

# INFORMAČNÍ LISTY



**Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela konané dne 20. 11. 2013 v Brně v Univerzitním kampusu v Bohunicích**

*Přítomni:* Doškař, Kočová, Mašek, Nešvera, Relichová, Šeda, Šmarda, Zadražil, Dostál (jako host)

*Omluveni:* Knoll, Malachová, Miadoková, Slaninová, Tomáška, Vojtíšková, Zelený

*Program schůze:*

1. Zahájení a kontrola zápisu z minulé schůze výboru
2. Informace o činnosti, dalším rozvoji a připravovaných aktivitách Mendelova muzea v Brně (ředitel muzea Mgr. Ondřej Dostál, Ph.D.)
3. Příprava obsahu dalšího čísla IL
4. Informace o stavu členské základny
5. Informace o stavu přihlášek do soutěže o Cenu GSGM v roce 2014
6. Příprava konference GSGM v roce 2014
7. Různé

ad 1) Schůzi zahájil prof. Doškař, který uvedl jednotlivé body programu a konstatoval, že většina úkolů byla splněna, některé trvají a jejich plnění bude průběžně kontrolováno. Chybí aktualizovaný seznam slovenských členů společnosti, prof. Šmarda opakovaně právem apeluje na vyšší aktivitu při zasílání příspěvků do IL a stále ne zcela uspokojivá je morálka placení členských příspěvků.

Poté přednesl prof. Doškař žádost dr. Vojtíškové o uvolnění z výboru GSGM a z funkce tajemníka společnosti. Uvedl důvody, které vedly dr. Vojtíškovou k tomuto rozhodnutí s tím, že nadále zůstane členkou společnosti a bude se podle možností účastnit akcí společnosti. Vyjádřil jménem výboru poděkování za činnost, kterou dr. Vojtíšková přispívala k plynulému chodu schůzí výboru a k činnosti celé společnosti. Popřál jí hodně zdraví a osobní pohody v dalších letech. V této souvislosti navrhl prof. Doškař pověřit do konce volebního období funkcí tajemníka společnosti dr. Kočovou, která dosud úzce spolupracovala s dr. Vojtíškovou při aktualizaci členské základny. Přítomní členové výboru i M. Kočová s návrhem souhlasili.

ad 2) Dr. Dostál seznámil členy výboru s činností a aktivitami Mendelova muzea. Předložil návrh „Memoranda o spolupráci“ mezi Mendelovým muzeem a Genetickou společností Gregora Mendela, v němž jsou specifikovány oblasti možné spolupráce. Pro obě smluvní strany nevyplývají z Memoranda žádné vzájemné finanční nároky.

Spolupráce se bude týkat zejména sdílení programů a aktivit a bude založena na vzájemné informovanosti v oblastech zájmu. Memorandum bude uzavřeno na dobu neurčitou. Členové výboru souhlasili s podpisem memoranda a s navázáním užší spolupráce s Mendelovým muzeem. Dr. Dostál nabídl prostory muzea pro pořádání vybraných akcí a pro konání pravidelných schůzí výboru GSGM. Dále navrhl vstupné do Mendelova muzea zdarma pro členy naší společnosti.

ad 3) Opět byla velmi kladně hodnocena vysoká úroveň IL a maximální úsilí, které přípravě a konečné podobě věnuje prof. Šmarda. Pro další číslo neobdržel zatím žádné příspěvky a zástupci LF a PŘF UK slíbili posoudit autoreferáty úspěšně obhájených doktorských dizertačních prací a oslovit případné vhodné autory o souhlas a dodání příslušných materiálů. Je rovněž žádoucí posílat příspěvky o plánovaných a pořádaných akcích, výročích a dalších událostech, které by mohly zajímat členskou základnu (zodpovídají Šeda, Mašek, termín do konce listopadu).

ad 4) Od minulé schůze výboru byl aktualizován stav členské základny z ČR. Aktuální seznam členů bude předán prof. Knollovi ke zveřejnění na webových stránkách společnosti (zodpovídá Knoll, Kočová). Stále trvá požadavek aktualizace slovenské členské základny (zodpovídá Slaninová). Na webové stránky budou doplněny chybějící zápisy ze schůzí výboru a IL (zodpovídá Knoll).

ad 5) Výbor obdržel prozatím jednu přihlášku do soutěže o cenu GSGM s uzávěrkou na konci dubna 2014. Opět bylo konstatováno, že malý zájem o soutěž zřejmě pramení z nedostatečné informovanosti o této akci i přesto, že v IL byla publikována výzva k účasti v soutěži. Dr. Zelený nabídl v minulosti pomoc při propagaci této akce prostřednictvím M.G.P. Zlín a bude požádán o pomoc při přípravě informačního letáku, který by pomohl uvést tuto akci do širšího povědomí mladých členů společnosti (zodpovídá Doškař, Zelený).

ad 6) Přítomní členové výboru z Prahy informovali o stavu příprav genetické konference v roce 2014. Byly představeny některé z navrhovaných lokalit, vybraných pro konání konference, včetně finančních kalkulací. Výbor souhlasil s termínem konání, který byl stanoven na 24. – 26. 9. 2014 a přiklonil se k návrhu uskutečnit konferenci v konferenčním komplexu FLORET v Průhonicích u Prahy. Byly představeny prostory tohoto komplexu a náklady, spojené s konáním konference. Byl podán návrh kombinovat na konferenci vybrané zvané přednášky s příspěvky mladých vědeckých pracovníků a studentů, se kterým členové výboru souhlasili a konstatovali, že program je plně v kompetenci pověřených organizátorů. Byl vznesen požadavek na pomoc při oslovování potenciálních sponzorů konference z řad dodavatelských a spolupracujících firem, které budou mít příležitost účastnit se konference a představovat svoje produkty. Členové výboru přislíbili v tomto směru maximální pomoc. Výbor zhodnotil dosavadní přípravy konference jako uspokojivé a doporučuje v přípravách pokračovat. Na příští schůzi výboru budou upřesněny další detaily (zodpovídají Kočová, Mašek, Nešvera, Šeda, Zadražil).

ad 7) Kočová podala návrh na zvýšení členského příspěvku, který je řadu let beze změny ve výši 150,- Kč. Návrh byl diskutován a změna bude navržena ke schválení členské základně na konferenci 2014.

Dále se diskutovalo o způsobu oslovení vybraných firem pro sponzorování konference, o formě jejich účasti a prezentace na konferenci a dalších detailech spojených s přípravou konference.

Zapsala: M. Kočová

## **VÝZVA Soutěž o Cenu GSGM v roce 2014**

Vážené kolegyně a kolegové,

v září 2014 se uskuteční genetická konference v Praze, jejíž nedílnou součástí je prezentace odborných výsledků studentů a mladých vědeckých pracovníků. Výbor GSGM při této příležitosti vyhlásil již pátý ročník Soutěže o cenu GSGM dotovanou společností M.G.P. s.r.o. Zlín finanční částkou 2000 EUR. Statut Ceny GSGM a veškeré další informace jsou k dispozici na internetových stránkách společnosti ([www.gsgm.cz](http://www.gsgm.cz)).

Výbor vyzývá všechny své členy a další pedagogické a vědecké pracovníky, aby podpořili účast svých mladších kolegů v soutěži o cenu GSGM, kterým se tak nabízí možnost získat prestižní ocenění GSGM a prezentovat výsledky své výzkumné činnosti na genetické konferenci.

### **Přihlášky do soutěže se přijímají do 30. dubna 2014 na adrese:**

Výbor Genetické společnosti Gregora Mendela  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity  
Kotlářská 2  
611 37 Brno

*Výbor GSGM*

**ZPRÁVA O STAVU HOSPODAŘENÍ GSGM K 30. 9. 2013 ZA ČR**

<b>Zůstatek k 30. 9. 2012</b>		<b>26674,88 Kč</b>
z toho	na účtu KB	23832,88
	v pokladně	2842,-

---

<b>Zůstatek k 30. 9. 2013</b>		<b>28160,00 Kč</b>
z toho	na účtu KB	25521,00
	v pokladně	2639,00

Zpracoval: Aleš Knoll

**VYÚČTOVANIE HOSPODÁRENIA GSGM K 30. 9. 2013 ZA SLOVENSKO**

<b>Zostatok k 30. 9. 2012</b>		<b>1311, 67 EUR</b>
z toho	na účte Tatra banka	1237,29 EUR
	v hotovosti	74,38 EUR

---

<b>Príjmy</b>		
členské príspevky		71,00 EUR

---

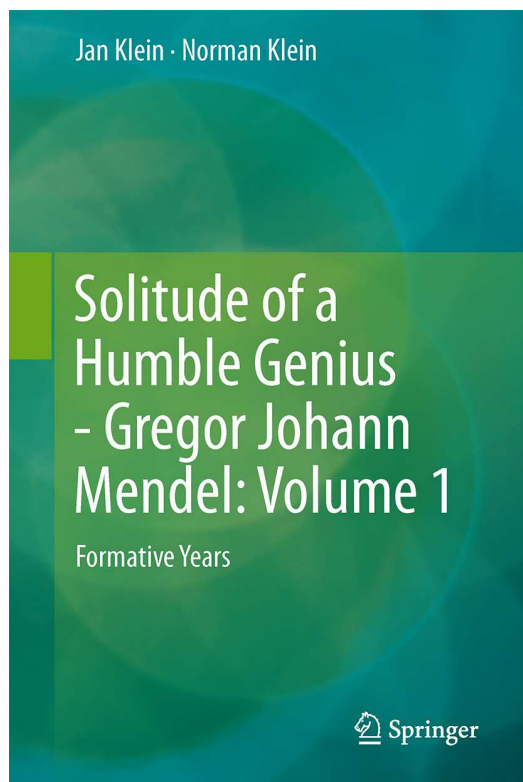
<b>Výdaje</b>		
poplatky banke za vedenie účtu		53,07 EUR
jiné výdaje		3,50 EUR

---

<b>Zostatok k 3. 9. 2013</b>		<b>1326,10 EUR</b>
z toho	na účte Tatra banka	1245,20 EUR
	v hotovosti	80,90 EUR

Spracovala: Miroslava Slaninová

## Právě vyšla nová kniha o Mendelovi



Jan Klein, Norman Klein  
***Solitude of a Humble Genius – Gregor Johann Mendel: Volume 1. Formative Years.*** Edited by Paul Klein.  
Springer, 2013, 407 stran, 86 ilustrací  
ISBN 978-3-642-35253-9

### Anna Matalová

Moravské zemské muzeum, Zelný trh 6,  
659 37 Brno

Dvousvazková monografie profesora Jana Kleina, ze které vyšel první díl, překonává všechny biografické knihy, které dosud o Mendelovi vyšly. Začíná starým Řeckem a vysvětluje, kde se moderní genetika setkává s Aristotelem a jak do toho všeho zapadá Mendel. S pocitem sounáležitosti představuje

Moravu a Slezsko, aby dopodrobna zachytil Mendelovo rodiště, jeho předky, rodiče, sourozence a jejich život na zemědělské usedlosti a také čtvero ročních období na Kravařsku v té době.

Z Hynčic provází Mendela na studia do Lipníku, na gymnázium do Opavy a na Filozofický ústav do Olomouce. Další soubor podrobných informací a zajímavých souvislostí uvádí v souboru o Brně a Augustiniánském řádu sv. Tomáše na Starém Brně, kde Mendel fyzicky i psychicky ztroskotává hned v začátcích své pastorační činnosti. Ty, kdo se zabývají Mendelem, překvapí šířka záběru tématu a jasnost, s jakou jsme vtaženi do příběhu. Autor svým systémovým uspořádáním dat usnadňuje rychlé vyhledávání konkrétních údajů Mendelova života. Jen tak mimochodem kniha podává cenné nálezy, ale skromně je nechá plynout v mohutném toku dat. V Brně kniha zajisté vyvolá utlumení rychlokvašných a rádoby objevných indicií o Mendelově životě, které se objevují v posledním desetiletí. Musíme si uvědomit, že Mendelův odkaz v Brně systematicky a dlouhodobě rozvíjeli Židé, Němci a Češi na vysoké úrovni. V současné Evropě je nutné Mendela interpretovat nově v mnohovrstevném vědeckém a kulturním kontextu. Data se nemění, mění se to, do jakých nových kontextů vstupují.

Jako znalec selského života prof. Klein chápe hloubku Mendelovy touhy po svobodě, která ho přivedla mezi revolucionáře v roce 1848. Mendelovo osobní nasazení při získávání vzdělání pro sebeuplatnění v osobním životě jako učitele fyziky a přírodovědy současně odhaluje poměry ve školství v monarchii. Poznáme, kdo vládl, kdo poslouchal a kdo se bouřil, kdo tvořil a odkud bral inspiraci, kdo podléhal utopiím a kdo je odmítal, kdo byl poslední, ale stal se prvním, kdo byl v pravý čas na pravém místě, i když nevěděl, co ho čeká. Ze světového hlediska se všichni rádi podíváme, jaké místo má v Evropě Mendelův rodný kraj, kdo byli a čím se živil jeho obyvatelé, kdo byli Mendelovi sousedé, v co věřili a jak si vysvětlovali svět. J. Klein vyplnil dokonce i bílá místa spojená s Mendelovým vstupem do kláštera, o kterém se dlouho převážně mlčelo, o dopadech revolučního roku 1848 na život v klášteře a změnách, které revoluce vyvolala a které Mendela pozitivně zasáhly. První díl končí Mendelovým studiem na univerzitě ve Vídni a získáním místa suplujícího profesora na vyšší státní reálce, se kterou jsou spojeny ambice svobodných zednářů. Každý z šesti myšlenkových okruhů (řecký pohled na dědičnost, sex a druh; Mendelova zkoušená vlast - Slezsko a Morava; dětství na zemědělské usedlosti; Mendelova učednická léta; slib věrnosti; marná snaha o získání profesury) je opatřen bohatými poznámkami, literárními odkazy a vysvětlivkami. Velkým přínosem pro knihu jsou kresby Normana Kleina, které přinášejí portréty osobností, budov a míst spojených s Mendelovým životem.

Profesor Jan Klein je aktuálně předsedou mezinárodního týmu expertů podílejících se na vybudování Mendelianum Centre v Biskupském dvoře u Zelného trhu v rámci Moravského zemského muzea, které muselo vyklidit své Mendelianum ve starobrněnském klášteře v roce 2000. Prof. Jan Klein se narodil v malé slezské vsi nedaleko Mendelových Hynčic. Stejně jako Mendel vyrůstal na zemědělské usedlosti a chodil do gymnázia v Opavě. V době lisenkiády hájil Mendelovu práci a zasazoval se o podporu Mendeliana i v dobách své emigrace. Donedávna byl nejcitovanějším českým vědcem a jeho objev histokompatibilního komplexu byl navržen na Nobelovu cenu. Svou Mendelovu monografii věnoval Mendelianu Moravského zemského muzea, na jehož půdě vznikla také Genetická sekce Československé biologické společnosti, současná Genetická společnost Gregora Mendela.



**PhDr. Anna Matalová** je dlouholetou pracovnící Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. Působila zde od jeho založení a po roce 1989 až do odchodu do důchodu jako vedoucí. Aktuálně se věnuje především realizaci centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky.

## Nobelovská výročí a věda v akci 2013

### Eva Matalová

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno

Podzim je obdobím, kdy jsou každoročně vyhlašovány Nobelovy ceny. Za fyziologii/medicínu ji letos v prosinci převezmou James E. Rothman, Randy W. Schekman a Thomas C. Südhof. Oceněn byl přínos těchto vědců v oblasti objasnění mechanismů regulujících transport vezikul v buňkách.

Prof. James E. Rothman (Yale University, USA) v osmdesátých a devadesátých letech minulého století studoval živočišné buňky z hlediska mechanismu transportu látek a jejich exportu z buněk. Objevil proteinový komplex, který umožňuje pohyb vezikul (váčků) s látkou k cytoplazmatické membráně a jejich fúzi následovanou vyloučením látky do extracelulárního prostoru. Současně zjistil, že tento mechanismus je specifický a váček s danou částí membrány musí být komplementární (zámek-klíč). Tento mechanismus je zásadní např. z hlediska vyloučení aktivní látky (např. hormonu) do odpovídajícího regionu tkáně.

Prof. Randy W. Schekman (University of California, Berkeley, USA) studoval v sedmdesátých letech genetické základy pro tvorbu vezikul v buňkách a její řízení. K experimentům používal buňky kvasinek s genetickým defektem, který vedl k poruše tvorby vezikul. Určením poškozených genů byly definovány tři skupiny genů, které řídí procesy určující, jak buňka vytváří transportní váčky a jak se tyto pohybují uvnitř buněk. Uvedené poznatky mají zásadní význam pro funkce zdravého organismu a jejich defekty se podílejí na onemocněních (např. diabetes, některé formy epilepsie).

Prof. Thomas C. Südhof (Stanford University, USA) se zajímal o komunikaci nervových buněk. Navázal na poznatky, že neurotransmitery se na synapsích vylučují z transportních váčků, které se otevírají pouze, je-li daná buňka aktivována v rámci nervové sítě. V devadesátých letech začal s výzkumem tohoto mechanismu a identifikoval molekuly, které za přítomnosti vápenatých iontů spouštějí přesun vezikul k membráně a vyprázdnění jejich obsahu do synaptické štěrby.

Mendelianum MZM Brno ve spolupráci s ÚŽFG AV ČR, v.v.i. v Brně v letošním cyklu Nobelovská výročí a věda v akci představilo nejenom novou Nobelovu cenu, ale připomnělo také výročí dalších oceněných objevů s širokým celospolečenským dopadem. V letošním roce byl připomenut zejména objev restričních enzymů a další související poznatky, které nastartovaly éru klonování, sekvenování a mapování genomů. Za objev restričních enzymů a jejich aplikaci v problematice molekulární genetiky získali Nobelovu cenu za fyziologii/medicínu v roce 1978 Werner Arber



(Švýcarsko), Daniel Nathans (USA) a Hamilton O. Smith (USA). Zahájení této revoluční etapy molekulární biologie však nebylo snadné, např. švédská televize po zveřejnění laureátů Nobelovy ceny uvedla, že „jejich metody otevírají možnost kopírovat lidi v laboratořích, vytvářet geniální bytosti, vyrobit spousty pracovních sil nebo také vytvořit kriminálníky“.

Cesta k nobelovskému ocenění začala již v roce 1962, kdy Werner Arber našel enzymatický systém, který umožňuje bakteriím rozeznat cizí DNA a zničit ji, zatímco současně modifikují svou vlastní DNA, aby zabránily autodestrukci. Následně W. Arber, S. Linn, M. Meselson a R. Yuan (Harvard University) izolovali extrakt z *Escherichia coli*, který efektivně rozkládal DNA fágů. Tento extrakt obsahoval první známou restriční endonukleázu, která rozeznávala a štěpila specifickou sekvenci v DNA. Fenomén restričních modifikací jako nástroj molekulární biologie však nebyl příliš efektivně využit až do roku 1970, kdy H. Smith a K. Wilcox (Johns Hopkins University) izolovali enzym z *Haemophilus influenzae*. Enzym nazvaný HindII nevykazoval modifikační aktivitu a byl schopen štěpit DNA přesně v místě, které rozeznával. První restriční endonukleázy však nebyly prakticky využitelné, jelikož štěpily DNA daleko od místa, které byly schopny rozeznat. D. Nathans (Johns Hopkins University) jako první ukázal širokou použitelnost restričních endonukleáz ve spojení s gelovou elektroforézou. Použil enzym HindIII pro štěpení purifikované DNA malého viru, který infikuje opice (SV40). Následně použil elektroforézu pro separaci fragmentů na základě jejich velikosti a ze získaných výsledků vytvořil restriční mapu viru. Podobné využití restričního štěpení DNA molekuly pro tvorbu restričních map bylo využito při mapování lidského genomu.

Ve dnech 7. a 8. listopadu 2013 se na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. mohli zájemci seznámit s aktuálním výzkumem a metodami molekulární biologie, ale také si je přímo v laboratořích vyzkoušet. Z důvodu zajištění "hands-on experience" byla akce otevřena pro limitovaný počet 100 účastníků rozdělených do čtyř skupin. O velkém zájmu vypovídá i fakt, že registrace byla obsazena bezprostředně po jejím otevření.

Materiály k akci Nobelovská výročí a věda v akci 2013 jsou dostupné na [www.mendelianum.cz](http://www.mendelianum.cz) stejně jako fotogalerie a informace o dalších aktivitách Mendeliana MZM Brno, které je jedinou vědeckou institucí zkoumající a rozvíjející odkaz JGM u nás, a to již přes padesát let. Genetické příběhy na pozadí Nobelových cen jsou připravovány i pro návštěvnické centrum Mendelianum-atraktivní svět genetiky, které bude dostavěno v příštím roce. Více info: [www.mendelianum.cz](http://www.mendelianum.cz)



**Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.** (e-mail: [matalova@iach.cz](mailto:matalova@iach.cz)) je vědeckou pracovnící Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., profesorkou na Fakultě veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a spolupracuje s Mendelianem MZM, nyní zejména na projektu Mendelianum – atraktivní svět genetiky.

## Výstava Mendelovo Brno na Mendelově univerzitě

**Tomáš Urban**

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Mendelianum Moravského zemského muzea v Brně ve spolupráci s partnery připravilo putovní výstavu o historických místech v Brně, která připomínají všestranné působení J. G. Mendela. V letošním roce hostila výstavu Mendelova univerzita, která ji umístila do nově otevřeného pavilonu X. Výstava dokumentuje Mendelovu činnost od jeho příchodu do Brna v jeho 21 letech a vstupu do augustiniánského řádu sv. Tomáše na St. Brně. Mendelovo působení však zdaleka nebylo omezeno na úzký prostor kláštera, který mu poskytoval především materiální zázemí, jak o tom píše ve vlastním životopise z roku 1850. Jako přírodovědec se Mendel realizoval v mnoha směrech. První odborné zkoušky skládal z rostlinné a živočišné výroby, ovocnářství a vinařství. Směrodatným bylo především jeho vědecké zapojení do výzkumného programu učené Hospodářské společnosti, která byla v té době považována za vědeckou akademii pro Moravu. Do činnosti Hospodářské společnosti se Mendel zapojil po svém návratu z Vídně, kde se věnoval studiu experimentální fyziky a přírodních věd. Svým zaměřením se Hospodářská společnost věnovala oborům, které jsou rozvíjeny na vysoké škole zemědělské: zemědělství, lesnictví, zahradnictví, vinařství, pomologie, včelařství, meteorologie, životní prostředí, přírodověda a vlastivěda. I tato skutečnost souvisí s Mendelovým jménem v názvu univerzity, která se stále věnuje rozvíjení Mendelova vědeckého odkazu.

Mendelova univerzita aktuálně spolupracuje na přípravě odborného scénáře návštěvnického centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky, které bude otevřeno v místech, kde Hospodářská společnost sídlila, tedy v budově Biskupského dvora u Zelného trhu. V roce stého výročí Mendelova objevu v roce 1965, kdy byla ukončena éra antimendelismu a lisenkismu, byla v Biskupském dvoře instalována výstava Minulost a přítomnost genetiky, která poukázala na spojení historických prostor Biskupského dvora s Mendelovou častou osobní přítomností v této budově jako člena odborných sekcí nebo člena hlavního výboru, který zde až do své smrti předsedal schůzím Hospodářské společnosti. Je vhodné také připomenout, že prvním šlechtitelským ústavem, který se přihlásil k Mendelovi ve svém názvu, je Mendeleum Mendelovy univerzity v Lednici s bohatou vědeckou a kulturní tradicí.

Výstava o Mendelově Brně dokládá také Mendelovu učitelskou činnost, která je spojena s brněnským Technickým studijním ústavem a Státní vyšší reálnou školou.

V roce 1860 v ní začal pracovat Přírodovědecký spolek, který vznikl z přírodovědné sekce Hospodářské společnosti. Mendel tento spolek zakládal jako člen liberálního kruhu profesora Zawadského a ředitele reálky Auspitze. Na reálce na Jánské Mendel přednášel poprvé o svém objevu elementů dědičnosti a lze o ní právem říci, že tam začala genetika.

Výstava představuje životní milníky týkající se J. G. Mendela, a pokouší se odpovědět na otázky, proč jsou někdy uváděna dvě různá data Mendelova narození, odkud pocházejí Mendelovy geny, co je podstatou Mendelovy práce a proč tak dlouho trvalo, než se v klášteře podařilo profesorovi Ilisovi objevit Mendelův rukopis v bedně mezi starými papíry a jak ho získal do majetku Přírodovědeckého spolku, odkud zmizel v roce 1940 i se zápisem schůze spolku. Výstava také zahrnuje faksimile Mendelova rukopisu, který potomci Mendelových sester zveřejnili v roce 1992 v Darmstadtu, aby o jeho držení informovali světovou veřejnost.

Výjimečnost výstavy spočívá také v původním zveřejnění přehledného Mendelova rodokmenu formou rodinného stromu, který připravil prof. Jan Klein, dlouhodobý spolupracovník Mendeliana MZM a člen mezinárodního Advisory Board návštěvnického centra Mendelianum – atraktivní svět genetiky.

Výstava je v prostorách Mendelovy univerzity přístupná do konce roku 2013.



**Doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.**

(e-mail: [urban@mendelu.cz](mailto:urban@mendelu.cz)) je docentem Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně a spolupracovníkem Mendeliana MZM Brno.

## **Myeloidní leukémie**

### **Tereza Lopotová**

Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení buněčné biochemie,  
U Nemocnice 1, 128 20, Praha 2

Myeloidní leukémie jsou maligní onemocnění, která se vyznačují expanzí myeloidní krevní řady. Zahrnují chronickou a akutní myeloidní leukémii. Rozdělení je především historického charakteru, konečná stádia chronické leukémie připomínají formu akutní.

### **Chronická myeloidní leukémie**

#### **Klinická charakteristika, časový průběh a epidemiologie CML**

Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproliferativní onemocnění, které vzniká v důsledku maligní transformace kmenové nebo primitivní progenitorové hematopoetické buňky. Bez cílené léčby probíhá CML ve třech stádiích. První fází je chronická fáze (CP), tj. fáze „preneoplastická“ charakterizovaná silnou expanzí myeloidní řady, buňky jsou většinou plně diferencované. Druhou fází je akcelerovaná fáze (AP) a třetí blastická krize (BC). AP je charakterizována alespoň jedním z následujících znaků: v periferní krvi nebo kostní dřeni je obsaženo 10 až 30 % blastů, nejméně 20 % blastů a promyelocytů, nejméně 20 % bazofilů, trombocytopenií (méně než  $100 \times 10^9/l$  krve bez vztahu k léčbě), progresivní splenomegalii a přídatnými chromozomovými aberacemi. V BC má pacient v periferní krvi nebo kostní dřeni více než 30 % blastů. AP a BC se souhrnně označují jako akutní fáze připomínající akutní leukémii. U 60 % případů mají blasty myeloidní morfolonii a exprimují myeloidní markery, v ostatních případech je fenotyp podobný akutní lymfoidní leukémii, vzácně se může jednat o megakaryoblasty a erytroblasty. V chronické fázi pacient dobře odpovídá na léčbu, zatímco akutní fáze, zvláště pak blastická krize, jsou terapeuticky těžko zvladatelné. Do nedávné minulosti končila CML smrtí pacienta v blastické krizi. Při současné cílené léčbě je progresse onemocnění poměrně vzácná.

CML je značně heterogenní onemocnění, jehož agresivita a příznaky se liší u jednotlivých pacientů. K běžným příznakům patří jinak nevysvětlitelné horečky, ztráta váhy, zvýšená únava, bolesti kloubů a kostí, atd. Incidence CML se uvádí mezi 1 až 2 případy na sto tisíc lidí. V rámci všech leukémií tvoří CML asi 15 až 20 %. Výskyt onemocnění roste s věkem, maxima dosahuje v šesté věkové dekádě (Mayer et al., 2002; Adam et al., 2001).

#### **Biologie CML**

##### *Translokace Ph, gen a protein BCR-ABL*

Příčinou rozvoje CML je reciproká translokace mezi chromozomy 9 a 22 (translokace Ph), jejímž produktem je tzv. Filadelfský (Ph) chromozom (zkrácený

chromozom 22), cytogenetický marker CML (Rowley et al., 1973). Ph chromozom je detekován u 95 % pacientů s CML, u 5 % pacientů se vyskytuje komplexní translokace, která zahrnuje ještě další chromozomy (Adam et al., 2001). Jediným dokázaným vnějším faktorem pro vznik translokace Ph je ionizující záření, význam mohou mít také duplikony (76 kb) v blízkosti genů *bcr* a *abl* (Salgio et al., 2002) nebo přiblížení obou genů v jádře hematopoetických prekurzorů při přechodu z S do G2 a během fáze G2 buněčného cyklu (Neves et al., 1999). Ve zlomových oblastech translokace se nacházejí dva geny – *abl* a *bcr*. Gen *abl* (9q,34, 225 kb) kóduje nerekceptorovou tyrozinovou kinázu, buněčný homolog onkogenu *v-abl* Abelsonova viru způsobujícího leukémii u myši. Jaderný ABL je významný proapoptotický protein, který hraje klíčovou roli v buněčné odpovědi na genotoxický stres, podílí se na spuštění apoptózy v buňkách vystavených ionizujícímu nebo gama záření (Yuan a spol. 1999). Gen *bcr* kóduje kinázu Ser/Thr (160 kDa). Jednou z nejdůležitějších částí tohoto proteinu je oligomerizační doména s "coiled-coil" motivem, která je kódována prvním exonem *bcr* a zajišťuje oligomerizaci BCR, jakož i chimérického proteinu BCR-ABL (viz dále) (McWhirter et al., 1993).

Na chromozomu Ph vzniká translokací fúzní gen *bcr-abl*, který je hlavní příčinou rozvoje CML. Za počáteční exony genu *bcr* na 22q11 dochází k připojení téměř celého genu *abl* z 9q34. Zlomové oblasti jsou lokalizovány téměř výlučně v oblastech intronů. Zlom v genu *abl* nastává na jeho 5'-konci před exonem 1b, za exonem 1a, nebo nejčastěji mezi nimi v oblasti o velikosti větší než 300 kb (Melo, 1996). Výsledný transkript *bcr-abl* je však vždy sestřižen tak, že sekvence *abl* v *bcr-abl* začíná exonem 2 (Morris et al., 1991). Zlomové oblasti uvnitř genu *bcr* spadají při CML do jedné ze dvou oblastí, tzv. „break point cluster regions“. (1) více než 90 % pacientů s CML má zlom v oblasti zvané „major break point cluster region“ (*M-bcr*) mezi exony 12 až 16 (označováno také jako b1 až b5, celkem 5,8 kb). Alternativním sestřihem mohou vznikat fúzní transkripty se spojením e13a2 (b2a2) nebo e14a2 (b3a2). Obě mRNA jsou potom překládány do proteinu p210 BCR-ABL (Heisterkamp et al., 1985), který je vedle CML spojován také s ALL, AML a vzácně dalšími onemocněními. (2) U pacientů s CML se zřídka vyskytuje také zlom v oblasti „minor break point cluster region“ (*m-bcr*) mezi alternativními exony e2' a e2 (celkem 54,4 kb). Vzniklá e1a2 mRNA se překládá do proteinu p190 BCR-ABL (Hermans et al., 1987), někdy označovaného také jako p185. Vzácně se vyskytují případy CML s jinými spojeními *bcr-abl*, jako např. b2a3 (Moravcova et al., 2005).

Přítomnost fúzního transkriptu *bcr-abl* byla prokázána i v krvi zdravých jedinců (Bose et al., 1998). Předpokládá se, že v takových případech se buď imunitnímu systému podaří včas maligní klon vymýtit nebo se jedná o buňku v terminálním stádiu diferenciace, která se již dále nedělí a nemůže z ní vzniknout maligní klon. Pro úplnost je třeba zmínit, že translokací Ph vzniká také nový 9q+ chromozom, na němž vzniká další fúzní gen *abl-bcr*. Přítomnost mRNA *abl-bcr* se nalézá přibližně u 70 % pacientů s CML (Melo et al., 1993).

### *Transformace buněk CML - působení proteinu BCR-ABL*

BCR-ABL funguje v buňkách jako tyrozinová kináza, která se na rozdíl od ABL vyskytuje výhradně v cytoplasmě. V důsledku ztráty prvního exonu a fúze s BCR je kináza BCR-ABL konstitutivně aktivní a zcela neregulovaná. BCR-ABL vstupuje do regulace základních buněčných drah udržujících rovnováhu mezi buněčným přežitím a smrtí.

## MAP-kinázová ("mitogen-activated protein kinase") dráha

MAP-kinázová (Ras/Raf/MEK/ERK) dráha je centrální dráhou signální transdukce, která přenáší signál z různých povrchových receptorů buňky do buněčného jádra. Její stimulace vede k proliferaci buněk a inhibici apoptózy. Protein Ras je membránová GTPáza, která se účastní různých signálních drah, mimo jiné právě v Raf/MEK/ERK. V řadě lidských maligních onemocnění se lze setkat s jejími mutacemi, v CML jsou však vzácné. BCR-ABL spolu s proteiny Grb2, Shc a Sos stabilizuje aktivní formu proteinu Ras (Skorski et al., 1994). K deregulaci dráhy Ras v BCR-ABL pozitivních buňkách přispívá zřejmě také nízká hladina produktu genu NF-1, neurofibrominu, který funguje jako negativní regulátor dráhy Ras (Jongen-Lavrencic et al., 2005). Dále BCR-ABL aktivuje expresi Raf-1 (Salomoni et al., 1998). Na úrovních níže od BCR-ABL je aktivován přes Rap-1 také B-Raf (Mizuchi et al., 2005).

## Dráha JAK/STAT

Signální dráha JAK/STAT přímo spojuje aktivaci cytokinových receptorů s genovou expresí. Skládá se ze tří rodin proteinů - JAK ("Janus family of tyrosine kinases"), STAT ("signal transducers and activators of transcription") a CIS/SOCS ("cytokine-induced SH2-containing proteins/suppressors of cytokine signaling"), která tlumí aktivitu dráhy JAK/STAT. Aktivovaná kináza JAK fosforyluje STAT na specifickém tyrozinu, následuje dimerizace STAT, zvýšení jeho stability a přesun do jádra, kde působí jako aktivátor transkripce. Faktory STAT mohou být v buňkách CML aktivovány nezávisle na kinázách JAK proteinem BCR-ABL (Illaria et al., 1996).

## Fosfatidylinositol-3kinázová dráha

Fosfatidylinositolkinázy (PIK) představují rodinu proteinů katalyzujících přenos  $\gamma$ -fosfátu z ATP na fosfoinositidy. Aktivita PI3K je spojena především s organizací cytoskeletu, buněčným dělením a inhibicí apoptózy. PI3K se skládá z katalytické podjednotky p110 se serin/threoninovou kinázovou aktivitou a regulační podjednotky p85, která stabilizuje a inhibuje p110. PI3K fosforyluje fosfoinositidy, které aktivují PDK fosforylující Akt (proteinkináza B, PKB). Pro proliferaci i ochranu BCR-ABL pozitivních buněk proti apoptóze je podmínkou aktivita kinázové dráhy PI3 (Shet et al., 2002). BCR-ABL nepřímo přes podjednotku p85 interaguje s PI3K. Ta je pak v komplexu s dalšími proteiny, jako je Gab2, aktivována (Sattler et al. 2002). Mimo to BCR-ABL inhibuje expresi fosfatázy SHIP1, která je jednou z fosfatáz inhibujících aktivitu kinázy Akt (Sattler et al. 1999).

## *Mechanismy progresu CML*

Mechanismus progresu CML do akutních fází není zcela jasný. Předpokládá se, že ke vzniku blastické krize stačí patrně samotné působení proteinu BCR-ABL mechanismem alterované regulace genů, který závisí na dávce BCR-ABL (Calabretta et al., 2004). BCR-ABL prokazatelně navozuje genetickou nestabilitu buněk. Přestože je za normálních podmínek protein BCR-ABL lokalizován výhradně v cytoplazmě, ukázalo se, že v leukemických buňkách vystavených genotoxickému stresu translokují do jádra, kde narušuje opravy DNA (Dierov et al., 2002). Existuje také několik studií poukazujících na vztah mezi expresí BCR-ABL a aktivitou nebo produkcí proteinů účastnících se oprav DNA, zvláště dvouřetězcových zlomů (Deutsch et al., 2001; Deutsch et al., 2003). Sekundární cytogenetické a molekulární

změny jsou nalézány během progresu onemocnění směrem k blastické krizi u 60 až 80 % pacientů. V chronické fázi se tyto změny vyskytují pouze přibližně v 5 % (Bacher et al., 2004). Chromozomální aberace zahrnují chromozomy 8, 17, 19 a 22. Mezi nejčastější patří duplikace chromozomu Ph a trizomie chromozomu 8 a naopak spíše výjimečně se objevuje ztráta chromozomu 7 (Bacher et al., 2004). Z molekulárních změn jsou u myeloidní blastické krize časté mutace v oblasti tumor supresorového genu p53 (Brusa et al., 2003). Přídavné změny jsou patrně současně příčinou i následkem probíhající progresu.

### Současné léčebné přístupy k CML

Léčbu CML lze v zásadě provádět dvěma způsoby - transplantací nebo medikamentózně.

#### *Transplantace kmenových buněk (TKB)*

Pod tímto pojmem rozumíme přenos kmenových buněk zdravého dárce do oběhu příjemce, kde mají za úkol obnovit krvetvorbu příjemce, předtím chemoterapeuticky úplně nebo částečně zničenou. V klinické praxi jsou využívány tři typy transplantací - alogenní příbuzenská nebo nepříbuzenská, syngenní nebo autologní. Alogenní transplantace je stále jedinou metodou, která může vést k trvalému vyléčení. Riziko relapsu činí přibližně 20 %. Přestože je TKB jedinou skutečně kurativní metodou, studie ukázaly, že s ohledem na riziko transplantační mortality a morbidit je výhodnější léčba medikamentózní (Hehlmann et al., 2007). S výjimkou velmi mladých pacientů se tak dnes dává před transplantací přednost imatinibu (viz dále).

#### *Léčba medikamentózní*

##### Chemoterapie a interferon $\alpha$ (IFN)

V současné době se z chemoterapeutik v léčbě CML používá už pouze hydroxyurea, inhibitor ribonukleotidreduktázy, tedy syntézy DNA (Hehlmann et al., 1993), a to v okamžiku diagnózy ke snížení počtu bílých krvinek pacientů. Monoterapie interferonem alfa (IFN) dokáže navodit hematologickou až cytogenetickou odpověď u pacientů s CML (Talpaž et al., 1986). Protinádorový účinek IFN je dán kombinací přímého antiproliferačního účinku a nepřímých účinků zprostředkovaných imunitním systémem. IFN působí stimulačně na NK-buňky a makrofágy a zároveň stimuluje expresi MHC gp I, nádorově specifických antigenů a adhezivních molekul nádorových buněk. Uvádí se také, že IFN má přímé cytostatické efekty na nádorové buňky (Jonasch et al., 2001). Mezi nevýhody IFN patřily především vedlejší účinky. Randomizovaná studie IRIS srovnávající interferon alfa s imatinibem (viz dále; O'Brien et al., 2003) ukázala na jasnou výhodu pokročilých léků – cílených kinázových inhibitorů. IFN se tak dnes používá pouze v případech, kdy nelze použít cílenou léčbu.

##### Molekulárně cílená terapie (MCT)

Principem MCT je specifická inhibice některé z molekul zapojených do vzniku, resp. rozvoje CML. Většina pacientů je v současné době léčena právě tímto typem léků. Imatinib mesylát (STI 571, obchodní názvy Glivec, v USA Gleevec, dále pouze imatinib) je selektivní inhibitor ABL, BCR-ABL, PDGFR, c-Kit a patrně také ARG. Imatinib kompetuje s ATP o vazebné místo v molekule kinázy (Buchdunger et al., 2000; Okuda et al., 2001). Na buněčných liniích bylo prokázáno, že imatinib může navozovat apoptózu a/nebo diferenciaci leukemických buněk (např. Jacquelin et al.,

2003). Indukovaná autofagie může vést k zastavení buněčného cyklu a apoptóze, nebo může naopak rakovinným buňkám pomáhat recyklací proteinů a organel zničených léčbou (Ertmer et al., 2007). V léčbě CML byl imatinib poprvé použit v roce 1998, dnes je používán jako léčebný prostředek první volby. V porovnání s IFN imatinib navozuje významně více kompletních hematologických a cytogenetických odpovědí (O'Brien et al., 2003). Dosavadní studie ukazují, že kinázové inhibitory druhé generace mohou v první linii imatinib předčít, nicméně vzhledem ke dlouhé zkušenosti s imatinibem a jeho bezpečností dává většina lékařů stále přednost imatinibu.

Druhá generace MCT zahrnuje dasatinib a nilotinib

Nilotinib (Tasigna, AMN107) je odvozen od imatinibu, je vysoce selektivní pro Abl1 a ve srovnání s imatinibem je 10-50x účinnější (Weisberg et al., 2006; Rosti et al., 2009). Je účinný proti nemutovanému BCR-ABL a pouze některým mutantním formám. Na rozdíl od imatinibu se do buněk dostává difuzí a může být proto s výhodou podán v případě mnohočetné lékové rezistence.

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel) je schopen vázat jak aktivní, tak i neaktivní formu kinázy BCR-ABL a inhibuje i kinázy rodiny Src (Tokarski et al., 2006). Ve srovnání s imatinibem je 300x účinnější. Dasatinib je účinný i proti mutantním formám kinázy BCR-ABL s výjimkou vysoce rezistentní formy s mutací T315I (Carter et al., 2005). Výsledky první fáze klinických testů ukázaly, že dasatinib navozuje hematologickou nebo až cytogenetickou remisi u pacientů, kteří netolerovali imatinib nebo k němu byli rezistentní (Talpaž et al., 2006). Dasatinib je cílen na časnější progenitory než imatinib, nicméně nejprimitivnější buňky CML v klidovém stavu (fázi G0) jsou rezistentní i k dasatinibu (Copland et al., 2006). Ve fázi klinických studií je v současné době celá řada dalších cílených léků.

### *Kurativní medikamentózní léčba CML?*

Nedořešenou otázkou současné léčby a důvodem, proč léčba kinázovými inhibitory není kurativní a vyžaduje doživotní užívání, je fakt, že tato léčba není účinná proti leukemickým kmenovým buňkám, zejména leukemickým kmenovým buňkám ve fázi G0. Jedním z důvodů je patrně nedávno prokázaná nezávislost přežití kmenových CML buněk na kinázové aktivitě BCR-ABL (Hamilton et al., 2012). Pokud bylo testováno vysazení léčby imatinibem v době kompletní cytogenetické remise, docházelo u pacientů k relapsům (např. Yhim et al., 2012). Ukázalo se ale, že výskyt relapsů je nižší u pacientů, kteří byli předléčeni IFN. Nedávno byla publikována práce, která tento jev může vysvětlit – podání IFN aktivuje leukemické kmenové buňky ve fázi G0 ke vstupu do buněčného cyklu (Essers et al., 2010). Tyto buňky, o nichž se věří, že jsou příčinou relapsů po vysazení imatinibu, se tak stávají citlivými na následnou imatinibovou léčbu.

Dále se testují také některé další přístupy pro eradikaci leukemických kmenových buněk. Příkladem je použití inhibitoru GSK3 beta ("glykogen synthase kinase 3 beta") v kombinaci s imatinibem (Reddiconto et al., 2012) nebo inhibice autofagie současně s tyrosin kinázovými inhibitory (Calabretta et al., 2011).

### *Rezistence k léčbě*

Protože je dnes většina pacientů léčena imatinibem, je pozornost nejvíce zaměřena na mechanismy rezistence právě k imatinibu. Lze rozlišit primární rezistenci, která se projeví nepřítomností účinku léčby již od jejího zahájení, nebo tzv.



sekundární rezistenci, která se projeví ztrátou efektivity léčby po počáteční odpovědi (Hochhaus et al., 2004). Podle mechanismu můžeme rozlišit rezistenci na BCR-ABL závislou a nezávislou. V praxi rozlišení umožňuje sledování fosforylace substrátů BCR-ABL jako např. CRKL (Hochhaus et al., 2002).

Donedávna se předpokládalo, že hlavním mechanismem rezistence závislé na BCR-ABL jsou mutace v genu *bcr-abl* (Branford et al., 2002). Pro vznik rezistence měly být významné především mutace v místech důležitých pro vazbu imatinibu, tj. především v kinázové doméně BCR-ABL, mutace v P smyčce, tj. v sekvenci, která se přímo účastní vazby ATP, mohou souviset s horší prognózou pacientů (Branford et al., 2003). V nepřítomnosti imatinibu ale většina mutací nepřináší buňkám žádnou růstovou výhodu (Miething et al., 2006) a přítomnost mutované alely ne vždy znamená klinickou rezistenci k imatinibu (Khorashad et al., 2006). Dalším možným mechanismem rezistence závislé na BCR-ABL je overexprese BCR-ABL, k níž může docházet v důsledku duplikace chromozomu Ph (Oshikawa et al., 2010) nebo genomické amplifikace *bcr-abl* (Virgili et al., 2010).

Imatinib je do buněk transportován aktivně prostřednictvím proteinu hOCT1 ("human organic cation transporter"). Snížená exprese nebo aktivita tohoto proteinu by tak mohla být jednou z příčin rezistence k imatinibu, ať už primární nebo sekundární (Thomas et al., 2004). Existuje také mechanismus mnohočetné lékové rezistence, kdy P-glykoprotein, produkt genu *mdr1*, zajišťuje aktivní vylučování imatinibu z buňky (Mahon et al., 2003).

Mechanismů rezistence nezávislé na BCR-ABL je patrně celá řada. Předpokládá se, že trvalá aktivace (exprese) některých molekul navozovaná BCR-ABL se může postupem času stát na tomto původním stimulu nezávislou. Jako možná příčina progresu a/nebo rezistence k léčbě byly identifikovány konstitutivně aktivní NFκB (Donato et al., 2003), nadměrná aktivace kináz Src, např. kinázy LYN spojená s overexpresí antiapoptotického proteinu BCL-2 (Donato et al., 2004; Dai et al., 2004), snížená exprese fosfatázy SHP-1 (Esposito et al., 2011), konstitutivní aktivace dráhy PI3K prostřednictvím mutace v PI3Kα (Quentmeier et al., 2011), aktivace kinázy Raf nezávislá na BCR-ABL i Ras (Hentschel et al., 2011), indukce cyklooxygenázy 2 (COX-2) (Kalle et al., 2010), aktivace ERK1/2 (Nambu et al., 2010). V některých případech může být rezistence důsledkem vývoje nemoci, během kterého se mohou objevit nové početní nebo strukturální cytogenetické aberace, které vedou k proliferaci leukemických buněk nezávisle na BCR-ABL.

#### *Odpovědi na léčbu a možnosti jejich predikce*

Odpověď na léčbu je hodnocena na úrovni klinické (celkový stav pacienta, stav sleziny, jater apod.), hematologické (krevní obraz a charakteristika jednotlivých krevních elementů), cytogenetické a molekulárně genetické. Cytogenetické metody využívají konvenční techniky, tzv. G-pruhování (barvení chromozomů podle Giemse) nebo metod FISH ("fluorescence *in situ* hybridization"). Citlivost těchto metod je zhruba 1 až 5 %. Molekulárně genetické metody se zaměřují na sledování transkriptu BCR-ABL kvantitativní reverzně transkriptázovou PCR (Q-RT-PCR), v případě dosažení BCR-ABL negativity kvalitativní dvoustupňovou RT-PCR. Citlivost těchto metod (0,001 až 0,0001 %) umožní zjistit jednu leukemickou buňku mezi  $10^5$  až  $10^6$  normálními leukocyty. Nárůst množství transkriptu BCR-ABL signalizuje špatnou odpověď na léčbu, pokles a nízká hladina BCR-ABL naopak dobrou odpověď na léčbu a dobrou prognózu. V indikovaných případech jsou vyšetřovány mutace v kinázové doméně BCR-ABL.

Na základě výsledků klinických, cytogenetických a molekulárně genetických vyšetření byly stanoveny jednotlivé odpovědi na léčbu imatinibem (Baccarani et al., 2009, tab. 1). U ztráty odpovědi na léčbu - relapsu onemocnění - rozlišujeme relaps hematologický, cytogenetický a molekulární. Hematologický relaps znamená zhoršení krevního obrazu nad normální hodnoty nebo obecně nárůst hodnot. O cytogenetickém relapsu mluvíme, pokud je detekován chromozom Ph po dosažení CCgR, nebo obecně dochází-li k nárůstu procentuálního počtu Ph+ metafází. Molekulární relaps je definován jako alespoň desetinásobný nárůst hladiny transkriptu *bcr-abl* při CCgR.

Odpověď na léčbu	Definice
velká molekulární (MMR)	$\leq 0,1\%$ BCR-ABL (mezinárodní stupnice)
kompletní cytogenetická (CCgR)	0% Ph+
částečná cytogenetická (pCgR)	1-34% Ph+
malá cytogenetická (mCgR)	35-94% Ph+
kompletní hematologická (CHR)	leukocyty $<10 \cdot 10^9/L$ , trombocyty $<450 \cdot 10^9/L$ , nepřítomnost nezralých buněk v periferní krvi, nepřítomnost splenomegalie
hematologická (HR)	jakékoliv zlepšení krevního obrazu

**Tabulka 1: Definice odpovědi na léčbu** (Baccarani et al., 2009)

Na základě statistického hodnocení výsledků léčby imatinibem od jeho zavedení do praxe byly postupně stanoveny „dynamické odpovědi na léčbu“. Jde o stanovení prognózy pacientů na základě odpovědí dosažených ve stanovených časových bodech. Podle Evropské Leukemické Sítě (ELN) lze rozlišit odpověď optimální, suboptimální a selhání léčby (Baccarani et al., 2009; tab. 2). Podle doporučení ELN jsou pacienti v tzv. selhání léčby indikováni ke změně léčby, i když nerelabují (kompletní hematologická odpověď). Pacienti, kteří odpovídají suboptimálně, jsou do selhání léčby přefazeni, pokud nedojde ke zlepšení.

Měsíce od nasazení imatinibu	Odpověď		
	optimální	suboptimální	selhání léčby
3	CHR	<CR	Bez CHR
6	$\geq$ pCgR	mCgR	žádná CgR
12	CCgR	pCgR	<pCgR
18	MMR	<MMR	<CCgR
kdykoliv	stabilní CCgR a MMR	ztráta MMR mutace přidatné aberace	ztráta HR ztráta CgR mutace

**Tabulka 2: Dynamické odpovědi na léčbu imatinibem** (Baccarani et al., 2009)

## Akutní myeloidní leukémie (AML)

### Klinická charakteristika a časový průběh, epidemiologie AML

Akutní myeloidní leukémie dospělých (AML) je klonální maligní onemocnění charakterizované akumulací leukemických blastů. Jedná se o velmi heterogenní onemocnění s řadou subtypů. Průměrná incidence výskytu AML v celé populaci je 3,4 případu na 100 000 obyvatel (1,2/100 000 v populaci mladší 30 let, 13,2/100 000 u lidí do 65 let a více než 20/100 000 obyvatel v populaci starší než 80 let). AML je převážně onemocnění starších lidí, medián věku při stanovení diagnózy AML je téměř 70 let. Toto onemocnění nemá žádné specifické projevy (únava, horečky, noční pocení, bolesti kloubů aj.). Nedostatek červených krvinek se projevuje chudokrevností a anemickým syndromem. Nedostatek funkčních bílých krvinek znamená sníženou imunitu. Nedostatek krevních destiček se projeví zvýšenou krvácivostí (tvorba modřin, krvácení z nosu, nález krve ve stolici, nález krve v moči, apod.). Akutní myeloidní leukémie postupuje poměrně rychle a nemocného bez léčby usmrtí do několika týdnů až měsíců (Adam et al., 2001).

### Biologie a klasifikace AML

AML je v porovnání s CML ještě o poznání více heterogenní onemocnění. Neexistuje jednotná příčina. Je známo množství aberací, které mají dle statistických hodnocení vliv na prognózu pacientů a jsou tak využity v klasifikaci jednotlivých subtypů AML (Grimwade et al., 2009). V praxi se paralelně používají dva klasifikační systémy. První představuje konsenzus francouzských, amerických a britských odborníků z roku 1976 (FAB, Bennett et al., 1976; Tab. 3) a je založen na morfoloickém a cytochemickém hodnocení blastů. Klasifikace WHO zohledňuje kromě morfologie i klinická a imunofenotypizační kritéria a současně i nejnovější poznatky na poli genetiky (Vardiman et al., 2002). Je značně nepřehledná, ale odráží rozdílnou leukemogenezi jednotlivých typů AML, což se odráží i v odlišném terapeutickém přístupu i prognóze (Tab. 4).

#### **„French-American-British“ (FAB) klasifikace**

- M0: minimálně diferencované leukémie
- M1: myeloblastická leukémie bez vyzrávání
- M2: myeloblastická leukémie s vyzráváním
- M3: hypergranulární promyelocytární leukémie
- M4: myelomonocytární leukémie
- M4Eo: varianta: nárůst abnormálních dřevňových eosinofilů
- M5: monocytární leukémie
- M6: erythroleukémie (DiGuglielmova nemoc)
- M7: megakaryoblastická leukémie

**Tabulka 3: Francouzsko-americko-britská klasifikace AML (Bennett et al., 1976)**

### I. AML s recurrentními genetickými abnormalitami

AML s t(8;21)(q22;q22);*RUNX1/RUNX1T1*

AML s abnormální eosinofilií v kostní dřeni [inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22);*CBFβ/MYH11*]

Akutní promyelocytární leukémie [AML with t(15;17)(q22;q12) (*PML/RARα*) and variants]<sup>b</sup>

AMLs 11q23 (*MLL*) abnormalitami

### II. AML s víceliniovou dysplázií

následující myelodysplastický syndrom, myelodysplastický syndrom, myeloproliferativní onemocnění

bez předchozího myelodysplastického syndromu

### III. AML a myelodysplastické syndromy, ve vztahu k léčbě

alkylačními látkami

inhibitory topoizomerázy II

jinými látkami

### IV. AML jinak nespecifikovaná

AML minimálně diferencovaná

AML bez vyžívání

AML s vyžíváním

akutní myelomonocytární leukémie

akutní monoblastická a monocytární leukémie

akutní erytroidní leukémie

akutní megakaryoblastická leukémie

akutní bazofilová leukémie

akutní panmyelóza s myelofibrózou

myeloidní sarkom

#### Tabulka 4: WHO klasifikace AML (Vardiman et al., 2002)

Na základě výsledků standardní karyotypizace leukemických buněk lze nemocné zařadit do 3 prognostických skupin: s příznivou, střední či špatnou prognózou, riziko je vztaženo k počtu komplexních remisí ("complete remission" - CR) a k celkovému přežití ("overall survival" - OS) (tab. 5, Slovak et al., 2000; Byrd et al., 2002). Intermediární prognóza zahrnuje různé karyotypy včetně normálního – CN-AML ("cytogenetically normal AML"). V tomto případě je pozornost soustředěna na mutační status některých genů. Znamé získané somatické mutace, které jsou klinicky relevantní, můžeme rozdělit do tří skupin: 1) mutace v genu *npm1* kódujícím nukleofosmin, *flt3* kódujícím "FMS-like tyrosine kinase 3", *cebpa* kódujícím

CCAAT/enhancer vazebný protein alfa, které jsou dnes doporučovány k testování v době diagnózy; 2) mutace v genech *idh* kódujícím izocitrát dehydrogenázu, *asx1*, *ezh2*, *dnmt3a* kódujícím DNA-metyltransferázu 3 $\alpha$ , které pravděpodobně ovlivňují biologii AML prostřednictvím vlivu na epigenom; 3) mutace v genech *ras*, *nf1*, tj. skupině genů, které mohou indikovat efektivitu léčby.

Rizikové skupiny	Abnormality	Pětileté přežití	Výskyt relapsu
dobrá prognóza	t(8;21), t(15;17), inv(16)	70 %	33 %
intermediální prognóza	normální, +8, +21, +22, del(7q), del(9q), abnormální 11q23, všechny jiné strukturní nebo početní změny	48 %	50 %
špatná prognóza	-5, -7, del(5q), abnormální 3q, komplexní cytogenetické změny	15 %	78 %

**Tabulka 5: Klasifikace AML do prognostických skupin podle karyotypu** (Slovak et al., 2000; Byrd et al., 2002)

### Léčba AML

Léčba AML může být s kurativním cílem, paliativní nebo pouze suportivní (korekce anémie, trombocytopenie atd.). Při kurativním přístupu se terapie AML zahajuje indukční léčbou, jejímž cílem je navodit kompletní remisi (CR). Je-li jí dosaženo, následují terapie postremisní - konsolidační (s cílem konsolidovat CR), nebo terapie udržovací. Nedojde-li k navození CR, podává se záchranná ("salvage") terapie.

### Monitorování pacientů s AML

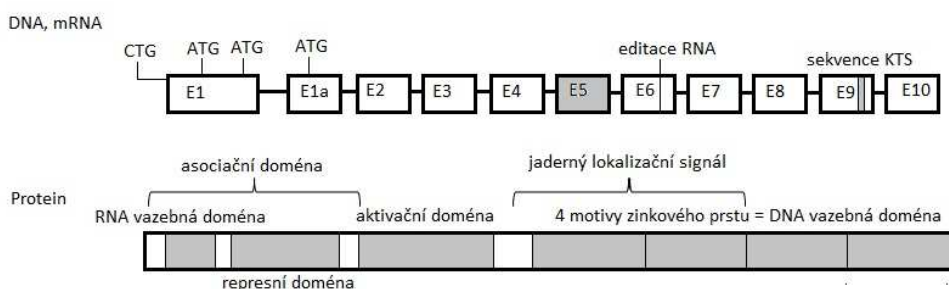
Stanovení genetických markerů AML je významné v době diagnózy pro stanovení prognózy a rozhodnutí o léčbě. Následně během chemoterapie a po transplantaci kmenových buněk se potom monitorováním těchto markerů sleduje výskyt minimální reziduální choroby a relapsu. Podle typu AML je na molekulární úrovni monitorována hladina fúzních transkriptů, početní nebo komplexní alterace jsou vyšetřovány pomocí interfázní FISH. V případě všech subtypů AML je pro monitorování minimální reziduální choroby významný především gen Wilmsova tumoru (*wt1*). Celková exprese mRNA *wt1* má patrně pro většinu pacientů s AML v průběhu léčby vysoký prognostický význam (Andersson et al., 2012; Polak et al., 2011, 2013), i když toto pozorování nepotvrzují všechny studie (Yanada et al., 2004).

### **Gen a protein Wilmsova tumoru (WT1)**

#### Struktura genu WT1 a regulace jeho exprese

Gen Wilmsova tumoru 1 (*wt1*) leží na 11. lidském chromozomu v oblasti 11p3 a sestává z deseti exonů (Call et al., 1990). Alternativní události, které dávají vznik velkému množství transkriptů a proteinových produktů WT1 jsou schématicky

znázorněny na obr. 1. Sekvence genu *wt1* zahrnuje dvě alternativně sestřihovaná místa – exon 5 a sekvenci KTS (lysin, treonin, serin). Varianty, které vznikají kombinací těchto dvou sestřihových míst jsou v literatuře označovány jako čtyři hlavní sestřihové varianty *wt1* (Haber et al., 1991). Alternativní první exon E1a zajišťuje vznik zkrácené varianty mRNA *swt1* (Dallosso et al., 2004; Hossain et al., 2006). Tyto události se mohou dále kombinovat s editací RNA - záměnou na konci exonu 6 (Sharma et al., 1994) a alternativními promotory (Bruening et al., 1996; Scharnhorst et al., 1999). Exprese další izoformy začínající na konci pátého intronu byla zatím popsána pouze u rakoviny prostaty, prsu a leukemických buněk (Dechsukhum et al., 2000).



**Obrázek 1: Struktura genu a proteinu WT1.** Šedě jsou na schématu DNA/mRNA označeny alternativně sestřihované oblasti.

WT1 je významný pro vývoj urogenitálního traktu a přechod mesotelia v epitel. V dospělosti je exprese WT1 omezena na tkáň urogenitálního systému, mozku a hematopoetickou tkáň (shrnuto v Yang et al., 2007). Na regulaci exprese se podílí patrně více transkripčních faktorů specifických pro konkrétní tkáň. V hematopoetických tkáních byla potvrzena regulace prostřednictvím GATA-1 a MYB (Wu et al., 1995; Zhang et al., 1997). V poslední době se v regulaci exprese WT1 ukazuje také role microRNA (miRNA), krátkých nekódujících RNA, které negativně regulují expresi cílových mRNA inhibicí translace nebo přímo štěpením cílových mRNA. U akutní myeloidní leukémie byla nedávno popsána regulační aktivita miR-132 a miR-212 ve vztahu k WT1 (Luesink et al., 2009). Gao a spol. ukázali význam miR-15a a miR-16-1 v regulaci exprese WT1 (Gao et al., 2011). O regulaci exprese jednotlivých izoform je toho známo jen velmi málo. Sestřih sekvence KTS je patrně regulován (mimo jiné) intronickým enhancerem (Yang et al., 2008).

### Struktura a funkce proteinu WT1, role jednotlivých izoform

Struktura vybraných izoform proteinu WT1 je znázorněna na obr. 1. S výše uvedenými změnami na úrovni transkripce se dále kombinují tři alternativní začátky translace. Hlavní AUG dává vznik proteinům o velikosti 52 (-5/-KTS) až 54 kDa (+5/+KTS) (Morris et al., 1991). Tomuto hlavnímu místu předchází CUG, ze kterého vznikají proteiny o velikosti 60 až 62 kDa (Bruening et al., 1996). Naopak za hlavním sestřihovým místem ve směru translace je AUG, které dává vznik proteinům o velikosti 36 až 38 kDa (Scharnhorst et al., 1999). Dohromady dávají všechny uvedené alternativní události vznik 36 izoformám proteinu WT1.

Přítomnost čtyř zinkových prstů typu Cys2His2 (DNA vazebná doména) na C-konci proteinu (exony 7 až 10) umožňuje proteinu WT1 vazbu na DNA a tedy funkci

transkripčního regulátoru (Nurmemmedov et al., 2006; Haber et al., 1991). Díky přítomnosti transkripčně represní i aktivační domény může WT1 ovlivňovat expresi cílových genů pozitivně i negativně. U sWT1 dochází ke ztrátě transkripčně represní domény a v důsledku toho k aktivaci genů, které jsou nezkráceným WT1 reprimovány (Hossain et al., 2006). Geny, jejichž expresi WT1 reguluje, lze zařadit mezi regulátory buněčného cyklu (p21, cyklin D), regulátory apoptózy (Bcl-2) nebo regulátory proliferace (Myb) (shrnutí v Yang et al., 2007).

Čtyři hlavní izoformy WT1 se liší svými vlastnostmi a funkcí v buňce. Sekvence KTS ovlivňuje vzájemné postavení zinkových prstů (Laity et al., 2000). Isoformy obsahující sekvenci KTS mají odlišný konsenzuální vazebný motiv na DNA (Hewitt et al., 1996), preferují vazbu RNA (Nurmemmedov et al., 2006, 2009), vykazují zrnité rozložení v buněčném jádře (Larsson et al., 1995), asociují s některými složkami sestřihového aparátu buňky a uvažuje se tak o jejich roli v sestřihu (Davies et al., 1998; Englert et al., 1995). Isoformy + i – KTS přechází mezi cytoplazmou a buněčným jádrem, asociují s ribonukleoproteinovými částicemi a aktivními polyzomy (Niksic et al., 2004). Exon 5 kóduje protein-protein interakční doménu a sekvence jím kódovaná je tedy významná pro interakci s dalšími proteiny (Campbell et al., 1994).

Působení WT1 dále ovlivňují také dva typy posttranslačních modifikací – fosforylace Ser365, Ser393 (Sakamoto et al., 1997) a sumoylace lysinů 17 a 173 (Smolen et al., 2004). O konkrétním významu těchto modifikací není zatím mnoho známo. Sumo-1 je malá molekula příbuzná ubikvitinu, na rozdíl od něj však naopak stabilizuje cílový protein. Sumoylace neovlivňuje buněčnou lokalizaci WT1 (Smolen et al., 2004). Sakamoto et al. (1997) ukázali, že fosforylace může hrát roli v modulaci transkripčně regulační aktivity proteinu WT1 interferencí s jadernou translokací a zároveň inhibicí vazby k DNA. Fosforylací docházelo také k inhibici vazby na RNA. Fosforylaci může zprostředkovat např. cAMP dependentní protein kináza A.

### Význam WT1 v hematopoéze

Role WT1 v hematopoéze není zatím zcela známá. Studie naznačují dílčí role: exprese WT1 je patrně omezená především na primitivní CD34<sup>+</sup> populaci buněk kostní dřeně, může být ale detekována i ve zralých krevních buňkách. Bylo ukázáno, že WT1 v progenitorových krevních buňkách hraje roli v jejich sebeobnovovacím potenciálu, přílišné zvýšení exprese ale vede k přechodu buněk do fáze G0 a podporuje myelomonocytární diferenciaci (Svedberg et al., 2001; Loeb et al., 2003). Jiné práce naopak uzavírají, že zvýšená exprese WT1 zastavuje diferenciaci (Svedberg et al., 1998; Gu et al., 2005). WT1 je patrně důležitou složkou regulace proliferace T lymfocytů závislé na oxidu dusnatém (Marcet-Palacios et al., 2007). Je patrné, že rozporupné výsledky jsou způsobeny především nedostatečnou komplexitou studií, kterou si značné množství izoform WT1 žádá.

### Význam WT1 v onkologii a hematoonkologii

WT1 byl poprvé izolován jako gen zodpovědný za dětskou nefrologickou malignitu, Wilmsův tumor (Haber et al., 1990). V tomto případě je WT1 inaktivován mutací a předpokládala se tak jeho nádorově supresorová funkce. Ukázalo se ale, že u řady malignit se WT1 chová naopak jako onkogen. WT1 je nadměrně exprimován u řady pevných nádorů (Oji et al., 2002; Loeb et al., 2001; Viel et al., 1994; Rodeck et al., 1994; Campbell et al., 1998; Amin et al., 1995; Amini et al., 2005; Oji et al., 2004) a také u většiny leukémií (Miwa et al., 1992). Více než 20 let výzkumu WT1 zatím

nevysvětlilo mechanismy, jakými funguje, pravděpodobně díky velkému množství genových produktů a modifikací WT1 vyžadujících při jeho studiu velmi komplexní přístup. V případě leukémií existuje řada důkazů pro onkogenní působení WT1. Pokusy na buněčných liniích ukázaly, že WT1 je významný pro přežívání leukemických buněk (Yamagami et al., 1996; Ito et al., 2006). Zvýšená exprese WT1 byla potvrzena na myším modelu jako druhý zásah v případě AML s fúzí *aml1/eto* (Nishida et al., 2006). Mutace *wt1* jsou detekovány u velmi nízkého procenta pacientů s AML. Mutace jsou heterozygotní, obvykle se jedná o drobné inserce, bodové mutace v oblasti zinkových prstů, nebo zkrácení proteinu. Vztah mezi přítomností mutované formy WT1 a horší prognózou pacientů s AML nebyl jednoznačně prokázán.

V poslední době se již objevují také práce, které ukazují na odlišný význam jednotlivých izoforem. Overexprese variant *wt1* obsahujících exon 5 chrání buňky K562 před buněčnou smrtí navozenou chemoterapeutiky (Ito et al., 2006). Renshaw et al. (2004) ukázali, že v důsledku léčby cytotoxickými látkami může docházet k narušení sestřihu exonu 5. Umlčení exprese izoforem obsahujících exon 5 na rozdíl od umlčení celkové exprese *wt1* vede ke zvýšení citlivosti buněk k apoptóze navozené cytostatiky. Graidista et al. (2010) a spol. ukázali, že izoformy +5/+KTS a +5/-KTS mohou fungovat jako antiapoptotické proteiny v buňkách rakoviny prsu. Přestože mechanismus fungování WT1 v leukemických buňkách ani zdravé hematopoéze není zatím vysvětlen, pro léčbu myeloidních leukémií jsou testovány vakcinace peptidem WT1 (Oka et al., 2009).

Především u dospělých pacientů AML a případně také u myelodysplastického syndromu (MDS) se používá celková exprese *wt1* na úrovni mRNA jako marker pro monitorování minimální reziduální choroby (Andersson et al., 2012; Polak et al., 2013; Polak et al., 2011; Gray et al., 2012; Yamauchi et al., 2012). Je však i několik prací, které takový význam pro WT1 nepotvrzují (Yanada et al., 2004; Miglino et al., 2011). V případě CML pravděpodobně díky existenci vysoce specifického markeru *bcr-abl* je prací, které se věnují *wt1* jako markeru, podstatně méně. První nadějně výsledky ukazující na význam exprese *wt1* pro pacienty s CML ukázalo několik málo studií (Kreutzer et al., 2001; Cilloni et al., 2003; Varma et al., 2011). Zatímco práce Kreutzer a spol. byla soustředěna na pacienty po transplantaci kostní dřeně, práce Cilloni a spol. a Varma a spol. naznačily význam exprese *wt1* také pro pacienty léčené imatinibem.

## Literatura

- Adam Z., Vorlíček J. (2001) *Hematologie II, Přehled hematologických maligních nemocí*, 1. vydání, Grada Publishing, Avicenum, Praha
- Agami R., Blandino G., Oren M., Shaul Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73-alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399:809-813
- Amin K. M., Litzky L. A., Smythe W.R., Mooney A.M., Morris J. M., et al. (1995) Wilms' tumor 1 susceptibility (WT1) gene products are selectively expressed in malignant mesothelioma. *Am J Pathol.* 146:344-356
- Amini N S., Hohenstein P., Jadidzadeh A., Van Dam K., Bastidas A., et al. (2005) Upregulation of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in desmoid tumors. *Int J Cancer* 114:202-208
- Andersson C., Li X., Lorenz F., Golovleva I., Wahlin A., Li A. (2012) Reduction in WT1 Gene Expression During Early Treatment Predicts the Outcome in Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Diagn Mol Pathol.* 21:225-233



Baccarani M., Cortes J., Pane F., Niederwieser D., Saglio G., et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 27:6041-6051

Bacher U., Hafferlach T., Hiddemann W., Schnittger S., Kern W., et al. (2004) Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive ALL and CML demonstrate a different cytogenetic pattern at diagnosis and follow different pathways at progression. *Cancer Genet Cytogenet* 157:53-61

Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A., et al. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French–American–British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33:451–458

Bose S., Deininger M., Gora-Tybor J., Goldman J. M., Melo J. V. (1998) The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 92:3362-3367

Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Parkinson I., Grigg A., et al. (2003) Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102:276-283

Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Grigg A., Arthur C., et al. (2002) High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99:3472-3475

Bruening W., Pelletier J. (1996) A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem.* 271:8646-8654

Brusa G., Benvenuto M., Mazzacurati L., Mancini M., Pattacini I., et al. (2003) p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p210BCR-ABL tyrosin kinase. *Haematologica* 88:622-630

Buchdunger E., Cioffi C.L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., et al. (2000) Abl protein kinase inhibitor STI571 inhibits *in vitro* signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 295:139-145

Byrd J., Mrózek K., Dodge R., Carroll A., Edwards C., et al. (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relaps and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100:4325-4336

Calabretta B., Perrotti D. (2004) The biology of CML blast crisis. *Blood* 103:4010-4022

Calabretta B., Salomoni P. (2011) Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* 52 (Suppl 1):54-59

Call K.M., Glaser T., Ito C.Y., Buckler A.J., Pelletier J., et al. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-520

Campbell C.E., Huang A., Gurney A.L., Kessler P.M., Hewitt J.A., et al. (1994) Antisense transcripts and protein binding motifs within the Wilms tumour (WT1) locus. *Oncogene* 9:583-595

Campbell C.E., Kuriyan N.P., Rackley R.R., Caulfield M.J., Tubbs R., et al. (1998) Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene (WT1) in renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 78:182-188

Carter T.A., Wodicka L.M., Shah N.P., Velasco A.M., Fabian M.A., et al. (2005) Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11011-11016

Cilloni D., Saglio G. (2003) Usefulness of quantitative assessment of Wilms tumor suppressor gene expression in chronic myeloid leukemia patients undergoing imatinib therapy. *Semin Hematol.* 40 (Suppl 2):37-41

Copland M., Hamilton A., Elrick L.J., Baird W.J., Allan E.K., et al. (2006) Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent population. *Blood* 107:4532-4539

Dai Y., Rahmani M., Corey S.J., Dent P., Grant S. (2004) A BCR/ABL independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem* 279:34227-34239

Dalosso A.R., Hancock A.L., Brown K.W., Williams A.C., 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.* 15:405-415

Davies R.C., Calvio C., Bratt E., Larsson S.H., Lamond A.I., Hastie N.D. (1998) WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev.* 12:3217-3225

Dechsukhum C., Ware J.L., Ferreira-Gonzalez A., Wilkinson D.S., Garrett C.T. (2000) Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. *Mol Diagn.* 5:117-128

Deutsch E., Dugray A., AbdulKarim M., Marangoni E., Magiorrella L., et al. (2001) BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-Pkcs. *Blood* 97:2084-2090

Deutsch E., Jarrousse S., Bet D., Dugray A., Bonnet M.L., et al. (2003) Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 101:4583 - 4588

Dierov J.K., Dierova R., Carrol M. (2002) BCR-ABL translocates to the nucleus after DNA damage and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* 3:275-285

Donato N.J., Wu J.Y., Stapley J., Gallick G., Lin H., et al. (2003) BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101:690-698

Donato N.J., Wu J.Y., Stapley J., Lin H., Arlinghaus R., et al. (2004) Imatinib mesylate resistance through BCR-ABL independence in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 64:672-677

Englert C., Vidal M., Maheswaran S., Ge Y., Ezzell R.M., et al. (1995) Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:11960-11964

Ertmer A., Huber V., Gilch S., Yioshimori T., Erfle V., et al., (2007) The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia advance online publication:1-7*

Esposito N., Colavita I., Quintarelli C., Sica A.R., Peluso A.L., et al. (2011) SHP-1 expression accounts for resistance to imatinib treatment in Philadelphia chromosome-positive cells derived from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 118:3634-3644

Essers M.A., Trumpp A. (2010) Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol Oncol.* 4:443-450

Gao S.M., Xing C.Y., Chen C.Q., Lin S.S., Dong P.H., Yu F.J. (2011) miR-15a and miR-16-1 inhibit the proliferation of leukemic cells by down-regulating WT1 protein level. *J Exp Clin Cancer Res.* 30:110

Graidista P., Nawakhanitworakula R., Saekooa J., Dechsukhumc C., Fujised K. (2010) Anti-apoptotic function of T-KTS+, T-KTS-, WT1+/+ and WT1+/- isoforms in breast cancer. *Asian Biomedicine* 4:711-720

Gray J.X., McMillen L., Mollee P., Paul S., Lane S., et al. (2012) WT1 expression as a marker of minimal residual disease predicts outcome in acute myeloid leukemia when measured post-consolidation. *Leuk Res.* 36:453-458

Grimwade D, Hills R.K. (2009) Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 385-395.

Gu W., Chen Z., Hu S., Shen H., Qiu G., Cao X. (2005) Changes in expression of WT1 isoforms during induced differentiation of the NB4 cell line. *Haematologica* 90:403-405

Haber D.A., Buckler A.J., Glaser T., Call K.M., Pelletier J., et al. (1990) An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61:1257-1269

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

Hamilton A., Helgason G.V., Schemionek M., Zhang B., Myssina S., et al. (2012) Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* 119:1501-1510

Hehlmann R, Berger U, Pfirrmann M, et al. (2007) Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 109:4686-4692

Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H.J., Pralle H., et al. (1993) Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood* 82:398-407

Heisterkamp N., Stam K., Groffen J., de Klein A., Grosveld K. (1985) Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* 315:758-761

Hentschel J., Rubio I., Eberhart M., Hipler C., Schiefner J., et al. (2011) BCR-ABL- and Ras-independent activation of Raf as a novel mechanism of Imatinib resistance in CML. *Int J Oncol.* 39:585-591

Hermans A., Heisterkamp N., von Lindern N., van Baal S., Meijer D., et al. (1987) Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 51:34-40

Hewitt S.M., Fraizer G.C., Wu Y.J., Rauscher F.J.3rd, Saunders G.F. (1996) Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 271:8588-8592

Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S., La Rosee P., Muller M.C., et al. (2002) Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16:2190-2196

Hochhaus A., La Rosee P. (2004) Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 18:1321-1331

Hossain A., Nixon M., Kuo M. T., Saunders G. F. (2006) N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *J Biol Chem.* 281: 28122-28130

Illaria R.L., Van Etten R.A. (1996) P210 and P190BCR/ABL Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific STAT Family Members. *J Biol Chem* 49:31704-31710

Ito K., Oji Y., Tatsumi N., Shimizu S., Kanai Y., et al. (2006) Antiapoptotic function of 17AA(+)/WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* 25:4217-4229

Jacquel A., Herrant M., Legros L., Belhacene N., Luciano F., et al. (2003) Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the BCR-ABL positive K562 cell line and its differentiation towards erythroid lineage. *FASEB J.* 17: 2347

Jonasch E., Haluska F.G. (2001) Interferon in oncological practice: Review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist* 6:34-55

Jongen-Lavrencic M., Saesle S., Delwel R., Verfaillie C.M. (2005) BCR/ABL-mediated downregulation of genes implicated in cell adhesion and motility leads to impaired migration toward CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in primary BCR/ABL – positive cells. *Leukemia* 19:373-380

Kalle A.M., Sachchidanand S., Pallu R. (2010) Bcr-Abl-independent mechanism of resistance to imatinib in K562 cells: Induction of cyclooxygenase-2 (COX-2) by histone deacetylases (HDACs). *Leuk Res.* 34:1132-1138

Khorashad J. S., Anand M., Marin D., Saunders S., Al-Jabary T., et al. (2006) The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 20:658-663

Kreuzer K.A., Saborowski A., Lupberger J., Appelt C., Na I.K., et al. (2001) Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. *Br J Haematol.* 114:313-318

Laity J.H., Chung J., Dyson H.J., Wright P.E. (2000) Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry* 39:5341-5348

Larsson S.H., Charlier J.P., Miyagawa K., Engelkamp D., Rassoulzadegan M., et al. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81:391-401

Loeb D.M., Evron E., Patel C.B., Sharma P.M., Niranjan B., et al. (2001) Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res.* 61:921-925

Loeb D.M., Summers J.L., Burwell E.A., Korz D., Friedman A.D., Sukumar S. (2003) An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia* 17:965-971

Luesink M., Nigten J., Knops R.H.J.N., de Witte T.J.M., van der Reijden B.A., Jansen J.H. (2009) MiR-132 and MiR-212 as Regulators of WT1 and GATA2 in Acute Myeloid Leukemia, ASH abstract

Mahon F.-X., Belloc F., Lagarde V., Chollet C., Moreau-Gaudry F., et al. (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101:2368 – 2373

Marcet-Palacios M., Davoine F., Adamko D.J., Moqbel R., Befus A.D. (2007) Human lymphocytes express the transcriptional regulator, Wilms tumor 1: the role of WT1 in mediating nitric oxide-dependent repression of lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 363:283-287

Mayer J., Starý J. (2002) *Leukémie*, Grada Publishing, Avicenum, Praha

McWhirter J.R., Galasso D.L., Wang J.Y. (1993) A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 13: 7587–7595

Melo J. V. (1996) The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88:2375

Melo J.V., Gordon D.E., Cross N.C., Goldman J.M. (1993) The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81:158-165

Miething C., Feihl S., Mugler C., Grundler R., von Bubnoff N., et al. (2006) The BCR-ABL mutations T315I and Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib. *Leukemia* 20:650-657

Miglino M., Colombo N., Pica G., Grasso R., Clavio M., et al. (2011) WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 52:1961-1969

Miwa H., Beran M., Saunders G.F. (1992) Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 6:405-409

Mizuchi D., Kurosu T., Kida A., Jin Z. H., Jin A., et al. (2005) BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the Mek/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 326:645-651

Moravcova J., Rulcova J., Polak J., Zemanova Z., Klamova H., Haskovec C. (2005) CML patient with rare b2a3 (e13a3) variant of BCR-ABL transcript: complete molecular response to imatinib. *Leukemia Res* 11:1365-1366

Morris C.M., Heisterkamp N., Groffen J., Fitzgerald P.H. (1991) Entire ABL gene is joined with 5'-BCR in some patients with Philadelphia-positive leukemia, *Blood* 78: 1078-1084

Morris J.F., Madden S.L., Tournay O.E., Cook D.M., Sukhatme V.P., Rauscher F.J. 3rd (1991) Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene* 6:2339-2348

Nambu T., Araki N., Nakagawa A., Kuniyasu A., Kawaguchi T., et al. (2010) Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci.* 101:137-142

Neves H., Ramos C., da Silva M. G., Parreira A., Parreira L. (1999) The nuclear topography of ABL, BCR, PML and RAR $\alpha$  genes: evidence of gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93: 1197-1207

Niksic M., Slight J., Sanford J. R., Caceres J. F., Hastie N.D. (2004) The Wilms' tumor protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum Mol Genet.* 13:463-471

Nishida S., Hoson N., Shirakata T., Kanato K., Yanagihara M., et al. (2006) AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* 107:3303-3312

Nurmemmedov E., Thunnissen M. (2006) Expression, purification, and characterization of the 4 zinc finger region of human tumor suppressor WT1. *Protein Expr Purif.* 46:379-389

Nurmemmedov E., Yengo R.K., Uysal H., Karlsson R., Thunnissen M.M. (2009) New insights into DNA-binding behavior of Wilms tumor protein (WT1)--a dual study. *Biophys Chem.* 145:116-125

O'Brien D.G., Guilhot F., Larson R.A., Gathmann I., Baccarani M., et al. (2003) Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *New Eng J Hematol* 348:994-1004

Oji Y., Miyoshi S., Maeda H., Hayashi S., Tamaki H., et al. (2002) Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer.* 100:297-303

Oji Y., Suzuki T., Nakano Y., Maruno M., Nakatsuka S., et al. (2004) Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci.* 95:822-827

Oka Y., Tsuboi A., Fujiki F., Li Z., Nakajima H., et al. (2009) WT1 peptide vaccine as a paradigm for "cancer antigen-derived peptide"-based immunotherapy for malignancies: successful induction of anti-cancer effect by vaccination with a single kind of WT1 peptide. *Anticancer Agents Med Chem.* 9:787-797

Okuda K., Weisberg E., Gilliland D. G., Griffen J. D. (2001) ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 97:2440-2448

Oshikawa G., Kurosu T., Arai A., Murakami N., Miura O. (2010) Clonal evolution with double Ph followed by tetraploidy in imatinib-treated chronic myeloid leukemia with e19a2 transcript in transformation. *Cancer Genet Cytogenet.* 199:56-61

Polak J., Hajkova H., Haskovec C., Cechova H., Marinov I., et al. (2013) Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma* 60:74-82

Polák J., Hájková H., Maaloufová-Soukupová J., Marková J., Sálek C., et al. (2011) Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression. *Exp Ther Med.* 3:129-133

Quentmeier H., Eberth S., Romani J., Zaborski M., Drexler H.G. (2011) BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. *J Hematol Oncol.* 4:6-15

Reddiconto G., Toto C., Palamà I., De Leo S., de Luca E., et al. (2012) Targeting of GSK3 $\beta$  promotes imatinib-mediated apoptosis in quiescent CD34+ chronic myeloid leukemia progenitors, preserving normal stem cells. *Blood* 119:2335-2345

Renshaw J., Orr R.M., Walton M.I., Te Poele R., Williams R.D. et al. (2004) Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: antisense down-regulation of exon 5 alters target gene expression and inhibits cell survival. *Mol Cancer Ther.* 3:1467-1484

Rodeck U., Bossler A., Kari C., Humphreys C.W., Györfi T., et al. (1994) Expression of the wt1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. *Int J Cancer* 59:78-82

Rosti G., Palandri F., Castagnetti F., Breccia M., Levato L., et al. (2009) Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Blood* 114:4933-4938

Rowley JD. (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293

Sakamoto Y., Yoshida M., Semba K., Hunter T. (1997) Inhibition of the DNA binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene* 15:2001-2012

Salgio G., Storlazzi C.T., Giugliano E., Surace C., Anelli L., et al. (2002) A 76-kb duplison maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9882-9887

Salomoni P., Wasik M.A., Riedel R.F., Reiss K., Choi J.K., et al. (1998) Expression of Constitutively Active Raf-1 in the Mitochondria Restores Antiapoptotic and Leukemogenic Potential of a Transformation-deficient BCR/ABL Mutant. *J Exp Med* 12:1995-2007

Sattler M., Mohi M.G., Pride Y.B., Quinnan L.R., Malouf N.A., et al. (2002) Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 5: 479-492

Sattler M., Verma S., Byrne C.H., Schrikhande K., Winkler T., et al. (1999) BCR/ABL Directly Inhibits Expression of SHIP, an SH2-Containing Polyinositol-5-Phosphatase Involved in the Regulation of Hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* 11:7473-7480

Sharma P.M., Bowman M., Madden S.L., Rauscher F.J. III, Sukumar S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev.* 8: 720-731

Shet A.S., Jahagirdar B.N., Verfaillie C.M. (2002) Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 16:1402-1411

Scharnhorst V., Dekker P., van der Eb A.J., Jochemsen A.G. (1999) Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem.* 274:23456-23462

Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A., Harrington D.H., Theil K.S., et al. (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96:4075–4083

Smolen G.A., Vassileva M.T., Wells J., Matunis M.J., Haber D.A. (2004) SUMO-1 modification of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Cancer Res.* 64:7846-7851

Svedberg H., Chylicki K., Baldetorp B., Rauscher F.J.3rd, Gullberg U. (1998) Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene* 16:925-932

Svedberg H., Richter J., Gullberg U. (2001) Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. *Leukemia* 15:1914-1922

Talpaz M., McCredie K.B., Kantarjian H.M., Trujillo J.M., Keating M.J., Gutterman J. U. (1986) Chronic myelogenous leukaemia: haematological remissions with alpha interferon. *Br J Hematol* 64:87-95

Talpaz M., Shah N.P., Kantarjian H., Donato N., Nicoll J., et al. (2006) Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. *New Eng J Med* 354:2531-2541

Thomas J., Wang L., Clark R.E., Pirmohamed P. (2004) Active transport of imatinib into and out of cells: implications of drug resistance. *Blood* 104:3739-3745

Tokarski J.S., Newitt J., Chang C.Y., Cheng J.D., Wittekind M., et al. (2006) The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 66:5790-5797

Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D. (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100:2292–2302

Varma N., Anand M.S., Varma S., Juneja S.S. (2011) Role of hTERT and WT1 gene expression in disease progression and imatinib responsiveness of patients with BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 52:687-693

Viel A., Giannini F., Capozzi E., Canzonieri V., Scarabelli C., et al. (1994) Molecular mechanisms possibly affecting WT1 function in human ovarian tumors. *Int J Cancer* 57:515-521

Virgili A., Nacheva E.P. (2010) Genomic amplification of BCR/ABL1 and a region downstream of ABL1 in chronic myeloid leukaemia: a FISH mapping study of CML patients and cell lines. *Mol Cytogenet.* 3:15

Weisberg E., Manley P., Mestan J., Cowan-Jacob S., Ray A., Griffin J.D. (2006) AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer* 94:1765-1769

Wu Y., Fraizer G.C., Saunders G.F. (1995) GATA-1 transactivates the WT1 hematopoietic specific enhancer. *J Biol Chem.* 270:5944-5949

Zhang X., Xing G., Fraizer G.C., Saunders G.F. (1997) Transactivation of an Intronic Hematopoietic-specific Enhancer of the Human Wilms' Tumor 1 Gene by GATA-1 and c-Myb. *J Biol Chem.* 272:29272-29280

Yamagami T., Sugiyama H., Inoue K., Ogawa H., Tatekawa T., 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* 87:2878-2884

Yamauchi T., Matsuda Y., Takai M., Tasaki T., Hosono N., et al. (2012) Wilms' tumor-1 transcript in peripheral blood helps diagnose acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in patients with pancytopenia. *Anticancer Res.* 32: 4479-4483

Yanada M., Terakura S., Yokozawa T., Yamamoto K., Kiyoi H., et al. (2004) Multiplex real-time RTPCR for prospective evaluation of WT1 and fusion gene transcripts in newly diagnosed de novo acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 45:1803-1808

Yang C., Romaniuk P.J. (2008) The ratio of +/-KTS splice variants of the Wilms' tumour suppressor protein WT1 mRNA is determined by an intronic enhancer. *Biochem Cell Biol.* 86:312-321

Yang L., Han Y., Suarez Saiz F., Minden M. D. (2007) A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 21:868-876

Yhim H.Y., Lee N.R., Song E.K., Yim C.Y., Jeon S.Y., et al. (2012) Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia who have received front-line imatinib mesylate therapy and achieved complete molecular response. *Leuk Res.* 36:689-93

Yuan Z.M., Shioya H., Ishiko T., Sun X., Gu J., et al. (1999) p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399:814-817



**Mgr. Tereza Lopotová, Ph.D.** (e-mail: [Tereza.Lopotova@uhkt.cz](mailto:Tereza.Lopotova@uhkt.cz)) je absolventkou oboru Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Doktorskou dizertační práci „Expres WT1 a jeho sestřihových variant v myeloidních leukémiích“ (školitelka RNDr. Jana Moravcová, CSc.) obhájila 30.5.2013.



## Co se děje s lidským prozánětlivým cytokinem interleukinem-1 $\alpha$ v buňkách *Saccharomyces cerevisiae*?

**Blanka Zámostná**

Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 5, 128 44  
Praha 2

### **Abstrakt**

Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) je pleiotropní cytokin, který hraje klíčovou roli v imunitní odpovědi organismu, je však produkován v celé řadě buněk mimo imunitní systém a v poslední době je intenzivně zkoumáno také jeho intrakrinní působení v buněčném jádře. S využitím kvasinkového dvouhybridového systému jsme již dříve popsali u lidského N-terminálního peptidu IL-1 $\alpha$  schopnost transaktivace transkripce a genetickou interakci s kvasinkovým histonacetyltransferázovým komplexem SAGA. V této studii jsme se zaměřili na potvrzení a charakterizaci fyzické interakce IL-1 $\alpha$  a SAGA. Zjistili jsme, že IL-1 $\alpha$  se v kvasinkách váže také k menšímu histonacetyltransferázovému komplexu ADA a že místem vazby je pravděpodobně tzv. HAT/Core modul, společný oběma komplexům SAGA a ADA. Také jsme vytvořili model terciární struktury N-koncového peptidu IL-1 $\alpha$  a popsali jeho strukturní podobnost s kvasinkovou kinázou Snf1. Podařilo se nám také prokázat, že lidský IL-1 $\alpha$  je schopen částečně komplementovat růstový defekt kmene s delecí *snf1* na agarových plotnách obsahujících 3-aminotriazol. Díky kvasinovému modelu a genetickým technikám, které by v savčích buňkách byly podstatně složitější, jsme tak získali další díly do skládky, představující složitou síť působení klíčové pleiotropní molekuly IL-1 $\alpha$  v lidském organismu.

### **Úvod**

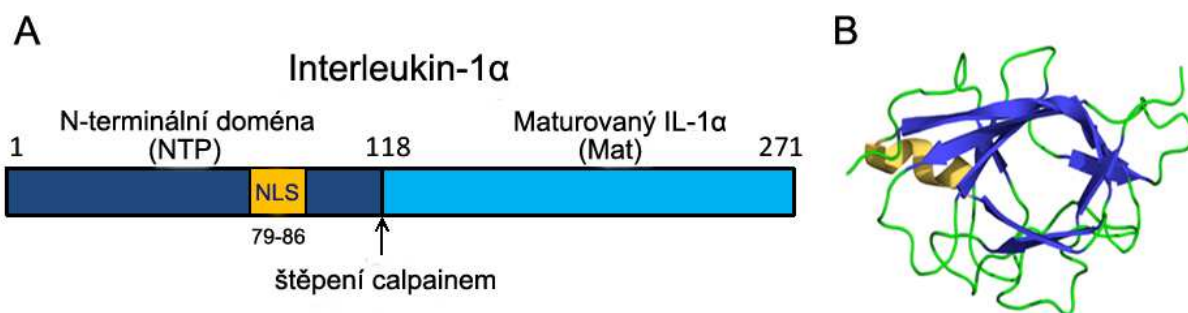
Kvasinky jakožto jednoduchý eukaryotní organismus bývají v mnoha případech využívány pro studium funkce, interakcí a jiných specifických vlastností proteinů charakteristických pro vyšší eukaryota. Heterologní exprese proteinů v kvasinkách předčí složitější eukaryotní systémy především díky svým vlastnostem jako je snadná a relativně levná kultivace, dostupnost široké škály kvasinkových kmenů a mnoha genetických technik, krátká generační doba a v neposlední řadě také konzervovanost řady buněčných procesů. V kvasinkách byly ze savčích proteinů v poslední době úspěšně zkoumány například transkripční faktory včetně nádorového supresoru p53. Nám se s využitím kvasinky *Saccharomyces cerevisie* zřejmě podařila rozřešit záhada, proč lidský cytokin interleukin-1 $\alpha$  transaktivuje transkripci reportérového genu v kvasinkovém dvouhybridovém systému i bez přítomnosti interakčního partnera. Mají snad kvasinky imunitní systém podobný tomu savčímu? Samozřejmě, že nikoliv. Podívejme se tedy, jak IL-1 $\alpha$  působí a co se s ním vlastně v kvasinkové buňce děje.

Informační listy GSGM, 2013, 42: 32-41

## Biologické vlastnosti interleukinu-1 $\alpha$

IL-1 $\alpha$  představuje klíčovou molekulu savčího imunitního systému, zodpovědnou za aktivaci a koordinaci obrany organismu v případě poranění, infekce nebo stresu. Jeho působení však zdaleka není omezeno jen na imunitní systém; IL-1 $\alpha$  je konstitutivně produkován v široké škále buněk a má vliv rovněž na normální růst a buněčnou morfogenezi i celkový metabolismus. Podobně jako IL-1 $\beta$ , mající podobnou strukturu, avšak poměrně odlišné biologické vlastnosti, působí IL-1 $\alpha$  prozánětlivě a je schopen vyvolat v organismu horečku. Obě formy IL-1 skrze membránové receptory spouští dráhu signální transdukce, čímž dochází k aktivaci transkripce cílových genů, například genů kódujících cytokiny (IL-1, IL-6, TNF), chemokiny (IL-8), proteiny akutní fáze (C-reaktivní protein, složky komplementového systému), růstové faktory (FGF) a jiné prozánětlivé mediátory (cyklooxygenáza, inducibilní NO syntáza). Rozdíl mezi IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  spočívá v odlišném způsobu produkce, štěpení, sekrece a především v rozdílné subcelulární lokalizaci. Zatímco IL-1 $\beta$  představuje „klasický“ cytokin sekretovaný z buněk za účelem aktivace IL-1 receptorů lymfocytů a monocytů, IL-1 $\alpha$  může díky svému jadernému lokalizačnímu signálu (NLS) vstoupit do buněčného jádra a uplatňuje se především intracelulárně.

IL-1 $\alpha$  je syntetizován zejména v monocytech, makrofázích, epiteliálních a endoteliálních buňkách nebo v keratinocytech. Transkripce je zvýšená zvláště během zánětu a infekce. Mezi faktory stimulující produkci IL-1 $\alpha$  patří například bakteriální lipopolysacharid. Produktem translace je prekursor IL-1 $\alpha$  proteolyticky štěpený proteázou calpainem za vzniku C-koncového zralého proteinu (IL-1 $\alpha$ Mat) a tzv. N-koncového peptidu IL-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ NTP; 16 kDa) (Kobayashi et al., 1990). Tento peptid je u savců překvapivě vysoce konzervovaný, je tedy pravděpodobné, že nejde o pouhý meziprodukt syntézy maturovaného IL-1 $\alpha$ , ale o protein s vlastní biologickou funkcí (Buryskova et al., 2004). Schéma molekuly IL-1 $\alpha$  i jeho krystalová struktura jsou znázorněny na obrázku 1.



**Obrázek 1: Schéma molekuly prekursoru IL-1 $\alpha$  (A) a krystalová struktura zralého IL-1 $\alpha$  (B).** V N-koncové části IL-1 $\alpha$  je znázorněn jaderný lokalizační signál (NLS) a také je vyznačeno místo štěpení proteázou calpainem. Trojrozměrná struktura IL-1 $\alpha$ Mat byla upravena dle PDB (PDB ID: 2KKI) (Chang et al., 2010).

Jadernému IL-1 $\alpha$  jsou připisovány rozličné biologické vlastnosti, jako například regulace buněčné motility (McMahon et al., 1997) nebo interakce s růstovým supresorem necdinem (Hu et al., 2003). Samotný N-koncový peptid IL-1 $\alpha$  se pak účastní transformace mesangiálních buněk (Stevenson et al., 1997) nebo indukce

apoptózy v nádorových buňkách (Pollock et al., 2003). V naší laboratoři se věnujeme studiu IL-1 $\alpha$  přes deset let a podstatnou část výsledků charakterizujících jadernou funkci IL-1 $\alpha$  se nám podařilo získat s využitím heterologní exprese IL-1 $\alpha$  v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*.

## Co přinesl dvouhybrid

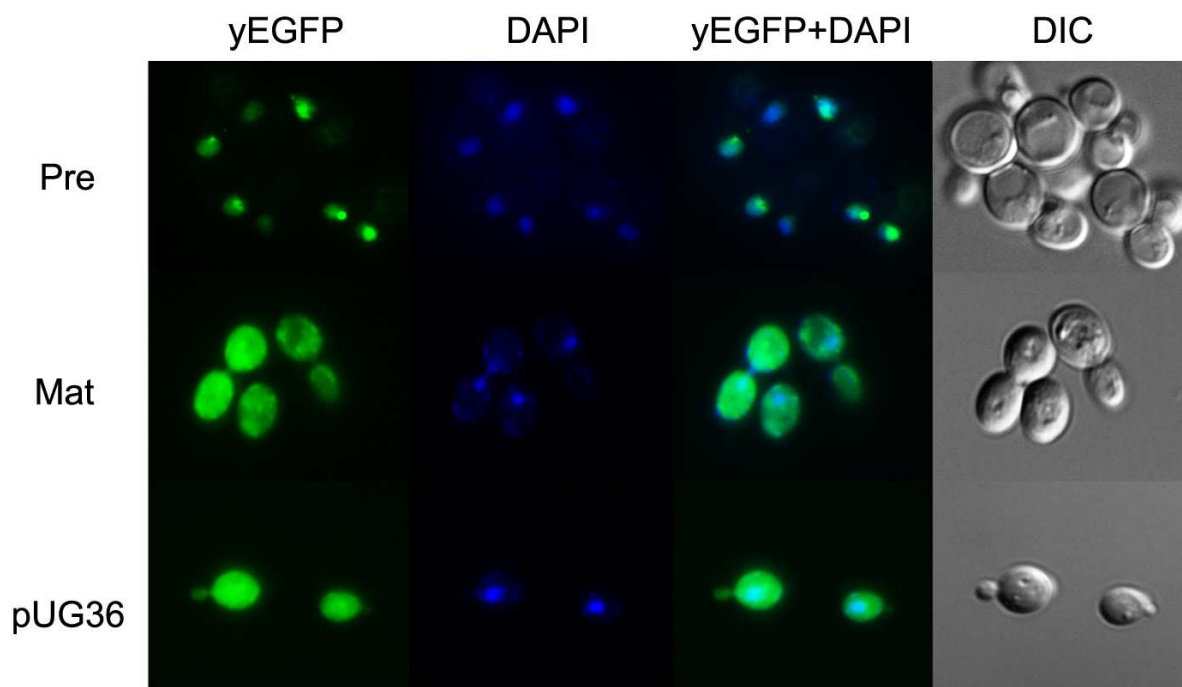
Na začátku naší cesty po stopách IL-1 $\alpha$  byl experiment v kvasinkovém dvouhybridovém systému, který ukázal, že N-koncový peptid IL-1 $\alpha$  ve fúzi s Gal4 DNA-vazebnou doménou transaktivuje transkripci reportérového genu i v nepřítomnosti interakčního partnera produkovaného ve fúzi s Gal4-aktivační doménou. V dalších experimentech jsme zjistili, že tato vlastnost IL-1 $\alpha$ NTP je podmíněna přítomností funkčního enzymatického komplexu SAGA (Buryškova et al., 2004), jenž patří mezi histonacetyltransferázy a podílí se na transkripční aktivaci cca 12% kvasinkových genů (Lee et al., 2000). Souvislost transaktivační funkce IL-1 $\alpha$ NTP s přítomností intaktního SAGA komplexu byla zajímavým výsledkem, který si však pro objasnění tohoto jevu vyžádal další experimenty.

## Transportují kvasinky IL-1 $\alpha$ do jádra?

Pro výzkum jaderné funkce IL-1 $\alpha$  za pomoci modelového organismu *S. cerevisiae* bylo nejdříve potřeba zjistit, zda subcelulární lokalizace IL-1 $\alpha$  v kvasinkové buňce odpovídá situaci v savčích buňkách. Tedy ověřit, zda v kvasinkách funguje jaderný lokalizační signál, přítomný v N-koncové části IL-1 $\alpha$ , který umožňuje aktivní transport prekursoru IL-1 $\alpha$  do kvasinkového buněčného jádra. Jaderné signály bývají v rámci eukaryot relativně poměrně dobře konzervované (Malik et al., 1997; Quan et al., 2008), bylo tedy možné předpokládat, že jaderný transport lidského IL-1 $\alpha$  bude fungovat i v kvasinkách. To potvrdily i naše experimenty, využívající produkci prekursoru a zralého IL-1 $\alpha$  ve fúzi se zeleným fluorescenčním proteinem upraveným pro použití v kvasinkách (yEGFP). Obr. 2 ukazuje, že zatímco zralý IL-1 $\alpha$  vykazuje v kvasinkách cytoplasmatickou lokalizaci stejně jako kontrolní prázdný vektor, prekursor IL-1 $\alpha$  je přítomen pouze v buněčném jádře a jeho transport do jádra je zde zachován.

## Kam se tedy IL-1 $\alpha$ v kvasinkách váže?

Předchozí experiment studující subcelulární lokalizaci IL-1 $\alpha$  v kvasinkách potvrdil, že jaderný lokalizační signál v oblasti IL-1 $\alpha$ NTP je v kvasinkách funkční a je tedy možné kvasinky využít pro studium jaderné funkce IL-1 $\alpha$ . Zralý IL-1 $\alpha$ , který do jádra nevstupuje, bylo možné využít při tomto studiu jako negativní kontrolu. Abychom zjistili, z jakého důvodu je SAGA komplex důležitý pro transkripčně aktivační funkci IL-1 $\alpha$ NTP, rozhodli jsme se pokusit se lépe charakterizovat dříve popsanou genetickou interakci IL-1 $\alpha$  s tímto kvasinkovým histonacetyltransferázovým komplexem.



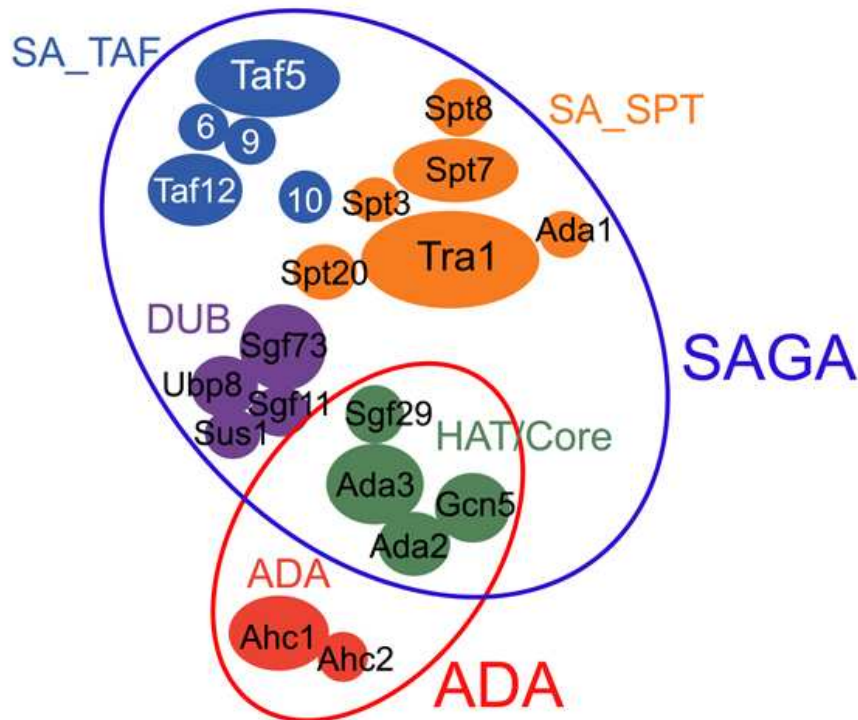
**Obrázek 2: Subcelulární lokalizace prekursoru IL-1 $\alpha$  a maturovaného proteinu v buňkách *S. cerevisiae*.** Kolokalizace s DAPI potvrdila jadernou lokalizaci prekursoru IL-1 $\alpha$  (Pre) označeného yEGFP, zatímco maturovaný IL-1 $\alpha$  a samotný yEGFP produkovaný z plasmidu pUG36 vykazují cytoplasmatickou lokalizaci. V pravém sloupci buňky pozorované v diferenciálním interferenčním kontrastu (DIC). Zvětšeno 600x.

SAGA komplex je u kvasinky *S. cerevisiae* tvořen pravděpodobně 19-20 podjednotkami a vykazuje modulární strukturu. Krystalografická analýza prokázala přítomnost čtyř funkčních modulů (Lee et al., 2011) (obr. 3). Tzv. HAT/Core modul obsahuje mimo jiné proteiny pro katalytickou podjednotku SAGA Gcn5, v rámci modulu SA\_SPT je přítomen například protein Spt7, důležitý pro integritu celého komplexu, a modul SA\_TAF obsahuje několik Taf proteinů. Čtvrtým modulem je DUB modul, který katalyzuje deubiquitinaci histonu H2B (Henry et al., 2003).

SAGA komplex představuje modelový kvasinkový histonacetyltransferázový komplex, který byl v minulosti velmi podrobně studován. Poněkud méně prozkoumanou kvasinkovou histonacetyltransferázou je podstatně menší ADA komplex, který sdílí se SAGA komplexem HAT/Core modul a navíc obsahuje tzv. ADA modul (obr. 3). Obecně jsou však eukaryotické histonacetyltransferázové komplexy velmi konzervované. Lidskou obdobou SAGA komplexu je komplex STAGA obsahující homology téměř všech podjednotek SAGA (Martinez et al., 2001).

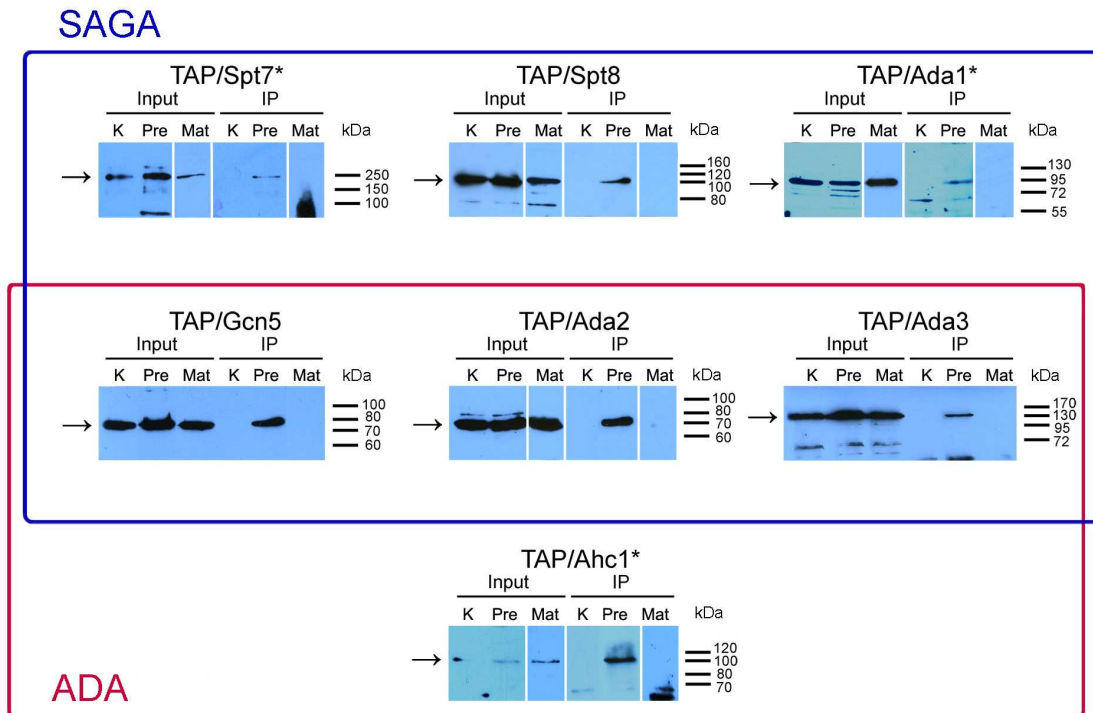
Protože naše předchozí výsledky poukazyvaly na genetickou interakci N-koncové domény lidského IL-1 $\alpha$  s proteiny SAGA komplexu *S. cerevisiae*, pokusili jsme se prokázat fyzickou interakci vybraných podjednotek SAGA (katalytická podjednotka Gcn5, strukturní podjednotky Spt7 a Ada1, adaptory Ada2 a Ada3 a podjednotka Spt8 vázající TATA-vazebný protein) s IL-1 $\alpha$ . Pro tento účel jsme využili kvasinkové kmeny, odvozené od kmene BY4741, produkující zmíněné proteiny ve fúzi s tzv. tagem TAP. Z předchozích výsledků bylo též patrné, že nedochází k interakci IL-1 $\alpha$  s ADA komplexem, zvolili jsme tedy protein Ahc1, specifický pro ADA komplex, jako negativní kontrolu. Jako negativní kontrola nám sloužil také zralý

IL-1 $\alpha$ , který neobsahuje NLS, nevstupuje do buněčného jádra a neměl by se tedy k jaderným histonacetyltransferázám vázat. Interakci vybraných podjednotek komplexů SAGA a ADA s prekursorem IL-1 $\alpha$  jsme studovali pomocí koimunoprecipitace s následnou detekcí western blottingem.



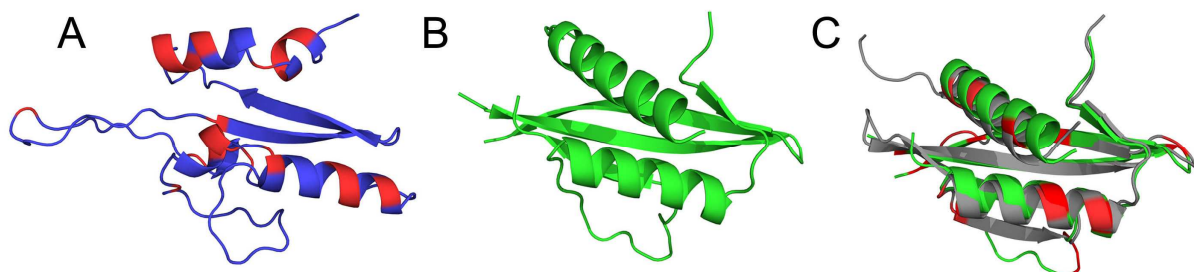
**Obrázek 3: Modulární struktura kvasinkového SAGA komplexu.** Tzv. HAT/Core modul sdílí SAGA komplex s histonacetyltransferázovým komplexem ADA, který navíc obsahuje unikátní modul ADA, tvořený proteiny Ahc1 a Ahc2. Upraveno podle (Lee et al., 2011).

K našemu překvapení však všechny zmíněné proteiny, včetně Ahc1, bylo možné precipitovat z kvasinkových lyzátů společně s IL-1 $\alpha$  (obr. 4). Naopak, v případě zralého IL-1 $\alpha$ , neobsahujícího N-koncovou doménu, k žádným interakcím nedocházelo. Z těchto a předchozích výsledků bylo patrné, že IL-1 $\alpha$  se váže na kvasinkové histonacetyltransferázy prostřednictvím N-koncové části molekuly a oproti původním předpokladům vykazuje fyzickou interakci také s histonacetyltransferázou ADA. Oba studované enzymatické komplexy, SAGA i ADA, spolu sdílí tzv. HAT/Core modul, tvořený proteiny Gcn5, Ada2, Ada3 a Sgf29. Usoudili jsme tedy, že pravděpodobným místem vazby IL-1 $\alpha$  k těmto komplexům bude právě tento modul. Následnou deleční analýzou, při které byly geny kódující vybrané podjednotky SAGA a ADA komplexů v jednotlivých kvasinkových kmenech nahrazeny kanamycinovou kazetou (Gueldener et al., 1996), jsme možné přímé interakční partnery IL-1 $\alpha$  v kvasince *S. cerevisiae* omezili na proteiny Ada2, Ada3 nebo Sgf29 (tyto výsledky zde nejsou pro jejich rozsah dokumentovány).



**Obrázek 4: Podjednotky SAGA a ADA, identifikované v proteinovém komplexu, který se váže k IL-1 $\alpha$  v *S. cerevisiae*. Zatímco prekursor IL-1 $\alpha$  vykazuje interakci se všemi studovanými podjednotkami SAGA nebo ADA, zralý protein tuto vlastnost postrádá.**

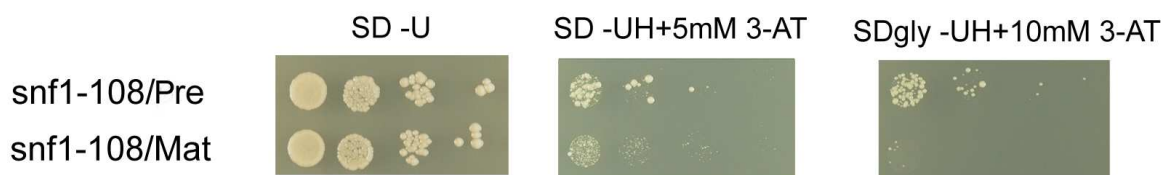
Jak již bylo uvedeno výše, IL-1 $\alpha$  se váže ke studovaným histonacetyltransferázám SAGA a ADA prostřednictvím své N-koncové části. K pravděpodobnému vysvětlení interakce lidského IL-1 $\alpha$  s kvasinkovými histonacetyltransferázovými komplexy nám napomohlo modelování terciární struktury N-koncové části IL-1 $\alpha$  *in silico* pomocí serveru Robetta (Kim et al., 2004). Tato struktura nebyla do té doby v literatuře publikována. Následné vyhledávání proteinů *S. cerevisiae* se strukturou podobnou IL-1 $\alpha$ -NTP pomocí serveru Dali (Holm a Rosenstrom, 2010) odhalilo, že model IL-1 $\alpha$ -NTP se nápadně podobá terciární struktuře C-koncové regulační domény podjednotky alfa kvasinkové kinázy Snf1. Zmíněnou doménu jsme nazvali doména INL (podle Interleukin-1 $\alpha$ NTP-Like) a zjistili jsme, že tato struktura je konzervovaná také u savců (obr. 5).



**Obrázek 5: Struktura IL-1 $\alpha$ NTP se podobá struktuře C-koncové oblasti katalytické podjednotky eukaryotické AMP-aktivované kinázy. Predikce terciární struktury IL-1 $\alpha$ NTP (A), struktura INL domény kvasinkové proteinkinázy Snf1 (B) a porovnání struktury INL domény kvasinkové Snf1 a savčí AMPK (C; zeleně Snf1, šedě AMPK potkana). Kyselé aminokyselinové zbytky jsou vyznačeny červeně.**

Enzym Snf1 patří do skupiny proteinkináz aktivovaných AMP (AMPK) a podílí se na regulaci kvasinkového metabolismu v případě nedostatku glukózy a využívání alternativních zdrojů uhlíku. N-koncovému peptidu IL-1 $\alpha$  se podobá mimo terciární struktury také tím, že byla popsána funkční a fyzická interakce Snf1 s podjednotkami SAGA (Gcn5, Sgf73, Spt3, Spt8 a Ubp8) i ADA (protein Ahc1) komplexu (Liu et al., 2005; Collins et al., 2007; Wilson et al., 2011). Mutantní kvasinkové kmeny *snf1 $\Delta$*  a *snf1-108*, obsahující pouze prvních 108 aminokyselin Snf1, vykazují defekt růstu na agarových plotnách s 3-aminotriazolem (3-AT) (Liu et al., 2005).

Pokusili jsme se tedy o komplementaci tohoto defektu produkcí prekursoru IL-1 $\alpha$  a naše výsledky ukázaly, že ve srovnání s IL-1 $\alpha$ Mat dochází v důsledku exprese prekursoru k viditelné supresi zmíněného růstového defektu. Největší efekt byl pozorován u kmene *snf1-108* na miskách s 10mM 3-AT a glycerolem jako zdrojem uhlíku (obr. 6), což dává smysl vzhledem k dříve popsané aktivaci Snf1 při přechodu na využívání uhlíku z glycerolu (Vincent et al., 2001). Naše výsledky nejen potvrzují hypotézu o strukturní podobnosti INL domén IL-1 $\alpha$  a Snf1, ale také naznačují, že při produkci prekursoru IL-1 $\alpha$  v *S. cerevisiae* mohou obě struktury soutěžit o stejné vazebné místo v rámci histonacetyltransferázových komplexů a podobně to může být i u savců (Zamostna et al., 2012).



**Obrázek 6: Částečná suprese hypersensitivity kmene *S. cerevisiae* snf1-108 k 3-AT pomocí produkce prekursoru IL-1 $\alpha$ .** V případě produkce prekursoru IL-1 $\alpha$  (Pre) je inhibice růstu potlačena oproti kmeni produkujícímu maturovaný IL-1 $\alpha$  (Mat). Efekt je patrný zejména na plotnách obsahujících zároveň 3-AT a glycerol jako zdroj uhlíku.

## Závěr

Ačkoliv se nezdá být pravděpodobné, že by byla kináza Snf1 „kvasinkovým IL-1 $\alpha$ “, strukturní podobnost INL domén IL-1 $\alpha$ NTP a Snf1 může být vysvětlením pro vazbu cizorodého IL-1 $\alpha$  na kvasinkové histonacetyltransferázové komplexy. Díky kvasinkovému modelu jsme byli schopni identifikovat HAT/Core modul jako pravděpodobné místo vazby IL-1 $\alpha$  k SAGA a ADA komplexu, další experimenty však již budou vyžadovat využití savčích buněk, ve kterých byla interakce IL-1 $\alpha$  s histonacetyltransferázami též popsána (Buryškova et al., 2004). Doposud není zcela jasné, jaký funkční význam má tato jaderná interakce v regulaci transkripce nebo případně jiného buněčného děje. Vzhledem k prokázané účasti IL-1 $\alpha$  při patogenezi celé řady lidských chorob je však výzkum biologických funkcí této molekuly velice aktuální. Jakožto účinná prozánětlivá molekula se IL-1 $\alpha$  podílí na rozvoji revmatoidní artritidy, Alzheimerovy choroby, vaskulární demence, systémové sklerózy, diabetu, psoriázy, spondyloartritidy, autoimunitní encefalomyelitidy a některých kardiovaskulárních onemocnění (Nicoll et al., 2000; Kawaguchi et al., 2004; Rainero et al., 2004; Mee et al., 2006; Sutton et al., 2006; Yucesoy et al., 2006; Vicenova et al., 2009; Mandrup-Poulsen et al., 2010). Blokování patologického působení IL-1 $\alpha$  a molekul, se kterými IL-1 $\alpha$  během tohoto svého působení spolupracuje, bude tedy zcela jistě mít terapeutický význam.

## Poděkování

Poděkování patří všem, kteří se na projektu výzkumu jaderné funkce IL-1 $\alpha$  podíleli, tedy zejména Josefu Novákovi, Václavovi Vopálenskému, Tomáši Maškovi, Ladislavu Burýškovi, Miroslavě Burýškové a Martinu Pospíškovi. Projekt byl podpořen grantem IGA NR/9526.

## Literatura

- Buryskova M., Pospisek M., Grothey A., Simmet T., Burysek L. (2004) Intracellular interleukin-1 $\alpha$  functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem.* 279:4017-4026
- Collins S.R., Kemmeren P., Zhao X.C., Greenblatt J.F., Spencer F., et al. (2007) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 6:439-450
- Gueldener U., Heck S., Fielder T., Beinhauer J., Hegemann J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24:2519-2524
- Henry K.W., Wyce A., Lo W.S., Duggan L.J., Emre N.C. et al. (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* 17:2648-2663
- Holm L., Rosenstrom P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 38:545-549
- Hu B., Wang S., Zhang Y., Feghali C.A., Dingman J.R., Wright T.M. (2003) A nuclear target for interleukin-1 $\alpha$ : interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10008-10013
- Chang H.K., Mohan S.K., Chin Y. (2010) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N backbone and side chain resonance assignments of human interleukin 1 $\alpha$ . *Biomol NMR Assign* 4:59-60
- Kawaguchi Y., McCarthy S.A., Watkins S.C., Wright T.M. (2004) Autocrine activation by interleukin 1 $\alpha$  induces the fibrogenic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts. *J Rheumatol* 31:1946-1954
- Kim D.E., Chivian D., Baker D. (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 32:526-531
- Kobayashi Y., Yamamoto K., Saido T., Kawasaki H., Oppenheim J.J., Matsushima K. (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5548-5552
- Lee K.K., Sardu M.E., Swanson S.K., Gilmore J.M., Torok M. et al. (2011) Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol Syst Biol.* 7:503
- Lee T.I., Causton H.C., Holstege F.C., Shen W.C., Hannett N., et al. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* 405:701-704
- Liu Y., Xu X., Singh-Rodriguez S., Zhao Y., Kuo M.H. (2005) Histone H3 Ser10 phosphorylation-independent function of Snf1 and Reg1 proteins rescues a *gcn5*-mutant in HIS3 expression. *Mol Cell Biol.* 25:10566-10579



Malik H.S., Eickbush T.H., Goldfarb D.S. (1997) Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13738-13742

Mandrup-Poulsen T., Pickersgill L., Donath M.Y. (2010) Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6:158-166

Martinez E., Palhan V.B., Tjernberg A., Lymar E.S., Gamper A.M., et al. (2001) Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol*. 21:6782-6795

McMahon G.A., Garfinkel S., Prudovsky I., Hu X., Maciag T. (1997) Intracellular precursor interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration in vitro. *J Biol Chem*. 272:28202-28205

Mee J.B., Cork M.J., di Giovine F.S., Duff G.W., Groves R.W. (2006) Interleukin-1: a key inflammatory mediator in psoriasis? *Cytokine* 33 72-78

Nicoll J.A., Mrak R.E., Graham D.I., Stewart J., Wilcock G. et al. (2000) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 47:365-368

Pollock A.S., Turck J., Lovett D.H. (2003) The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *Faseb J* 17:203-213

Quan Y., Ji Z.L., Wang X., Tartakoff A.M., Tao T. (2008) Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins. *Mol Cell Proteomics* 7:1254-1269

Rainero I., Bo M., Ferrero M., Valfre W., Vaula G., Pinessi L. (2004) Association between the interleukin-1alpha gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 25:1293-1298

Stevenson F.T., Turck J., Locksley R.M., Lovett D.H. (1997) The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:508-513

Sutton C., Brereton C., Keogh B., Mills K.H., Lavelle E.C. (2006) A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 203:1685-1691

Vicenova B., Vopalensky V., Burysek L., Pospisek M. (2009) Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiol Res*. 58:481-498

Vincent O., Townley R., Kuchin S., Carlson M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev*. 15:1104-1114

Wilson M.A., Koutelou E., Hirsch C., Akdemir K., Schibler A., et al. (2011) Ubp8 and SAGA regulate Snf1 AMP kinase activity. *Mol Cell Biol*. 31:3126-3135

Yucesoy B., Peila R., White L.R., Wu K.M., Johnson V.J. et al. (2006) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with dementia in a community-based sample: the Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol Aging* 27:211-217

Zamostna B., Novak J., Vopalensky V., Masek T., Burysek L., Pospisek M. (2012) N-Terminal Domain of Nuclear IL-1alpha Shows Structural Similarity to the C-Terminal



**Mgr. Blanka Zámostná, Ph.D.** (e-mail: VicenovaB@seznam.cz) je vědeckou pracovnící v Laboratoři biochemie RNA na Katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze, v současnosti na mateřské dovolené. V roce 2013 obhájila svou doktorskou disertační práci zaměřenou na studium jaderné funkce IL-1alfa (školitel RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.).

### Perličky ze školních lavic

Výroky zkoušených studentů tak, jak je zaznamenal během své pedagogické kariéry na Biologickém ústavu Lékařské fakulty MU (dříve UJEP) prof. MUDr. Jan Šmarda, DrSc.

"Galaktóza se vyskytuje v mléčných výrobcích, např. v mléce."

\*\*\*

"Amfimixie je, myslím, na pustém ostrově, když dochází ke styku mezi bratrem a sestrou. Nebo by to mohlo být také mezi otcem a dcerou? Ted' nevím."

\*\*\*

Otázka examinátora: "Ve kterém orgánu dochází k oplození u člověka?" Odpověď studenta: "To může být různé."

\*\*\*

"Já bych chtěla mít hodně dětí, ale při studiu člověk nemá na nic čas."

Otázka: "Podmíněný reflex". Odpověď: "Paprsek přicházející od potravy se nám spojí s paprskem přicházejícím od žrádla."

\*\*\*

"Přírodní výběr je tak masový boj o samice."



# Spektrakulární

Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence je jedinečná kombinace spektrofotometru s fluorimetrem v jednom šikovním, univerzálním, kompaktním přístroji. Ideální pro kvantifikaci biomolekul měřením absorpance nebo fluorescence.

Unikátní rozsah měřených koncentrací od 2,5 pg/μl DNA až do 150 ng/μl a nebo až do 1500 ng/μl při použití mikrokyvety Eppendorf μCuvette™ G1.0 pro objemy od 1,5 μl do 10 μl.

Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence kombinuje možnosti měření v UV/VIS oblasti a měření fluorescence ve fixních vlnových délkách pro **stanovení velmi nízkých koncentrací** nukleových kyselin a proteinů (pg/μl) pomocí fluorescenčních barviček.



Otevřená mikrokyveta Eppendorf μCuvette™ G1.0

- > Rozsah UV/VIS od 200 do 830 nm, krok 1 nm.
- > Měření absorpance při jedné vlnové délce nebo v jednom vzorku více vlnových délek, proměří spektra, umí metody s faktory, standardy či sériemi standardů, spočítá koncentrace a čistoty.
- > Fluorescenční modul umožňuje excitaci při 470 nm a měření emisních vlnových délek při 520 a 560 nm.
- > Předprogramované základní metody u absorpance (kvantifikace dsDNA, ssDNA, RNA, BCA, Lowry, OD600...)
- > Předprogramované základní metody u fluorescence (pro běžně používané fluorescenční barvičky).
- > Umožňuje vytvořit a uložit vlastní metody měření.
- > Malý (29,5 x 40 x 15 cm), lehký přístroj.
- > Možnost propojit přímo do PC bez nutnosti použít další SW nebo přenos dat do USB paměti. Export dat do Excelu.
- > Kompatibilní se standardními kyvetami i mikrokyvetami.

[www.eppendorf.com/photometry](http://www.eppendorf.com/photometry)  
[www.eppendorf.cz](http://www.eppendorf.cz)



**Vsaďte všechno na jednu kartu!**

## *Nový real-time PCR přístroj LightCycler® 96*

Na základě více než 10-ti let zkušeností s Real-time PCR jsme vyvinuli zcela nový gradientový LightCycler® 96, který splňuje náročné požadavky moderní laboratoře na kvalitu, výkon, design a uživatelsky příjemný SW.

- Nejpřesnější real-time PCR instrument na trhu – optická vlákna zaručují přesné snímání ze všech 96-ti jamek zároveň
- Gradientový stříbrný blok umožňuje velmi rychlé cyklování, délka trvání amplifikačního běhu < 40min
- Moderní, uživatelsky příjemný SW Vám ušetří čas při analýze dat, SW Vás informuje o ukončení běhu a naměřená data Vám odešle e-mailem
- Dotyková obrazovka Vám umožní spustit běh bez použití externího počítače
- Přístroj je velmi tichý, 43dB (A), nebude Vás rušit, ani pokud ho budete mít přímo na Vašem pracovním stole
- Více na [www.lightcycler96.com](http://www.lightcycler96.com)

Máte-li zájem zdarma vyzkoušet LightCycler® 96 ve Vaší laboratoři, kontaktujte nás, prosíme, na adrese [czech.appliedscience@roche.com](mailto:czech.appliedscience@roche.com)