skupiny: standardní	30	6
střední	NA	20
vysoké	43	2
Follow-up - medián (rozmezí) [měsíce]	47 (1 – 173)	8 (1 -21)
Relaps	24	12
Exitus - leukémie	25	12
ostatní příčiny	0	0
<b>MDS</b>	<b>Dětské</b>	<b>Dospělé</b>
Počet pacientů	20	29
M / Ž	12/8	18/11
Věk - medián (rozmezí) [roky]	10 (1 – 19)	68 (46 – 89)
Subtypy: RC/RA	13	4
RARS	0	10
RCMD	0	10
RAEB	6	5
JMML	1	0
Léčebný protokol	EWOG-MDS 1998 and 2006	národní protokol
Follow-up - medián (rozmezí) [měsíce]	23 (1 – 203)	15 (2-158)
Progrese do AML	2	2
Exitus - MDS/AML	3	6
ostatní příčiny	0	0
<b>AA</b>	<b>Dětské</b>	<b>Dospělé</b>
Počet pacientů	9	-
M / Ž	5/4	-
Věk - medián (rozmezí) [roky]	13 (1 – 18)	-
Follow-up - medián (rozmezí) [měsíce]	16 (5 – 32)	-
Exitus - AA	0	-
ostatní příčiny	0	-

Tabulka 2 – Charakteristika pacientů analyzovaných v hlavní části dizertační práce - Stanovení expresního profilu izoforem *WT1*

### **3.2. Leukemické linie**

Pro navržení a optimalizaci unikátního systému detekce a kvantifikace izoformem *WT1* jsme použili vzorky leukemických linií (Kasumi-1, NB-4, MV4;11, K562, RS4;11, REH, NALM6, UOCB6, Jurkat, SUPB15, TOM-1). V rámci srovnání hladiny genu *WT1* na úrovni mRNA a proteinu byly zpracovány také linie germinálních nádorů varlat (TGCTs – testicular germ cell tumors) - NCCIT, NTerra-2 a TCam.

Leukemické linie jsme obdrželi z DSMZ (Human and Animal Cell Lines Database, Německo). Linie UOCB6 byla získána od Dr. Krejčího (Massachusetts General Hospital, Boston, USA). Linie testikulárních nádorů NCCIT a NTerra-2 jsme zakoupili z ATCC (American Type Culture Collection, USA). Buněčnou linii TCam se nám podařilo získat od Dr. Looijengy (Erasmus University, Rotterdam, Holanadsko).

### **3.3. Zpracování vzorku**

Vzorky KD či PK pacientů resp. zdravých kontrol byly odebrány do sterilních zkumavek s antikoagulancii, transportovány do laboratoří a poté ihned zpracovány.

#### **3.3.1. Izolace mononukleárních buněk**

Centrifugací v sacharózovém gradientu (Ficoll-Paque Research Grade, Pharma Tech, New Jersey, USA) jsme ze vzorku izolovali mononukleární buňky. Ve výsledném hustotním gradientu tato frakce představuje prstenec buněk, který se nachází mezi fází krevní plazmy a cukerného roztoku. Buňky promyté v PBS (Phosphate Buffered Saline; lékárna FN Motol, Praha, ČR) byly skladovány v mrazících boxech při teplotě - 80°C.

#### **3.3.2. Izolace nukleových kyselin**

RNA jsme ze zamražených buněk izolovali pomocí modifikované metody podle Chomczynského a Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) případně pomocí RNeasy Mini kitu (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. Kvalita a koncentrace výsledné RNA byla kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, USA) případně kapilární elektroforézou s využitím čipové technologie – Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Pro mutační analýzu jsme ze vzorků izolovali také deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) pomocí DNA blood kitu (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Kvalitu a koncentraci výsledné DNA jsme opět kontrolovali spektrofotometricky.

### 3.3.3. Reverzní transkripce

RNA ve výchozím množství 1 µg byla přepsána do cDNA pomocí kitu iScript (BioRad, Hercules, USA), jenž využívá schopnosti modifikované reverzní transkriptázy MMLV syntetizovat komplementární DNA k templátovému řetězci RNA za použití oligo(dT) a náhodných hexamerových primerů.

### 3.3.4. PCR

Pro přípravu plazmidových konstruktů jsme použili metodu kvalitativní polymerázové řetězové reakce (PCR), která nám umožnila amplifikaci dlouhého úseku genu *WT1* (exon 4 – exon 10), jenž byl následně vložen do plazmidového vektoru a zpracován dle protokolu pro molekulární klonování (viz níže).

Pro amplifikaci templátové cDNA byla připravena reakční směs s následujícím složením: polymeráza AmpliTaqGold (1,25 U) včetně odpovídajícího pufru (Life Technologies, Carlsbad, USA), dNTPs (deoxyribonukleotidy) (200 µM) (Life Technologies, Carlsbad, USA), MgCl<sub>2</sub> (chlorid hořečnatý) (2,5 mM) (Life Technologies, Carlsbad, USA), primery ohraničující požadovanou oblast (200 nM každého primeru; Fwd (exon4): 5'GAATCAGATGAACTTAGGAGC3', Rvs (exon 10): 5'TGTGATGGCGGACTAATTCAT3'), cDNA (10% mixu po reverzní transkripci (RT)) a sterilní vodu. PCR reakce probíhala v přístroji 2720 Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, USA) za následujících reakčních podmínek: 10 min aktivace polymerázy při 95°C, 35 cyklů skládajících se z 30 s denaturace při 94°C, 30 s tzv. „annealing“ (nasedání primerů) při 62°C a 30 s amplifikace při 72°C. PCR reakce byla zakončena 10-minutovou finální amplifikací při 72°C.

Princip kvalitativní PCR byl využit také pro stanovení mutačního stavu genu *WT1* (viz níže). Výsledné PCR produkty jsme elektroforeticky separovali na 2% agarózovém gelu (UltraPure Agarose; Life Technologies, Carlsbad, USA) případně kapilární elektroforézou (Agilent 2100 bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) pro zjištění nespecifických amplifikací. Pomocí velikostního standardu byla stanovena jejich délka.

### 3.3.5. qPCR

#### *Detekce celkové exprese genu WT1*

Pro stanovení exprese genu *WT1* a kontrolního genu *ABL* (Abelson gene) byla použita metoda qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) (Boublikova, Kalinova *et al.* 2006). Reakční směs obsahovala tyto složky: 2x Universal Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA), forward a reverse primery (300 nM každého), detekční sonda pro *ABL* respektive *WT1* s fluorescenční značkou 6FAM (6-carboxyfluorescein) a zhasičem TAMRA (tetramethylrhodamine) (200 nM), cDNA (10% RT mixu) a sterilní voda. Sekvence primerů a sond jsou uvedeny v Tabulce 2 Přílohy 1. PCR reakce probíhala ve dvou přístrojích – LightCycler 480 (Roche, Basel, Švýcarsko) a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA) s následujícími reakčními podmínkami: 2 min 50°C; 10 min 95°C a 50 cyklů skládajících se z 15 s při 95°C a 60 s při 60°C.

Reakce stanovující počet kopií mRNA *WT1* byla provedena v triplikátu, reakce pro *ABL* v duplikátu. Konkrétní počet kopií pro daný gen byl stanoven na základě výpočtu analyzačního softwaru přístroje, jenž vychází z parametrů standardní křivky kalibrátorů. Pro gen *ABL* jsme použili komerční kalibrátory (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) zatímco pro gen *WT1* jsme použili námi připravené plazmidy se zaklonovanými fragmenty *WT1*.

Výsledný počet kopií *WT1* byl normalizován ke kontrolnímu genu *ABL* dle následujícího výpočtu (*WT1* NCN (normalised copy number)).

$$WT1 (NCN) = \frac{\text{počet kopií } WT1 \times 10000}{\text{počet kopií } ABL}$$

Gen *ABL* byl vybrán jako dostatečně stabilní tzv. „housekeeping“ gen pro analýzu jak leukemických vzorků a zdravých kontrol tak i sortovaných subpopulací jednotlivých stádií krevtvorby.

Pro stanovení hladiny exprese genu *WT1* v rámci mezinárodní spolupráce jsme použili odlišný qPCR systém publikovaný Dr. Willaschem. Reakční směs v tomto případě obsahovala 2x Universal Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA), forward a reverse primery (250 nM pro gen *WT1*; 300 nM pro gen *ABL*), fluorescenčně značenou sondu pro *ABL* (200 nM) respektive *WT1* (100 nM), cDNA (10% RT mixu) a sterilní vodu. Sekvence primerů a sond viz (Willasch, Gruhn *et al.* 2009). Reakce byla



provedena vždy v duplikátu na přístroji iCycler IQ (BioRad, Hercules, USA) s reakčními podmínkami stejnými jako v předchozím případě. Pro určení výchozího počtu kopií *ABL* a *WT1* jsme použili kalibrátory těchto genů, vyrobené v naší laboratoři (*WT1*) nebo získané z laboratoře Dr. Cazzanigy (*ABL*).

#### *Detekce exprese izoformem genu WT1*

Navržení a optimalizace detekčního systému umožňujícího kvantifikaci izoformem genu *WT1* je problematické, neboť délka amplifikovaného úseku (cca 460 bp) výrazně přesahuje amplikony běžně používaných qPCR systémů. Jednou z dalších komplikací je také sekvenční homologie KTS + a KTS - variant genu *WT1*. Při vývoji takto komplikované metodiky jsme použili několik přístupů, díky nimž se nám podařilo výše zmíněné problémy překonat. Kromě různých PCR mixů a enzymů jsme testovali také nejrůznější typy primerů včetně primerů se zavedenými tzv. „mismatch“ nukleotidy atd.

Pro dosažení co nejvyšší specifity a senzitivity systému jsme použili tzv. „touch-down“ typ amplifikace, kdy dochází v prvních cyklech PCR k velmi specifické amplifikaci daného produktu při vyšší teplotě a následně k maximálně účinné amplifikaci produktu při optimálních, nižších teplotách.

Reakční směs obsahovala polymerázu Fast Start Taq (1 U) včetně odpovídajícího pufru (Roche, Basel, Švýcarsko), dNTPs (800 uM) (Life Technologies, Carlsbad, USA), MgCl<sub>2</sub> (2 mmol) (Life Technologies, Carlsbad, USA), primery vždy ohraničující požadovanou oblast pro každou izoformu *WT1* (600 nM), fluorescenčně značenou sondu stejnou pro všechny izoformy *WT1* (200 nM), cDNA (10% mixu RT) a sterilní vodu. Sekvence navržených primerů a sond jsou uvedeny v Tabulce 2 Přílohy 1. PCR reakce probíhala za těchto podmínek: 2 min 50°C; 10 min 95°C, 10 cyklů touch down (15 s 95°C a 60 s při 67 – 62,5 °C). Následovalo 40 standardních cyklů (15 s 95°C a 60 s 62°C).

Pro kvantifikaci izoformem *WT1* jsme použili dva typy přístrojů - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA) a LightCycler 480 (Roche, Basel, Švýcarsko). Reakce pro všechny 4 izoformy byly vždy provedeny v triplikátu. Vzorek byl hodnocen jako pozitivní pokud alespoň jedna reakce z triplikátu byla pozitivní, zatímco negativní vzorek byl negativní ve všech replikátech. Expresní vzorec variant genu *WT1* byl vyjádřen jako poměr jednotlivých izoformem vůči jejich součtu.

### *Detekce exon 5 +/- a KTS +/- izoforem genu WT1*

Alternativní metodikou pro kvantifikaci exprese izoforem *WT1* je systém, který detekuje zvlášť exon 5 +/- respektive KTS +/- izoformy. Reakční směsi konkrétních reakcí obsahovaly 2x Universal Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA), primery (300 nM) a fluorescenčně značenou sondu (200nM) navržené tak, aby detekovaly vždy přítomnost či absenci jednoho z inzertů, cDNA (10% RT mixu) a sterilní vodu. Sekvence primerů a sond viz Tabulka 2 Přílohy 1. Pro tento způsob kvantifikace izoforem *WT1* jsme použili přístroje LightCycler 480 (Roche, Basel, Švýcarsko) a Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA). Reakční podmínky byly identické jako v případě amplifikace celkového genu *WT1* resp. *ABL*.

Výsledný poměr jednotlivých variant jsme získali vynásobením takto získaných dílčích poměrů vůči sobě. Vynásobením (exon 5 -) x (KTS -) tak získáme množství izoformy A; (exon 5 +) x (KTS -) odpovídá izoformě B; (exon 5 -) x (KTS +) izoformě C a (exon 5 +) x (KTS +) izoformě D.

### **3.3.6. Kapilární elektroforéza a fragmentační analýza - GeneScan**

Unikátní metodu kvantifikace izoforem genu *WT1* pomocí qPCR jsme ověřili referenční semikvantitativní metodou publikovanou pracovní skupinou Dr. Kruga. Jedná se o kvalitativní PCR v kombinaci s kapilární elektroforézou a následnou fragmentační analýzou. V rámci této metody byl úsek genu *WT1* (exon 4 – exon 10) amplifikován pomocí forward a reverse primerů, z nichž jeden je fluorescenčně značený (sekvence primerů a metodika viz (Krug, Yasmeen *et al.* 2009)).

PCR produkty jsme následně separovali pomocí kapilární elektroforézy a fragmentační analýzou jsme zjistili délku a koncentraci jednotlivých fragmentů odpovídajících konkrétním izoformám *WT1*.

### **3.4. Pěstování leukemických linií**

Leukemické linie Kasumi-1, NB-4, MV4;11, K562, RS4;11, REH, NALM6, UOCB6 a testikulární linie TCam jsme pěstovali v kultivačním médiu RPMI1640 (Life technologies, Carlsbad, USA) s 10% fetálním sérem (FBS) (Life technologies, Carlsbad, USA) a antibiotiky (Life Technologies, Carlsbad, USA). Adherentní linie testikulárních nádorů byly kultivovány v médiích RPMI1640 ATCC Modification (Life

technologies, Carlsbad, USA) v případě NCCIT a McCoy's 5A (ATCC, Manassas, USA) v případě NTerra2. Veškeré buněčné linie byly pěstovány v kultivátorech s 5 % CO<sub>2</sub> (HERAcell 150 CO<sub>2</sub> (ThermoScientific, Wilmington, USA).

### 3.5. Klonování

Plazmidové kalibrátory pro kvantifikaci genu *WT1* a jeho jednotlivých izoform byly připraveny pomocí TOPO TA Cloning kitu (Life Technologies, Carlsbad, USA). Kalibrátory pro kvantifikaci genu *ABL* jsme získali z laboratoře Dr. Cazzanigy, kde byly vytvořeny vložením úseku genu *ABL* do Phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOS) vektoru (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, Velká Británie).

Pro přípravu kalibrátorů *WT1* izoform jsme do PCR 2.1/4.0 TOPO vektoru vložili úsek genu *WT1* amplifikovaný pomocí PCR reakce s primery lokalizovanými v oblasti exonu 4 a 10, tak aby pokrýval všechny 4 izoformy *WT1*. Takto připraveným vektorem jsme pomocí tepelného šoku transfekovali kompetentní buňky *E. Coli*, které byly následně vysety na odpovídající selekční půdy InMedia AmpBlue (Life Technologies, Carlsbad, USA). Vybrané kolonie obsahující vektor s vloženým úsekem genu *WT1* byly namnoženy v LB médiu (Luria Broth Base; Life Technologies, Carlsbad, USA). Pomocí PCR s primery M13 (bakteriofág M13), jejichž sekvenci obsahuje PCR 2.1 TOPO vektor, a následnou sekvenační analýzou byly vybrány 4 klony, které obsahovaly vždy jednu z izoform *WT1*. Masivní amplifikací těchto buněčných klonů jsme připravili zásobní aliquoty plazmidů. Pro izolaci plazmidové DNA z transfekovaných buněk jsme použili MiniPrep DNA plasmid kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Koncentrace plazmidů byla ověřena spektrofotometricky.

Z takto vytvořených plazmidů jsme připravili standardní ředící řady kalibrátorů obsahující izoformu A, B, C či D v množství  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^1$  kopií na 5  $\mu$ l. Plazmidovou DNA jsme vždy ředili do cizorodé DNA, která umožňuje zachování přirozeného genetického pozadí ve vzorku (Salmon sperm DNA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Tímto postupem byly připraveny jak *WT1* kalibrátory používané v rámci standardizované metodiky detekce *WT1* (Willasch, Gruhn et al. 2009) tak i *WT1* kvantifikátory používané v metodice MUDr. Boublíkové (Boublikova, Kalinova et al. 2006) a také kalibrátory pro kvantifikaci izoform *WT1*. V posledních dvou jmenovaných případech byly plazmidy před přípravou dilučních řad linearizovány

pomocí restriční endonukleázy FastDigest EcoRI (ThermoScientific, Wilmington, USA).

### 3.6. Mutační analýza

Analýza mutačního stavu genu *WT1* pacientů s AML byla provedena v rámci mezinárodní pracovní skupiny European Study Group on *WT1* Expression in Childhood AML. Pro mutační analýzu všech exonů na DNA resp. cDNA úrovni 91 pacientů s AML jsme použili metodiky, které publikovaly Dr. Hollink (Hollink, van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2009) a Dr. Gaidzik (Gaidzik, Schlenk *et al.* 2009). Obě tyto metody jsou z hlediska mutační analýzy genu *WT1* srovnatelné.

Produkty sekvenčních reakcí byly přečištěny pomocí MiniElute PCR Purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo), sekvenovány na přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, USA) a analyzovány v softwaru Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, USA). Výsledky jsme korelovali s celkovou hladinou exprese genu *WT1* detekovanou pomocí qPCR systému používaného v rámci mezinárodní spolupráce a u části pacientů také systémem lokalizovaným do oblasti exonu 1 a 2, tedy mimo oblast častého výskytu mutací (Gottardi E 2005).

### 3.7. Detekce proteinu WT1

Detekce proteinu WT1 patří z metodického hlediska k obtížnějším technikám vzhledem k nízké koncentraci proteinu WT1 a to zejména v klinických vzorcích pacientů i zdravých kontrol. K detekci proteinu WT1 lze využít imunohistochemii (IHC), imunofluorescenční mikroskopii (IFM), průtokovou cytometrii (PC) a Western blot. V rámci této studie byly použity metody IFM, PC a Western blot.

#### *Imunofluorescenční detekce proteinu WT1*

V sortovaných buněčných populacích jsme protein WT1 detekovali metodou IFM. Přibližně 10 000 buněk od každé populace jsme pomocí cytopsinu nanесли na podložní sklíčko, následně fixovali 3% paraformaldehydem (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), fixovali 0,1% Tritonem X-100/PBS a blokovali směsí 0,05% Tween-20 (BioRad, Hercules, USA) a 5% BSA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo) v PBS. Králičí monoklonální protilátka anti-WT1 (1:20; EP1131Y, Novus Biologicals, Littleton, USA)

byla použita jako primární protilátka (60 min při 37°C). Pro sekundární značení jsme zvolili protilátku Alexa Fluor 488 (goat anti rabbit, 1 : 1000; Life technologies, Carlsbad, USA). Fluorescenční značení jader analyzovaných buněk jsme provedli barvením DAPI/PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Buňky byly analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon TE2000E, Nikon, Tokyo, Japonsko).

Účinnost námi používané primární protilátky jsme validovali analýzou proteinu WT1 výše popsanou metodou za použití nejběžněji používané myší protilátky anti-WT1 (6F-H2, Dako, Glostrup, Dánsko).

#### *Detekce proteinu WT1 pomocí průtokové cytometrie*

V kontrolních vzorcích KD a PK byla exprese proteinu WT1 stanovena také pomocí průtokové cytometrie. Buňky promyté v PBS jsme nejdříve označili protilátkami proti povrchovým antigenům lymfoidních a myeloidních buněk. Potom jsme je preparovali pomocí kitu Fix and Perm (Fix and Perm Catlag kit; An Der Group Bioresearch, Kaumberg, Rakousko) a inkubovali se stejnou primární a sekundární protilátkou proti WT1 jako při IFM detekci proteinu WT1 (primární v ředění 1 : 2, sekundární 1 : 10). Vzorky byly poté ihned analyzovány na přístroji LSR II (BD, San José, USA).

#### *Detekce proteinu WT1 pomocí Western Blotu*

V rámci této metody byl z iniciální suspenze buněk připraven proteinový lyzát. K buňkám promytým vychlazeným PBS jsme přidali lyzační RIPA pufr s následujícím složením - NaF (Fluorid sodný), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (ortovanadát sodný) PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluorid), inhibitor proteáz (7x komplete), MgCl<sub>2</sub> (chlorid hořečnatý) a lyzační pufr (Triton-X-100, SDS (sodiumdodecylsulfát), EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), NaCl (chlorid sodný), Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethane a kyselina chlorovodíková). Po přidání RIPA pufru jsme buňky cca 10 s sonikovali (Model 150VT Ultrasonic Homogenizer, Biologics, Inc., Manassas, USA), stočili a výsledný supernatant skladovali v - 80°C. Koncentrace takto připravených proteinových lyzátů byla stanovena pomocí DC Protein Assay (BioRad, Hercules, USA). Na základě vypočítaného množství jsme připravili nanášecí směs vzorku obsahující stabilizující „sample buffer“ (stacking buffer (viz níže), glycerol, SDS, 2-Mercaptoethanol, Bromphenol Blue (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), a dH<sub>2</sub>O.

Vzorky včetně velikostního standardu byly separovány na 10% polyakrylamidovém gelu. Separační gel o složení – TrisBase (BioRad, Hercules, USA), SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), HCl, akrylamide stock (BioRad, Hercules, USA), TEMED (BioRad, Hercules, USA), APS (Ammonium persulfáte; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a dH<sub>2</sub>O byl po ztuhnutí převrstven řidším zaostřovacím gelem a zalit odpovídajícím pufrem (TrisBase (BioRad, Hercules, USA), Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a dH<sub>2</sub>O). Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) proběhla na aparatuře Power PAC 200 (BioRad, Hercules, USA). Proteiny rozdělené podle své velikosti byly poté z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu (BioRad, Hercules, USA) pomocí iBlot 7-Minute Blotting System (Life technologies, Carlsbad, USA). Membránu s navázanými proteiny jsme následně blokovali 1 hod 5% roztokem mléka (BioRad, Hercules, USA) v PBS-Tween a poté inkubovali přes noc v primární králičí monoklonální protilátce anti-WT1 (Novus Biologicals, EP1131Y, Novus Biologicals, Littleton, USA) v koncentraci 1 : 2000. Následující den jsme membránu promyli v PBS-Tween a inkubovali se sekundární protilátkou (goat anti-rabbit; BioRad, Hercules, USA) v 1 % roztoku mléka v PBS-Tween. Pro vizualizaci navázané protilátky jsme použili Immun-Star AP Chemiluminescence kit (BioRad, Hercules, USA). Výsledná chemiluminiscence byla zachycena na světločivém filmu, který byl následně vyvolán na přístroji OptiMax X-ray Processor (ClassicXray, Rolla, USA).

Pro kontrolu přesnosti nanášení jsme použili myší protilátku proti B-aktinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po hodinové inkubaci a následném promytí v PBS-Tween jsme membránu inkubovali v sekundární protilátce (rabbit anti-mouse; BioRad, Hercules, USA). Vizualizaci navázané protilátky proti B-aktinu jsme provedli výše popsaným postupem.

### **3.8. Průtoková cytometrie**

V rámci léčebných protokolů pacientů s akutními leukémiemi je v laboratořích CLIP pomocí standardního panelu monoklonálních protilátek vyšetřován imunofenotyp leukemické populace pacientů. Kromě iniciálního stanovení subtypu leukémie daného pacienta jsme pro tuto studii využili metodu průtokové cytometrie také při analýze množství proteinu WT1 v buňce (viz výše) a pro sortování jednotlivých stádií vývoje hematopoetických buněk (viz níže). V LPC CLIP jsou pro tento typ analýzy k dispozici

přístroje CYAN (Dako, Glostrup, Dánsko), FACS LSR II (BD, San José, USA) a FACS ARIA (BD, San José, USA), který umožňuje nejen analýzu buněk s navázanými protilátkami ale také jejich separaci do požadovaných frakcí.

### 3.9. Sortování buněk

Jednotlivé subpopulace normální kostní dřeně lze charakterizovat na základě unikátní kombinace specifických povrchových molekul – tzv. CD znaků. Vzorky zdravých KD či PK jsme inkubovali s protilátkami detekujícími jednotlivé povrchové molekuly a pomocí 7-barevné průtokové cytometrie jsme z těchto vzorků na přístroji FACS ARIA (BD, San José, USA) vysortovali tato stádia hematopoetického vývoje:

CD34+/38dim-neg/19neg	kmenové buňky
CD34+/38+/33+/19neg	prekurzory myeloidní řady
CD34+/38+/19+	prekurzory B-lymfocytů
CD34neg/38+/33+/4+/14+	monocyty
FSC/SSC	granulocyty
CD3+	T-lymfocyty

### 3.10. Analýza dat a statistická analýza

Výsledky byly zpracovány ve statistickém softwaru Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA) a SPSS 12.0.1. (SPSS, Chicago, USA). Sekvence primerů a sond jsme navrhli v programu Vector NTI 8 Suite Software (Informax, Bethesda, USA). Specifitu jejich vazby k cílové DNA a případnou tvorbu sekundárních struktur jsme testovali v programech Vector NTI 8 Suite Software (Informax, Bethesda, USA) a webové aplikaci NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Data získaná sekvenační analýzou jsme zpracovali v programu Mutation Surveyor 4.0 (SoftGenetics, State College, USA). Charakter nalezených mutací respektive SNP (single nucleotide polymorphism) jsme testovali ve webové aplikaci Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/>). Veškerá data z průtokového cytometru se v laboratořích CLIP analyzují softwarem FlowJo 9.2 (TreeStar, Oregon, USA).

Korelaci detekčních systémů pro celkové WT1 a konkrétní izoformy jsme testovali pomocí „Spearman rank correlation“. Pro porovnání dat mezi danými skupinami jsme

použili neparametrické testy „Mann-Whitney“ či „Kruskal-Wallis“ včetně „Dunn's multiple comparison post-test“. Parametry přežití EFS (event-free survival), OS (overall survival), RFS (relaps-free survival) a CIR (cumulative incidence of relapse) byly hodnoceny pomocí Kaplan-Meierových křivek přežití. Prognostický vliv expresního vzorce izoform genu *WT1* jsme testovali v lineární regresi. Mnohonásobná logistická regrese byla použita pro definici vztahu exprese jednotlivých izoform a typu diagnózy pacientů. Pro vizualizaci tohoto typu analýzy se využívá tzv. „principal component analysis“. Výsledné „heatmaps“ byly zkonstruovány a vizualizovány pomocí hierarchického klastrování (Euclidean metric, Ward linkage clustering).



## 4. Výsledky

### 4.1. Detekce a kvantifikace izoform genu *WT1*

Nezbytnou součástí plánovaných experimentů v rámci našeho projektu bylo navržení a optimalizace metodiky pro detekci a kvantifikaci 4 hlavních izoform genu *WT1* (izoformy A, B, C a D). Podařilo se nám navrhnout systém, který je schopen stanovit expresní vzorec variant *WT1* s dostatečnou specificitou, senzitivitou i reprodukovatelností.

Výsledné parametry detekčního systému:

**Senzitivita:** sklon standardních křivek pro všechny 4 izoformy *WT1* se pohyboval v rozmezí 3,19 - 3,4, intercept 38,45 – 38,87. Plazmidu s danou izoformou o koncentraci  $1 \times 10^5 / 5 \mu\text{l}$  odpovídalo Ct 21,8 – 23 cyklu. Nejmenší ředění standardní řady –  $1 \times 10^1$  bylo stanoveno jako limit senzitivity systému pro všechny varianty *WT1*. Citlivost qPCR reakcí zůstala nezměněna i po přidání nespecifického templátu (ostatní 3 izoformy) do reakce pro danou variantu.

**Specificita:** Námi navrženou metodiku jsme testovali také z hlediska specificity jednotlivých reakcí. Systém amplifikující konkrétní izoformu poskytoval negativní výsledky pro ostatní 3 izoformy; pouze při velmi vysoké koncentraci kontaminující izoformy docházelo k detekci slabého signálu (Ct cca 41. cyklus) vždy o více než 6 cyklů za specifickou izoformou v nejnižší koncentraci.

**Reproducibilita:** Při testování reproducibility jsme provedli analýzu vzorků leukemických linií v 6-plikátu (biologický replikát) a také opakovanou analýzu vybraných vzorků. Variabilita mezi replikáty resp. opakovanými výsledky byla minimální. Dosáhli jsme excelentní korelace mezi hladinou celkového *WT1* a součtem všech 4 izoform (korelační koeficient 0,972,  $p < 0,0001$ , Obr. 5). Hladina celkového *WT1* byla pro daný vzorek vždy o cca 0,5 – 1 řád vyšší než součet variant *WT1* (viz Obr. 6).

V rámci testování parametrů detekčního systému jsme pomocí dilučních experimentů stanovili nejnižší počet kopií celkového *WT1* resp. součtu izoform *WT1*, při kterém analýza poměru sestřihových variant *WT1* ještě poskytovala spolehlivý výsledek (viz Obr. 7). Pro celkové *WT1* byla tato hranice stanovena na 100 kopií a pro součet izoform 10 kopií. Vzorky, které nesplňovaly tyto parametry, byly z následné analýzy vyřazeny.

#### 4.1.1. Exprese WT1 a jeho izoforem v leukemických liniích

Ve vzorcích leukemických linií (Kasumi-1, NB-4, MV4;11, K562, RS4;11, REH, NALM6 a UOCB6) jsme detekovali variabilní hladiny celkového *WT1* ( $98 - 71\,915$  *WT1/ABL*  $\times 10^4$  NCN; Obr. 8) Analýza expresního vzorce izoforem *WT1* v těchto vzorcích ukázala významné rozdíly v poměru jednotlivých sestřihových variant. Přesto jsme byli schopni identifikovat určité společné znaky, které se vyskytovaly u všech analyzovaných linií – prevalence izoformy D a izoforem obsahujících exon 5 (viz Obr. 9). Poměr izoforem obsahujících či postrádajících KTS inzert vykazoval menší variabilitu než poměr exon 5 +/- variant (viz Obr. 10 a 11).

Experimenty analyzující stabilitu expresního vzorce izoforem *WT1* v průběhu růstu kultury ukázaly zajímavé výsledky. Přestože během kultivace leukemických buněk dochází k mírným fluktuacím celkové hladiny *WT1*, poměr jednotlivých izoforem *WT1* se téměř nemění (viz Obr. 12).

#### 4.1.2. Exprese WT1 a jeho izoforem v kontrolních vzorcích KD a PK a sortovaných subpopulacích kontrolních KD

Medián hladiny celkového *WT1* u zdravých kontrol byl  $29$  *WT1/ABL*  $\times 10^4$  NCN ( $0 - 595$  NCN, Obr. 13). Vzhledem k takto nízkým hodnotám celkového *WT1*, splnil kritéria pro analýzu expresního vzorce izoforem *WT1* (viz kapitola 4.1) pouze 1 kontrolní vzorek KD, kde byl poměr variant *WT1*  $0,12 : 0,18 : 0,17 : 0,53$  pro izoformy A, B, C respektive D. Další dva vzorky umožnily analýzu alespoň exon 5 +/- a KTS +/- variant a následný výpočet poměru jednotlivých variant (viz metodika). Takto získané výsledky byly srovnatelné s daty naměřenými u výše uvedeného vzorku KD –  $0,02 : 0,11 : 0,14 : 0,73$  pro izoformy A, B, C a D. Tyto výsledky naznačují, že ve zdravé KD je poměr izoforem *WT1* stabilní a vyznačuje se převahou izoformy D ( $D > C \approx B > A$ ) (viz Obr. 13).

Pomocí průtokové cytometrie se nám podařilo separovat základní hematopoetické buněčné subpopulace definované expresí povrchových znaků. Tyto subpopulace odpovídaly jednotlivých diferenačním stádiím KD: stádium časných prekurzorů s charakterem kmenových buněk (N=11), myeloidního prekurzoru (N=13), prekurzoru B řady (N=12), dále stádium monocytů (N=13), granulocytů (N=2) a prekurzorů T buněk (N=4). V těchto subpopulacích jsme detekovali odlišné hladiny celkového *WT1* ( $p < 0,0001$ ). Charakteristickým znakem byla vyšší exprese *WT1* v kmenových buňkách

a v prekurzorech myeloidní resp. B řady. V pozdějších stádiích vývoje se exprese *WT1* snižuje (Obr. 14).

Populace buněk, které jsou získány separací na průtokovém cytometru jsou obvykle velmi malé. Detekce kontrolního genu i celkové hadiny transkriptu *WT1* se v takovýchto vzorcích pohybuje na hranici detekčního limitu qPCR metodiky. Tyto subpopulace proto nemohly být zařazeny do souboru vzorků analyzovaných na expresní profil izoform *WT1*.

#### 4.1.3. Exprese *WT1* a jeho izoform ve vzorcích pacientů

##### *Expresní vzorce *WT1* a jeho izoform u dětské AML*

Pacienti s dětskou AML exprimovali celkový *WT1* na hladině  $2058 \text{ WT1/ABL} \times 10^4$  NCN (medián, rozmezí 0 – 251 786 NCN; Obr. 13). Signifikantně vyšší hladina *WT1* v diagnostických vzorcích pacientů s dětskou AML ve srovnání s kontrolami umožnila analýzu izoform u 57 vzorků. U naprosté většiny pacientů jsme našli uniformní expresní vzorec izoform *WT1* s převahou izoformy D a srovnatelnými hladinami izoform A a C ( $D > B > C \approx A$ ). Medián poměru konkrétních izoform byl 0,09 : 0,25 : 0,11 : 0,55 pro izoformu A, B, C a D (Obr. 13), přičemž tento poměr byl uniformní i v rámci jednotlivých podskupin AML (definovaných na základě molekulárně genetických či morfologických charakteristik), u kterých jsme pozorovali signifikantně odlišné hladiny celkového *WT1* (viz Obr. 15 a Obr. 16). *FLT3/ITD* + pacienti měli stejný profil izoform *WT1* jako pacienti, kteří tuto mutaci neměli (Obr. 17). Podobně také pacienti standardního rizika exprimovali izoformy *WT1* ve stejném poměru jako pacienti ve skupině vysokého rizika (Obr. 18). Neprokázali jsme korelaci vzorce sestřihových variant *WT1* s rizikem relapsu, či výsledky léčby (Obr. 19).

##### *Expresní vzorce *WT1* a jeho izoform u dětských MDS a AA*

U dětí s MDS jsme našli signifikantně nižší hladiny celkového *WT1* než u pacientů s dětskou AML (medián 196, rozmezí 0 – 4221 *WT1/ABL*  $\times 10^4$  NCN;  $p = 0,003$ ; Obr. 13). Pro RAEB subtyp byla charakteristická vyšší hladina *WT1* a výrazně menší rozptyl naměřených hodnot (medián 638, 325 – 2645 NCN) ve srovnání s RC (medián 22, 0 – 4221 NCN). Dvanáct pacientů s dětským MDS splnilo kritéria pro analýzu izoform *WT1*. Ve srovnání s dětskou AML, byl u těchto pacientů profil variant

*WT1* odlišný a vyznačoval se výraznější variabilitou. Varianta D byla opět převládající izoformou, zatímco ostatní varianty byly exprimovány velmi podobně – čili  $D > C \approx B \approx A$ . (medián poměru A, B, C a D – 0,16 : 0,15 : 0,17 : 0,46; Obr. 13).

Aplastická anemie je charakteristická velmi nízkou expresí celkového *WT1* (medián 4, rozmezí 2 – 26 *WT1/ABL* x 10<sup>4</sup> NCN; Obr. 13). Proto u pacientů s tímto typem diagnózy nebylo možné provést analýzu expresního vzorce izoform *WT1*.

#### *Expresní vzorce WT1 a jeho izoform u dospělé AML s MDS*

Celková hladina genu *WT1* u dospělých AML byla srovnatelná s hodnotami nalezenými u dětské AML (medián 3446 *WT1/ABL* x 10<sup>4</sup> NCN, rozpětí 2 – 23579; Obr. 13). Srovnatelný byl i profil izoform *WT1* u 27 analyzovaných pacientů s dospělou AML ( $D > B > C \approx A$ ), který se však vyznačoval výrazně nižší variabilitou mezi jednotlivými vzorky (0,13 : 0,31 : 0,13 : 0,45 pro izoformy A, B, C a D) (Obr. 13). Analýza morfologicky či molekulárně geneticky definovaných podskupin neukázala žádné signifikantní rozdíly. Identický profil izoform *WT1* jsme našli také u pacientů standardního resp. vysokého rizika, či *FLT3/ITD* pozitivních resp. negativních pacientů. Dospělí s AML, kteří zrelabovali, měli srovnatelný vzorec izoform *WT1* jako ti, kteří zůstávají v kompletní remisi. Nalezli jsme pouze nesignifikantní trend k vyššímu riziku relapsu u pacientů s vyšším relativním množstvím izoformy B (logistická regrese  $p = 0,063$ , Chi-kvadrát test  $p = 0,021$ ).

Dvacet devět dospělých pacientů s MDS expimovalo celkový *WT1* na hladině podobné dětskému MDS (medián 65, rozpětí 1 – 3146 *WT1/ABL* x 10<sup>4</sup> NCN; Obr. 13). Poměry izoform *WT1* vykazovaly opět vyšší variabilitu s převahou izoformy D a rovnoměrně exprimovanými ostatními variantami ( $D > C \approx B > A$ ) – konkrétně 0,12 : 0,22 : 0,21 : 0,41 pro A, B, C a D (Obr. 13).

#### *Expresní vzorce izoform WT1 – vztah k jednotlivým diagnózám*

Výsledky nesupervidovaného hierarchického klastrování ukázaly, že expresní vzorec izoform *WT1* je schopen rozdělit pacienty do skupin představujících jednotlivé diagnózy. Pacienti jsou takto rozdělení signifikantně lépe než podle hladin celkového *WT1* ( $p < 0,0001$ ; Obr. 20). Z výsledků analýzy také vyplývá, že je profil izoform *WT1* naprosto nezávislý na hladině celkového *WT1*.

#### *Exon 5 +/- a KTS +/- poměr ve vzorcích pacientů*

Výraznější rozptyl poměru exon 5 +/- variant ve srovnání s KTS +/- nalezený u leukemických linií jsme pozorovali i u patientských vzorků. Exon 5 +/- poměr se lišil více mezi jednotlivými diagnózami ( $p < 0,001$ ) zatímco KTS +/- poměr závisel více na věku pacientů nezávisle na typu diagnózy ( $p < 0,001$ ; Obr. 21).

## **4.2. Prognostický význam exprese celkového WT1 u dětské AML**

### *Mezinárodní spolupráce v rámci „European Study Group on WT1 Expression in Childhood AML“*

Pracovní skupina sdružující významná výzkumná centra v Německu, Itálii a České republice, vznikla ve snaze definovat význam genu *WT1* u dětské AML. Jedním z prvních úkolů byl vývoj, optimalizace a zejména standardizace metodiky detekce genu *WT1*, tak aby bylo možné analyzovat vzorky nezávisle v různých laboratorních centrech. V rámci standardizace této metody proběhlo několik kol kontroly kvality tak, aby byla zaručena reproducibilita získaných dat (Willasch, Gruhn et al. 2009).

V rámci spolupráce se nám podařilo získat více než 200 konsektivních diagnostických vzorků dětí s AML, což vzhledem k obecně nízkému počtu pacientů s tímto typem diagnózy představuje rozsáhlý a reprezentativní soubor.

### *Prognostický význam hladiny mRNA genu WT1*

V pilotní studii, zahrnující pacienty z České republiky a Německa, jsme analyzovali vztah diagnostické hladiny *WT1* u dětské AML s prognózou těchto pacientů. Vzhledem k odlišné léčebné strategii pacientů s APL (N=16) jsme provedli jak analýzu celé kohorty pacientů tak i analýzu kohorty bez APL pacientů (N=195). Medián hladiny genu *WT1* při diagnóze byl 2014 (rozmezí 0 – 235775)  $WT1/ABL \times 10^4$  NCN a 1779 (rozmezí 0 - 235775)  $WT1/ABL \times 10^4$  NCN pro všechny pacienty respektive pacienty bez APL. Nalezli jsme signifikantně vyšší expresi *WT1* ve skupině vysokého rizika ve srovnání s pacienty standardního rizika ( $p < 0,0001$  a  $p = 0,0014$  pro všechny pacienty respektive pacienty bez APL; viz Obr. 22).

Nejvyšší hladinu *WT1* jsme detekovali u AML M3 (N = 16; medián 7959  $WT1/ABL \times 10^4$  NCN), naopak nejméně exprimovali *WT1* pacienti s AML M5 (N = 44; medián 10  $WT1/ABL \times 10^4$  NCN; viz Obr. 23). Přítomnost prognosticky příznivých

znaků  $t(15;17)$ ,  $t(8;21)$  či  $inv16$  signifikantně korelovala s vysokou expresí *WT1*, zatímco pacienti s translokacemi *MLL* genu měli nejnižší expresi *WT1* ( $p < 0,0001$ ) (viz Obr. 24). Ve skupině pacientů s *FLT3/ITD* ( $N = 23$ ) jsme detekovali signifikantně vyšší hladinu *WT1* než u pacientů bez této aberace ( $p = 0,0001$  pro všechny pacienty i pacienty bez APL; viz Obr. 25).

Neprokázali jsme souvislost hladiny exprese *WT1* s pohlavím či iniciálním počtem leukocytů ať již v kohortě všech pacientů či kohortě bez APL. Ve skupině vysokého rizika jsme našli nesignifikantní trend ( $p > 0,05$ ) k vyšší expresi *WT1* při diagnóze u pacientů s  $> 5\%$  blastů v d15 iniciální fáze léčby (viz Obr. 26).

Analýza křivek přežití nepotvrdila korelaci hladiny *WT1* a EFS (event free survival) či CIR (cumulative incidence of relapse) ať již v kohortě všech pacientů, pacientů bez APL, či pacientů s NK-AML ( $N=43$ ) (3-letý EFS pro pacienty s  $</> = 140$   $WT1/ABL \times 10^4$  NCN byl 61% vs. 52%,  $p = 0,12$ ; 3-letá CIR byla 39% vs. 35%,  $p = 0,45$ ; viz Obr. 27 a 28).

### **4.3. Mutační analýza genu *WT1* u pacientů s AML**

Mutace v genu *WT1* jsme našli u 13 pacientů z 91 analyzovaných dětí (14,2 %). U části mutovaných pacientů byla prokázána aberace zasahující do oblasti nasedání reverzního primeru námi používaného systému pro detekci celkové exprese *WT1*. Porovnáním exprese *WT1* u mutovaných resp. nemutovaných pacientů jsme neprokázali negativní vliv těchto aberací na celkovou hladinu transkriptu *WT1*. Pacienti s mutací v genu *WT1* měli naopak signifikantně vyšší hladinu *WT1* ( $p < 0,01$ ; Obr. 29). Část vzorků ( $N=5$ ) byla proto analyzována také alternativním qPCR systémem detekce *WT1*, který potvrdil výše zmiňovanou overexpresi celkového *WT1* u mutovaných pacientů. Zajímavým výsledkem je také vysoká exprese *WT1* nalezená u pacienta s bialelickou mutací v genu *WT1*. Neprokázali jsme souvislost hladiny exprese genu *WT1* s přítomností nejčastějšího jednonukleotidového polymorfismu SNP rs16754 (viz Obr. 30).

### **4.4. Srovnání exprese genu *WT1* ve vzorcích KD a PK pacientů s dětskou AML**

Pro srovnání hladin exprese *WT1* ve vzorcích KD a PK a jejich případnému využití pro sledování MRN u dětské AML byla provedena analýza párových diagnostických

vzorků KD a PK 90 dětských pacientů s AML. V rámci této analýzy byl zpracován také soubor 24 vzorků zdravých kontrolních KD a PK.

Fyziologická exprese genu *WT1* ve zdravých KD a PK byla 28 respektive  $1,4 \text{ WT1/ABL} \times 10^4 \text{ NCN}$  (rozmezí 8 – 115 a 0,2 – 13,2 NCN). Ve vzorcích KD pacientů s AML byla exprese *WT1* o přibližně 0,2 řádů vyšší než v jejich PK (medián 2587 (rozpětí 0 – 57065)  $\text{WT1/ABL} \times 10^4 \text{ NCN}$  pro KD a 1640 (rozpětí 0 – 16517)  $\text{WT1/ABL} \times 10^4 \text{ NCN}$  pro PK;  $p = 0,02$ ; viz Obr. 31). Aberantně zvýšená exprese *WT1* byla nalezena u 76 % a 80 % vzorků KD respektive PK.

Výsledky této analýzy ukázaly, že rozdíl v expresi *WT1* mezi zdravou tkání a leukemickými vzorky je v případě PK 3,1 řádu zatímco v KD je tento rozdíl pouze 2 řády (viz Obr. 32).

Srovnání párových hladin *WT1* v PK a KD ukázalo excelentní korelaci naměřených hladin (korelační koeficient 0,89,  $P < 0,0001$ ; viz Obr. 33), nicméně nebyla prokázána korelace mezi hladinou exprese *WT1* v KD respektive PK a procentuálním zastoupením blastů.

Pacienti s AML M3 exprimovali gen *WT1* na nejvyšší hladině (jak na úrovni KD tak i PK) zatímco pro subtyp AML M5 byla charakteristická nejnižší hladina *WT1* ( $p < 0,0001$  pro KD i PK; viz Obr. 34). Pacienti standardního rizika měli expresi *WT1* signifikantně vyšší ve srovnání se skupinou vysokého rizika ( $p < 0,0001$  pro KD i PK).

V rámci analýzy nebyla prokázána korelace hladiny exprese *WT1* s věkem, pohlavím pacientů či jejich odpovědí na iniciační fázi léčby. Podobně také nekoreluje exprese genu *WT1* s výsledky léčby, neboť pacienti, kteří zrelabovali, měli srovnatelnou hladinu *WT1* v KD i PK s těmi, kteří jsou v remisi. V případě analýzy PK však byl naznačen nesignifikantní trend k lepšímu přežití u pacientů s vyšší expresí *WT1* (viz Obr. 35 a 36).

#### **4.5. Prognostický význam před- a potransplantační hladiny exprese genu WT1 a jeho možné využití pro sledování MRN u dětí s AML**

V rámci této části studie byly zpracovány vzorky KD 20 pacientů s dětskou AML. Kromě diagnostických vzorků byly do analýzy zařazeny také vzorky před a po TKD. U části pacientů (N=15) byly k dispozici také vybrané vzorky odebrané v průběhu jejich následné léčby případně při relapsu.

Pacienti, kteří prodělali relaps leukemie, měli hladinu *WT1* při relapsu srovnatelnou s expresí *WT1* v době diagnózy (medián 1585 respektive 2512 *WT1/ABL* 10<sup>4</sup> NCN). V kompletní hematologické remisi se exprese *WT1* v KD pohybovala v mezích jeho fyziologické hladiny (Obr. 37). U 4 z 5 pacientů, u kterých byl materiál k dispozici, byla exprese genu *WT1* v posledním vzorku odebraném před hematologickým relapsem srovnatelná s hodnotami, které nacházíme ve zdravé KD (viz Obr. 38).

Vzhledem k některým recentním publikacím, které naznačily význam před- respektive potransplantační hladiny genu *WT1* byla provedena také analýza prognostického významu exprese *WT1* v těchto časových bodech. Mezi pacienty, kteří po TKD zrelabovali, a pacienty zůstávající v kompletní remisi, jsme neprokázali signifikantní rozdíl v expresi *WT1* ať již v před- nebo potransplantačních vzorcích (Obr. 39 - 42).

#### **4.6. Srovnání hladin exprese WT1 na úrovni mRNA a proteinu**

V rámci projektu bylo provedeno srovnání hladin mRNA a proteinu WT1 ve vzorcích leukemických linií a linií germinálních nádorů varlat detekovaných pomocí qPCR a Wester blotu, IFM či PC.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1.2, v sortovaných subpopulacích zdravé KD a PK jsme detekovali odlišné hladiny genu *WT1* ( $p < 0,0001$ ; viz Obr. 14). Analýza proteinu WT1 pomocí IFM ukázala velmi podobné výsledky. Vysokou expresi proteinu WT1 nacházíme v nezralých kmenových buňkách a prekurzorech myeloidní resp. B buněčné řady. V pozdějších stádiích hematopoetického vývoje je podobně jako v případě mRNA i exprese proteinu WT1 výrazně nižší (viz Obr. 43).

Výsledky získané imunofluorescenční mikroskopií byly potvrzeny průtokovou cytometrií, která opět prokázala vysokou expresi v kmenových buňkách a nezralých progenitorech a velmi nízkou hladinu WT1 v periferní krvi.

Ve vybraných leukemických liniích a liniích TGCTs jsme porovnali expresi mRNA s proteinem WT1 detekovaným pomocí Western blotu. Výsledky analýzy však nepotvrdily korelaci těchto dvou hladin. Z Obr. 44 je patrné, že i ve vzorcích linií, které mají velmi vysokou hladinu mRNA genu *WT1*, byla detekována nízká hladina proteinu WT1. Naopak linie s nízkou expresí mRNA měly hladinu proteinu WT1 vysokou.



#### 4.7. Diferenciálně diagnostický algoritmus pro pacienty s RC MDS s použitím kvantifikace mRNA WT1

V této části práce jsme spolupracovali s laboratoří průtokové cytometrie CLIP na pilotním projektu identifikace nových faktorů, které by pomohly lépe rozlišit dětský MDS typu RC od AA. Při PC analýze vzorků bylo prokázáno signifikantně vyšší zastoupení CD34<sup>poz</sup> a CD117<sup>poz</sup> prekurzorů u pacientů s RC než u AA ( $p=0,0017$  (CD34);  $p = 0,00041$  (CD117)). Naopak, pacienti s AA mívají vyšší množství lymfocytů včetně CD19<sup>poz</sup> a CD3<sup>poz</sup> buněk ( $p = 0,000011$  (CD19);  $p = 0,048$  (CD3)). Poměr CD19/CD34 se zdá být parametrem nejlépe rozlišujícím RC a AA ( $p < 0,00001$ ).

U těchto pacientů jsme detekovali také expresi genu *WT1*. Podobně jako v předchozí kohortě dětských MDS a AA (viz 4.1.3.), jsme našli nejvyšší hladinu *WT1* u pacientů s MDS RAEB (medián 794 (rozpětí 325 – 2645) *WT1/ABL* x 10<sup>4</sup> NCN) a JMML (zde se však jedná pouze o jednoho pacienta; 545 *WT1/ABL* x 10<sup>4</sup> NCN; viz Obr. 45). Pacienti s MDS RC sice exprimují *WT1* na nižší hladině, nicméně ve srovnání s AA se vyznačují signifikantně vyšší expresí *WT1* ( $p = 0,0047$ ). Hladina *WT1* koreluje s procentuálním zastoupením CD34<sup>poz</sup> prekurzorů u pacientů s AA (korelační koeficient  $R = 0,74$ ;  $p = 0,034$ ), nikoliv u pacientů s RC ( $R = 0,5$ ;  $p = 0,2$ ).

V testovaném diagnostickém algoritmu pro rozlišení RC a AA je tedy zahrnuto hodnocení CD34<sup>poz</sup>, CD117<sup>poz</sup> prekurzorů, poměru CD19/CD34 a hladiny *WT1*. Na základě našich výsledků lze říci, že tato kombinace parametrů může významně přispět k diferenciaci obou typů onemocnění.

## 5. Diskuze

Gen *WT1* je dlouhodobě studován u hematologických malignit i solidních tumorů. Možný význam exprese *WT1* pro vznik a rozvoj nemoci byl popsán u dospělých pacientů s akutními leukémiemi, MDS i chronickou myeloidní leukémií (CML). Dosavadní studie také poukazují na potenciál *WT1* v terapii těchto onemocnění ať již v rizikové stratifikaci, sledování MRN či imunoterapii. V oblasti dětských hematologických malignit je však k dispozici jen omezené množství publikací zaměřených na toto téma.

Naše pracovní skupina CLIP (Childhood Leukemia Investigation Prague) přispěla k objasnění role genu *WT1* u dětské AML již pěti pracemi. V první a pilotní studii prognostického významu *WT1* jsme prokázali korelaci hladiny exprese *WT1* s průběhem onemocnění a MRN stanovenou cytometricky u zhruba poloviny analyzovaných pacientů (Trka, Kalinova *et al.* 2002). Na tuto práci navázala MUDr. Boublíková, která ve své studii našla signifikantně nižší hladinu *WT1* u pacientů s ALL ve srovnání s AML. Překvapivě také prokázala negativní prognostický význam jak vysoké tak i nízké iniciační exprese *WT1* (Boublikova, Kalinova *et al.* 2006). V roce 2009 jsme v rámci mezinárodní pracovní skupiny European Study Group on *WT1* Expression in Childhood AML publikovali univerzální a standardizovanou qPCR metodu kvantifikace genu *WT1* (Willasch, Gruhn *et al.* 2009). Poslední dvě publikace jsou zaměřeny na izoformy genu *WT1* respektive využití PK pro sledování MRN pomocí *WT1* a jsou podkladem této práce.

V poslední době se objevily dva fenomény, o kterých se předpokládalo, že by mohly vysvětlit řadu diskrepancí, které výsledky studií významu *WT1* u hematologických malignit provázejí. Prvním z nich je přítomnost mutací v genu *WT1*, které nacházíme u cca 10 – 15 % pacientů s AML a mohou ovlivňovat výslednou funkci proteinu WT1. Již od objevu genu *WT1* je také známo, že se v buňce vyskytuje ve více izoformách. Intenzivním studiem v průběhu následujících let byly postupně odhaleny konkrétní role genu *WT1*, které lze připsat přímo těmto jednotlivým variantám *WT1* (Burwell, McCarty *et al.* 2007; Ito, Oji *et al.* 2006; Jomgeow, Oji *et al.* 2006). Jejich konkrétní význam pro vývoj hematologických respektive leukemických buněk však nebyl doposud detailně studován. Jednou z příčin nedostatku relevantních dat je také fakt, že detekce základních izoform (A, B, C a D) pomocí qPCR je vzhledem k délce ampliconů a sekvenční homologii technicky velmi obtížná.

Naším hlavním cílem tedy bylo vyvinout metodiku detekce izoforem *WT1*, která by umožnila spolehlivě stanovit poměry jednotlivých sestřihových variant v normálních a maligních buňkách. Detekční systém, který se nám podařilo navrhnout a optimalizovat, představuje unikátní techniku detekce a kvantifikace izoforem genu *WT1*. Intenzivním testováním jsme také ověřili veškeré parametry metody z hlediska senzitivity, specificity i reprodukovatelnosti. Tato technologie představuje významný nástroj pro studium a pochopení role genu *WT1* a jeho izoforem v nejrůznějších tkáních.

Během testování metody jsme narazili na některé důležité aspekty, které je nutné zvážit při analýze a zejména interpretaci získaných dat. Přestože jsme dosáhli excelentní korelace hladin celkového *WT1* a součtu izoforem, zjistili jsme, že je tento součet o cca 0,5 – 1 řád nižší než celková hladina *WT1*. Rozdíl mezi těmito hodnotami lze vysvětlit jednak tím, že náš qPCR systém detekuje pouze 4 hlavní izoformy a nedetekuje ostatní minoritní varianty (viz kapitola 1.2.2). Nejpravděpodobněji je však tento rozdíl způsoben odlišnou efektivitou systémů pro detekci izoforem resp. celk. hladiny *WT1*, neboť lze předpokládat, že qPCR amplifikující velmi dlouhé úseky DNA bude mít vždy efektivitu nižší.

Další neméně významný výsledek poskytly experimenty s dilučními řadami leukemických linií. Zjistili jsme totiž, že pokud má daný vzorek velmi nízkou hladinu exprese celkového *WT1*, může analýza poměru izoforem *WT1* přinést nepřesné a zkreslující výsledky. Vzhledem k faktu, že většina vzorků normální KD i PK exprimuje *WT1* na nízkých hladinách, měly by být podle našeho názoru doposud publikované rozdíly mezi maligní respektive zdravou KD interpretovány velmi opatrně.

Pomocí této unikátní metodiky jsme provedli analýzu expresního profilu izoforem ve vzorcích leukemických linií, kontrolních KD, pacientů s AML a MDS, které splnily kritéria minimální hladiny celkového *WT1* stanovené v rámci testování metodiky.

Ve vzorcích leukemických linií jsme našli odlišné expresní profily izoforem *WT1*. Nepodařilo se nám však prokázat souvislost těchto profilů s molekulárně genetickými resp. morfologickými charakteristikami linií (REH a UOCB6, které jsou obě pre-B ALL a *TEL-AML1* pozitivní exprimovaly izoformy *WT1* v naprosto jiném poměru, zatímco nejbližší k sobě měly z hlediska variant *WT1* dvě zcela odlišné linie – REH a NALM6). Možné vysvětlení tohoto jevu souvisí s fluktuací celkové hladiny *WT1* v průběhu buněčného cyklu, která byla již dříve popsána (Kerst, Bergold *et al.* 2008). Podobně totiž může kolísat i exprese jednotlivých izoforem. Proto jsme provedli experimenty stanovující stabilitu profilu izoforem *WT1* v průběhu kultivace buněčných linií. Z našich

výsledků vyplývá, že se relativní množství jednotlivých variant *WT1* v průběhu růstu kultury nemění (i přes mírné fluktuace celkové hladiny *WT1*). Exprese izoforem *WT1* tedy není definována fází buněčného cyklu, ale pravděpodobně složitějšími regulačními mechanismy, které zohledňují širší spektrum vlastností imortalizované buňky v buněčné linii.

Zjistili jsme také, že poměr exon 5 +/- izoforem se mezi leukemickými liniemi výrazně liší, zatímco poměr KTS +/- se zdá být stabilnější a tento jev jsme zaznamenali i ve vzorcích pacientů. Podobný fenomén pozorovali také Renshaw *et al.*, kteří během analýzy nejrůznějších vzorků ať již fyziologického či maligního původu zjistili, že KTS +/- poměr se v těchto vzorcích pohybuje ve velmi úzkém rozmezí hodnot, zatímco poměr exon 5 +/- variant je výrazně ovlivněn typem buňky či např. jejím diferenciačním stádiem (Renshaw, King-Underwood *et al.* 1997). Neméně zajímavé výsledky publikovali autoři Kent *et al.*, kteří zjistili, že exon 5 je přítomen pouze u savců a ostatních druhů se nevyskytuje, zatímco KTS inzert detekovali u všech analyzovaných druhů (Kent, Coriat *et al.* 1995). Mezdruhovou stabilitu poměru KTS +/- izoforem pozorovali i autoři předchozí publikace. Je tedy pravděpodobné, že regulace sestřihu těchto dvou inzertů probíhá nezávisle skrze odlišné molekulární mechanismy. Z hlediska karcinogeneze lze předpokládat, že tato regulace může být v průběhu maligní transformace narušena.

Analýza kontrolních vzorků, pacientů s AML a MDS ukázala signifikantní rozdíly mezi jednotlivými typy diagnóz a také mezi dětskými resp. dospělými pacienty. Expresní profil izoforem *WT1* byl schopen spolehlivě rozdělit pacienty do skupin představující konkrétní diagnózu a to signifikantně lépe než celková hladina *WT1*.

U pacientů s dětskou resp. dospělou AML jsme našli překvapivě identický vzorec izoforem *WT1* s převahou izoformy D a exon 5 + variant. Tento profil byl nezávislý na celkové hladině *WT1*, což vyvrací některé spekulace, podle nichž je vysoká hladina celkové exprese *WT1* daná vyšší expresí konkrétní izoformy. Zajímavé také je, že se nalezený profil nelišil mezi molekulárně geneticky a morfologicky definovanými podskupinami AML, přestože se tyto skupiny výrazně odlišují z hlediska hladiny celkového *WT1*.

MDS pacienti vykazovali výraznější rozptyl v relativním množství jednotlivých variant. Převažující variantou sice také byla varianta D, ale ostatní izoformy se vyskytovaly v podobném množství. Tyto výsledky pravděpodobně odrážejí vlastnosti

myelodysplastických buněk a to zejména jejich heterogenitu a různý potenciál k maligní transformaci.

Neprokázali jsme souvislost izoformou *WT1* s rizikem relapsu resp. výsledky léčby. Pouze ve skupině dospělých AML jsme našli trend k horší prognóze u pacientů s vyšší expresí izoformy B. Definitivní stanovení prognostického významu profilu izoformou *WT1* však vyžaduje rozsáhlejší studii.

European Study Group on *WT1* Expression in Childhood AML je na poli *WT1* uznávanou pracovní skupinou. V rámci této skupiny jsme zahájili studii analyzující expresi genu *WT1* u dětských pacientů s AML, léčených v ČR, Německu a Itálii. Jedná se o unikátní analýzu, která pomůže definitivně stanovit prognostický význam genu *WT1* u dětské AML. Význam této studie dokládá jednak velikost souboru pacientů, (finální soubor bude obsahovat více než 350 pacientů), jejich uniformní léčba v rámci protokolu AML-BFM 2004 resp. AIEOP AML 2002/01 a také standardizovaná metodika, díky níž lze kvantifikovat *WT1* na různých pracovištích.

Pilotní analýza 211 pacientů ukázala, že diagnostická hladina *WT1* nemá prognostický význam u dětí s AML, což je v rozporu s většinou doposud publikovaných dat (zejména v oblasti dospělých AML). Finální soubor pacientů umožní stanovit tento prognostický význam i v rámci dílčích podskupin dětské AML, neboť většina doposud publikovaných studií byla pro tento typ separátní analýzy vzhledem k nízkému počtu pacientů nevhodná.

Je také velmi zajímavé, že výsledky analýzy nebyly ovlivněny vyloučením skupiny pacientů s AML M3. Tento subtyp leukémie představuje obtížně hodnotitelnou skupinu pacientů, neboť se jedná o velmi agresivní formu leukémie. S objevem all-trans retinové kyseliny (ATRA), která kompenzuje neschopnost mutovaného receptoru retinové kyseliny reagovat na její fyziologické hladiny, však došlo k dramatickému zlepšení přežití těchto pacientů. Studium klinického významu molekulárně genetických aberací u APL tak může poskytnout zavádějící výsledky. Jako nejvhodnější postup při studiu pacientů s AML se proto jeví výše zmíněná analýza v rámci podskupin definovaných podle morfologických respektive molekulárně genetických charakteristik.

Výsledky analýzy diagnostických hladin *WT1* připravujeme k publikaci a v současné době také zpracováváme data z definovaných časových bodů léčby pacientů. Chtěli bychom tak stanovit prognostický význam hladiny *WT1* i v jiných než diagnostických vzorcích. V rámci této analýzy bychom také rádi definitivně objasnili význam genu *WT1* pro studium MRN u dětí s AML a jejich podskupin.

Jedním z dalších cílů mezinárodní pracovní skupiny bylo stanovení vlivu mutací v genu *WT1* na detekci hladiny celkové exprese *WT1*. Analýzou mutovaných a nemutovaných pacientů jsme zjistili překvapivé výsledky. Pacienti s mutací ve *WT1*, která zasahuje do oblasti nasedání jednoho z primerů našeho systému, měli oproti očekávání vyšší celkovou hladinu *WT1*, kterou jsme potvrdili také alternativním detekčním systémem, který je lokalizován do exonu 1 čili mimo oblasti, ve kterých se mutace nejčastěji vyskytují. Je tedy pravděpodobné, že u pacientů s monoalelickou mutací je exprese *WT1* zajišťována i (nebo výhradně) z druhé alely a tyto mutace proto neinterferují s detekčními qPCR systémy.

Velká část studií zaměřených na význam genu *WT1* u dospělé AML je založena na analýze vzorků PK. V případě dětské AML je však KD i nadále preferovanější zdroj leukemických buněk. Analýza párových diagnostických vzorků KD a PK dětí s AML ukázala velmi zajímavé výsledky. Expresní hladina genu *WT1* v PK je sice nižší než v KD, nicméně vzhledem k excelentní korelaci těchto dvou naměřených hodnot a zejména díky výrazně nižší fyziologické expresi *WT1* v PK usuzujeme, že tento materiál poskytuje z klinického hlediska hodnotnější informaci pro sledování MRN pomocí exprese *WT1*.

V další části této práce jsme se zaměřili na analýzu prognostického významu hladin *WT1* ve vzorcích před respektive po TKD. Některé studie poukázaly na možný význam těchto dvou časových bodů pro rizikovou stratifikaci transplantovaných pacientů (Candoni, Tiribelli *et al.* 2009; Zhao, Jin *et al.* 2012). Naše výsledky však tato pozorování nepotvrdily, neboť incidence relapsů byla v námi analyzovaném souboru pacientů naprosto nezávislá na hladině exprese *WT1* před resp. po TKD.

U naprosté většiny pacientů, kteří zrelabovali, jsme nebyli schopni detekovat ve vzorku těsně předcházejícím relapsu hladinu *WT1* vyšší než je jeho fyziologická exprese v KD. Přestože se jedná o malý soubor pacientů, považujeme naše výsledky za relevantní, a nepředpokládáme tedy, že by sledování kinetiky *WT1* v KD představovalo pro pacienty s AML po TKD jakýkoli významný přínos (vzhledem k intervalům mezi aspiracemi KD v potransplantačním období, které jsou pro sledování MRN pomocí *WT1* poměrně dlouhé). Nabízí se samozřejmě otázka, zda by analýza vzorků PK ve stejných nebo dokonce častějších časových bodech neposkytla z hlediska sledování MRN u těchto pacientů přesnější informaci. Relevantní studie v této oblasti však zatím stále chybí.

Studium významu jakéhokoli genu na úrovni mRNA poskytuje z mnoha úhlů pohledu velmi neúplnou informaci. Vzhledem k širokému spektru posttranskripčních a posttranslačních modifikací, které se uplatňují v regulaci genové exprese, nelze jednoduše předpokládat, že hladina exprese genu detekovaná na úrovni mRNA bude přímo korelovat s množstvím jeho proteinu. Nelze také opomenout složitou kaskádu regulačních drah, které mohou ovlivňovat výsledné množství případně i roli daného proteinu. Existuje zatím pouze minimum studií zaměřených na význam genu *WT1* u hematologických malignit, které by přímo detekovaly protein WT1. Přispívá k tomu i fakt, že detekce proteinu WT1 ve vzorcích pacientů je vzhledem k jeho malému množství velmi obtížná.

V části práce věnované této problematice jsme se tedy pokusili porovnat expresi WT1 na úrovni mRNA a proteinu. Zjistili jsme, že ve zdravých hematopoetických buňkách lze pozorovat podobný expresní profil mRNA a proteinu WT1 u jednotlivých vývojových stádií (zejména při srovnání hematopoetických prekurzorů a periferních leukocytů). Proto jsme provedli detailnější analýzu vzorků buněčných linií postihujících široké spektrum hladin exprese mRNA *WT1* (cca 3 řády). Detekce proteinu WT1 v těchto vzorcích však neprokázala jeho korelaci s hladinami mRNA. Tuto diskrepanci lze interpretovat několika způsoby. Je zřejmé, že charakteristiky jednotlivých metod detekujících protein WT1 (IFM, PC, WB) se liší a jejich senzitivita ani zdaleka nedosahuje parametrů qPCR. Na základě našich výsledků lze tedy spekulovat, zda je vůbec reálné tyto hodnoty přímo korelovat. Odlišné hladiny mRNA a proteinu WT1 mohou také odrážet jejich odlišnou kinetiku v buňkách, ať už normálních či nádorových. Na diskrepantních nálezech se může podílet i arteficiální charakter buněčných linií, u nichž se mohou uplatňovat odlišné požadavky na množství a role proteinu WT1 než v *in vivo* podmínkách.

Vzhledem k faktu, že jsme neprokázali korelaci mRNA a proteinu WT1, nabízí se otázka, zda jsou naše výsledky získané analýzou mRNA relevantní. Protože byl opakovaně prokázán vztah mezi hladinou mRNA *WT1* a klinickými či molekulárně biologickými charakteristikami u pacientů s leukémiemi i dalšími malignitami, lze říci, že kvantifikace exprese mRNA *WT1* je akceptovaná validní metoda s klinickým významem. Nelze však vyvozovat expresi proteinu WT1 z hladiny jeho mRNA a opačně. Stanovení významu exprese proteinu WT1 tedy bude vyžadovat ještě další studie.

V poslední části jsme se pokusili stanovit diferenciálně diagnostický algoritmus pro rozlišení mezi RC a AA. Současná diagnostika těchto dvou onemocnění je založená především na morfologickém a histopatologickém hodnocení KD a je tedy v některých případech nedostačující. Pilotní výsledky prokázaly signifikantní rozdíly v expresi *WT1* jak mezi RC a AA, tak i v rámci podskupin MDS. Testovaný algoritmus zahrnuje kromě hodnocení CD34<sup>poz</sup> a CD117<sup>poz</sup> prekurzorů a poměru CD19/CD34 také hladiny exprese *WT1* a měl by usnadnit diagnostiku obou onemocnění.



## Závěr

Studium genu *WT1* odkrývá stále nové poznatky o jeho významu u nejrůznějších typů nádorů a premaligních syndromů. Vzhledem k jeho pravděpodobně zásadnímu postavení v karcinogenezi je proto považován za slibný terapeutický cíl, zejména u hematologických malignit. I přes široké spektrum doposud publikovaných studií stále neznáme jeho konkrétní fyziologickou respektive patologickou funkci.

V rámci předkládané práce jsme studovali význam genu *WT1* a jeho izoforem v několika důležitých aspektech. Stanovili jsme prognostický význam diagnostické a před- a potransplantační hladiny *WT1* u dětské AML a zhodnotili jsme jeho možné využití ke sledování MRN u transplantovaných pacientů. Prokázali jsme, že z hlediska detekce MRN je PK vhodnější materiál pro kvantifikaci *WT1* než KD. Naše výsledky dále naznačily význam genu *WT1* pro diferenciální diagnostiku MDS typu RC a AA.

Prokázali jsme také, že kvantifikace *WT1* ve vzorcích pacientů s AML není negativně ovlivněna přítomností mutací v tomto genu. Tyto výsledky mají velký význam pro mnoho doposud publikovaných studií, neboť většina mutací v genu *WT1* zasahuje do oblastí, kde jsou lokalizovány qPCR systémy používané ke kvantifikaci exprese *WT1*.

Přestože jsme nepotvrdili korelaci hladiny mRNA a protienu WT1, předpokládáme, že studie založené na analýze mRNA *WT1*, i přesto poskytují relevantní a velmi hodnotné výsledky zejména z klinického hlediska.

Naším hlavním cílem však bylo studium expresního profilu izoforem genu *WT1* u pacientů s hematologickými malignitami. Podařilo se nám vyvinout unikátní metodiku, která umožňuje kvantifikaci variant *WT1* v nejrůznějších tkáních ať již fyziologického či maligního původu. Naše pilotní analýza ukázala překvapivě uniformní poměr izoforem *WT1* u pacientů s AML. Jedná se o naprosto unikátní studii zaměřenou na význam expresních variant *WT1* u AML a také první studii tohoto druhu založenou na relevantní metodice jejich detekce. Naše výsledky také poukázaly na nedostatky některých dříve publikovaných dat.

V rámci studia biologických příčin vzniku hematologických malignit patří problematika genu *WT1* mezi intenzivně studovaná témata, zejména v oblasti dětské i dospělé AML. Výsledky této práce poukázaly na mnoho zajímavých vlastností genu *WT1*, z nichž řada může mít klinický dopad, a významným způsobem přispěly k prohloubení našich znalostí o roli *WT1* a jeho izoforem u AML. Předpokládáme také,

že námi vyvinutá metodika bude použita v dalších navazujících studiích, které definitivně stanoví význam izoform *WT1* a přispějí k objasnění diskrepancí, které studium genu *WT1* stále doprovázejí.

## Abstrakt

Vysokou expresi genu Wilmsova tumoru 1 (*WT1*) nacházíme u většiny akutních leukémií a dalších hematologických malignit. *WT1* je proto považován za potenciální univerzální marker minimální reziduální nemoci (MRN), zejména u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Jiné studie však tyto výsledky nepotvrdily a role genu *WT1* ve sledování MRN stejně jako jeho prognostická signifikance tak zůstávají stále nejasné.

Existuje více než 36 variant genu *WT1*, které mají odlišné, částečně se překrývající funkce a jejich poměr významným způsobem ovlivňuje výslednou funkci *WT1*. Vzhledem k nedostatku publikovaných dat a absenci relevantní metodiky však doposud nebyl objasněn konkrétní význam expresního profilu izoforem *WT1*.

V rámci hlavního cíle této práce jsme vyvinuli unikátní metodiku pro kvantifikaci 4 hlavních izoforem *WT1* a stanovili jejich expresní profil ve vzorcích pacientů s AML, myelodysplastickým syndromem (MDS) a zdravých kontrol. Expresní vzorec izoforem *WT1* se liší mezi konkrétními diagnózami, ale v rámci daného typu malignity je překvapivě uniformní a nezávisí na hladině celkového *WT1*. Neprokázali jsme souvislost profilu izoforem *WT1* s prognózou pacientů.

Naším dalším cílem bylo definitivní stanovení prognostického významu celkové exprese *WT1* u dětské AML v rámci mezinárodní spolupráce. Výsledky analýzy rozsáhlé kohorty pacientů ukázaly, že *WT1* není nezávislý prognostický faktor pro léčbu dětské AML. V rámci spolupráce byla provedena také mutační analýza těchto pacientů. Přestože část mutací v genu *WT1* zasahuje do oblasti lokalizace qPCR systému pro detekci *WT1*, prokázali jsme, že tyto mutace neovlivňují kvantifikaci exprese *WT1*.

Kromě diagnostické exprese *WT1* jsme stanovili také prognostický význam hladiny exprese *WT1* před a po transplantaci kostní dřeně. Naše výsledky neprokázaly význam hladiny *WT1* v těchto časových bodech či jejího kontinuálního sledování v posttransplantačním období pro úspěšnost léčby transplantovaných pacientů s AML.

V rámci studia genu *WT1* jsme se zaměřili také na jeho potenciál v detekci MRN u dětské AML. Přestože většina studií zaměřených na toto téma je založena na analýze vzorků kostní dřeně, zjistili jsme, že pro účel sledování MRN představuje periferní krev vhodnější materiál pro kvantifikaci exprese *WT1*.

Součástí této práce bylo také srovnání exprese *WT1* na úrovni mRNA a proteinu. Přestože jsme neprokázali korelaci těchto dvou hladin, domníváme se, že studie

založené na analýze mRNA *WT1* poskytují relevantní a velmi hodnotné výsledky zejména z klinického hlediska.

Výsledky pilotní analýzy poslední části této práce poukázaly na možné využití kvantifikaci exprese *WT1* v rámci diferenciatně diagnostického algoritmu, který je schopen lépe odlišit pacienty s refrakterní cytopenií a aplastickou anémií než doposud používané morfologické a cytochemické charakteristiky.

Tato práce přinesla nový pohled na roli genu *WT1* a jeho izoforem v hematopoéze i leukemogenezi a poukázala na možný význam poměru izoforem *WT1* v maligní transformaci hematopoietických buněk.

## Abstract

Wilms' tumor gene 1 (*WT1*) is highly expressed in acute leukemia and other hematological malignancies. It has been therefore suggested as a potential universal marker of minimal residual disease (MRD), particularly in patients with acute myeloid leukemia (AML). Due to controversial results of some of the studies, the role of *WT1* in MRD follow-up and *WT1* prognostic significance remain unclear.

*WT1* protein is produced in more than 36 different isoforms. These variants have distinct, partially overlapping functions and their ratio is supposed to influence the final effect of *WT1*. However, despite the increasing number of studies, the clinical impact of *WT1* and its isoforms in acute leukemia have not yet been elucidated.

We established a unique qPCR method to assess the expression pattern of the main 4 *WT1* isoforms. Using this method, we determined the ratio of *WT1* variants in the samples of patients with AML, myelodysplastic syndrome (MDS) and healthy controls. Our data showed that this pattern can distinguish among particular hematological malignancies, but lacks a prognostic significance.

Within our international study group we determined the prognostic significance of total *WT1* expression in childhood AML. Based on our results of a large cohort of patients we can conclude that *WT1* expression at diagnosis is not an independent prognostic factor for the outcome of pediatric AML. Mutation analysis of this cohort showed no impact of *WT1* mutations on the quantification of its expression.

In addition to evaluating the prognostic significance of *WT1* at diagnosis, we also investigated the impact of pre/post-transplantation levels of *WT1* expression in patients with childhood AML undergoing stem-cell transplantation (SCT). In contrast to some previously published data, we could not observe any clinical relevance of either pre/post SCT expression of *WT1* or monitoring of *WT1* expression after SCT in pediatric AML.

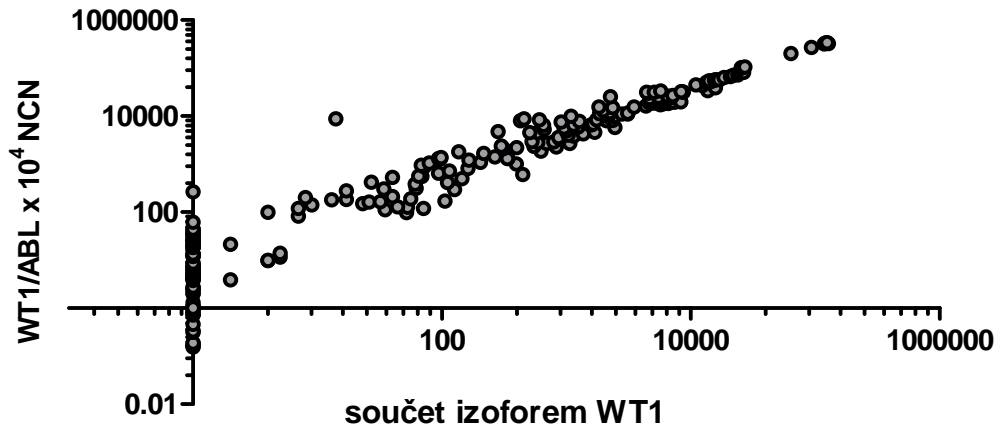
In the majority of studies on childhood AML, *WT1* detection is realized by analysis of bone marrow (BM) samples, although there are some suggestions that peripheral blood (PB) is more suitable for this purpose. The results of our analysis suggest that PB can provide more useful information on MRD in childhood AML.

Although we could not confirm the correlation of *WT1* mRNA and protein level, it has been shown that the studies on the clinical relevance of *WT1* that were based on the analysis of mRNA level provide relevant and conclusive data.

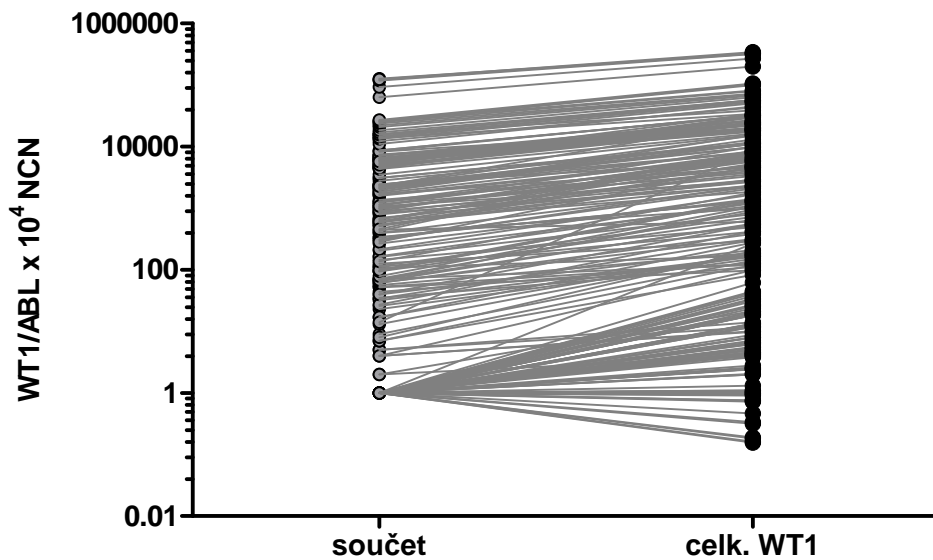
Lastly, analysis of patients with MDS supported the involvement of *WT1* quantification into the diagnostic algorithm that should help in differential diagnosis between patients with refractory cytopenia and aplastic anemia.

In conclusion, this study has brought several novel aspects of the role of *WT1* gene and its isoforms in hematopoiesis and leukemogenesis and underlined the importance of *WT1* isoform expression pattern in malignant transformation of hematopoietic cells.

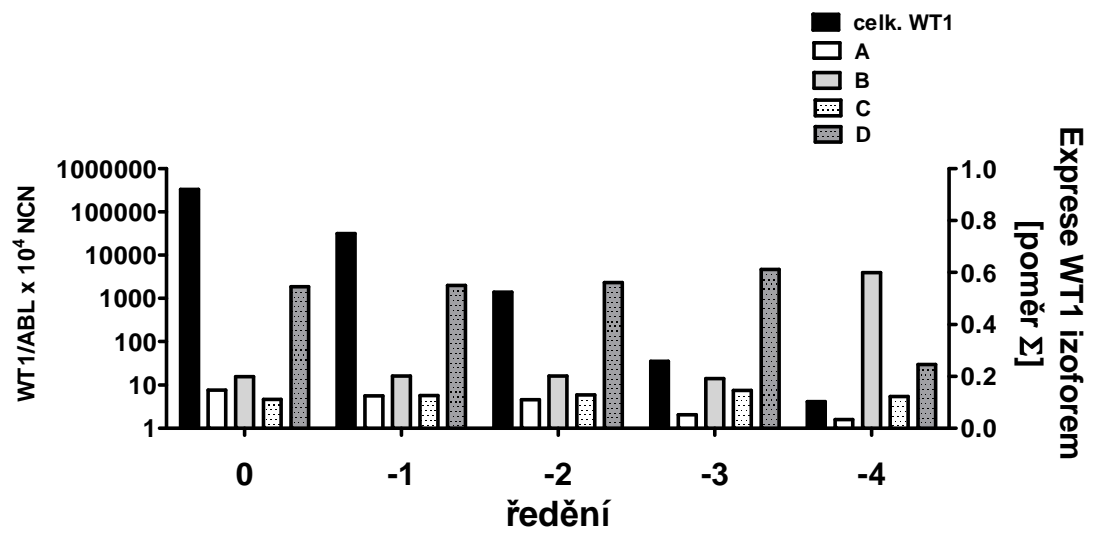
## Obrázky



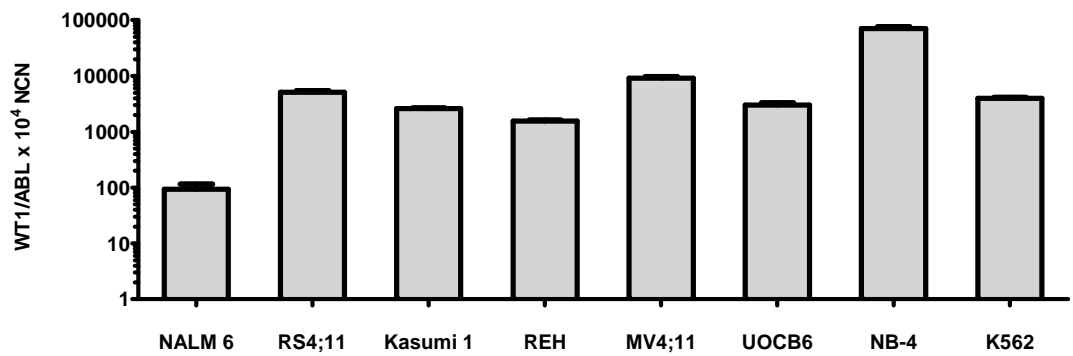
Obr. 5 – Korelace celkové hladiny *WT1* a součtu jednotlivých izoforem



Obr. 6 – Srovnání celkové hladiny *WT1* a součtu jednotlivých izoforem

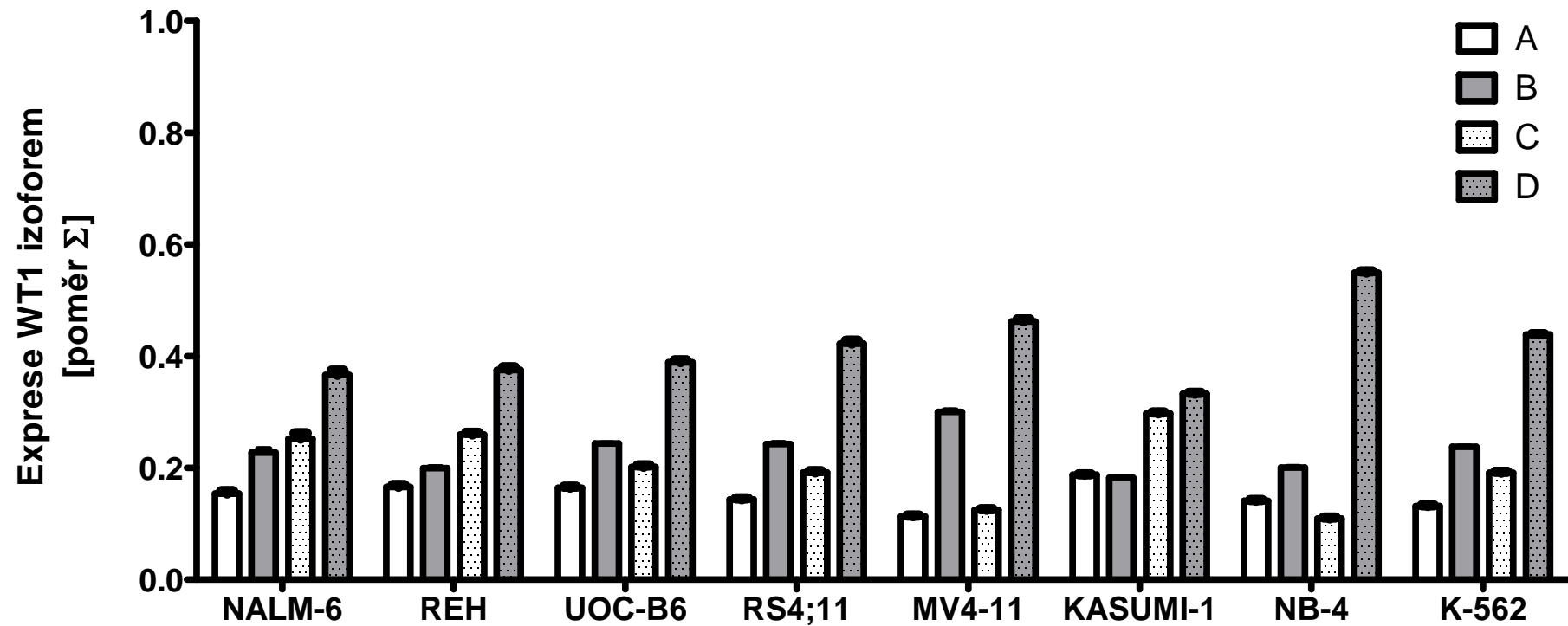


Obr. 7 – Diluční experimenty s cDNA leukemické linie NB4

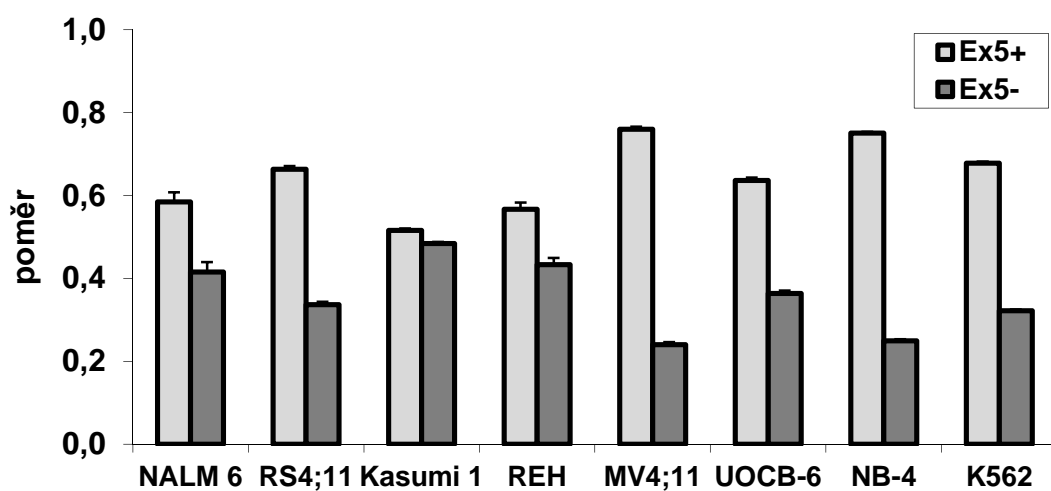


Obr. 8 – Hladiny genu *WT1* u leukemických linií (Kasumi-1, NB-4, MV4;11, K562, RS4;11, REH, NALM6 a UOCB6)

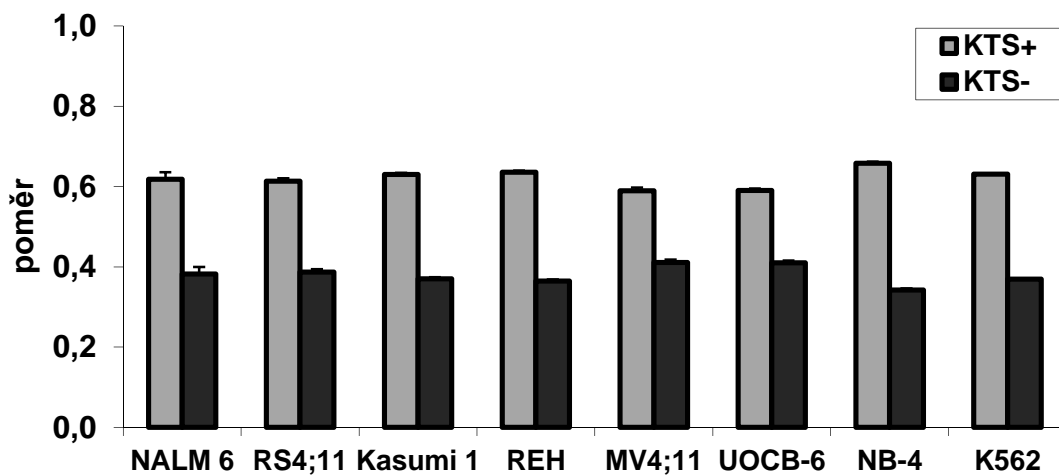




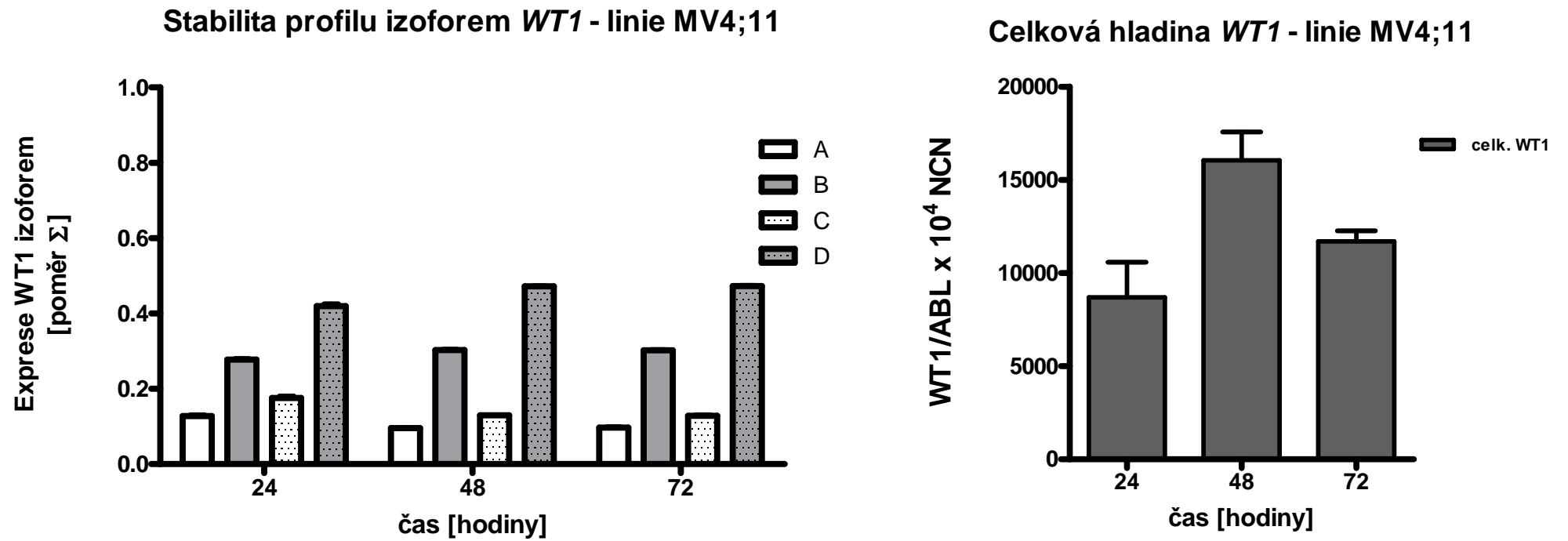
Obr. 9 – Expresní vzorce izoformem *WT1* ve vzorcích leukemických linií (Kasumi-1, NB-4, MV4;11, K562, RS4;11, REH, NALM6 a UOCB6)



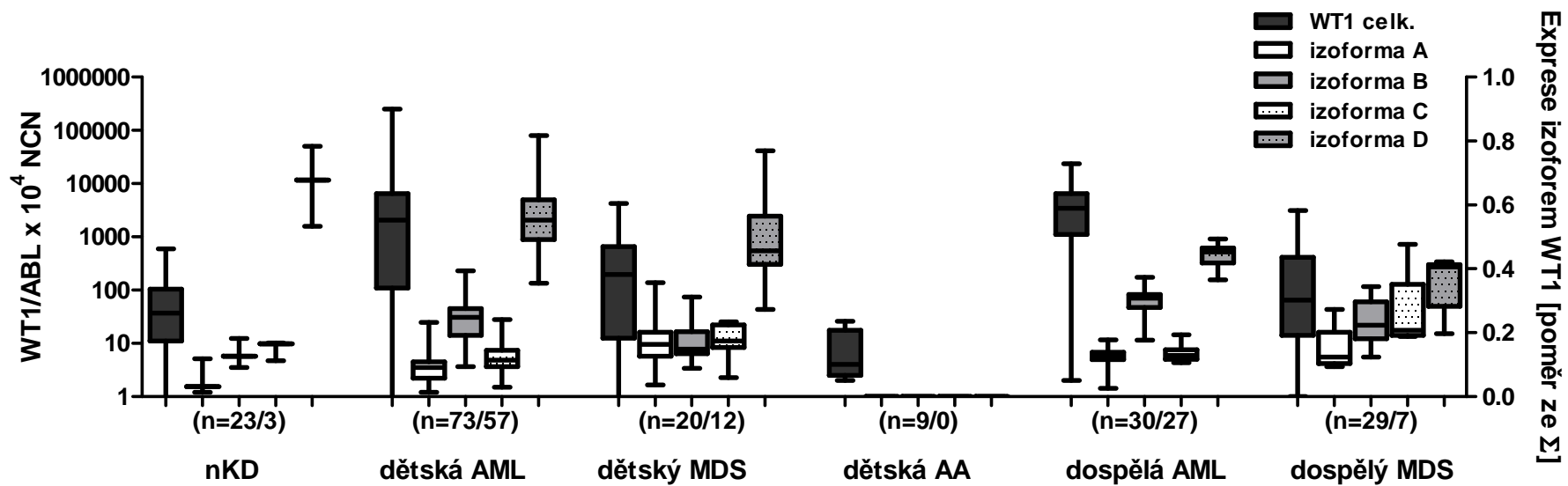
Obr. 10 – Poměr exon 5 +/- izoforem WT1 ve vzorcích leukemických linií



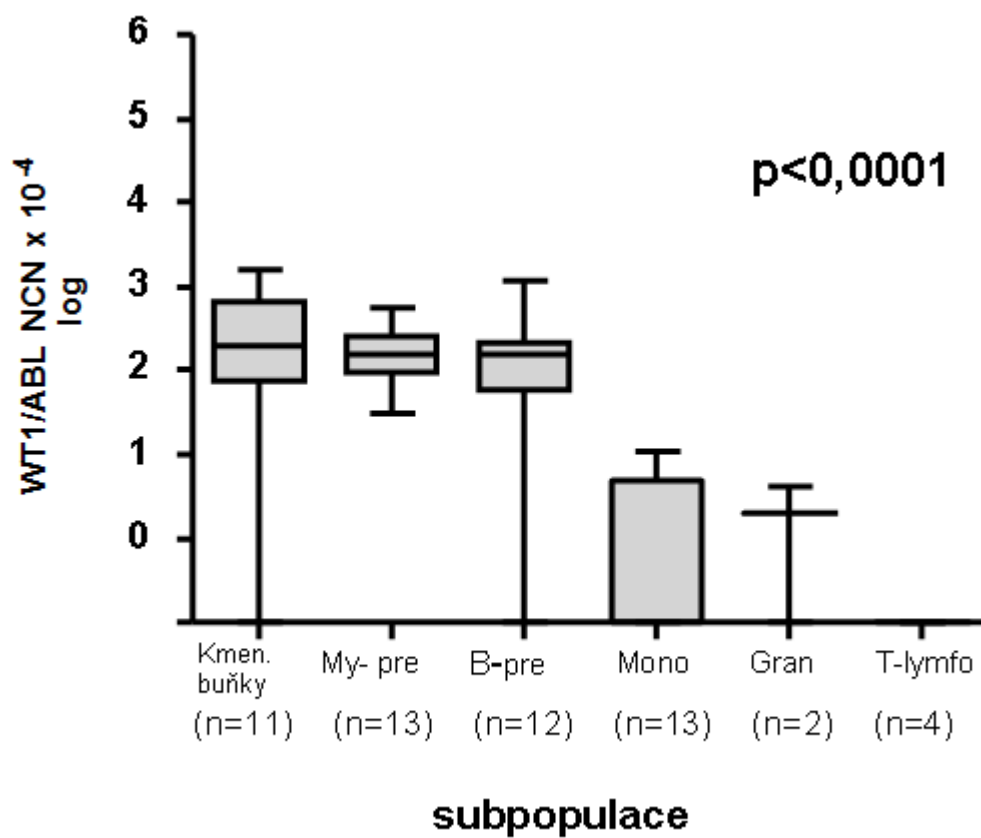
Obr. 11 – Poměr KTS +/- izoforem WT1 ve vzorcích leukemických linií



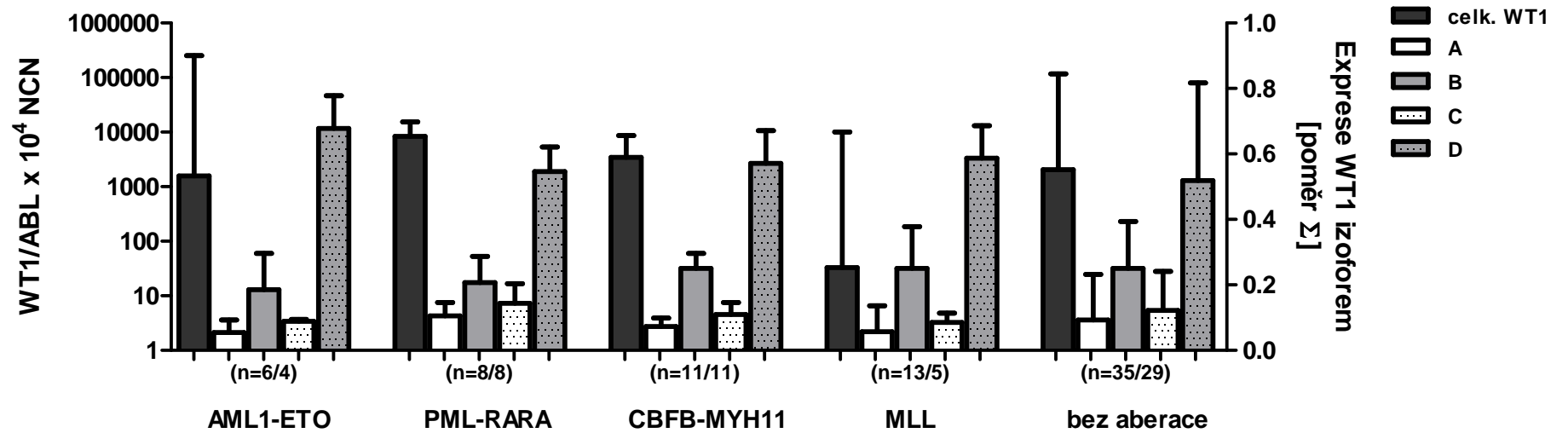
Obr. 12 – Stabilita celkové hladiny *WT1* a expresního vzorce izoformem *WT1* během kultivace linie MV4;11



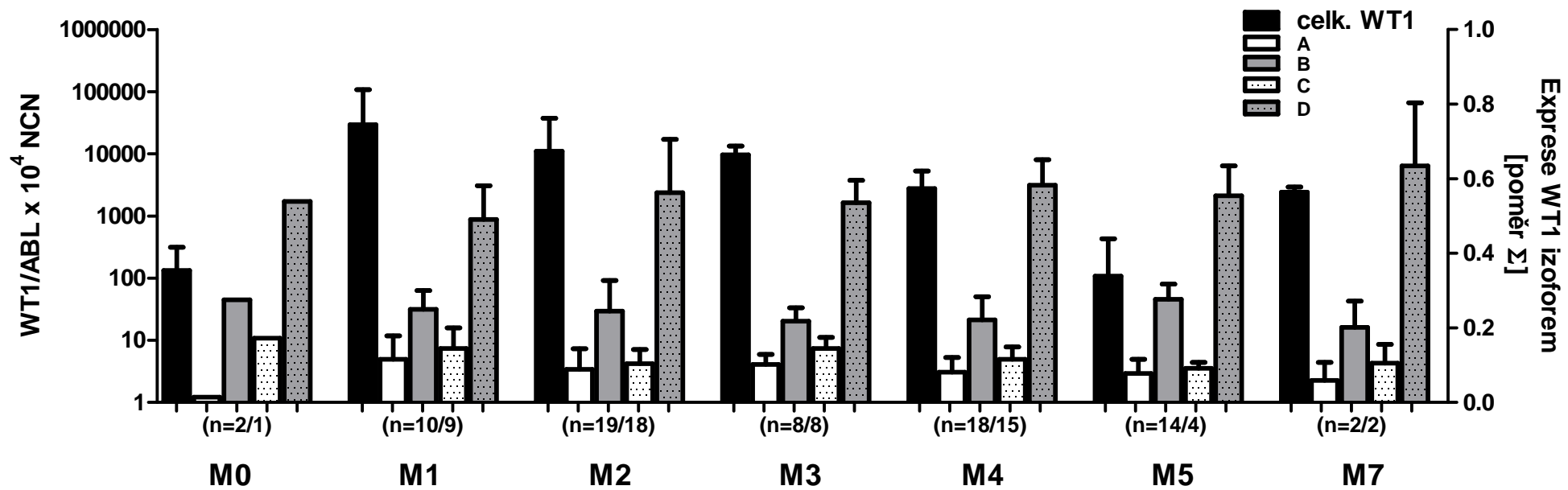
Obr. 13 – Expresní vzorec izoformem *WT1* ve vzorcích kontrolních KD, pacientů s dětskou resp. dospělou AML, dětskou AA a dětským resp. dospělým MDS



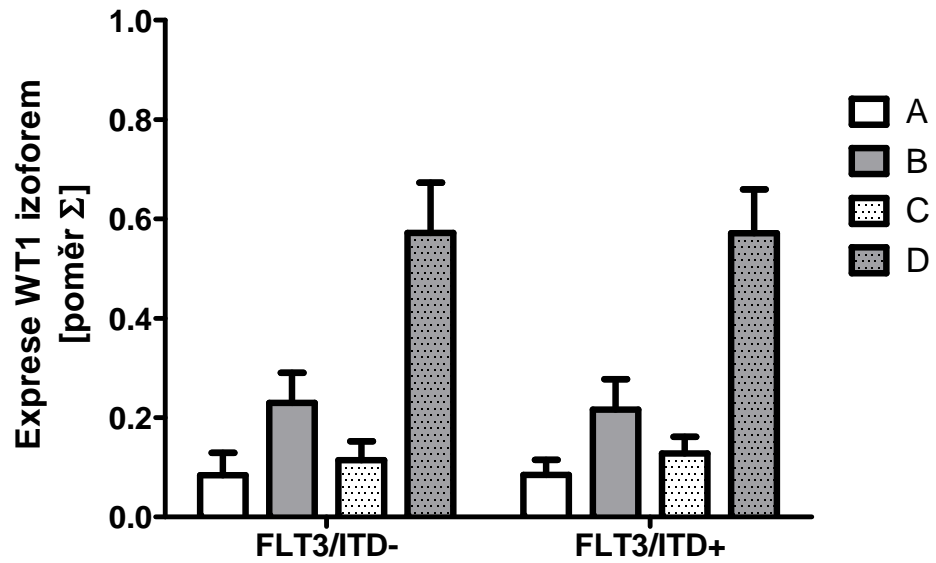
Obr. 14 – Hladina celkové exprese genu *WT1* v základních hematopoetických subpopulacích



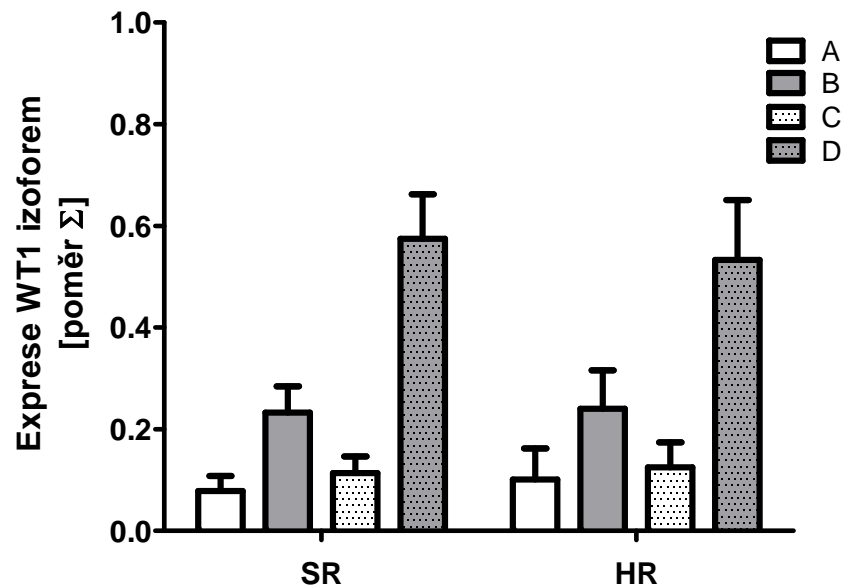
Obr. 15 – Expresní vzorce izoforem *WT1* v rámci molekulárně geneticky definovaných podskupin dětské AML



Obr. 16 – Expresní vzorce izoforem *WT1* v rámci morfologicky definovaných podskupin dětské AML

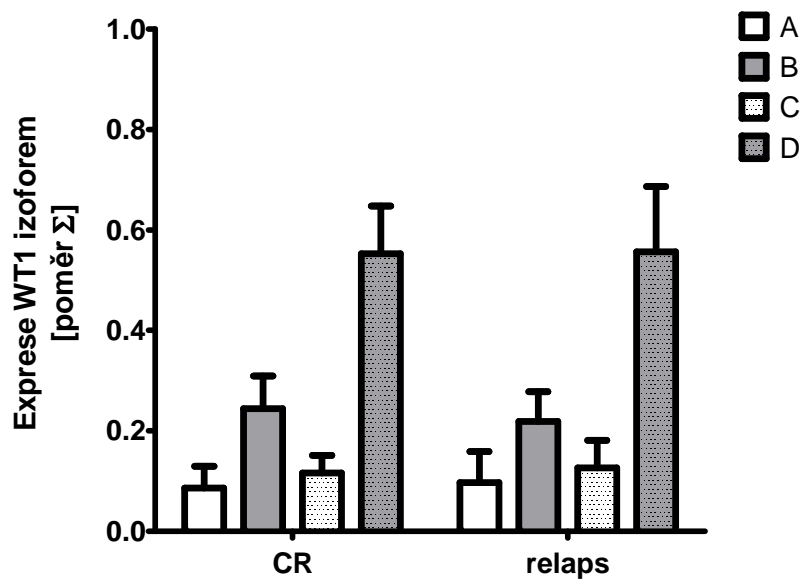


Obr. 17 – Expresse izofořem *WT1* u *FLT3/ITD* pozitivních resp. negativních pacientů s dětskou AML

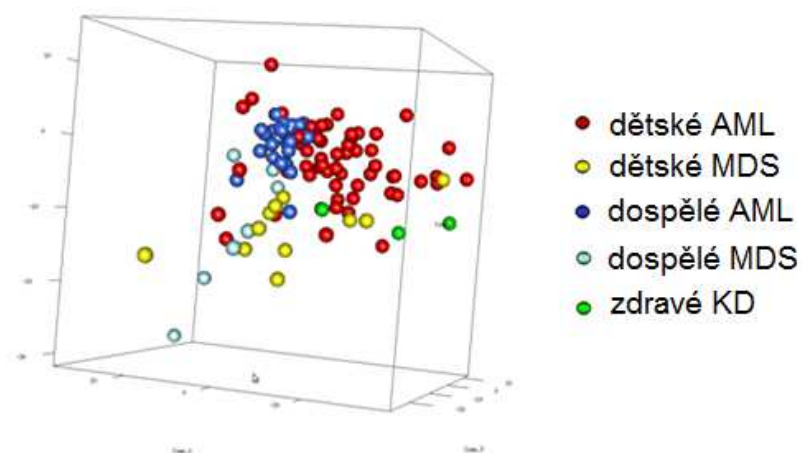


Obr. 18 – Expresse izofořem *WT1* u pacientů standardního vs. vysokého rizika

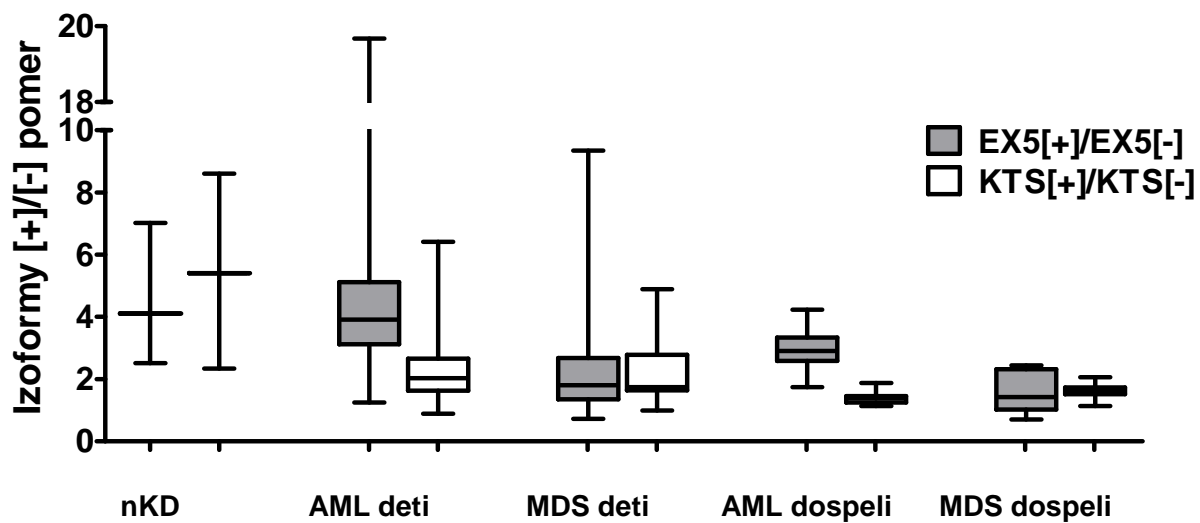




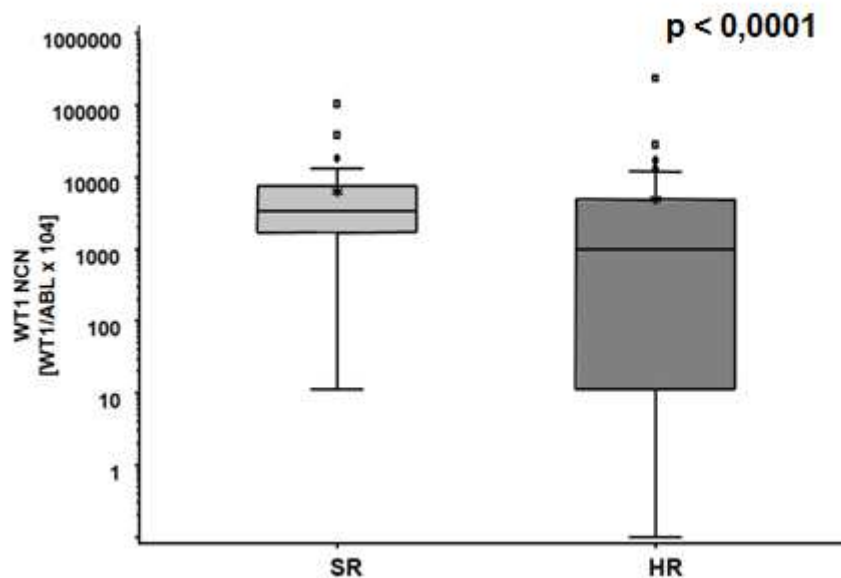
Obr. 19 – Expresse izoformem *WT1* při diagnóze u AML pacientů v kompletní remisi respektive pacientů, kteří prodělali relaps



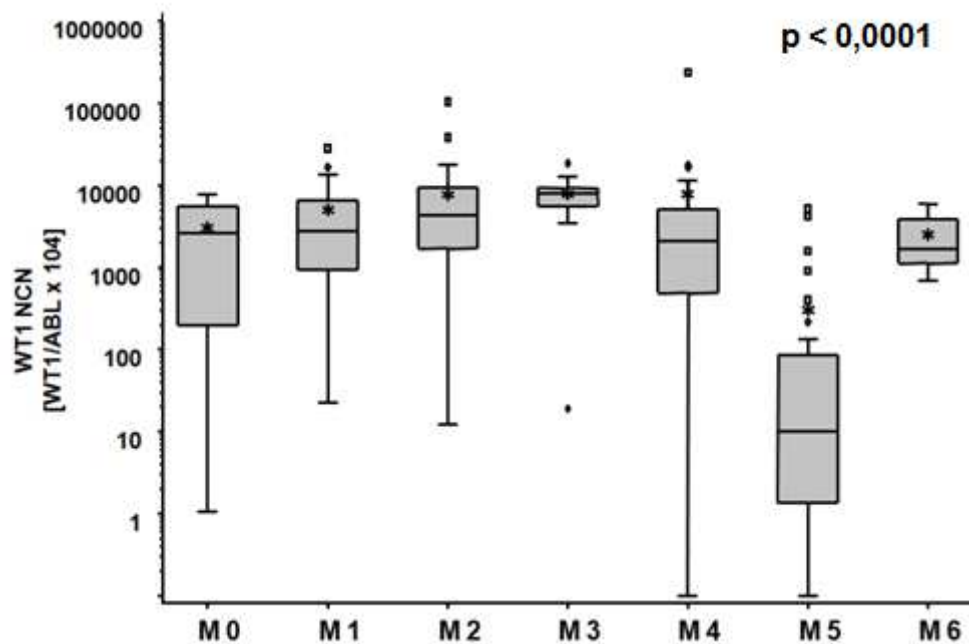
Obr. 20 – Rozdělení pacientů do skupin v klastrové analýze podle expresního vzorce izoformem *WT1*



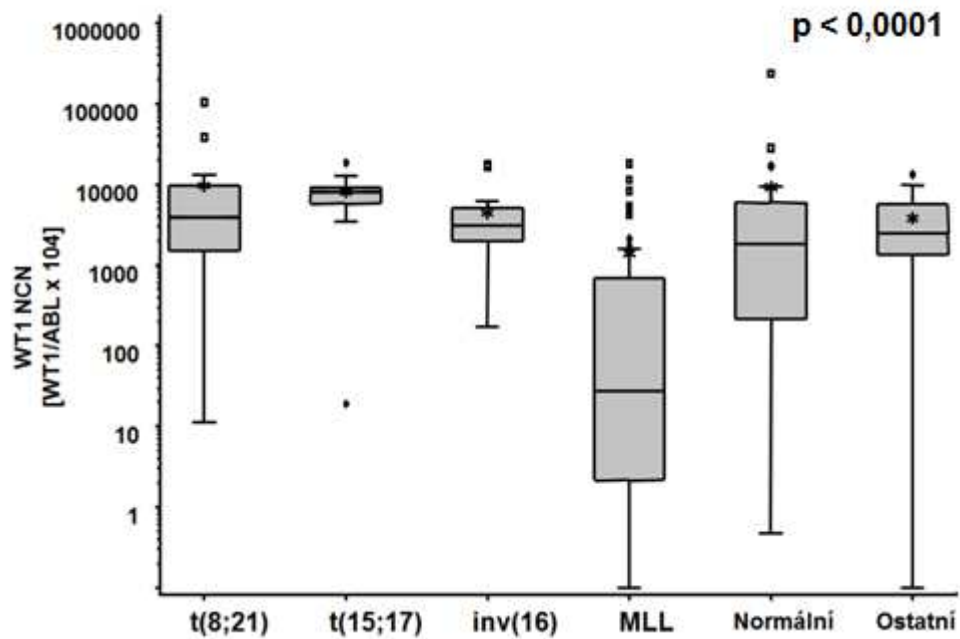
Obr. 21 – Poměr exon 5 +/- a KTS +/- izoformem *WT1* u jednotlivých typů diagnóz



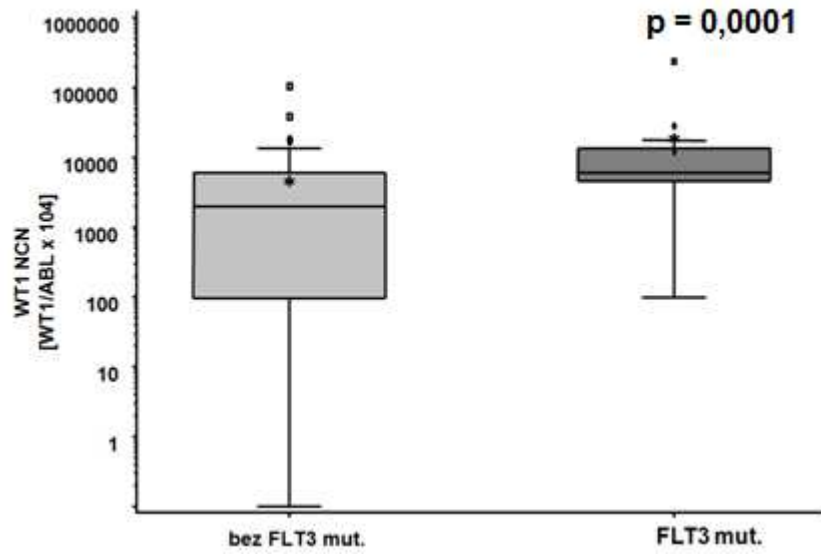
Obr. 22 – Hladina exprese celkového *WT1* u pacientů standardního vs. vysokého rizika



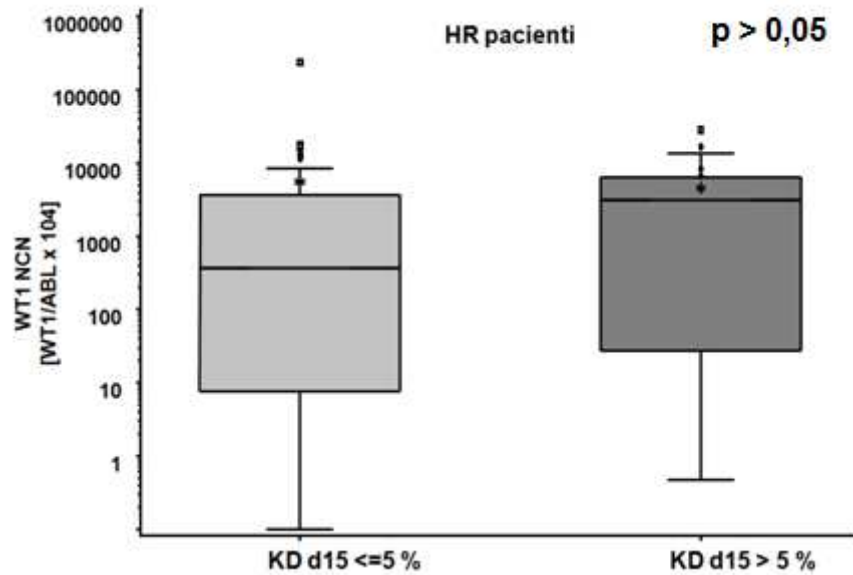
Obr. 23 – Hladina exprese *WT1* v rámci morfologicky definovaných podskupin dětské AML



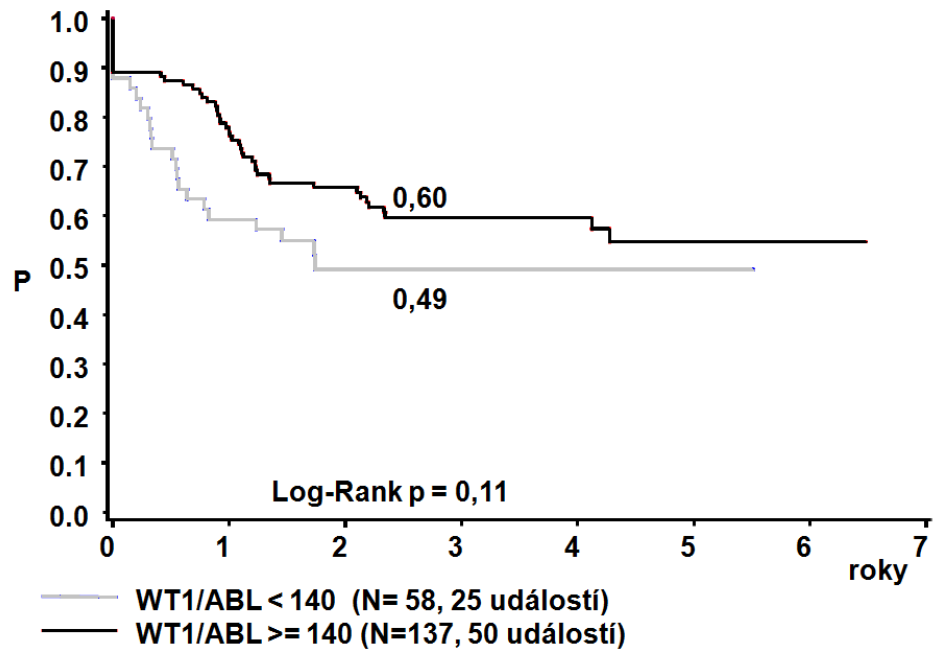
Obr. 24 – Hladina exprese *WT1* v rámci molekulárně geneticky definovaných podskupin dětské AML



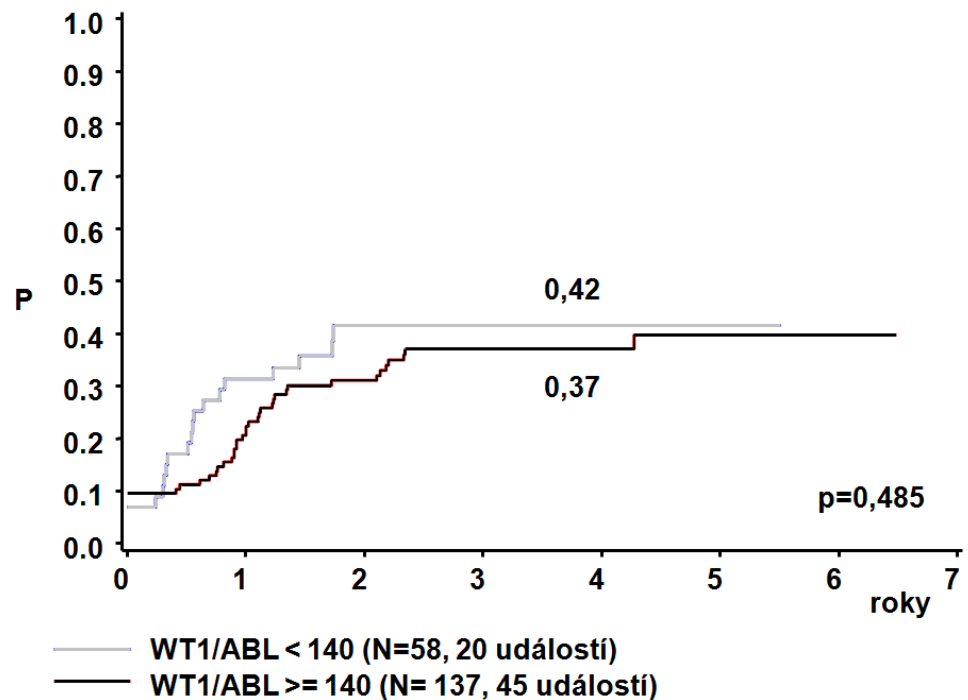
Obr. 25 – Hladina exprese *WT1* u pacientů s/bez aberace postihující gen *FLT3*



Obr. 26 – Hladina exprese *WT1* pacientů s vysoce rizikovou AML (HR) podle odpovědi na iniciační fázi léčby



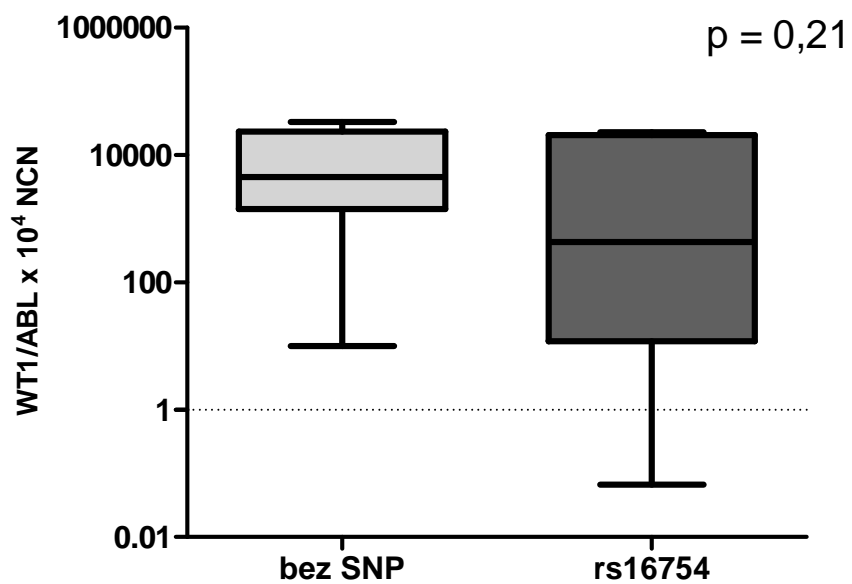
Obr. 27 – EFS pacientů s dětskou AML (bez AML M3) rozdělených do skupin podle exprese *WT1*



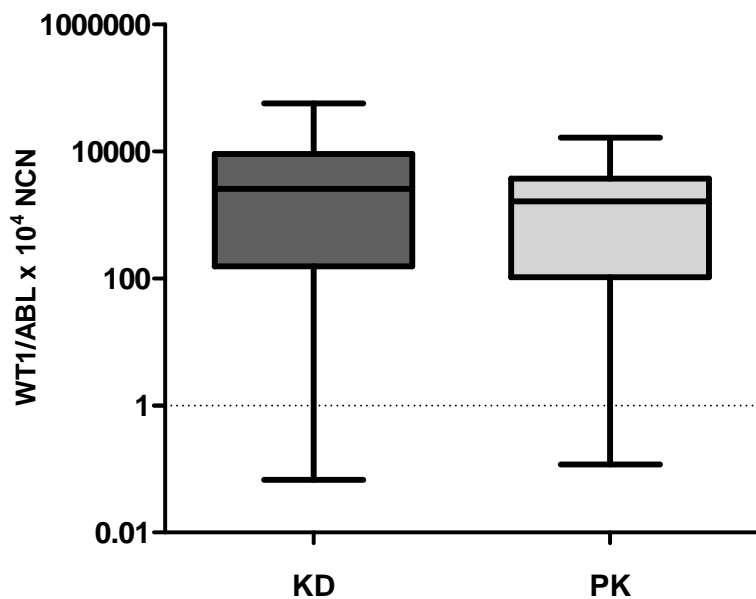
Obr. 28 – CIR pacientů s dětskou AML (bez AML M3) rozdělených do skupin podle exprese *WT1*



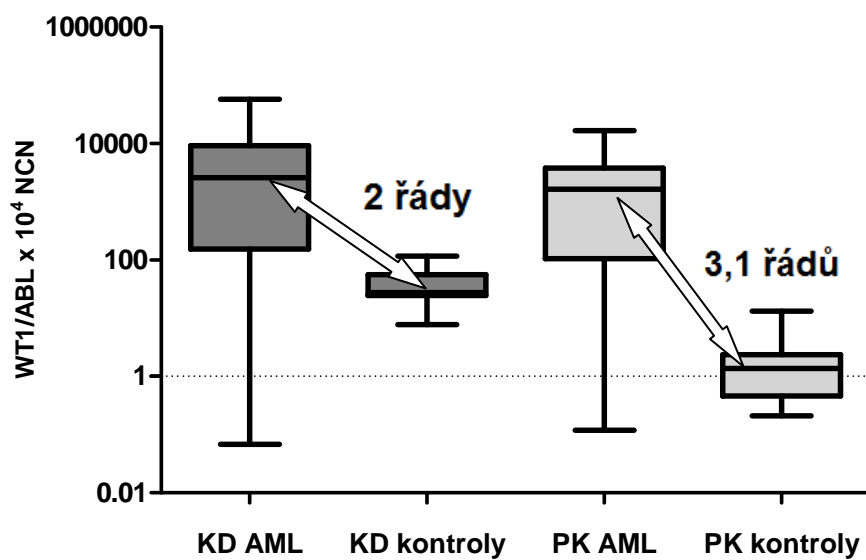
Obr. 29 – Hladina *WT1* u pacientů bez respektive s mutací v exonu 7



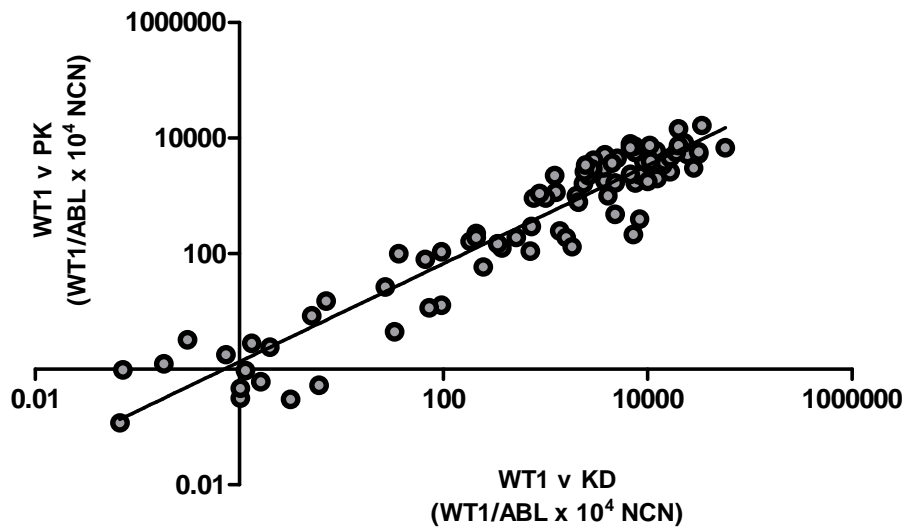
Obr. 30 - Hladina *WT1* u pacientů bez respektive s SNP rs16754



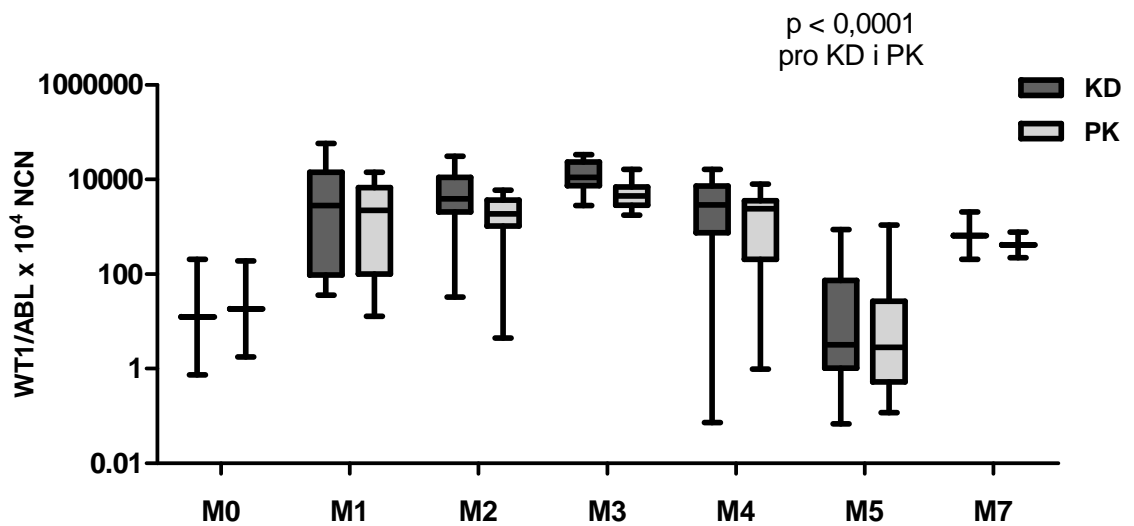
Obr. 31 – Hladina exprese genu *WT1* ve vzorcích KD a PK pacientů s AML



Obr. 32 – Hladina exprese *WT1* ve vzorcích KD a PK pacientů s AML – srovnání s kontrolními KD a PK

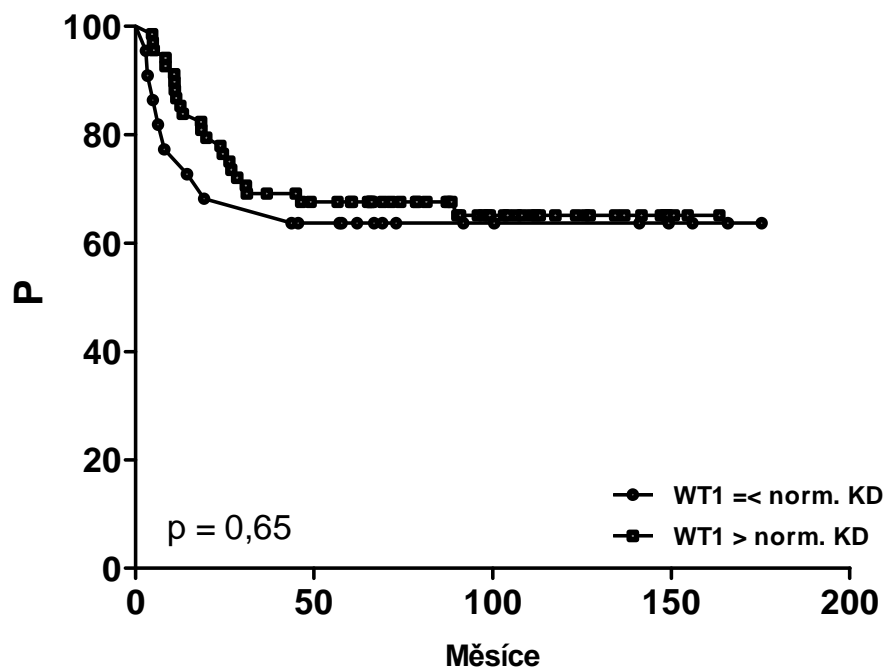


Obr. 33 – Korelace hladiny exprese genu *WT1* v párových vzorcích KD a PK

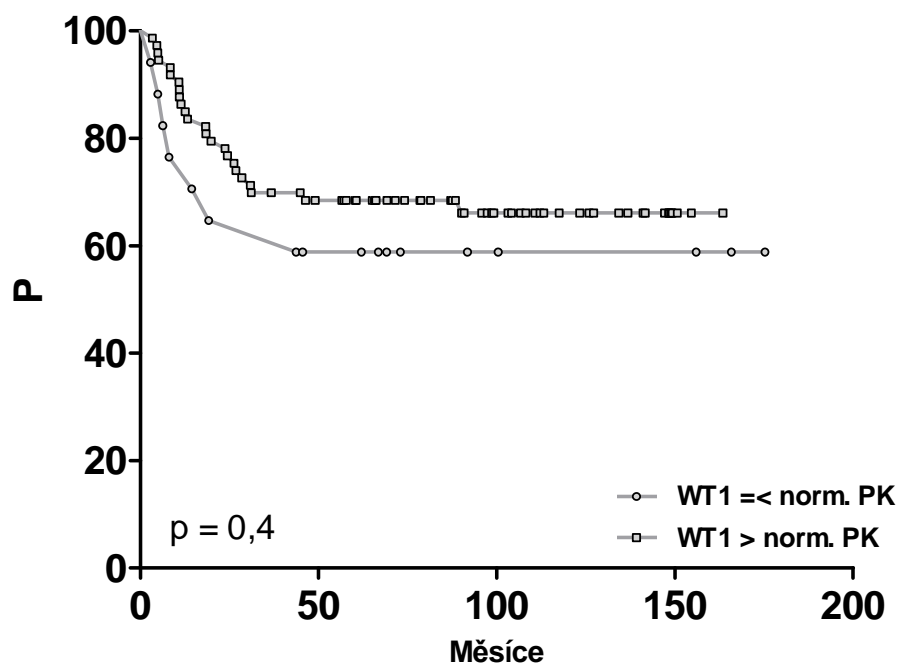


Obr. 34 – Exprese *WT1* ve vzorcích KD a PK v rámci morfológických podskupin AML

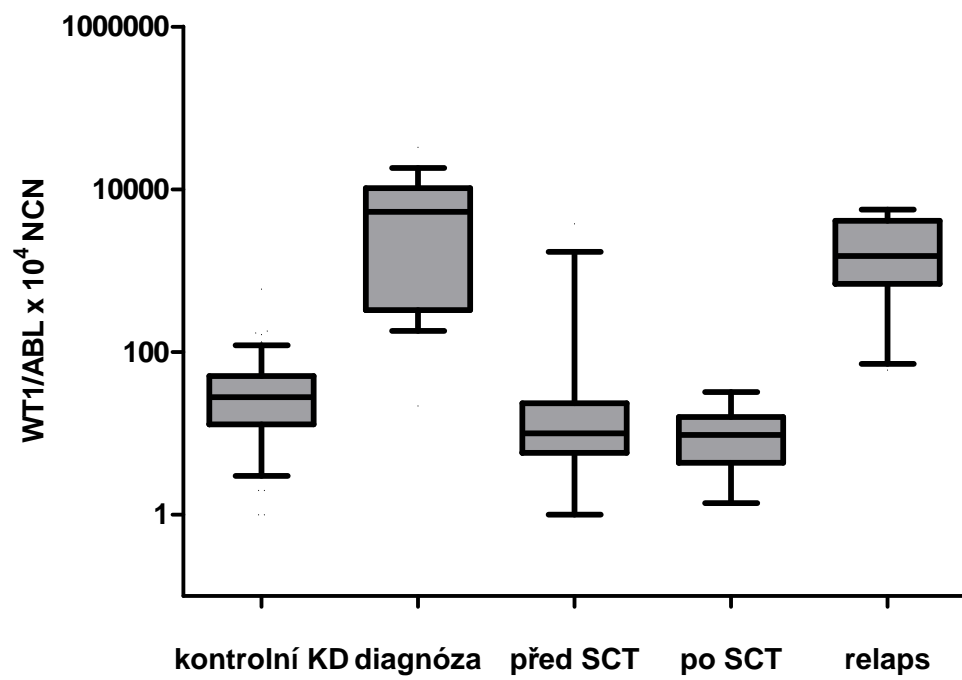




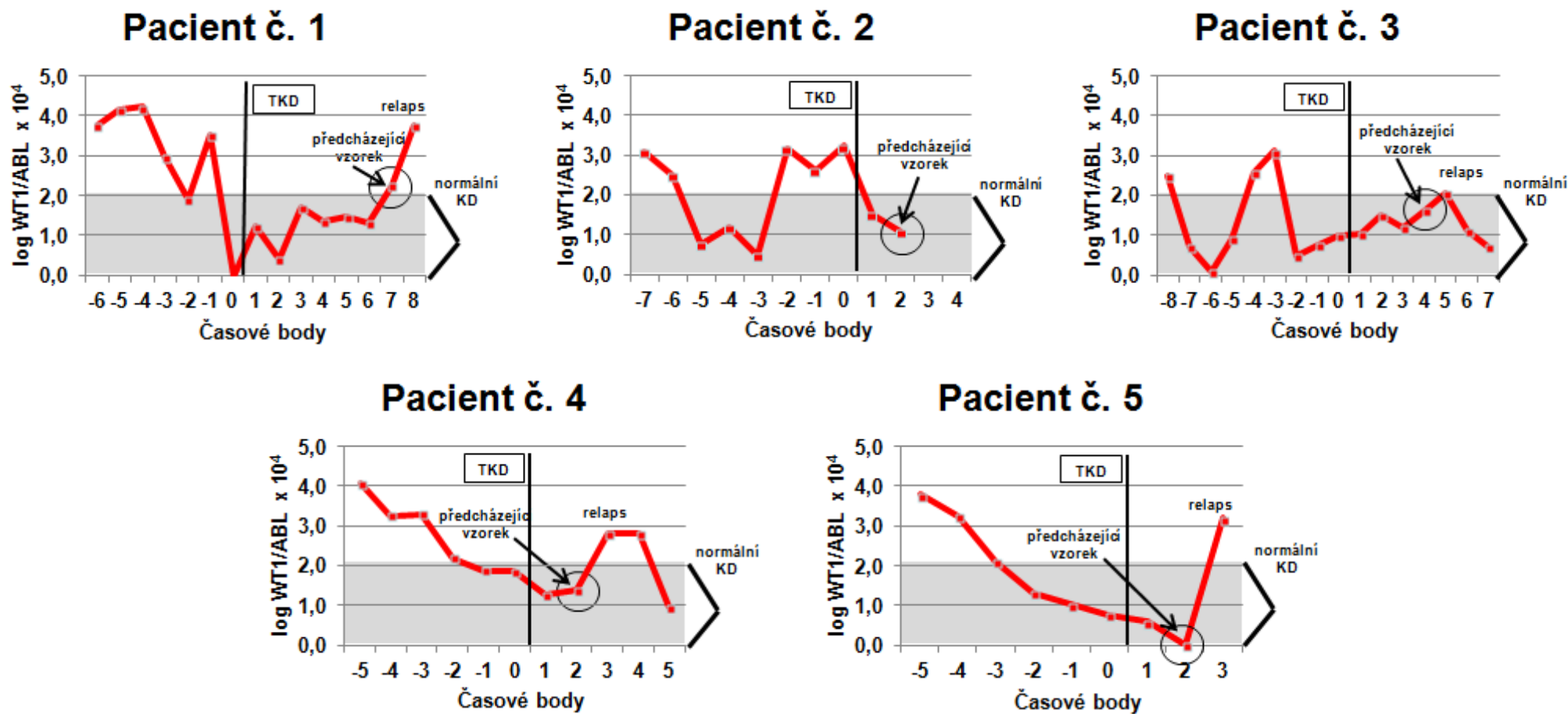
Obr. 35 – RFS pacientů s AML rozdělených do podskupin podle hladiny exprese *WT1* v KD



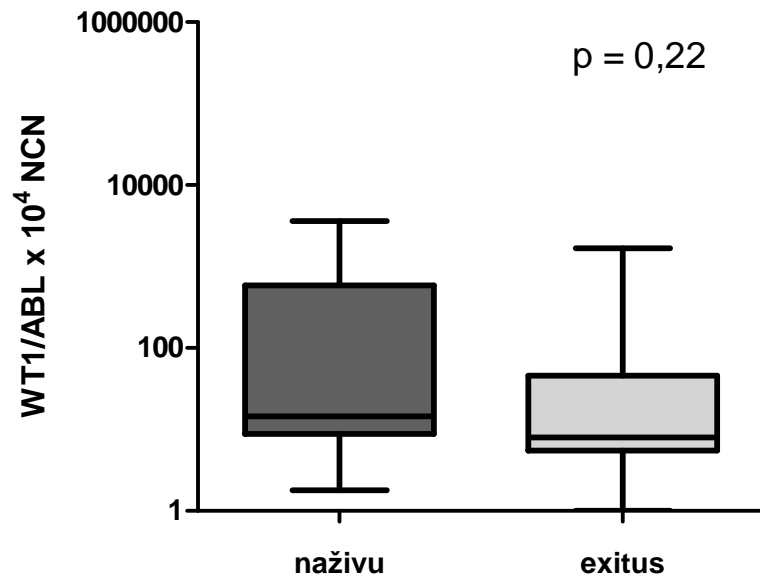
Obr. 36 – RFS pacientů s AML rozdělených do podskupin podle hladiny exprese *WT1* v PK



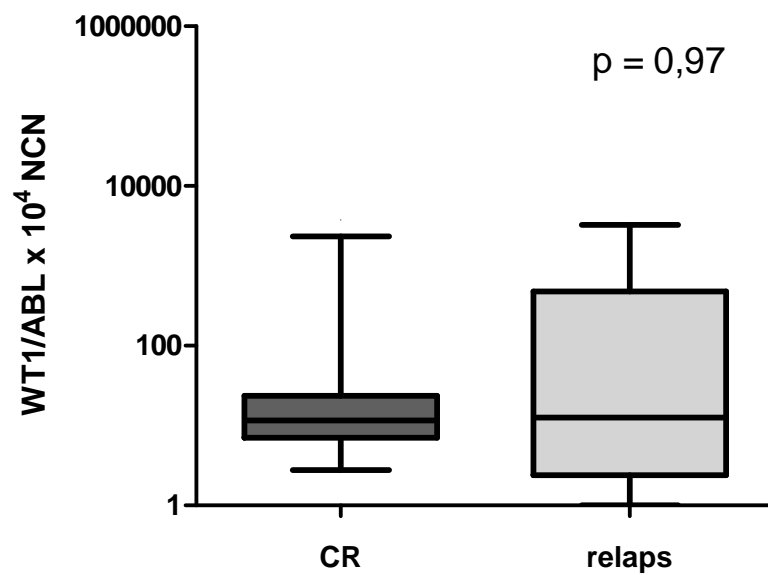
Obr. 37 – Expresse genu *WT1* v definovaných časových bodech léčby transplantovaných pacientů s dětskou AML



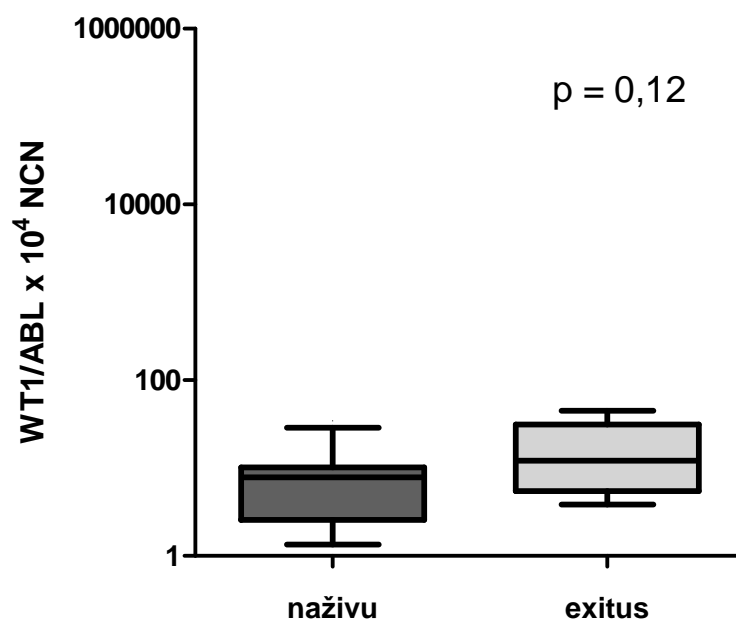
Obr. 38 – Kontinuální sledování hladiny exprese *WT1* ve vzorcích transplantovaných pacientů s dětskou AML



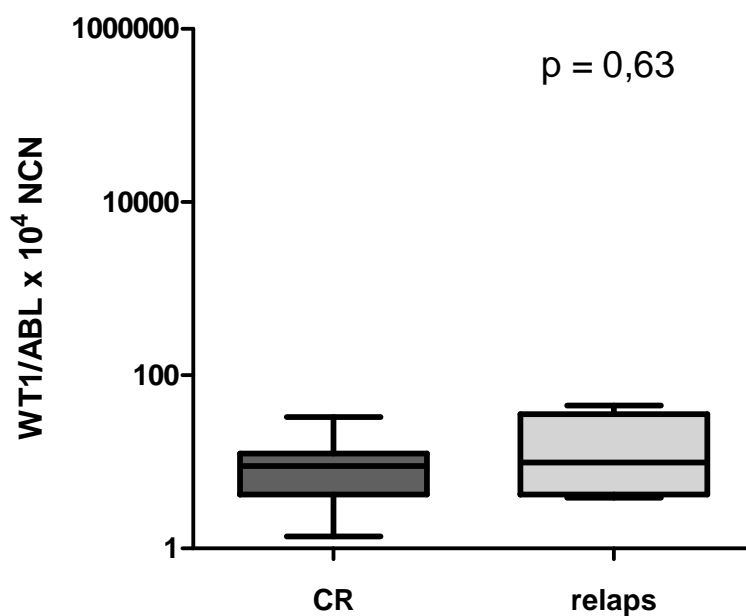
Obr. 39 – Hladina genu *WT1* před TKD u pacientů s AML a jejich OS status



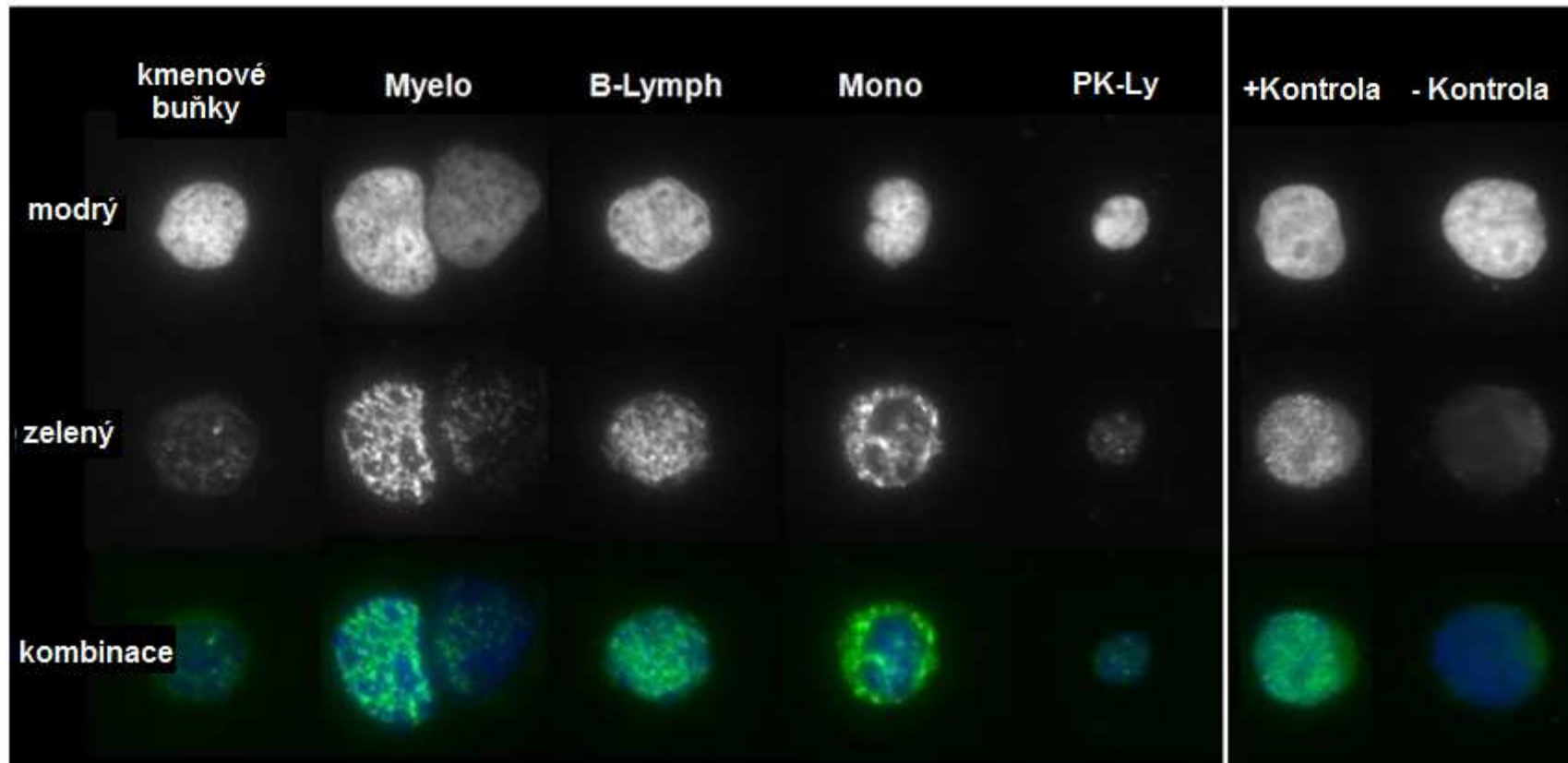
Obr. 40 – Hladina genu *WT1* před TKD u pacientů s AML a jejich RFS status



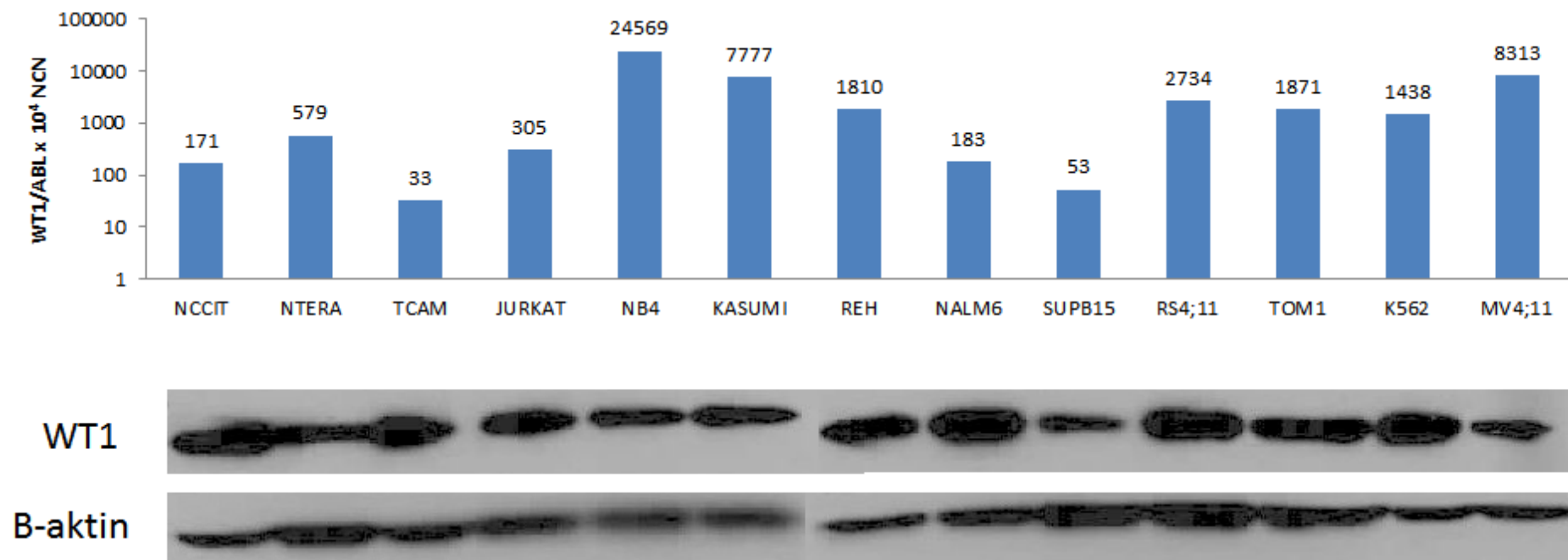
Obr. 41 – Hladina genu *WT1* po TKD u pacientů s AML a jejich OS status



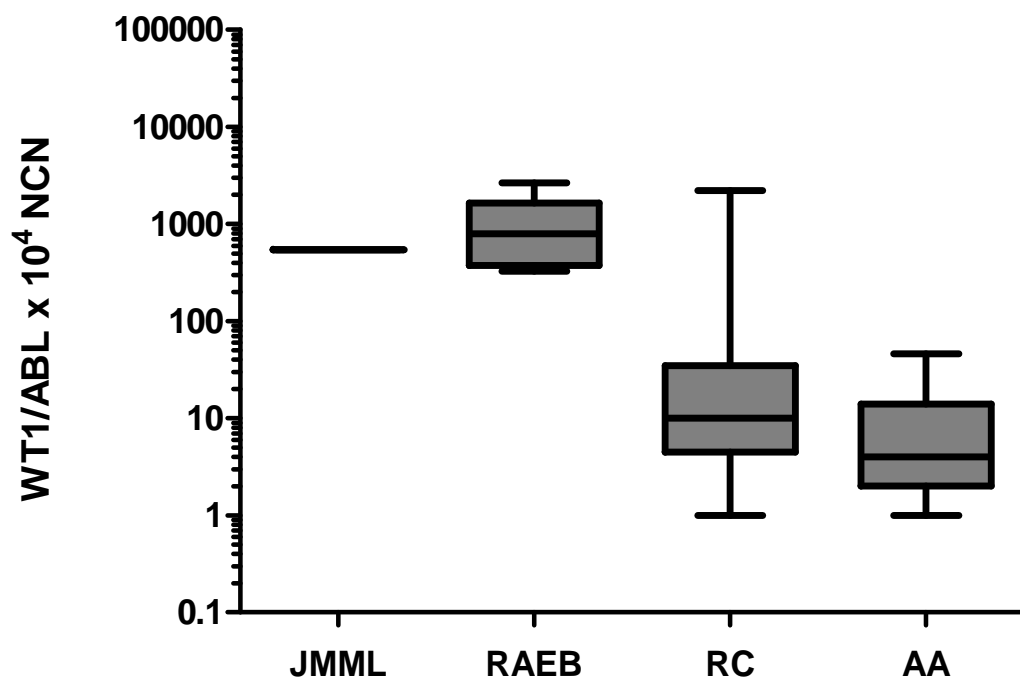
Obr. 42 – Hladina genu *WT1* po TKD u pacientů s AML a jejich RFS status



Obr. 43 – Detekce proteinu WT1 pomocí IFM v základních subpopulacích hematopoetického vývoje



Obr. 44 – Srovnání hladiny exprese WT1 na úrovni mRNA (qPCR) a proteinu (WB)



Obr. 45 – Expresse genu *WT1* v rámci morfologických podskupin MDS a AA



## Seznam použitých zkratk

6FAM	6-carboxyfluorescein
AA	aplastická anémie
ABL	Abelson gene
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AML1	acute myeloid leukemia 1 protein
APL	akutní promyelocytární leukémie
APS	ammonium persulfate
AR	androgen receptor
AREG	amphiregulin
ASLX1	additional sex combs like 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	all-trans retinová kyselina
AUG	start kodón
AWT1	alternative WT1 transcript
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCP	B-cell precursor
BCR	breakpoint cluster region
BFM	Berlin-Frankfurt-Munster
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
cALL	common ALL
CBF	core binding factor
CBP	CREB-binding protein
CCNE	cyclin E
CCNG1	cyclin G1
CD	cluster of differentiation
CDH1	E-cadherin
cDNA	complementary DNA
CEBPa	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CIR	cumulative incidence of relapse
CLIP	Childhood Leukemia Investigation Prague

CML	chronic myeloid leukemia
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CSF1	colony stimulating factor-1
CTLs	cytotoxické T-lymfocyty
Cys	cystein
CR	complete remission
ČR	Česká republika
d15	den 15
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
Da	Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT3a	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3a
DNMT3b	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3b
dNTPs	deoxyribonukleotidy
DSMZ	Human and Animal Cell Lines Database
dT	deoxythymidin
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EFS	event free survival
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGR1	early growth response 1
EGR2	early growth response 1
EPO	erythropoietin
ETO	runt-related transcription factor 1
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FAB	French-American-British cooperative group
FBS	fetal bovine serum
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
FN	fakultní nemocnice
Fwd	forward
Glu	glutamin
Gran	granulocyty
HDACs	histone deacetylases
His	histidin

HR	high risk
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
IFM	imunofluorescenční mikroskopie
Ig	immunoglobulin
IGF-2	insulin-like growth factor II
IGFBP-4	insulin-like growth factor-binding protein 4
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IHC	immunohistochemie
inv	inverze
IR	insulin receptor
ITD	internal tandem duplication
JMML	juvenilní myelomonocytární leukémie
KD	kostní dřeň
KDHO	Klinika dětské hematologie a onkologie
k	kilo
KTS	Lysin, Threonin, Serin
LB	Luria Broth Base
LMG	laboratoř molekulární genetiky
MDS	myelodysplastickým syndrom
M13	bakteriofág M13
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
m	mili
M	molar
min	minuta
MIS	müllerian inhibiting substance
MLL	mixed lineage leukemia
MMLV	murine leukemia viruses
Mono	monocyty
MRN	minimální reziduální nemoc
mRNA	messenger RNA
My	myeloid
MYB	myeloblastosis oncogene
MYC	myelocytomatosis oncogene
MYH11	myosin, heavy chain 11

N	počet
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	ortovanadát sodný
NaF	fluorid sodný
NCN	normalised copy number
NK-AML	normal karyotype AML
ODC	ornithine decarboxylase
p	probability
PAR4	protease-activated receptor 4
PAX2	paired box gene 2
PBS	phosphate buffered saline
PC	průtoková cytometrie
PCR	polymerase chain reaction
PDGFA	platelet derived growth factor A-chain
PK	periferní krev
PML	promyelocytic leukemia
PMOS	phosphorodiamidate morpholino oligomers
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluorid
pre	prekurzor
pro	prolin
PSDH	pracovní skupina pro dětskou hematologii
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
R	korelační koeficient
RA	refrakterní anemie
RAEB	refrakterní anemie s excesem blastů
RAEB-T	refrakterní anemie s excesem blastů v transformaci
RARa	retinoic acid receptor alpha
RC	refrakterní cytopenie
RCMD	refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
Rvs	reverse
s	sekunda
SCD1	syndecan-1

SDS	sodiumdodecylsulfát
SF1	splicing factor 1
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SP1	specificity Protein 1
SPSS	statistical Package for the Social Sciences
SRSF2	serine/arginine-rich splicing factor 2
SRY	sex determining region Y
sWT1	short WT1
TAA	tumor associated antigen
TAMRA	tetramethylrhodamine
TCR	T-cell receptor
TEL	ets variant 6
TET2	tet methylcytosine dioxygenase 2
TFIIB	transcription factor IIB
TGCTs	testicular germ cell tumors
TGFb	transforming growth factor-beta
Th	T helper cell
THBS1	thrombospondin-1
TKD	transplantace kostní dřeň
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	unit
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
U2AF65	U2AF large subunit
ÚHKT	ústav hematologie a krevní transfúze
USA	United States of America
WAGR	Wilms tumour, Aniridia, Genitourinary anomalies, mental Retardation
WHO	World Health Organization
WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 4
WT1	Wilms' tumor gene 1

## Citovaná literatura

1. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB (1993) The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* **40**, 85-97.
2. Arora A, Scholar EM (2005) Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 971-9.
3. Barbaux S, Niaudet P, *et al.* (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* **17**, 467-70.
4. Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernandez P, Collado R, Sayas MJ, Sanz MA (2004) Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* **89**, 926-33.
5. Bejar R, Stevenson K, *et al.* (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* **364**, 2496-506.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**, 451-8.
7. Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND (1992) Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* **257**, 235-7.
8. Boublikova L, Kalinova M, *et al.* (2006) Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* **20**, 254-63.
9. Bruening W, Pelletier J (1996) A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* **271**, 8646-54.
10. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE (1991) Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol Cell Biol* **11**, 1707-12.
11. Burwell EA, McCarty GP, Simpson LA, Thompson KA, Loeb DM (2007) Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells. *Oncogene* **26**, 3423-30.
12. Call KM, Glaser T, *et al.* (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* **60**, 509-20.

13. Campana D, Pui CH (1995) Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* **85**, 1416-34.
14. Candoni A, Tiribelli M, *et al.* (2009) Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* **82**, 61-8.
15. Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, Hastie ND, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A (1996) RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7562-6.
16. Cilloni D, Gottardi E, *et al.* (2002) Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* **16**, 2115-21.
17. Cilloni D, Gottardi E, *et al.* (2003) Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* **21**, 1988-95.
18. Cilloni D, Messa F, *et al.* (2008) Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* **93**, 921-4.
19. Cilloni D, Saglio G (2004) WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* **112**, 79-84.
20. Coosemans A, Van Calster B, Verbist G, Moerman P, Vergote I, Van Gool SW, Amant F (2011) Wilms tumor gene 1 (WT1) is a prognostic marker in high-grade uterine sarcoma. *Int J Gynecol Cancer* **21**, 302-8.
21. Creutzig U, Zimmermann M, *et al.* (2005) Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* **19**, 2030-42.
22. Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K (2004) Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet* **13**, 405-15.
23. Damm F, Kosmider O, *et al.* (2012) Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 3211-8.
24. Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N (2004) Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* **13**, 235-46.

25. Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND (1998) WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* **12**, 3217-25.
26. Davis MM, Bjorkman PJ (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395-402.
27. Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS, Garrett CT (2000) Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. *Mol Diagn* **5**, 117-28.
28. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ, 3rd (1992) Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* **257**, 674-8.
29. Dumur CI, Dechsukhum C, Wilkinson DS, Garrett CT, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A (2002) Analytical validation of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction quantitation of different transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Anal Biochem* **309**, 127-36.
30. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA (2001) The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Embo J* **20**, 1897-909.
31. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R, Klein-Hitpass L, Ottinger H, Beelen DW, Opalka B (2005) WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica* **90**, 326-34.
32. Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Haber DA (1997) Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* **57**, 1429-34.
33. Figueroa ME, Skrabanek L, *et al.* (2009) MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **114**, 3448-58.
34. Gaidzik V, Dohner K (2008) Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol* **35**, 346-55.
35. Gaidzik VI, Schlenk RF, *et al.* (2009) Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* **113**, 4505-11.
36. Gaiger A, Linnerth B, Mann G, Schmid D, Heinze G, Tisljar K, Haas OA, Gadner H, Lion T (1999) Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *Eur J Haematol* **63**, 86-93.
37. Gaiger A, Reese V, Disis ML, Cheever MA (2000) Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **96**, 1480-9.



38. Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Collins T, Sukhatme VP (1992) Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10984-8.
39. Gianfaldoni G, Mannelli F, Ponziani V, Longo G, Bencini S, Bosi A, Vannucchi AM (2010) Early reduction of WT1 transcripts during induction chemotherapy predicts for longer disease free and overall survival in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **95**, 833-6.
40. Goodyer P, Dehbi M, Torban E, Bruening W, Pelletier J (1995) Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1. *Oncogene* **10**, 1125-9.
41. Gottardi E CD, Daly S, Green S, Pallisgaard N, Hokland P et al. (2005) Standardization of WT1 mRNA quantification for minimal residual disease (MRD) monitoring in acute leukemia patients: a European LeukemiaNet concerted action. *Blood (ASH annual meeting abstracts)* **106**, 3295.
42. Greaves M (2006) Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* **6**, 193-203.
43. Griffiths EA, Gore SD (2008) DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* **45**, 23-30.
44. Grimwade D, Walker H, et al. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**, 2322-33.
45. Gu W, Hu S, Chen Z, Qiu G, Cen J, He B, He J, Wu W (2010) High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemias with more predominant WT1+17AA isoforms at relapse. *Leuk Res* **34**, 46-9.
46. Guan LS, Liu JJ, Xu YH, Wang ZY (1998) A point mutation within exon 5 of the WT1 gene of a sporadic unilateral Wilms' tumor alters gene function. *Cancer Res* **58**, 4180-4.
47. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9618-22.
48. Hamalainen MM, Kairisto V, et al. (2008) Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* **80**, 201-7.

49. Harrington MA, Konicek B, Song A, Xia XL, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd (1993) Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J Biol Chem* **268**, 21271-5.
50. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, Head DR (2003) A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* **17**, 277-82.
51. Hayashi S, Oji Y, Kanai Y, Teramoto T, Kitaichi M, Kawaguchi T, Okada M, Sugiyama H, Matsumura A (2012) Low Wilms' tumor gene expression in tumor tissues predicts poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Invest* **30**, 165-71.
52. Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer LM (1997) The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* **272**, 19609-14.
53. Hewitt SM, Fraizer GC, Wu YJ, Rauscher FJ, 3rd, Saunders GF (1996) Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J Biol Chem* **271**, 8588-92.
54. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ, 3rd, Saunders GF (1995) Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* **55**, 5386-9.
55. Hewitt SM, Saunders GF (1996) Differentially spliced exon 5 of the Wilms' tumor gene WT1 modifies gene function. *Anticancer Res* **16**, 621-6.
56. Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, *et al.* (2009) Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* **113**, 5951-60.
57. Hollink IH, Zwaan CM, *et al.* (2009) Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia* **23**, 262-70.
58. Hosen N, Sonoda Y, *et al.* (2002) Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol* **116**, 409-20.
59. Hossain A, Nixon M, Kuo MT, Saunders GF (2006) N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *J Biol Chem* **281**, 28122-30.
60. Hossain A, Saunders GF (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* **276**, 16817-23.
61. Hubinger G, Schmid M, Linortner S, Manegold A, Bergmann L, Maurer U (2001) Ribozyme-mediated cleavage of wt1 transcripts suppresses growth of leukemia cells. *Exp Hematol* **29**, 1226-35.

62. Chomeczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
63. Inoue K, Ogawa H, *et al.* (1996) Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* **88**, 2267-78.
64. Inoue K, Tamaki H, *et al.* (1998) Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* **91**, 2969-76.
65. Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* **35**, 685-8.
66. Ito K, Oji Y, *et al.* (2006) Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* **25**, 4217-29.
67. Jacobsohn DA, Tse WT, Chaleff S, Rademaker A, Duerst R, Olszewski M, Huang W, Chou PM, Kletzel M (2009) High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival. *Br J Haematol* **146**, 669-74.
68. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekeres M, Sauntharajah Y, Maciejewski JP (2009) Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* **113**, 1315-25.
69. Jomgeow T, Oji Y, *et al.* (2006) Wilms' tumor gene WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform induces morphological changes and promotes cell migration and invasion in vitro. *Cancer Sci* **97**, 259-70.
70. Kaspers GJ, Zwaan CM (2007) Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* **92**, 1519-32.
71. Keilholz U, Menssen HD, *et al.* (2005) Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* **19**, 1318-23.
72. Kent J, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND, van Heyningen V (1995) The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* **11**, 1781-92.
73. Kerst G, Bergold N, Viebahn S, Gieseke F, Kalinova M, Trka J, Handgretinger R, Muller I (2008) WT1 protein expression in slowly proliferating myeloid leukemic cell lines is scarce throughout the cell cycle with a minimum in G0/G1 phase. *Leuk Res* **32**, 1393-9.
74. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K (1996) Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* **87**, 2171-9.

75. Ko M, Huang Y, *et al.* (2010) Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839-43.
76. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**, 679-91.
77. Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, Appelt C, Na IK, le Coutre P, Schmidt CA (2001) Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol* **114**, 313-8.
78. Krug U, Yasmeen A, Beger C, Baumer N, Dugas M, Berdel WE, Muller-Tidow C (2009) Cyclin A1 regulates WT1 expression in acute myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* **34**, 129-36.
79. Ladomery MR, Slight J, Mc Ghee S, Hastie ND (1999) Presence of WT1, the Wilm's tumor suppressor gene product, in nuclear poly(A)(+) ribonucleoprotein. *J Biol Chem* **274**, 36520-6.
80. Lapillonne H, Renneville A, *et al.* (2006) High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **24**, 1507-15.
81. Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* **81**, 391-401.
82. Liu JJ, Wang ZY, Deuel TF, Xu YH (1999) Imbalanced expression of functionally different WT1 isoforms may contribute to sporadic unilateral Wilms' tumor. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 197-9.
83. Loeb DM, Summers JL, Burwell EA, Korz D, Friedman AD, Sukumar S (2003) An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia* **17**, 965-71.
84. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Hill DE, Haber DA (1993) Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5100-4.
85. Maslak PG, Dao T, *et al.* (2010) Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* **116**, 171-9.
86. Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L (1997) The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol* **25**, 945-50.

87. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS (1999) WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* **18**, 3990-4003.
88. Menke AL, Shvarts A, Riteco N, van Ham RC, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1997) Wilms' tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res* **57**, 1353-63.
89. Menke AL, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1998) The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol* **181**, 151-212.
90. Miglino M, Colombo N, *et al.* (2011) WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **52**, 1961-9.
91. Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H, Noguchi S (2002) High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **8**, 1167-71.
92. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A (1999) YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **126**, 1845-57.
93. Moore AW, Schedl A, McInnes L, Doyle M, Hecksher-Sorensen J, Hastie ND (1998) YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev* **79**, 169-84.
94. Moorwood K, Salpekar A, Ivins SM, Hall J, Powlesland RM, Brown KW, Malik K (1999) Transactivation of the WT1 antisense promoter is unique to the WT1[+/-] isoform. *FEBS Lett* **456**, 131-6.
95. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* **93**, 445-54.
96. Nishida S, Hosen N, *et al.* (2006) AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* **107**, 3303-12.
97. Nomdedeu JF, Hoyos M, *et al.* (2013) Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia*.
98. Noronha SA, Farrar JE, Alonzo TA, Gerbing RB, Lacayo NJ, Dahl GV, Ravindranath Y, Arceci RJ, Loeb DM (2009) WT1 expression at diagnosis does not predict survival in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* **53**, 1136-9.

99. Oka Y, Elisseeva OA, *et al.* (2000) Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1 ) product. *Immunogenetics* **51**, 99-107.
100. Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Elisseeva OA, Nakajima H, Udaka K, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H (2006) Development of WT1 peptide cancer vaccine against hematopoietic malignancies and solid cancers. *Curr Med Chem* **13**, 2345-52.
101. Oka Y, Tsuboi A, *et al.* (2004) Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13885-90.
102. Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, Elisseeva OA, Ogawa H, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H (2000) Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol* **164**, 1873-80.
103. Paschka P, Marcucci G, *et al.* (2008) Wilms Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*.
104. Pelletier J, Bruening W, *et al.* (1991) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* **67**, 437-47.
105. Phelan SA, Lindberg C, Call KM (1994) Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ* **5**, 677-86.
106. Pritchard-Jones K, Renshaw J, King-Underwood L (1994) The Wilms tumour (WT1) gene is mutated in a secondary leukaemia in a WAGR patient. *Hum Mol Genet* **3**, 1633-7.
107. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* **29**, 551-65.
108. Pui CH, Sandlund JT, *et al.* (2003) Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *Jama* **290**, 2001-7.
109. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM (2004) Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 118-45.
110. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein HJ, Carroll AJ (1999) Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood* **94**, 3707-16.
111. Rauscher FJ, 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T (1990) Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* **250**, 1259-62.

112. Renshaw J, King-Underwood L, Pritchard-Jones K (1997) Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* **19**, 256-66.
113. Rezvani K, Brenchley JM, *et al.* (2005) T-cell responses directed against multiple HLA-A\*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res* **11**, 8799-807.
114. Richard DJ, Schumacher V, Royer-Pokora B, Roberts SG (2001) Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev* **15**, 328-39.
115. Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, Matsuda EI, Nowill AE, Brandalise SR, Yunes JA (2007) Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **49**, 133-8.
116. Ross ME, Mahfouz R, *et al.* (2004) Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* **104**, 3679-87.
117. Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Dressler GR (1995) Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* **121**, 867-75.
118. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ, 3rd, Sukumar S (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev* **8**, 720-31.
119. Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau Yf C, Saunders GF (1997) The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* **3**, 2571-80.
120. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG (2001) WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* **273**, 141-61.
121. Schmid D, Heinze G, *et al.* (1997) Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* **11**, 639-43.
122. Scholz H, Kirschner KM (2005) A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)* **20**, 54-9.
123. Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E (2004) Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol* **83**, 745-50.
124. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT, Jr., Daniel CW (1997) Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8132-7.

125. Silverman LB, Gelber RD, *et al.* (2001) Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* **97**, 1211-8.
126. Smith SI, Weil D, Johnson GR, Boyd AW, Li CL (1998) Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood* **91**, 764-73.
127. Sotobori T, Ueda T, Oji Y, Naka N, Araki N, Myoui A, Sugiyama H, Yoshikawa H (2006) Prognostic significance of Wilms tumor gene (WT1) mRNA expression in soft tissue sarcoma. *Cancer* **106**, 2233-40.
128. Stary J, Mayer J, kolektiv (2002) 'Leukemie.' (Grada Publishing)
129. Stiller CA (2004) Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* **23**, 6429-44.
130. Sugiyama H (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* **73**, 177-87.
131. Sugiyama H (2002) Wilms tumor gene WT1 as a tumor marker for leukemic blast cells and its role in leukemogenesis. *Methods Mol Med* **68**, 223-37.
132. Sundarasetty BS, Singh VK, *et al.* (2013) Lentivirus-induced dendritic cells for immunization against high-risk WT1(+) acute myeloid leukemia. *Hum Gene Ther* **24**, 220-37.
133. Trka J, Kalinova M, *et al.* (2002) Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* **16**, 1381-9.
134. Tsuboi A, Oka Y, *et al.* (2000) Cytotoxic T-lymphocyte responses elicited to Wilms' tumor gene WT1 product by DNA vaccination. *J Clin Immunol* **20**, 195-202.
135. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013-34.
136. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H (1992) Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* **6 Suppl 1**, 47-59.
137. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL (1991) Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* **198**, 1-91.



138. Virappane P, Gale R, *et al.* (2008) Mutation of the Wilms' Tumor 1 Gene Is a Poor Prognostic Factor Associated With Chemotherapy Resistance in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol.*
139. Wagner KD, Wagner N, Schedl A (2003) The complex life of WT1. *J Cell Sci* **116**, 1653-8.
140. Walter MJ, Ding L, *et al.* (2011) Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**, 1153-8.
141. Wang W, Lee SB, Palmer R, Ellisen LW, Haber DA (2001) A functional interaction with CBP contributes to transcriptional activation by the Wilms tumor suppressor WT1. *J Biol Chem* **276**, 16810-6.
142. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF (1993) The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem* **268**, 9172-5.
143. Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF (1995) Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* **10**, 415-22.
144. Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S (2005) Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **19**, 1416-23.
145. Willasch AM, Gruhn B, *et al.* (2009) Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* **23**, 1472-9.
146. Wu F, Oka Y, *et al.* (2005) Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia* **19**, 268-74.
147. Yamagami T, Sugiyama H, *et al.* (1996) Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* **87**, 2878-84.
148. Yang C, Romaniuk PJ (2008) The ratio of +/-KTS splice variants of the Wilms' tumour suppressor protein WT1 mRNA is determined by an intronic enhancer. *Biochem Cell Biol* **86**, 312-21.
149. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD (2007) A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21**, 868-76.
150. Yin JA, Grimwade D (2002) Minimal residual disease evaluation in acute myeloid leukaemia. *Lancet* **360**, 160-2.

151. Zdrahalova K, Stary J (2007) Leukemie. *Sanquis* **51**.
152. Zhao XS, Jin S, Zhu HH, Xu LP, Liu DH, Chen H, Liu KY, Huang XJ (2012) Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* **47**, 499-507.

## **Přílohy**

**P1.** Kramarzova K, Stuchly J, Willasch A, Gruhn B, Schwarz J, Cermak J, Machova-Polakova K, Fuchs O, Stary J, Trka J, Boublikova L. Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia* 2012; 26: 2086–2095.

**(IF=10,164)**

## ORIGINAL ARTICLE

# Real-time PCR quantification of major *Wilms' tumor gene 1 (WT1)* isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences

K Kramarzova<sup>1</sup>, J Stuchly<sup>1</sup>, A Willasch<sup>2</sup>, B Gruhn<sup>3</sup>, J Schwarz<sup>4</sup>, J Cermak<sup>4</sup>, K Machova-Polakova<sup>4</sup>, O Fuchs<sup>4</sup>, J Stary<sup>1</sup>, J Trka<sup>1</sup> and L Boublikova<sup>1</sup>

*Wilms' tumor gene 1 (WT1)* functions including some contradictory effects may be explained by the presence and interactions of its isoforms, however, their evaluation has been so far complicated by several technical problems. We designed unique quantitative PCR systems for direct quantification of the major *WT1* isoforms A [EX5 – /KTS –], B [+ / –], C [– / +] and D [+ / +] and verified their sensitivity, specificity and reproducibility in extensive testing. With this method we evaluated *WT1* total and isoform expression in 23 normal bone marrow (BM) samples, 73 childhood acute myeloid leukemia (AML), 20 childhood myelodysplastic syndrome (MDS), 9 childhood severe aplastic anemia (SAA), 30 adult AML and 29 adult MDS patients. *WT1* isoform patterns showed differences among these samples and clustered them into groups representing the specific diagnoses ( $P < 0.0001$ ). Isoform profiles were independent of total *WT1* expression and possess certain common features—overexpression of isoform D and EX5[+] variants. The KTS[+]/KTS[–] ratio was less variable than the EX5[+]/EX5[–] ratio and differed between children and adults ( $P < 0.001$ ); the EX5[+]/EX5[–] ratio varied between diagnoses (AML vs MDS,  $P < 0.001$ ). These findings bring new insights into *WT1* isoform function and suggest that the ratio of *WT1* isoforms, particularly EX5 variants, is probably crucial for the process of malignant transformation.

*Leukemia* advance online publication, 1 May 2012; doi:10.1038/leu.2012.76

**Keywords:** *Wilms' tumor gene 1 (WT1)*; isoforms; acute myeloid leukemia; myelodysplastic syndrome; real-time quantitative PCR (qPCR)

## INTRODUCTION

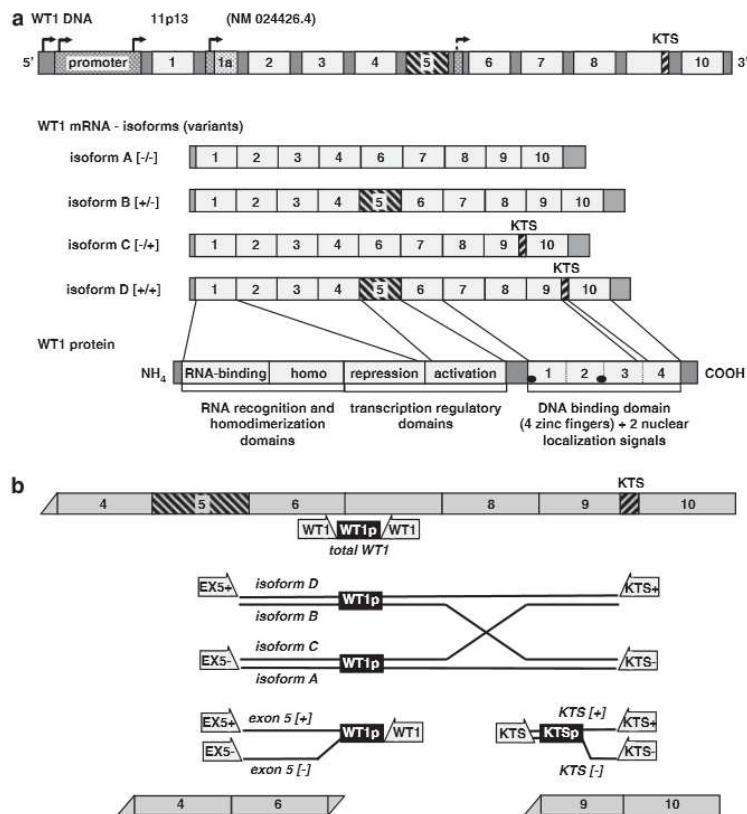
*Wilms' tumor gene 1 (WT1)* has been intensively studied because of its important role in embryogenesis and oncogenesis, as a potential new prognostic factor, minimal residual disease marker and target of vaccination immunotherapy in various malignancies, particularly in acute myeloid leukemia (AML; reviewed<sup>1–7</sup>). Although there is an increasing number of genes and signaling pathways *WT1* has been shown to interact with, the actual relevance and input of *WT1* to the malignant process has yet to be elucidated. It seems probable that at least several aspects influence and contribute to the final outcome of the *WT1* pro- or anti-oncogenic effect: deregulation of *WT1* expression, discrepancy in the proportion of functionally differing *WT1* isoforms, interactions with other factors and cofactors and the particular status and perceptiveness of the cell. Disturbed *WT1* regulatory function may alter the mesenchymal–epithelial balance, resulting in malignant proliferation as well as non-malignant diseases associated with the *WT1* gene (for example, glomerulosclerosis).<sup>8,9</sup>

*WT1* is located on chromosome 11p13 and encodes a zinc-finger transcription factor. It activates or more often represses the transcription of many target genes involved in the cell cycle, proliferation, differentiation and apoptosis control, and is also involved in post-transcriptional mRNA processing.<sup>3,10–12</sup> At least

36 isoforms of *WT1* protein are produced from the same DNA template as a result of alternative transcription initiation, alternative pre-mRNA splicing, mRNA editing and alternative translation initiation.<sup>1,3,5,10,13–18</sup> The four major *WT1* isoforms are generated by an alternative splicing and vary in the presence or absence of so called 17AA insert (17 amino acids encoded by the whole exon 5) and KTS insert (according to the three amino acids leucine–threonine–serine encoded by the terminal sequence of exon 9)—*WT1* variants A [EX5 – /KTS –], B [EX5 + /KTS –], C [EX5 – /KTS +] and D [EX5 + /KTS +].<sup>19–23</sup> An alternative *WT1* transcript, *AWT1* (also short transcript, *sWT1*), maintains *WT1* exonic structure between exons 2 and 10 but uses another first exon located in intron 1 of *WT1* (exon 1a). It may otherwise exist in all splicing variants characteristic of *WT1*.<sup>14,15</sup> Another N-terminally truncated transcript, lacking exons 1–5, has been previously described and the presence of a cryptic promoter within *WT1* intron 5 hypothesized.<sup>24,25</sup> All of these modifications markedly influence the activity of *WT1* protein. The KTS insert is located between the protein's third and fourth zinc finger and alters the spacing between these fingers, changing the DNA recognition site and decreasing the DNA-binding ability. The 17AA (EX5) insert is located in the middle of the protein and may function as a transcriptional activation domain. The *AWT1* transcript does not contain the repression domain (Figure 1).<sup>1,3,14,15,26,27</sup>

<sup>1</sup>CLIP–Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Pediatric Hematology, Oncology and Hemostaseology, Goethe University, Hospital for children and adolescents II/III, Frankfurt am Main, Germany; <sup>3</sup>Department of Pediatrics, University Hospital of Jena, Jena, Germany and <sup>4</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic. Correspondence: Professor J Trka, CLIP–Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague, V Uvalu 84 15006, Prague, Czech Republic. E-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

Received 9 December 2011; revised 15 February 2012; accepted 7 March 2012; accepted article preview online 20 March 2012



**Figure 1.** Scheme of *WT1* gene and protein and qPCR detection systems. *WT1* gene and its products (a)-alternative splice sites are crosshatched, black arrows indicate alternative transcription initiation sites. qPCR detection systems for total *WT1* and its main isoforms (b)-primers indicated by gray arrows, probes by black rectangles, their detailed description is given in Table 2.

Isoforms containing both splice inserts are the prevalent variants, the least common transcripts are those missing both inserts, and the physiological ratio of A[-/-] : B[+/-] : C[-/+ ] : D[+/+] seems to be stable during the development of *WT1* expressing tissues; for fetal kidney and Wilms' tumors, the ratio referred is 1.0 : 2.5 : 3.8 : 8.3.<sup>10</sup> An altered ratio of *WT1* KTS[+ ]/KTS[- ] variants caused by defective splicing has been described in rare pre-malignant syndromes (Frasier syndrome, Denys-Drash syndrome).<sup>28-31</sup> In AML, significantly higher expression levels of EX5[+] variants at diagnosis and at relapse have been detected.<sup>26,32,33</sup> In addition, the alternative *AWT1* transcript has been found to be overexpressed in leukemia samples.<sup>15,34</sup> Functional studies suggest that many of *WT1* effects are related to particular *WT1* isoforms.<sup>8,20,35-40</sup>

The available data on *WT1* isoform expression patterns in normal and malignant hematopoiesis are scarce and the methods so far used for the detection of *WT1* major isoforms (reverse transcriptase PCR, GeneScan, quantitative PCR of EX5[+] and KTS[+] variants) have only yielded an approximate estimation of *WT1* isoform levels.

The main aim of this project was to design and optimize a real-time quantitative PCR (qPCR) method that would enable precise quantification of the four major *WT1* variants, and using this method to determine the ratio of *WT1* isoforms in healthy donors, leukemic cell lines, childhood and adult AML and in myelodysplastic syndrome (MDS) samples, to demonstrate their clinical relevance.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

**Cell lines.** Eight leukemic cell lines (Supplementary Table S1) were cultured according to the supplier's recommendations. They were used for method optimization, validation studies and as positive controls.

For tests of *WT1* expression stability, cell lines were harvested (in triplicate) 24, 48 and 72 h after the start of culture and further processed.

**Patients samples.** Following ethical committee approval and informed consent, 73 diagnostic BM samples from childhood patients with AML treated from 1994 to 2009 in the Czech Pediatric Hematology Working Group centers and at the University Hospital in Jena, Germany, were collected on a consecutive basis. For comparison, further diagnostic BM samples from related diseases were tested, including 20 samples of childhood MDS, 9 samples of childhood SAA, both diagnosed and treated from 1994 to 2011 in the same hospitals, 30 samples from adult AML and 29 from adult MDS, managed from 1998 to 2011 in the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic (Table 1).

In addition, 23 non-malignant BM samples were used as negative controls. These were obtained from healthy donors or from leukemia patients in long-term complete remission with confirmed MRD negativity.

### Methods

**Sample processing.** BM samples were collected into sterile tubes with anticoagulant, immediately transported to the lab and processed. Mononuclear cells were separated on a density gradient medium (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) and stored at -80 °C. RNA was isolated using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany),

**Table 1.** Patients' characteristics

AML	Childhood	Adult
Total no. of patients	73	30
M/F	34/38	13/17
Age—median (range) [years]	11 (0–19)	50 (19–72)
Subtypes		
M0	2	2
M1	10	2
M2	19	10
M3	8	3
M4	18	10
M5	14	2
M6	0	1
M7	2	0
Molecular aberrations		
t(15;17) PML-RARA	8	3
t(8;21) AML1-ETO	6	1
inv(16) MYH11-CBFB	11	2
t(11q23) MLL rearrangements	13	0
FLT3-ITD <sup>a</sup>	9	13
Th. protocols	AML-BFM 98 and 2004	national protocols
Risk groups		
Standard	30	6
Intermediate	NA	20
High <sup>b</sup>	43	2
Follow-up—median (range) [months]	47 (1–173)	8 (1–21)
Relapse	24	12
Died of leukemia	25	12
Other cause	0	0
MDS	Childhood	Adult
Total no. of patients	20	29
M/F	12/8	18/11
Age—median (range) [years]	10 (1–19)	68 (46–89)
Subtypes		
RC/RA	13	4
RARS	0	10
RCMD	0	10
RAEB	6	5
JMML	1	0
Th. protocols	EWOG-MDS 1998 and 2006	national protocols
Follow-up—median (range) [months]	23 (1–203)	15 (2–158)
Progression to AML	2	2
Died of MDS/AML	3	6
Other cause	0	0
SAA	Childhood	Adult
Total no. of patients	8	—
M/F	5/4	—
Age—median (range) [years]	13 (1–18)	—
Follow-up—median (range) [months]	16 (5–32)	—
Died of SAA	0	—
Other cause	0	—

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; BM, bone marrow; M/F, male/female; MDS, myelodysplastic syndrome; MLL, mixed lineage leukemia; MRC, Medical Research Council; NA, not applicable; SAA, severe aplastic anemia; Th., therapy. <sup>a</sup>In 15 childhood AML patients the FLT3 status is not known. <sup>b</sup>Risk group stratification of childhood AML (AML-BFM 98 and 2004): standard risk—FAB M1/M2 with Auer rods, M3, M4eo, Down's syndrome, t(8;21), t(15;17), inv(16), and ≤5% of blasts in BM at D15 (except M3); high risk—others. Risk group stratification of adult AML (MRC classification): standard (favorable) risk—t(8;21), t(15;17), inv(16); intermediate risk—others; high (adverse) risk—abn(3q), del(5q), -5/-7, complex karyotype, and no favorable aberration; for two adult AML patients the risk stratification is not available.

its concentration was evaluated by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cDNA synthesis was performed using the iScript kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) starting from 1 µg of total RNA.

**qPCR for total WT1.** Quantification of total WT1 expression was performed by qPCR of our own design,<sup>41</sup> which performance is quite comparable with a commercially available WT1 kit (WT1 ProfileQuant, Ipsogen, Marseille, France).

**Capillary electrophoresis and fragment analysis (GeneScan) detection of WT1 isoforms.** As a reference method, detection of WT1 isoforms was performed by capillary electrophoresis and fragment analysis as described previously.<sup>42</sup>

**RT-PCR for WT1 isoforms.** RT-PCR assays for separate detection of the four main WT1 isoforms were established with several sets of primers located on exon 5 (EX5+), the exon 4/exon 6 boundary (EX5-), KTS (KTS+) and the exon 9/exon 10 boundary (KTS-). PCR products were analyzed by electrophoresis on agarose gel or by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), as described elsewhere.

**Plasmid calibrators for WT1 isoforms.** Products of RT-PCR with primers located on exon 4 and exon 10 of WT1 gene were cloned using the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as described previously.<sup>41</sup> The WT1 isoforms were identified by RT-PCR and selected clones were used for bulk plasmid production. Sets of calibrators for WT1 A, B, C and D isoforms with final concentrations of 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> and 10<sup>1</sup> copies per 5 µl were prepared.

**qPCR for WT1 isoforms.** Detection of the WT1 isoforms A[EX5-/KTS-], B[+/-], C[-/+ ] and D[+/+] by qPCR is problematic because of the length of the amplicon (~460 bases) and high sequence homology between KTS[+] and KTS[-] variants. To overcome these difficulties, we tested several approaches: (i) different amplification enzymes and PCR mixes; (ii) different primer designs (including short primers, primers with introduced point mutations/mismatches close to the 3'-end); and (iii) other concepts that could increase the sensitivity and specificity of the reactions (for example, touch-down PCR). Plasmids, cell lines, patient and donor samples were used as controls. The reactions characteristics were compared with those of qPCR for total WT1 and for the control gene ABL.<sup>43–45</sup> For further reference and correlation, qPCR reactions detecting only one of the two splicing regions—variants EX5[+], EX5[-], KTS[+] and KTS[-] were established. The efficacy of qPCR assays was also validated against the results of RT-PCR and GeneScan detection of WT1 isoforms.

The final optimized primer design and reaction conditions are summarized in Figure 1 and Table 2. The qPCR reaction was performed on the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) or LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). ABL was used as a control gene; detection of WT1 was carried out in triplicate, detection of ABL and calibrators in duplicate. Samples were considered positive if at least one reaction of the replicate was positive, and negative if all reactions were negative, within the detection range. WT1 (total and isoform) and ABL copy number and WT1 normalized copy number (NCN = WT1/ABL × 10<sup>4</sup>) were calculated from the plasmid standard curves. The ratio of WT1 isoforms was counted as their proportion of all WT1 isoforms sum. From the variants EX5[+], EX5[-], KTS[+] and KTS[-], ratios of A, B, C and D isoforms could also be estimated by multiplication of the ratios of these variants by each other: the ratio of EX5[-] multiplied with the ratio of KTS[-] yields the ratio of isoform A; EX5[+] with KTS[-] for isoform B; EX5[-] with KTS[+] for isoform C; and EX5[+] with KTS[+] for isoform D.<sup>33</sup>

**Statistical analysis.** Results were analyzed using statistical software (Excel, Microsoft, Redmond, WA, USA; Prism, GraphPad, La Jolla, CA, USA; R-project, Vienna, Austria). Correlations of results in between the different assays were checked by non-parametric Spearman's rank correlation. Group comparisons were performed by non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison post test. Possible dependence of WT1 isoform expression patterns on total WT1 values was tested using linear regression modeling. The prognostic potential of WT1 isoform expression was evaluated by logistic regression. Multinomial logistic regression was used to assess the relation of total WT1 and WT1 isoform expression to specific diagnoses and their ability to separate the particular diagnoses

into discrete clusters. To compare the statistical model,  $\chi^2$  tests on residual deviance were performed. The principal component analysis was used for the dimensional reduction in visualization. Heatmaps were generated by hierarchical clustering—Euclidean metric—Ward linkage. The relation of particular WT1 isoforms to each other and the independence of their splicing was estimated by linear regression.

## RESULTS

### qPCR for WT1 isoforms—assay performance

**Sensitivity.** The main characteristics of standard curves generated by plasmid calibrators and cell line 10-fold dilution series were quite comparable with those of qPCR for total WT1 and ABL control gene (slope 3.19 to  $-3.40$ , intercept 38.45–38.87, mean  $C_t$  of  $10^5$  copies 21.80–23.00 for plasmid calibrators). The reliable sensitivity threshold for each isoform was identified as  $10^1$  plasmid copies, which was the lowest plasmid concentration used; it always generated positive results, in each reaction in replicates and for each of the four detected isoforms. Addition of the other three isoforms in much higher concentrations ( $10^5$  copies of each) did not affect this sensitivity (Supplementary Figure S1). The sensitivity of various cell line dilution series reached  $10^{-2}$  to  $10^{-4}$ , depending on their total WT1 expression level.

**Specificity.** In extensive testing, no unspecific, cross-reaction positivity was detected within the detection range (cycles 11–40). The reactions for any of the three isoforms other than the specific one, even in high plasmid concentrations of  $10^5$  copies, were always negative (very weak positivities were noticed with non-specific plasmids in high concentrations of  $10^5$  copies coming up after cycle 41, at least 6 cycles after the positivity of the specific plasmid in the lowest concentration  $10^1$  copies. Supplementary Figure S1).

**Reproducibility.** Variations in detected levels and ratios of WT1 isoforms within the same samples were minimal, as confirmed by multiple processing and testing of the samples—in replicates (six replicates) and in repeated experiments. These validation experiments were performed by two independent investigators, using two different qPCR systems (AB 7500, Roche LC480). There was an excellent correlation between the sum of WT1 isoforms and the measured total WT1 expression (Spearman's rank correlation,  $Rho = 0.972$ ,  $P < 0.0001$ ); in absolute values, the sum of WT1 isoforms was 0.5–1.0 log lower than the amount of total WT1. In cell line dilution experiments, WT1 isoform ratios remained constant in samples with total WT1 expression  $\geq 100$  copies and/or the sum of WT1 isoform expression  $\geq 10$  copies. In cases of lower—that means very low—WT1 expression, the determined WT1 isoform ratio may not be correct and its interpretation therefore impossible. Detection of WT1 isoforms by qPCR demonstrated higher sensitivity and accuracy than RT-PCR and GeneScan assays.

### WT1 isoform expression in leukemic cell lines

**WT1 isoform expression patterns in different leukemic cell lines.** Total WT1 expression in leukemic cell lines ranged from 98 to 71 915 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN (Figure 2). WT1 isoform expression patterns were quite diverse among different cell lines, however, the predominance of isoform D[+/+] and overexpression of EX5[+] variants were characteristic of all cell lines (Kruskal–Wallis,  $P < 0.0001$ ). The ratio of KTS[+]/KTS[–] variants seemed to be much more stable across the cell lines than the EX5[+]/EX5[–] ratio (Figure 2).

**Stability of WT1 isoform expression in cells.** Although the total WT1 expression levels fluctuated slightly at different time-points of harvest, the ratio of WT1 isoforms remained very stable during cell growth (Supplementary Figure S2).

### WT1 isoform expression in clinical samples

**WT1 isoform expression in control samples.** In 23 normal and remission BM, total WT1 expression detected was within the physiological levels, with a median of 29 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN (range 0–595; Figure 3). These very low levels of total WT1 unfortunately precluded valid analysis of WT1 isoforms in the majority of control samples. The only healthy BM sample analyzed revealed a substantial overexpression of isoform D, with a ratio of 0.12 : 0.18 : 0.17 : 0.53 for isoforms A, B, C and D, respectively. In two additional samples, EX5[–], EX5[+], KTS[–] and KTS[+] variants could be detected and the ratio of A, B, C and D isoforms calculated (as described in Methods). WT1 isoform expression patterns established in this way were close to the one detected by direct assessment of isoforms A, B, C and D, the ratio of medians for A, B, C and D being 0.02 : 0.11 : 0.14 : 0.73, respectively. Altogether, expression of WT1 isoforms in control normal and non-malignant BM showed a consistent pattern with high prevalence of isoform D  $> C \approx B > A$ .

**WT1 isoform expression pattern in childhood AML.** The median level of total WT1 expression in 73 childhood AML samples was 2058 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN, with a range of 0–251 786 NCN (Figure 3), allowing the analysis of WT1 isoforms in 57 samples. In the majority of them, a common profile of WT1 isoforms could be detected, with the overexpression of EX5[+] variants and the predominance of isoform D, the median ratio of A, B, C and D being 0.09 : 0.25 : 0.11 : 0.55, respectively (D  $> B > C \approx A$ ). Despite the significant differences in total WT1 expression levels of morphologically and cytogenetically defined subgroups, the ratio of WT1 isoforms was constant across these subgroups (Figure 4). Children with the FLT3/ITD mutation had the same WT1 isoform profile as those with the wild-type FLT3 gene; the same applied to patients of different risk groups. Relapsed patients had an identical WT1 isoform pattern to patients who remained in complete remission, and no relation between the isoform ratio and the risk of relapse could be observed in logistic regression analysis.

**WT1 isoform expression patterns in childhood MDS and SAA.** A total of 20 patients with childhood MDS expressed total WT1 at significantly lower levels compared with AML (median 196, range 0–4221 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN;  $P = 0.003$ ); in RAEB subtype, the total WT1 expression was higher (638, 325–2645 NCN) and less fluctuating than in RC subtype (22, 0–4221 NCN; Figures 3 and 4). The analysis of WT1 isoforms could be performed in 12 patients with sufficient total WT1 levels. In comparison with AML, different and more variable ratios of WT1 isoforms were found in children with MDS, with an abundance of variant D and similar levels of isoforms A, B and C—the median ratio of A, B, C and D was 0.16 : 0.15 : 0.17 : 0.46, D  $> C \approx B \approx A$ .

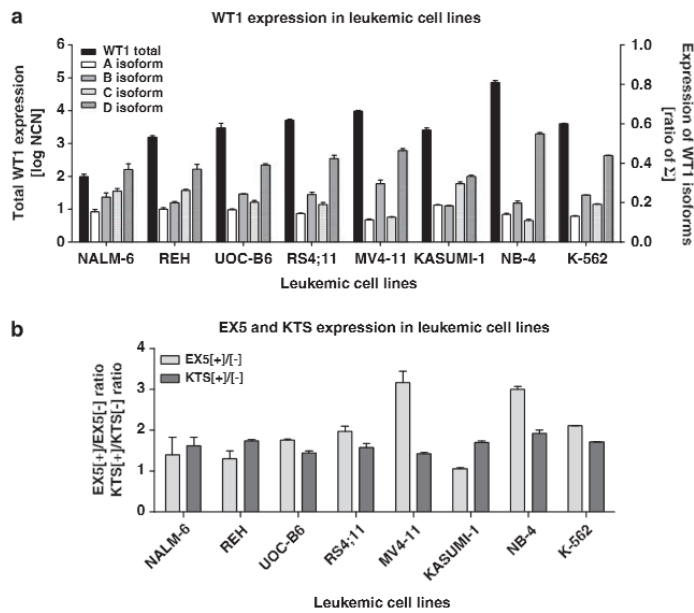
SAA was associated with very low total WT1 expression, similar to or even lower than physiological WT1 expression in control BM samples (median 4, range 2–26 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN; Figure 3). Therefore, analyses of WT1 isoforms in SAA patients could not be performed.

**WT1 isoform expression patterns in adult AML and MDS.** The median total WT1 expression in 30 adults with AML was 3446 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN (range 2–23579), which was comparable to the level detected in childhood AML (Figure 3). In 27 patients, analyzed for the expression pattern of WT1 isoforms, the median ratio of the isoforms A, B, C and D was 0.13 : 0.31 : 0.13 : 0.45, respectively, D  $> B > C \approx A$ . Variations among adult patients were smaller compared with the childhood data. Although there were differences in the levels of respective variants between adults and children, the general expression profile of WT1 isoforms was uniform in both types of AML. Likewise, the ratio of WT1

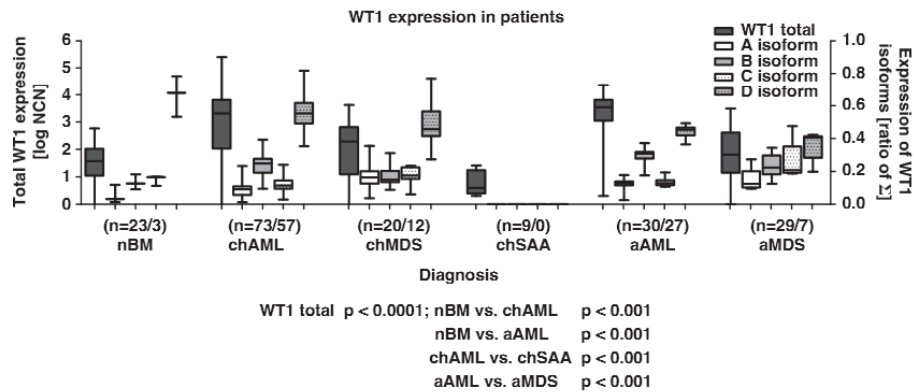
**Table 2.** qPCR detection systems for total WT1 and its main isoforms

Primers and probes				
Primer/probe code	5' Position (size)	Sequence 5'-3' and exon location		
WT1-fwd	1257 (21)	TAC ACA CGC ACG GTG TCT TCA ←──────────────────→ exon 6		
WT1-rvs	1342 (21)	CTC AGA TGC CGA CCA TAC AAG ←──────────────────→ exon 7		
EX5(-)-fwd	1125 (19)	GAG CCA CCT TAA AGG GCC A ←──────────────────→ exon 4                                exon 6		
EX5(+)-fwd	1171 (20)	ATG GAC AGA AGG GCA GAG CA ←──────────────────→ exon 5		
KTS(-)-rvs	1639 (22)	GCT GAA GGG CTT TTC ACC TGT A ←──────────────────→                                ←──────────────────→ exon 10                                exon 9		
KTS(+)-rvs	1638 (25)	CTG AAG GGC TTT TCA CTT GTT TTA C ←──────────────────→                                ←──────────────────→ exon 10                                KTS		
KTS(com)-fwd	1501 (24)	GCT CAA AAG ACA CCA AAG GAG ACA ←──────────────────→ exon 8		
WT1-probe	1279 (25)	6FAM-AGG CAT TCA GGA TGT GCG ACG TGT G-TAMRA ←──────────────────→                                ←──────────────────→ exon 6                                exon 7		
KTS-probe	1562 (24)	6FAM-CGA AAG TTC TCC CGG TCC GAC CAC-TAMRA ←──────────────────→ exon 9		
WT1 variants detected				
WT1 variant	Fwd primer	Probe	Rvs primer	Size of qPCR product
WT1—total	WT1-fwd	WT1-probe	WT1-rvs	86
WT1—isoform A (-/-)	EX5(-)-fwd	WT1-probe	KTS(-)-rvs	455
WT1—isoform B (+/-)	EX5(+)-fwd	WT1-probe	KTS(-)-rvs	460
WT1—isoform C (-/+)	EX5(-)-fwd	WT1-probe	KTS(+)-rvs	463
WT1—isoform D (+/+)	EX5(+)-fwd	WT1-probe	KTS(+)-rvs	468
WT1—exon 5 (-)	EX5(-)-fwd	WT1-probe	WT1-rvs	167
WT1—exon 5 (+)	EX5(+)-fwd	WT1-probe	WT1-rvs	172
WT1-KTS (-)	KTS(com)-fwd	KTS-probe	KTS(-)-rvs	130
WT1-KTS (+)	KTS(com)-fwd	KTS-probe	KTS(+)-rvs	138
Reaction conditions				
Component	qPCR for total WT1		qPCR for WT1 isoforms	
cDNA	5 µl (10% of RT mixture)		5 µl (10% of RT mixture)	
Fwd primer (15 µM)	0.5 µl (300 nM)		1 µl (600 nM)	
Rvs primer (15 µM)	0.5 µl (300 nM)		1 µl (600 nM)	
Probe (5 µM)	1 µl (200 nM)		1 µl (200 nM)	
dNTPs (10 mM)			2 µl (800 µM)	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)			2 µl (2 mM)	
PCR buffer 10X			2.5 µl	
Taq DNA polymerase (5 U/µl) <sup>a</sup>			0.2 µl	
ROX-5 or ROX-6 (10 µM) <sup>b</sup>			0.1 µl (40 nM)	
Universal Master Mix 2X <sup>c</sup>	12.5 µl			
sdH <sub>2</sub> O to total volume	25 µl		25 µl	
Incubation	50 °C for 2 min 95 °C for 10 min 50 cycles: 95 °C for 15 s 60 °C for 60 s		50 °C for 2 min 95 °C for 10 min 10 cycles of touch-down: 95 °C for 15 s 67–62.5 °C for 60 s 40 cycles: 95 °C for 15 s 62 °C for 60 s	
Abbreviations: WT1, <i>Wilms' tumor gene 1</i> ; dNTPs, deoxyribonucleotide triphosphates; Fwd, forward; Rvs, reverse; qPCR, real-time quantitative PCR. All positions correspond to WT1 mRNA variant D sequence, NM_024426.4; exon 5 sequence contains 51 bases (1141–1191) and KTS sequence 9 bases (1614–1622), which are excluded in primers and WT1 variants lacking these regions. Note: performance of qPCR for WT1 isoforms was significantly worse with the use of universal master mixes or AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), in our hands; other enzymes were not tested. The system works well even without initial 10 touch-down cycles—in specificity tests with plasmids no significant differences could be detected if touch-down was omitted; however, we use it and recommend it as it may, from our experience, increase the specificity of detection in particular clinical samples. <sup>a</sup> Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) or FastStart Taq DNA Polymerase (Roche). <sup>b</sup> If required for the qPCR system. <sup>c</sup> TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) or FastStart Universal Probe Master (Roche).				





**Figure 2.** WT1 expression in leukemic cell lines. Expression of WT1 total and isoforms A, B, C and D in different leukemic cell lines (a); expression of EX5[+]/[−] and KTS[+]/[−] variants in the same cell lines (b).



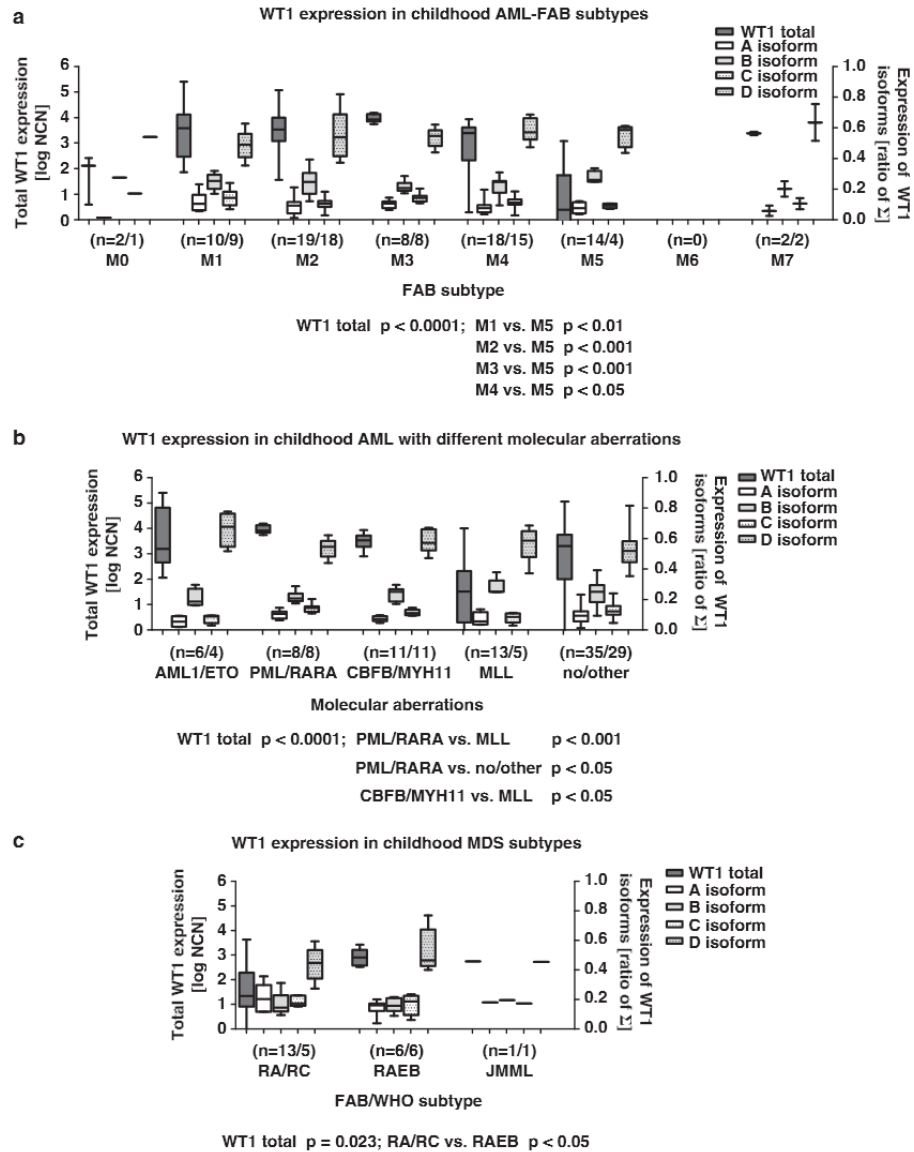
**Figure 3.** Expression of WT1 total and isoforms A, B, C and D in patients' samples. *n* refers to number of patients analyzed for total WT1 expression/WT1 isoform expression. *P* refers to results of Kruskal–Wallis tests with Dunn's multiple comparison post tests.

isoforms was comparable among subgroups defined by FAB subtype, the presence of genetic aberrations, the *FLT3* mutation status or risk stratification. Relapsed patients had similar WT1 variant profiles to patients remaining in complete remission; however, the regression model revealed that patients with higher isoform B expression tended to have a higher risk of relapse (logistic regression—significance of estimated parameter  $P = 0.063$ ,  $\chi^2$  test on logistic regression model  $P = 0.021$ ).

Total WT1 expression in 29 adult patients with MDS corresponded to that of childhood MDS (median 65, range 1–3146 WT1/ABL  $\times 10^4$  NCN; Figure 3). Likewise the aforementioned childhood samples, the seven adult MDS samples analyzed showed variable expression of WT1 isoforms with median

ratios 0.12 : 0.22 : 0.21 : 0.41 for isoforms A, B, C and D, respectively,  $D > C \approx B > A$ .

**Relation of WT1 isoform expression patterns to diagnosis.** Unsupervised hierarchical cluster analysis according to the expression pattern of WT1 isoforms indicated that the clinical samples could be separated into discrete clusters representing the different diagnoses. Multinomial logistic regression and  $\chi^2$  tests on residual deviance confirmed the significance of diagnosis determination by WT1 isoform expression ratios and their superiority over total WT1 ( $P < 0.0001$ ; Figure 5). In linear regression, WT1 isoform expression patterns proved to be independent of total WT1 expression.

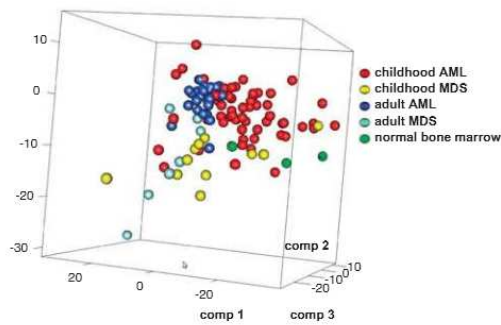


**Figure 4.** WT1 expression in childhood AML and MDS WHO/FAB subtypes and cytogenetic subgroups. Expression of WT1 total and isoforms A, B, C and D in childhood AML divided according to the WHO/FAB subtypes (a), and cytogenetics (b), and childhood MDS divided according to the WHO/FAB subtypes (c). *n* refers to number of patients analyzed for total WT1 expression/ WT1 isoform expression. *P* refers to results of Kruskal–Wallis tests with Dunn’s multiple comparison post tests.

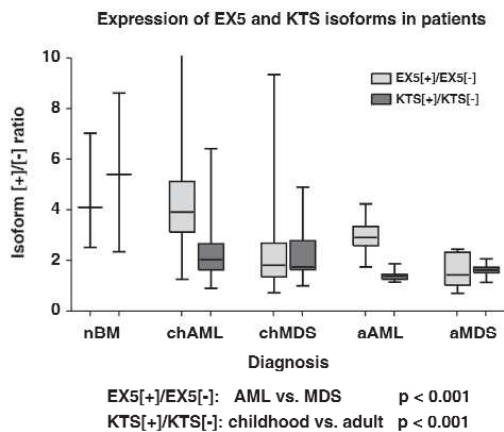
*Expression of EX5[+]/EX5[−] and KTS[+]/KTS[−] variants in clinical samples.* As previously observed in cell lines, also in clinical samples the EX5[+]/EX5[−] ratio showed quite high variability, whereas the KTS[+]/KTS[−] ratio was rather stable. Further analysis revealed that there were significantly higher EX5[+]/EX5[−] ratios in AML than in MDS samples (Kruskal–Wallis,  $P < 0.001$ ). In contrast, the KTS[+]/KTS[−] ratios differed between

childhood samples (wider range with a trend to higher levels) and adult samples (very uniform expression pattern), irrespective of diagnosis ( $P < 0.001$ ; Figure 6).

*WT1 isoform splicing preferences.* The comparison of expression levels of WT1 isoforms A, B, C and D detected in all samples directly and their values calculated from the expression levels



**Figure 5.** The principal component analysis of *WT1* isoform expression in clinical samples. Three dimensional scatter plot based on the first three components.



**Figure 6.** Expression of EX5 and KTS variants in patients' samples. *P* refers to results of Kruskal-Wallis tests with Dunn's multiple comparison post tests.

of EX5[−], EX5[+], KTS[−] and KTS[+] isoforms (described in Methods) revealed a consistent, small (mean 0.02) but significant (*t*-test,  $P < 0.0001$ ) prevalence of isoforms A[−/−] and D[+/+] over B[+/-] and C[−/+], than would be expected if exon 5 and KTS insert were spliced quite randomly and independently.

**DISCUSSION**

The exact quantification of the major *WT1* isoforms, essential for assessment of their activities in regulatory processes and cellular signaling, has been complicated by technical difficulties caused by the length and sequence homology of the isoforms. We managed to overcome these difficulties and, after testing several approaches, developed a unique qPCR assay enabling precise quantification of the four major *WT1* isoforms. The robustness of this method, its sensitivity, specificity and reproducibility were verified in extensive tests, and it may be recommended for any further studies on *WT1* isoform expression. During the method validation, a few important aspects of *WT1* isoform quantification emerged. Despite the excellent correlation between the sum of isoforms and

the total *WT1*, the absolute numbers of detected copies of all isoforms are always lower than total *WT1* expression (0.5–1.0 log in this study). Although it is possible that total *WT1* values include some other *WT1* isoforms than the four major detected (for example, isoforms lacking the first five exons), the main reason of this discrepancy will probably be the unequal performance of the qPCR detection systems for total *WT1* and the isoforms, which must be generally lower in cases of *WT1* isoforms with very long amplicons. Although it means that the sensitivity of isoform detection is slightly lower compared with total *WT1*, it is crucial that the enumeration of their ratios is not affected, as follows from dilution experiments. Owing to the potential unequal performance of reactions for *WT1* isoforms and total *WT1*, we strongly recommend to perform always detection of both EX5[−] and EX5[+], or KTS[−] and KTS[+] sites and not to deduce the values of EX5[−] or KTS[−] from total *WT1* minus EX5[+] or KTS[+], respectively, which has been described previously and could give misleading results. Dilution experiments also revealed that a certain minimal level of *WT1* expression is necessary for a reliable evaluation of isoform ratio; in samples with very low total *WT1* expression and only few single copies of isoforms being detected, evaluation of *WT1* isoform ratio is impossible or will be inaccurate. This logical assay limitation should be considered especially when comparing *WT1* isoform ratios in leukemic cells expressing higher levels of total *WT1* and normal BM with quite low total *WT1* expression—otherwise the differences found may not reflect the real imbalances in *WT1* ratios but rather reaching the method limits in the control samples. With respect to this fact, we would interpret the previously referred differences between physiological and leukemic ratios of *WT1* isoforms with caution.

In leukemic cell lines, highly diverse expression patterns of *WT1* isoforms were detected and no specific profile could be assigned to cell lines with certain common characteristics (leukemia type—lymphoid vs myeloid, cytogenetic aberrations—*TEL-AML1*, *MLL-AF4*). The two most related cell lines (REH and UOC-B6, both pre-B-ALL with *TEL-AML1* fusion) showed the most different *WT1* isoform expression patterns; on the contrary, the two cell lines with the most similar expression patterns, which were distinct from the rest (NALM-6 and REH), do not share any apparent common features other than pre-B origin. A plausible explanation might be that the isoform expression pattern depends on the growth phase and proliferation rate of the cells in culture rather than on the cell line characteristics. We therefore evaluated *WT1* isoform expression in three cell lines at several time-points from the beginning of culture and showed that despite slight fluctuation of total *WT1* expression, which has been described previously and related to the cell cycle phase,<sup>46</sup> the levels of respective variants remained markedly stable. Thus, *WT1* isoform expression patterns appear to be rather determined by the intrinsic characteristics of the leukemic cells.

There were significant differences in total *WT1* expression in clinical samples with particular diagnoses. In AML and MDS, there were also different total *WT1* levels among distinct FAB subtypes and subgroups with specific molecular aberrations. These findings have been previously described and are in concordance with results of other studies.<sup>47–55</sup>

*WT1* isoform expression patterns showed at first glance subtle but significant differences among normal BM, AML and MDS, and also between childhood and adult samples. These specific patterns enabled the clustering of samples into groups representing the individual diagnoses. Although more profound alterations of isoform profile could have been expected when comparing normal, dysplastic and malignant BMs, it is not surprising that in the complex and very precise regulatory mechanisms of *WT1* even slight imbalance in isoform ratios may have considerable effect and serious outcomes for the concerned cells. The isoform expression patterns were more uniform in AML than in MDS,

probably reflecting higher heterogeneity of MDS, with its potential progression from BM harboring certain dysplastic features to BM containing clearly malignant cells. On the other hand, despite marked differences in expression of total *WT1*, we could not observe any notable variations in *WT1* isoform ratios among morphologically and cytogenetically defined subgroups of AML and MDS. Similarly, as in case of leukemic cell lines, this may indicate that the *WT1* isoform expression patterns are related to specific biological attributes of the (pre)leukemic cells, independent of other molecular or biological characteristics. In agreement with previously published studies,<sup>10,32,33</sup> we found isoform D containing both splicing elements and EX5[+] variants to be the most abundant in all samples and diagnoses. We proved that the levels of isoform D are not dependent on total *WT1* levels; thus, the overexpression of total *WT1* in malignancies is not caused by the overexpression of isoform D, as sometimes suggested.

We could not demonstrate a clear correlation between *WT1* isoform profiles and the risk of relapse in AML; although in adult AML, there was a trend (of borderline clinical significance) toward higher risk of relapse associated with the overexpression of isoform B. Here, a larger study would be of benefit to investigate the prognostic potential of *WT1* isoforms.

The KTS[+]/KTS[-] ratio was less variable than the EX5[+]/EX5[-] ratio also in clinical samples. Interestingly, while the EX5[+]/EX5[-] ratio differed more between diagnoses (AML vs MDS), the KTS[+]/KTS[-] ratio was little dependent on the diagnosis but rather seemed to be determined by the age of the patients (children vs adults). On the basis of these findings and data from previously published functional studies, we hypothesize that while imbalances in EX5[+]/EX5[-] expression may have a role in the development of malignant and non-malignant diseases associated with disrupted *WT1* function, KTS[+]/KTS[-] expression, evolutionary more conserved, may undergo minor shifts from higher and variable to uniform lower levels during one's life and aging. This hypothesis may be supported by an evaluation of *WT1* isoform and KTS[+]/KTS[-] ratios in normal children and adult BM; unfortunately, the lack of such control samples and low levels of total *WT1* expression precluding isoform analysis in most of them make this aim hard to realize.

The two *WT1* splicing sites are supposed to function on an autonomous basis and some studies evaluating the expression of *WT1* isoforms indirectly by quantification of EX5[+]/EX5[-] and KTS[+]/KTS[-] variants followed by mathematical calculation of isoforms A, B, C and D relied on it.<sup>10,32,33</sup> We documented a constant, small but not negligible overexpression of isoforms containing or excluding both splicing elements (A[-/-] and D[+/+]) than would be expected if exon 5 and KTS insert were spliced quite randomly and independently. This observation may add a new piece of information to the complex mosaic of *WT1* structure and functions.

In summary, we designed a specific qPCR method of detection of the four major *WT1* variants (A[-/-], B[+/-], C[-/+]) and D[+/+]) that provides an excellent tool for future studies on *WT1* isoform expression patterns. On various cell lines and cohorts of childhood and adult patients with myeloid malignancies, we could demonstrate that (i) the overexpression of isoform D[+/+] and EX5[+] variants is a common trait in all cells, expression of isoform D being independent on total *WT1* expression; (ii) childhood and adult AML and MDS diagnostic samples express unique *WT1* isoform profiles but, in contrast to total *WT1*, there is no relation between *WT1* isoform profiles and morphologically or cytogenetically defined AML or MDS subtypes; (iii) the KTS[+]/KTS[-] ratio is much more stable than the EX5[+]/EX5[-] ratio, EX5[+]/EX5[-] ratios differ significantly between the diagnoses (AML vs MDS) and their imbalance may thus be implicated in disease progression, while KTS[+]/KTS[-] ratios seem to be related to the

patient's age; (iv) isoform splicing is not quite random event with constant, mild preference for isoforms with or without both splicing elements (A[-/-] and D[+/+]); and (v) the prognostic impact of *WT1* expression patterns on the outcome of patients with hematological malignancies requires further evaluation in larger studies.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

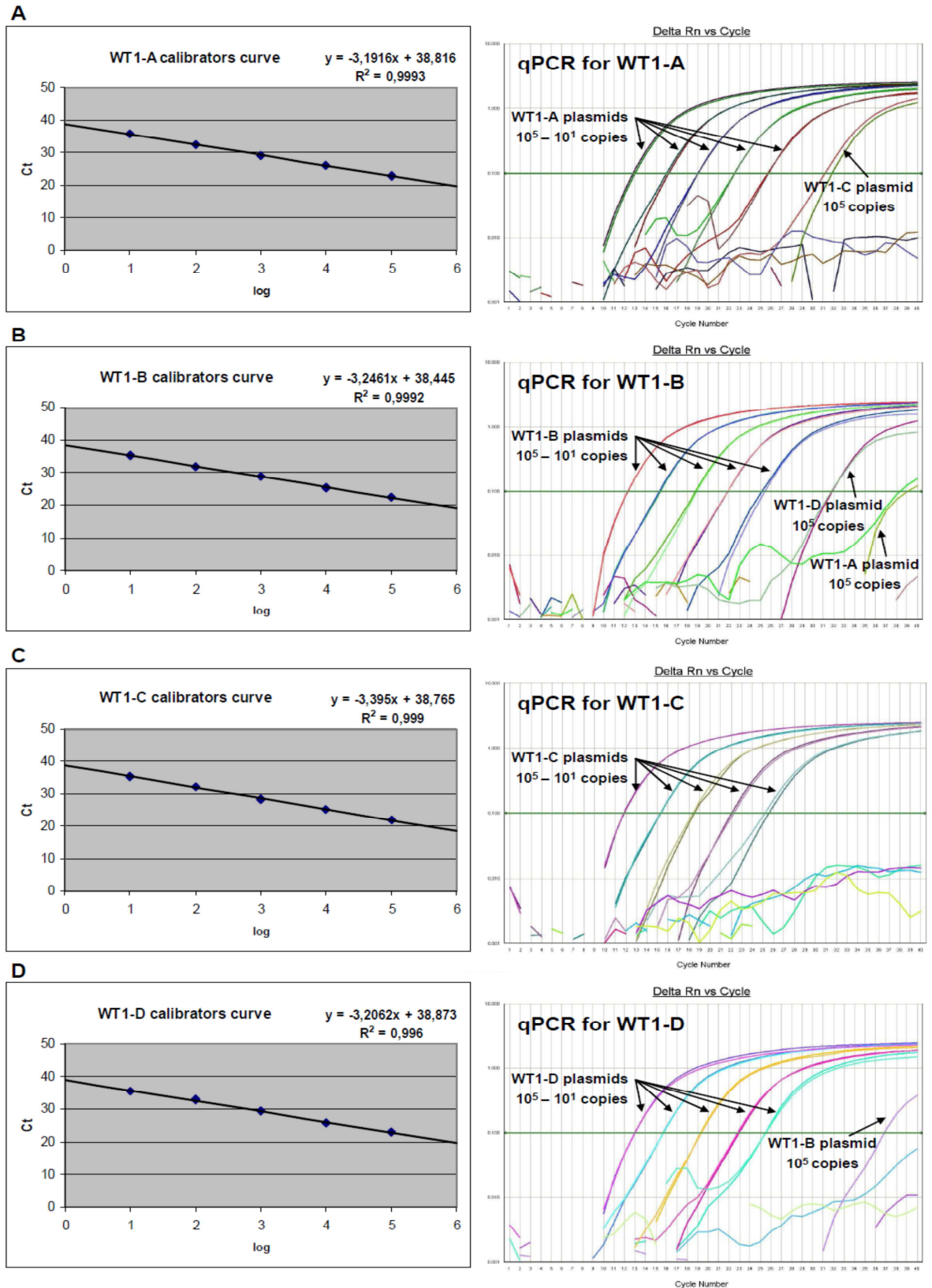
We thank Ondrej Cinek from the Department of Pediatrics, Pavel Seeman from the Department of Pediatric Neurology, Zdenek Sedlacek from the Institute of Medical Biology and Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Olfert Landt from TIB-MOLBIOL, Berlin, Germany and Fiona Quinn from the Cancer Molecular Diagnostics Laboratory, St James's Hospital, Dublin, for their invaluable advice and experienced opinions during method development and testing. We also appreciated the help of Katerina Muzikova, Ester Mejstrikova and Martina Sukova from the Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and Jana Markova from the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, with the identification and initial processing of some samples. We thank the staff of the participating Czech Pediatric Hematology Working Group centers for cooperation. This study is supported by the grant IGA NS10488-3. KK was supported by the Charles University (GAUK 81709) solely and JT by the COST Program (OC 09051).

#### REFERENCES

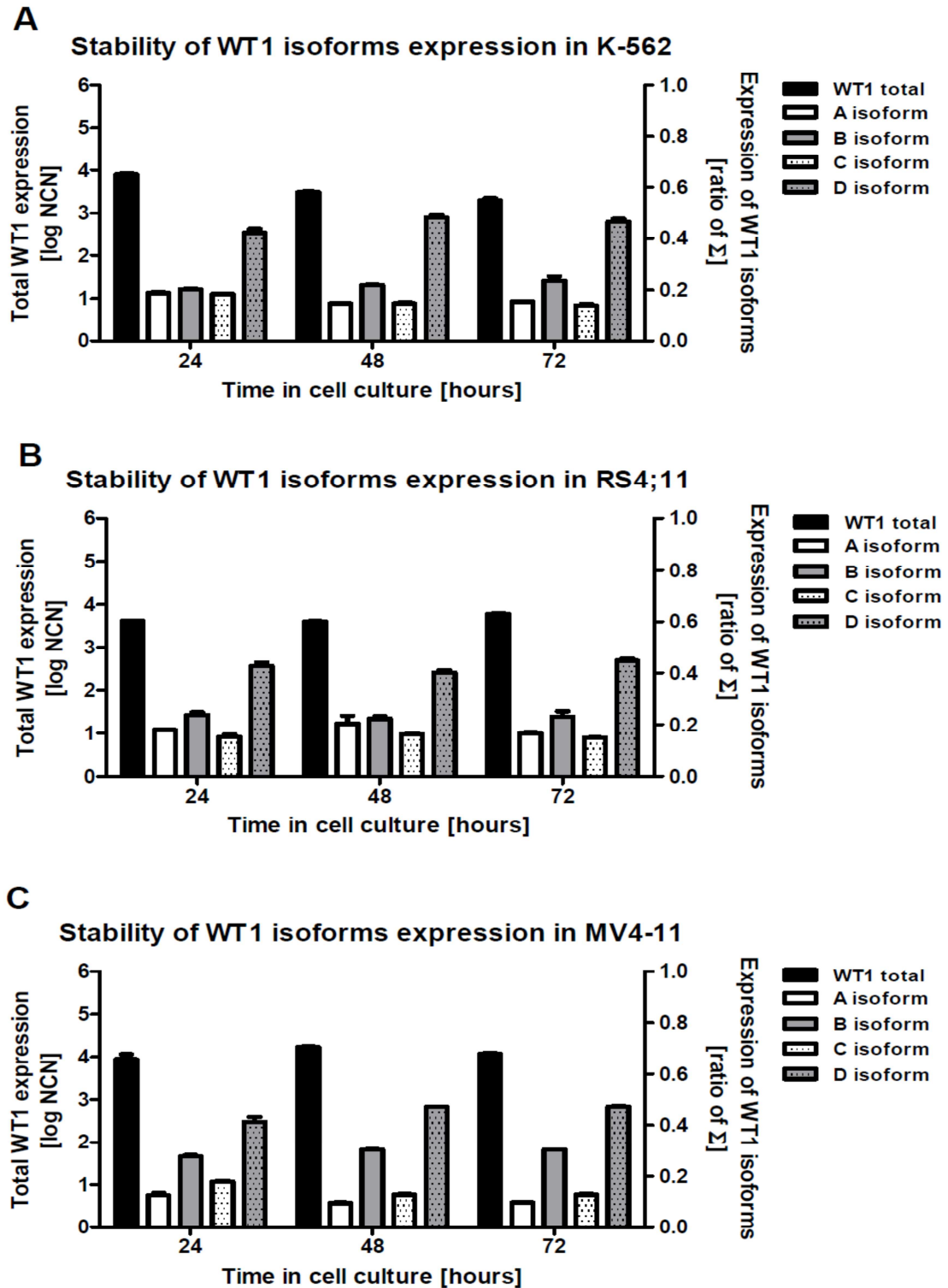
- Sugiyama H. Wilms' tumor gene *WT1*: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001; **73**: 177–187.
- Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J et al. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5429–5435.
- Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. *WT1* proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001; **273**: 141–161.
- Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor *WT1* directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* 2001; **20**: 1897–1909.
- Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of *WT1*. *J Cell Sci* 2003; **116**(Pt 9): 1653–1658.
- Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (*WT1*) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev Mol Med* 2007; **9**: 1–17.
- Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the *WT1* story. *Leukemia* 2007; **21**: 868–876.
- Burwell EA, McCarty GP, Simpson LA, Thompson KA, Loeb DM. Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*) have distinct effects on mammary epithelial cells. *Oncogene* 2007; **26**: 3423–3430.
- Scholz H, Kirschner KM. Oxygen-dependent gene expression in development and cancer: lessons learned from the Wilms' tumor gene, *WT1*. *Front Mol Neurosci* **4**: 4.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene *WT1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9618–9622.
- Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher 3rd FJ, Saunders GF. Regulation of the proto-oncogenes *bcl-2* and *c-myc* by the Wilms' tumor suppressor gene *WT1*. *Cancer Res* 1995; **55**: 5386–5389.
- Harrington MA, Konicek B, Song A, Xia XL, Fredericks WJ, Rauscher 3rd FJ. Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J Biol Chem* 1993; **268**: 21271–21275.
- Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel *WT1* isoforms. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8646–8654.
- Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K. Genomic imprinting at the *WT1* gene involves a novel coding transcript (*AWT1*) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 405–415.
- Hossain A, Nixon M, Kuo MT, Saunders GF. N-terminally truncated *WT1* protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *J Biol Chem* 2006; **281**: 28122–28130.
- Niksic M, Slight J, Sanford JR, Caceres JF, Hastie ND. The Wilms' tumour protein (*WT1*) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 463–471.

- 17 Florio F, Cesaro E, Montano G, Izzo P, Miles C, Costanzo P. Biochemical and functional interaction between ZNF224 and ZNF255, two members of the Kruppel-like zinc-finger protein family and WT1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* 19; 3544–3556.
- 18 Dutton JR, Lahiri D, Ward A. Different isoforms of the Wilms' tumour protein WT1 have distinct patterns of distribution and trafficking within the nucleus. *Cell Prolif* 2006; 39: 519–535.
- 19 Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF. Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 1995; 10: 415–422.
- 20 Ito K, Oji Y, Tatsumi N, Shimizu S, Kanai Y, Nakazawa T *et al*. Antiapoptotic function of 17AA(+)-WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* 2006; 25: 4217–4229.
- 21 Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND. Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* 1992; 257: 235–237.
- 22 Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 1998; 12: 3217–3225.
- 23 Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC *et al*. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 1999; 18: 3990–4003.
- 24 Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS, Garrett CT. Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. *Mol Diagn* 2000; 5: 117–128.
- 25 Dumur CI, Dechsukhum C, Wilkinson DS, Garrett CT, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A. Analytical validation of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction quantitation of different transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Anal Biochem* 2002; 309: 127–136.
- 26 Renshaw J, King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 256–266.
- 27 Moorwood K, Salpekar A, Ivins SM, Hall J, Powlesland RM, Brown KW *et al*. Transactivation of the WT1 antisense promoter is unique to the WT1[+/-] isoform. *FEBS Lett* 1999; 456: 131–136.
- 28 Barbaux S, Naudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttent F *et al*. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 1997; 17: 467–470.
- 29 Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE *et al*. Germine mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; 67: 437–447.
- 30 Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 2006; 15(special Issueno 2): R196–R201.
- 31 Yang C, Romaniuk PJ. The ratio of +/-KTS splice variants of the Wilms' tumour suppressor protein WT1 mRNA is determined by an intronic enhancer. *Biochem Cell Biol* 2008; 86: 312–321.
- 32 Gu W, Hu S, Chen Z, Qiu G, Cen J, He B *et al*. High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemias with more predominant WT1 + 17AA isoforms at relapse. *Leuk Res* 2010; 34: 46–49.
- 33 Siehl JM, Reinwald M, Heufelder K, Menssen HD, Keilholz U, Thiel E. Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Ann Hematol* 2004; 83: 745–750.
- 34 Ishikawa Y, Kiyoi H, Naoe T. Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res May* 35: 685–688.
- 35 Jongeom T, Oji Y, Tsuji N, Ikeda Y, Ito K, Tsuda A *et al*. Wilms' tumor gene WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform induces morphological changes and promotes cell migration and invasion *in vitro*. *Cancer Sci* 2006; 97: 259–270.
- 36 Bor YC, Swartz J, Morrison A, Rekosh D, Ladomery M, Hammarskjold ML. The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev* 2006; 20: 1597–1608.
- 37 Tatsumi N, Oji Y, Tsuji N, Tsuda A, Higashio M, Aoyagi S *et al*. Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *Int J Oncol* 2008; 32: 701–711.
- 38 Moriya S, Takiguchi M, Seki N. Expression of the WT1 gene—KTS domain isoforms suppresses the invasive ability of human lung squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2008; 32: 349–356.
- 39 Morrison AA, Venables JP, Delliare G, Ladomery MR. The Wilms tumour suppressor protein WT1 (+KTS isoform) binds alpha-actinin 1 mRNA via its zinc-finger domain. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 789–798.
- 40 Han Y, San-Marina S, Yang L, Khoury H, Minden MD. The zinc finger domain of Wilms' tumor 1 suppressor gene (WT1) behaves as a dominant negative, leading to abrogation of WT1 oncogenic potential in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R43.
- 41 Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O *et al*. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006; 20: 254–263.
- 42 Krug U, Yasmeen A, Beger C, Baumer N, Dugas M, Berdel WE *et al*. Cyclin A1 regulates WT1 expression in acute myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2009; 34: 129–136.
- 43 Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N *et al*. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2318–2357.
- 44 Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E *et al*. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2474–2486.
- 45 Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, Kalinova M, Schneider G, Kreyenberg H *et al*. Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* 2009; 23: 1472–1479.
- 46 Kerst G, Bergold N, Viebahn S, Gieseke F, Kalinova M, Trka J *et al*. WT1 protein expression in slowly proliferating myeloid leukemic cell lines is scarce throughout the cell cycle with a minimum in G0/G1 phase. *Leuk Res* 2008; 32: 1393–1399.
- 47 Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, Appelt C, Na IK, le Coutre P *et al*. Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol* 2001; 114: 313–318.
- 48 Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F *et al*. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002; 16: 2115–2121.
- 49 Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2004; 112: 79–84.
- 50 Trka J, Kalinova M, Hrusak O, Zuna J, Krejci O, Madzo J *et al*. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002; 16: 1381–1389.
- 51 Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients—results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004; 125: 590–600.
- 52 Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T *et al*. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1416–1423.
- 53 Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C *et al*. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1507–1515.
- 54 Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernandez P *et al*. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with *de novo* acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89: 926–933.
- 55 Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, Matsuda EI, Nowill AE, Brandalise SR *et al*. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 49: 133–138.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)



**Figure S1** qPCR for WT1 isoforms - reaction characteristics. Sensitivity and specificity tests of qPCR quantification of isoforms A (A), B (B), C (C) and D (D). Reactions for each isoform performed in duplicates with specific plasmids in five 10-fold dilutions ( $10^1 - 10^5$ ), with the remaining three unspecific plasmids at the highest concentration ( $10^5$ ) and with no template control ( $H_2O$ ); plasmid standard curves (left) and amplification plots (right). Note: the first 10 cycles of touch-down are not displayed on the amplification plots, therefore the cycle 1 on the plots corresponds to the cycle 11 of total cycling, the cycle 40 to the cycle 50. (AB 7500 Fast Real-Time PCR System used)



**Figure S2** Stability of WT1 expression in different leukemic cell lines during the culture. Expression of WT1 total and isoforms A, B, C and D in cell line K-562 (A), RS4;11 (B) and MV4-11 (C) after 24, 48 and 72 hours of culturing.

**Table S1** Leukemic cell lines

<i>Name</i>	<i>Source</i>	<i>Type</i>	<i>Major aberration</i>
NALM-6	DSMZ ACC 128	B-ALL	
REH	DSMZ ACC 22	B-ALL	TEL-AML1
UOC-B6	gift from Dr Ondrej Krejci, Massachusetts General Hospital, Boston, USA	B-ALL	TEL-AML1
RS4;11	DSMZ ACC 508	B-ALL	MLL-AF4
MV4-11	DSMZ ACC 102	AML	MLL-AF4
KASUMI-1	DSMZ ACC 220	AML	AML1-ETO
NB-4	DSMZ ACC 207	AML	PML-RARA
K-562	DSMZ ACC 10	CML-BC	BCR-ABL

DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures



**P2.** Kramarzova K, Boublikova L, Stary J, Trka J. Evaluation of WT1 expression in bone marrow vs. peripheral blood samples of children with acute myeloid leukemia-impact on minimal residual disease detection. *Leukemia*. 2013 Apr;27(5):1194-6  
**(IF=10,164)**

**LETTER TO THE EDITOR**

# Evaluation of *WT1* expression in bone marrow vs peripheral blood samples of children with acute myeloid leukemia—impact on minimal residual disease detection

*Leukemia* advance online publication, 13 November 2012;  
 doi:10.1038/leu.2012.291

*Wilms' tumor gene 1 (WT1)* is located on chromosome 11p13. As a zinc finger transcription factor, *WT1* regulates expression of many target genes involved in regulation of cell cycle, proliferation, differentiation and apoptosis.<sup>1,2</sup> Overexpression of *WT1* was found in majority of acute leukemias and other hematological malignancies. *WT1* has, therefore, been intensively studied as a potential prognostic factor, marker for minimal residual disease (MRD) and target for immunotherapy (summarized in references<sup>1,3–5</sup>).

In this report, we focus on the role of *WT1* as a marker for monitoring of malignant cells in patients with childhood acute myeloid leukemia (AML). Many important studies proved the usefulness of *WT1* for this purpose, showing that this gene provides a promising tool for residual disease detection. In general, these studies were based on the analysis of bone marrow

(BM) samples,<sup>6–8</sup> while only minority used peripheral blood (PB) as a source of leukemic cells.<sup>9,10</sup> Considering the fact, that the percentage of blasts can differ between BM and PB, one could assume that the choice of material for *WT1* detection may influence the subsequent analysis. Nevertheless, no consensus has been made so far.

To investigate whether both BM and PB provide similar information on leukemia burden in childhood AML measured by *WT1* expression, we determined the diagnostic level of *WT1* in 90 children with AML treated in the Czech Pediatric Hematology (CPH) centers (Table 1). Following ethical committee approval and informed consent, paired samples of BM and PB were processed as described earlier<sup>11</sup> and the resulting cDNA was used for quantification of *WT1* and *ABL* control gene by the quantitative PCR assay of our own design.<sup>12</sup> To define the physiological level of *WT1*, we also analyzed 24 samples of healthy BM and PB donors.

Physiological expression of *WT1* in unsorted BM and PB samples was 28 and 1.4 *WT1/ABL* × 10<sup>4</sup> NCN (range 8–115 and 0.2–13.2), respectively. In leukemic patients, the level of *WT1* in BM was 0.2 log higher when compared with PB (median 2587 (range 0–57065) *WT1/ABL* × 10<sup>4</sup> NCN for BM and 1640 (range 0–16517) *WT1/ABL* × 10<sup>4</sup> NCN for PB; *P* = 0.02; Figure 1a). *WT1* overexpression (defined as > 1.5-fold higher than maximum of physiological level) was found in 76% of BM and 80% of PB samples. The difference in *WT1* expression between patients' samples and healthy controls was 3.1 logs for PB in contrast to only 2.0 logs for BM (Figure 1b).

Comparison of paired BM and PB levels of *WT1* revealed an excellent correlation between these values with the correlation coefficient of 0.89 (*P* < 0.0001; Figure 1c). However, there was no relation between *WT1* levels in PB or BM and the percentage of blasts.

According to French–American–British (FAB) classification, M3 subtype of AML was associated with the highest *WT1* expression, while patients with M5 AML had the lowest *WT1* level (*P* < 0.0001 for both BM and PB; Figure 1d). Standard risk cases expressed *WT1* on higher level compared with high risk group (*P* < 0.0001 for both BM and PB). We could not prove any relation of *WT1* level to age, sex or d15 treatment response. Neither did the expression of *WT1* correlate with survival characteristics of our cohort of childhood AML; patients with high and low initial level of *WT1* had the same relapse-free survival probability (Figure 1e).

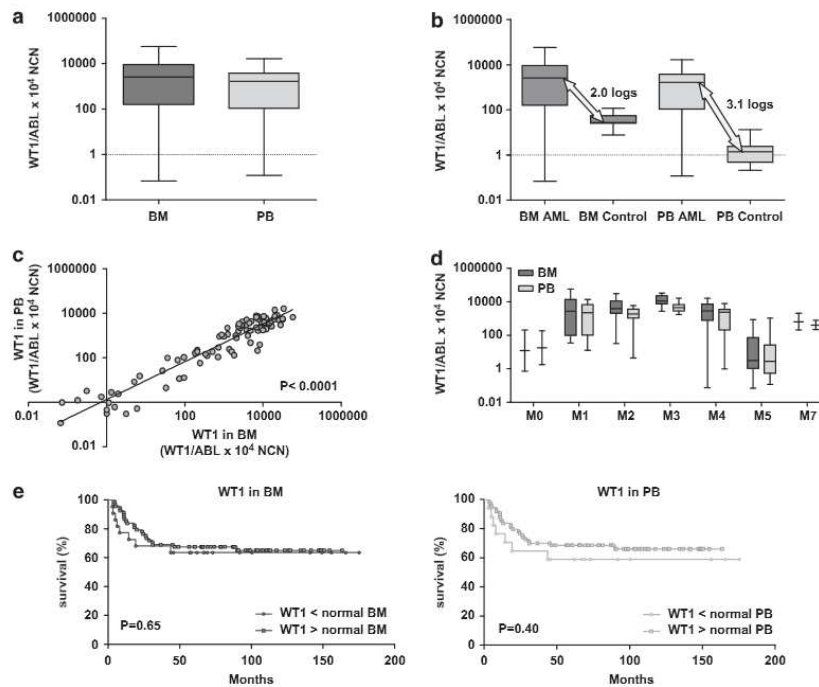
In summary, we found an excellent correlation of *WT1* expression in paired BM and PB samples. However, in contrast to studies mostly on adult AML, we could not confirm the prognostic significance of *WT1* expression at diagnosis of pediatric AML. Comparison of *WT1* levels in healthy controls and leukemia samples revealed a wider distance between physiological and malignant expression of *WT1* in PB. This observation makes PB superior to BM for monitoring of MRD by *WT1* expression.

	N	%
Patients	90	
Age (median/years)	10.5	
<i>FAB</i>		
M0	2	2
M1	11	12
M2	20	22
M3	14	16
M4	22	24
M5	19	21
M7	2	2
<i>Molecular genetics</i>		
AML1/ETO	8	9
CBF/MYH11	12	13
MLL+	21	23
PML/RARα	14	16
Negative	33	37
No data	2	2
<i>Risk groups</i>		
Standard	39	43
High	51	57
<i>Follow-up (median/years)</i>		
Relapse	31	34
Death	35	39

Abbreviations: FAB, French–American–British classification; MLL, mixed lineage leukemia.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.



**Figure 1.** Expression pattern of *WT1* gene in BM and PB samples of patients with childhood AML and healthy controls: (a) Box plots showing *WT1* expression in BM and PB of AML patients. (b) Comparison of the distance between leukemic and physiological *WT1* expression in BM and PB ( $P < 0.001$  for BM and  $P < 0.0001$  for PB). (c) Comparison of *WT1* levels in BM vs PB of AML patients—correlation coefficient 0.89 ( $P < 0.0001$ ). (d) Distribution of *WT1* expression among morphologically defined subgroups of AML (FAB subtypes;  $P < 0.0001$  for both BM and PB). (e) Survival analysis of AML patients—relapse-free survival according to *WT1* expression in BM vs PB.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project (Ministry of Health, Czech Rep) for conceptual development of research organisation 00064203 (University Hospital Motol, Prague, Czech Rep), UNCE204012 and the COST program (OC 09051). We would like to thank the staff of the participating Czech Pediatric Hematology (CPH) centers for cooperation. We also appreciated the help of Katerina Muzikova for the initial processing of some samples.

K Kramarzova, L Boublikova, J Stary and J Trka  
 CLIP—Childhood Leukemia Investigation Prague,  
 Department of Pediatric Hematology and Oncology,  
 2nd Faculty of Medicine, Charles University and  
 University Hospital Motol,  
 Prague, Czech Republic  
 E-mail: jan.trka@lfmotol.cuni.cz

#### REFERENCES

- Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001; **273**: 141–161.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9618–9622.
- Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001; **73**: 177–187.
- Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of WT1. *J Cell Sci* 2003; **116** (Pt 9): 1653–1658.
- Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev Mol Med* 2007; **9**: 1–17.
- Trka J, Kalinova M, Hrusak O, Zuna J, Krejci O, Madzo J *et al.* Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002; **16**: 1381–1389.
- Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, Kalinova M, Schneider G, Kreyenberg H *et al.* Standardization of WT1 mRNA quantitation for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* 2009; **23**: 1472–1479.
- Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T *et al.* Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 1416–1423.
- Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Gottardi E, Fava M *et al.* Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* 2008; **93**: 921–924.
- Ommen HB, Nyvold CG, Braendstrup K, Andersen BL, Ommen IB, Hasle H *et al.* Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. *Br J Haematol* 2008; **141**: 782–791.
- Kramarzova K, Stuchly J, Willasch A, Gruhn B, Schwarz J, Cermak J *et al.* Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia* 2012; **26**: 2086–2095.
- Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O *et al.* Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006; **20**: 254–263.

### **P3. Seznam publikací, abstrakt a přednášek**

#### **Publikace:**

Kramarzova K, Boublikova L, Sary J, Trka J. Evaluation of WT1 expression in bone marrow vs. peripheral blood samples of children with acute myeloid leukemia-impact on minimal residual disease detection. *Leukemia*. 2013 Apr;27(5):1194-6

Kramarzova K, Stuchly J, Willasch A, Gruhn B, Schwarz J, Cermak J, Machova-Polakova K, Fuchs O, Sary J, Trka J, Boublikova L. Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia* 2012; 26: 2086–2095.

Bödör C, Renneville A, Smith M, Charazac A, Iqbal S, Etancelin P, Cavenagh J, Barnett MJ, Kramarzova K, Krishnan B, Matolcsy A, Preudhomme C, Fitzgibbon J, Owen C. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica*. 2012 Jun;97(6):890-4

Starý J., Vávra V., Gajdoš P., Hrstková H., Kopečná L., Štěrba J., Dembická D., Mendelová D., Mihál V., Pospíšilová D., Novák Z., Blažek B., Ptoszková H., Hak J., Toušovská K., Procházková D., Černá Z., Jabali Y., Timr P., Smíšek P., Zdráhalová K., Sedláček P., Šrámková L., Keslová P., Formánková R., Komrska V., Mejstříková E., Vrzalová A., Kramarzová K, Michalová K., Zemanová Z., Jarošová M., Housková J., Zámková A., Zuna J., Hrušák O., Trka J., Schwarz J., Creutzig U. Second national study AML-BFM 98 improved remission rate and overall survival in children with acute myeloid leukemia in the Czech Republic. *Transfuze Hematologie dnes*, 14, 2008, No. 4, p. 166-174.

Starý J., Vávra V., Zuna J., Sedláček P., Mihál V., Štěrba J., Toušovská K., Pospíšilová D., Mendelová D., Hak J., Smíšek P., Hrušák O., Mejstříková E., Zemanová Z., Michalová K., Jarošová M., Oltová A., Gajdoš P., Formánková R., Keslová P., Jabali Y., Blažek B., Černá Z., Procházková D., Kramarzová K, Vrzalová A., Housková J., Trka J. Interfant 99 - Treatment reflecting unique biology of the infant acute lymphoblastic leukemia. The results in the Czech Republic. *Transfuze Hematologie dnes*, 15, 2009, No. 2, p. 83-90

Stary J., Gajdoš P., Hrstková H., Kopečná L., Štěrbá J., Dembická D., Mendelová D., Pospíšilová D., Hajdúch M., Blažek B., Ptoszková H., Hak J., Toušovská K., Procházková D., Černá Z., Jabali Y., Timr P., Smíšek P., Vávra V., Zdráhalová K., Sedláček P., Šrámková L., Komrská V., Mejstříková E., Vrzalová A., Kramarzová K., Michalová K., Zemanová Z., Jarošová M., Housková J., Zuna J., Hrušák O., Trka J., Mihál V. Third consecutive national study ALL-BFM 95 improved the outcome of acute lymphoblastic leukemia in children in the Czech Republic. *Transfúze Hematologie dnes*, 14, 2008, No. 3, p. 102-109

### **Abstrakta v časopisech s IF:**

Kramarzova K., Boublikova L, Sedlacek P, Stary J, Trka J. No benefit of WT1 expression-monitoring for the outcome prediction of patients with childhood acute myeloid leukaemia undergoing stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, April 2013, 48(s2): 247

Kramarzova K. , Drabkin H, Zuna J, Zemanova Z, Stary J, Trka J., Starkova J. Transcription Regulation of HOX Genes in Normal Hematopoiesis and Leukemogenesis in Children. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2012; 120: 4614

Kramarzova K., Stuchly J, Willasch A, Gruhn B, Markova J, Schwarz J, Cemak J, Stary J, Trka J, Boublikova L. Expression Pattern of WT1 Isoforms in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML), Myelodysplastic Syndrome (MDS) and Severe Aplastic Anemia (SAA). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2011; 118: 2502.

Reiterova M, Kramarzova K., Sukova M, Campr V, Vodickova E, Zapletal O., Blatny J., Zemanova Z., Lizcova L., Pelkova V., Trka J., Stary J., Hrusak O., Mejstrikova E. Changes Identified by Flow Cytometry and WT1 Expression in Consecutive Bone Marrow Samples in Refractory Cytopenia of Childhood and Aplastic Anemia Before Start of the Therapy. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2011; 118: 1342.

Kramarzova K., Boublikova L, Willasch L, Lopotova T, Stary J, Machova-Polakova K., Trka J. *Expression pattern of WT1 isoforms in patients with childhood AML. Haematologica*, June 2011; 96(s2):25-26

Kramarzova K., Willasch A, Gruhn B, Boublikova L, Kreyenberg H, Rettinger E., Zimmermann M., Stary J., Reinhardt D., Creutzig U., Pession A., Cazzaniga G., Coliva T., Bader P., Trka J. WT1 Expression at the

Diagnosis of Childhood AML Has No Prognostic Value but Corresponds with the Biological Characteristics of Leukemic Cells - Results From European Multicenter Study. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2010; 116: 1684.

Kramarzova K, Boublikova L, Muzikova K, Sary J, Trka J. WT1 expression in peripheral blood has no prognostic value but can provide more useful information on MRD compared to BM in children with AML. *Haematologica*, June 2010; 95:31-32

### **Přednášky:**

Kramarzova K, Willasch A., Gruhn B., Stuchly J., Schwarz J., Cermak J., Machova-Polakova K., Fuchs O., Kreyenberg H., Rettinger E., Zimmermann M., Sary J., Reinhardt D., Creutzig U., Pession A., Cazzaniga G., Coliva T., Bader P., Sedlacek P., Boublikova L. Trka J. Clinical significance of Wilms' tumour gene 1 (WT1) in childhood acute myeloid leukaemia (AML). University of Calgary and Alberta Blood and Marrow Transplant Program, Calgary, Kanada - hostující přednášející (2013)

Kramarzova K., Stuchly J., Willasch A., Gruhn B., Schwarz J., Cermak J., Machova-Polakova K., Fuchs O. , Sary J., Trka J., Boublikova L. WT1 Isoform Expression Pattern in Acute Myeloid Leukemia (AML) and Myelodysplastic Syndrome (MDS). The 6<sup>th</sup> International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Japonsko (2012)

Boublikova L., Kramarzova K., Buchler T, Dusek P, Grega M, Zachoval R, Rosova B, Klezl P, Vernerova Z, Kubecova M, Krolupper M, Benkova K, Stahalova V, Pesl M, Sary J, Kodet R, Babjuk M, Abrahamova J, Trka J. WT1 expression in testicular germ-cell tumors. The 6<sup>th</sup> International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Japonsko (2012)

Kramarzova K., Stuchly J., Willasch A., Gruhn B., Boublikova L., Kreyenberg H., Rettinger E., Zimmermann M., Sary J., Reinhardt D., Creutzig U., Pession A., Cazzaniga G., Coliva T., Bader P. and Trka J. Clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in childhood acute myeloid leukemia (AML). 4<sup>th</sup> Midsummer Meeting on Paediatric Haematology and Oncology, Gorlitz, Německo (2012)

Kramarzova K., Willasch A., Gruhn B., Boublikova L., Kreyenberg H., Rettinger E., Zimmermann M., Sary J., Reinhardt D., Creutzig U., Pession

A., Cazzaniga G., Coliva T., Bader P. and Trka J. Hladina genu WT1 při diagnóze dětské AML nemá prognostický význam, ale úzce souvisí s biologickými vlastnostmi leukemických buněk. Vědecká konference 2LF UK, Praha, ČR (2011)

Kramarzova K., Willasch A., Gruhn B., Boublikova L., Kreyenberg H., Rettinger E., Zimmermann M., Stary J., Reinhardt D., Creutzig U., Pession A., Cazzaniga G., Coliva T., Bader P. and Trka J. WT1 Expression at the Diagnosis of Childhood AML Has No Prognostic Value but Corresponds with the Biological Characteristics of Leukemic Cells - Results from European Multicenter Study. The 5<sup>th</sup> International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Turín, Itálie (2011)

Kramarzová K., Willasch A., Gruhn B., Boublikova L., Kreyenberg H., Rettinger E., Zimmermann M., Stary J., Reinhardt D., Creutzig U., Pession A., Cazzaniga G., Coliva T., Bader P., Trka J. Hladina genu WT1 při diagnóze dětské AML nemá prognostický význam, ale úzce souvisí s biologickými vlastnostmi leukemických buněk. Pražský hematologický den, Praha, ČR (2010)

Kramarzová K., Boublíková L., Trka J. Gen WT1 a jeho isoformy - význam u dětské akutní myeloidní leukémie (AML). Výjezdní zasedání pracovní skupiny CLIP, Měříň, ČR

Kramarzová K., Boublíková L., Muzikova K., Trka J. WT1 expression in patients with childhood AML undergoing stem cell transplantation. The 4<sup>th</sup> International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Osaka, Japonsko (2009)

Kramarzová K., Boublíková L., Muzikova K., Trka J. WT1 expression in peripheral blood can provide more useful information on MRD in children with AML. The 4<sup>th</sup> International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Osaka, Japonsko (2009)

Kramarzová K., Boublíková L., Kalinová M., Trka J. Expres genu WT1 u dětských akutních myeloidních leukémií: (2002 – 2007). XVII. Výroční sjezd českých a slovenských hematologů, Špindlerův Mlýn, ČR (2007)