

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologický obor  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Zuzana VONDRÁKOVÁ

MODELY ANEMICKÝCH ONEMOCNĚNÍ  
ANAEMIA DISEASE MODELS

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Bartůněk, CSc.

Konzultant: Mgr. Jana Oltová

Laboratoř buněčné diferenciaci, ÚMG AV ČR

Praha 2017

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Bartůňkovi, CSc. za pomoc, vstřícnost, ochotu a odborné vedení během psaní této práce. Zároveň děkuji všem členům laboratoře, zvláště pak Mgr. Janě Oltové za odborné konzultace, trpělivost a mnoho času. V neposlední řadě děkuji své rodině, příteli Bc. Adamu Vedralovi a kamarádce Alise Loginové za jejich shovívavost a podporu při vzniku této bakalářské práce.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha, 10. 5. 2017

Zuzana Vondráková

## Abstrakt

Hematopoéza je proces, kterým se utváří krevní buňky. Všichni obratlovci mají dvě fáze hematopoézy – primitivní a definitivní. Základním smyslem primitivní hematopoézy je produkce červených krvinek, které umožňují okysličení tkání embrya. Definitivní hematopoéza pak dá vzniknout všem krevním buněčným liniím. Hlavním úkolem erytrocytů je transport kyslíku ke tkáním. Pokud z nějakého důvodu dojde ke snížené produkci erytrocytů, k poškození jejich membrány, enzymatického vybavení erytrocytu či k poruše tvorby hemoglobinu, nastává anémie. Srpkovitá anémie a  $\beta$ -thalasémie se souhrnně nazývají hemoglobinopatie, protože jsou způsobeny poruchou hemoglobinizace erytrocytů. Fanconiho anémie je zapříčiněna mutacemi v jednom z jednadvaceti genů dráhy Fanconiho anémie, které se účastní oprav DNA. Diamondova-Blackfanova anémie vzniká jako odpověď na mutaci v genech kódujících ribozomální proteiny. Lidské buňky, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* a *Danio rerio* se jeví jako vhodné modely pro studium těchto onemocnění a jsou také velmi užitečné pro hledání dalších terapeutických cílů.

**Klíčová slova:** krvetvorba, diferenciace, červené krvinky, anémie, modelové organismy, zebřička

## Abstract

Hematopoiesis is a process by which blood cells are generated. All vertebrates have two phases of hematopoiesis – primitive and definitive. The main purpose of primitive hematopoiesis is the production of red blood cells, which provide oxygenation to the developing embryo. Other blood cell lineages are established by definitive hematopoiesis. The main function of erythrocytes is oxygen transport to all tissues. When erythrocyte production is decreased or they are damaged due to the membrane, enzyme or hemoglobin impairment, the condition called anemia arises. Sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia are called hemoglobinopathies as they are caused by the damaged hemoglobin. Fanconi anemia is caused by mutations in one of 21 genes of Fanconi anemia pathway, which plays an essential role in DNA repair. Diamond Blackfan anemia is caused by mutations gene for ribosomal proteins. Human cells, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* and *Danio rerio* seem to be good models for study of this diseases and they are also useful for achieving therapeutical goals.

**Key words:** hematopoiesis, differentiation, erythrocytes, anemia, model organisms, zebrafish

# Obsah

Poděkování

Prohlášení

Abstrakt

Abstract

Obsah

Seznam použitých zkratek

1.	Úvod.....	1
2.	Hematopoéza.....	2
	2.1 Primitivní hematopoéza.....	2
	2.2 Definitivní hematopoéza .....	3
3.	Erytropoéza .....	6
	3.1 Erytrocyty.....	7
	3.1.1 Hemoglobin.....	8
	3.2 Hlavní regulátory erytropoézy.....	9
4.	Anémie .....	10
	4.1 Hemolytické anémie z poruchy tvorby hemoglobinu .....	11
	4.2 Fanconiho anémie.....	12
	4.2.1 Molekulární podstata dráhy Fanconiho anémie .....	12
	4.3 Diamondova-Blackfanova anémie .....	13
	4.3.1 Patologie DBA .....	14
	4.3.2 Souvislost s výskytem rakoviny.....	15
	4.4 Léčba anemických onemocnění .....	16
5.	Modely pro studium anemických onemocnění .....	19
	5.1 Lidský buněčný model .....	19
	5.1.1 Indukované pluripotentní kmenové buňky .....	19
	5.1.2 Objasnění funkce RPS19 v hematopoéze .....	20
	5.2 <i>Mus musculus</i> .....	20
	5.2.1 Genetické manipulace v <i>M. musculus</i> .....	20
	5.2.2 Možné využití v klinické praxi .....	21

5.3	<i>Gallus gallus</i> .....	22
5.4	<i>Xenopus laevis</i> .....	22
5.5	<i>Danio rerio</i> .....	23
5.5.1	Knock-down ribozomálních proteinů v <i>D. rerio</i> .....	24
5.5.2	Budoucí směry výzkumu DBA v <i>D. rerio</i> .....	25
6.	Diskuze a závěr.....	27
7.	Literatura.....	29

## Seznam použitých zkratek

AGM – aorta-gonad-mesonephros

BFU-E – burst forming units-erythroid

Cas9 – CRISPR associated protein 9

CFU-E – colony forming units-erythroid

CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DBA – Diamondova-Blackfanova anémie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dpf – dny po fertilizaci

EPO – erythropoetin

FA – Fanconiho anémie

HbF – fetální hemoglobin

hpf – hodiny po fertilizaci

HPFH – dědičné přetrvání fetálního hemoglobinu (hereditary persistence of fetal hemoglobin)

HSC – hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cells)

HSP – protein teplotního šoku (heat shock protein)

HSPCs – hemato. kmenové a progenitorové buňky (hematopoietic stem and progenitor cells)

ICLs – mezivláknová překřížení DNA (interstrand crosslinks)

ICM – intermediate cell mass

iPSCs – indukované pluripotentní kmenové buňky

MEP – megakaryo-erytroidní progenitor

Morfant - organismus modifikovaný pomocí morfolino antisense oligonukleotidů

Morfolino - fosfordiamidátový morfolinový oligomer sloužící k knock-downu genu

RBCs – erytrocyty (red blood cells)

RBI – rostral blood island

RNA – ribonukleová kyselina

RPS19 – ribozomální protein S19

SCD – srpkovitá anémie (sickle cell disease)

SCF – stem cell factor

TPO – trombopoetin

# 1. Úvod

Ve zdravých jedincích je rovnováha produkce erytrocytů zajišťována homeostatickými mechanismy, jejichž selhání způsobuje anémii. Existují tři základní problémy postihující červené krvinky, které zapříčiňují tuto chorobu: snížení produkce erytrocytů, zvýšení jejich destrukce (hemolýza) či jejich ztráta (krvácení). Mezi geneticky podmíněná anemická onemocnění se řadí srpkovitá anémie,  $\beta$ -thalasémie, Fanconiho anémie a Diamondova-Blackfanova anémie.

U srpkovité anémie vzniká hemoglobin S substitucí kyseliny glutamové valinem v 6. pozici  $\beta$ -globinového řetězce. Může docházet také k rozpadu červených krvinek, volný hemoglobin a hemy pak přispívají k patologii tohoto onemocnění.  $\beta$ -thalasémie je způsobena mutacemi  $\beta$ -globinových genů, které způsobují snížení produkce tohoto řetězce a uvolnění volného  $\alpha$ -globinu. Terapeuticky využívaná transfuze zapříčiňuje přetížení železem a transplantace kmenových buněk je nevhodná z hlediska toxicity a dostupnosti dárců. Proto se hledají jiné farmakologické cíle týkající se obnovy exprese fetálního hemoglobinu. Dráha Fanconiho anémie momentálně zahrnuje 21 genů podílejících se na opravě DNA, jejichž mutace se projevuje jako Fanconiho anémie. Klasická léčba zahrnuje kortikosteroidy či transplantaci kmenových buněk z pupečnickové krve. Studium Fanconiho anémie je však značně ztížené právě kvůli nedostatku znalostí genetických systémů. Diamondova-Blackfanova anémie vzniká poruchou biogeneze ribozomů, která je způsobena mutacemi v ribozomálních proteinech. Také v mechanismu tohoto onemocnění stále zůstává mnoho otázek.

Cílem této práce bylo poukázat na některé typy anémií a nedostatky v jejich poznání, představit modely vhodné pro studium těchto onemocnění, shrnout jejich využití pro získání nových poznatků a hledání nových terapeutických cílů.



## 2. Hematopoéza

### 2.1 Primitivní hematopoéza

Hematopoéza je proces, kterým se utváří krevní buňky. Nejčasnější stádia embryonálního vývoje se uskutečňují bez přítomnosti krevních buněk. Až potom co se embryo zvětší natolik, že nestačí zásobování kyslíkem a dalšími faktory pouhou difuzí, vyvinou se krevní buňky (Rieger and Schroeder 2012, review). Všichni obratlovci mají dvě fáze hematopoézy. První fáze se nazývá embryonální (primitivní), dává vzniknout erytrocytům a makrofágům během časného embryonálního vývoje. Základní smysl primitivní hematopoézy je produkce červených krvinek, které usnadňují okysličení tkání během embryonálního růstu. Erytroidní progenitory v primitivní fázi nemají schopnost sebeobnovy (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review).

Mnoho pozdně embryonálních a všechny dospělé krevní buňky jsou u savců produkovány z hematopoetických kmenových buněk (HSCs), ale v časném embryu se nachází také přechodné, tzv. primitivní krevní buňky. Primitivní erytrocyty si zachovávají jádro a exprimují fetální formu hemoglobinu, jsou však brzy nahrazeny konečnými protějšky a do dospělce se nešíří. První hematopoetické buňky vznikají v extraembryonálním žloutkovém vaku, alantoisu a placentě. Později jsou hematopoetické kmenové buňky de novo vytvářeny intraembryonálně v tzv. aorta-gonad-mesonephros (AGM) oblasti i extraembryonálně v placentě. Buňky vytvořené v AGM rychle migrují do placenty a fetálních jater. Později migrují do sleziny a bezprostředně po narození do kostní dřeně. Fetální HSCs umožňují regeneraci krvetvorby rychleji než dospělé HSCs, ale mají omezený diferenciací potenciál (Rieger and Schroeder 2012, review).

U ptáků se erytroidní progenitorové buňky poprvé vyskytují v krevních ostrůvcích v extraembryonálním žloutkovém vaku. Definitivní hematopoetické kmenové buňky vznikají v AGM oblasti vyvíjejícího se embrya, migrují do fetálních jater a později do kostní dřeně, která se stává místem výskytu HSCs v dospělých jedincích (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review). Ryby (*D. rerio*, zebřičky) mají primitivní hematopoézu lokalizovanou do dvou intraembryonálních oblastí – intermediate cell mass (ICM) a rostral blood island (RBI). Buňky ICM jsou ekvivalentní krevním ostrůvkům savčího žloutkového vaku. Tyto buňky se diferencují do endoteliálních buněk cévních kmenů a proerytroblastů, které vstupují do cirkulace kolem 24 hodin po fertilizaci (hpf). U těchto cirkulujících buněk už dochází k expresi transkripčního faktoru Gata1 a embryonálního  $\alpha$ - a  $\beta$ -globinu. V RBI pak dochází převážně ke vzniku makrofágů (Zon 2005, review, Taylor and Zon 2011, review).

Úzký vztah mezi hematopoetickými kmenovými buňkami a angioblasty vedl k hypotéze, že existuje jejich společný prekurzor hemangioblast. O přítomnosti bipotentního hemangioblastu jako buněčného prekurzoru se vedly značné diskuze, ale jeho přítomnost byla nakonec demonstrována in vivo právě na zebřičce (Vogeli, Jin et al. 2006).

Pro časná stádia hematopoézy je esenciální transkripční faktor GATA2, který je důležitý pro rozrůstání multipotentních hematopoetických progenitorů a vznik žírných buněk (Orkin 1997, Zon 2010, review). PU.1 je další důležitý transkripční faktor primitivní hematopoézy - vysoká hladina jeho exprese vede k omezení potenciálu progenitorů na myeloidní linii, zatímco nízká hladina exprese vede k linii lymfoidní (Dzierzak and Philipsen 2013, review). Rovnováha mezi produkcí primitivních erytroidních a ostatních myeloidních buněk je založena na vyváženosti Gata1 a Pu.1 exprese v ICM, kdy nedostatek Gata1 exprese vede k vychýlení rovnováhy ve prospěch ostatních myeloidních prekurzorů (Zon 2010, review).

## 2.2 Definitivní hematopoéza

Při přechodu do definitivní hematopoézy dochází ke vzniku erytro-myeloidních progenitorů v krevních ostrůvcích (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review). Dospělé savčí HSCs jsou multipotentní, ale jejich potenciál je během diferenciaci více a více omezován, až dojde ke vzniku všech krevních buněčných linií (Rieger and Schroeder 2012, review). Definitivní hematopoéza poskytuje organismům s HSCs schopnost neomezené sebeobnovy a schopnost vytvořit všechny typy zralých hematopoetických buněk (Dzierzak and Philipsen 2013, review). Pro obratlovce je místem vzniku definitivních hematopoetických kmenových buněk AGM. Později HSCs migrují do fetálních jater a místem dospělé hematopoézy se stává kostní dřev (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review).

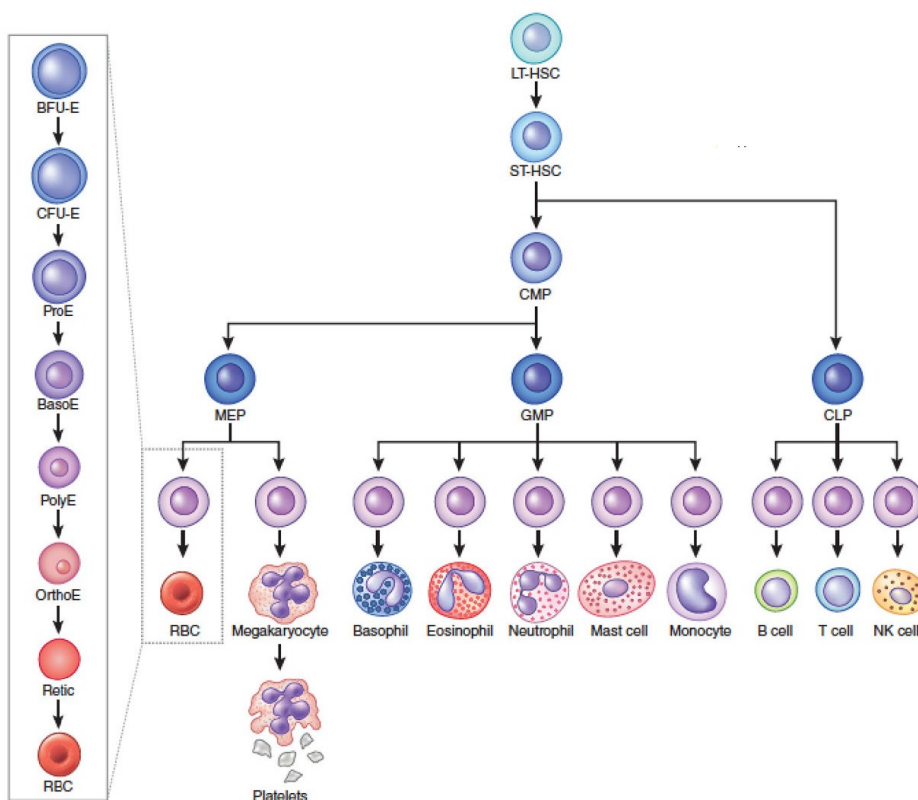
Zebřičky mají ekvivalent savčího AGM a podobně jako u myši je i u zebřiček hlavním transkripčním faktorem zajišťujícím vznik hematopoetických kmenových buněk v AGM oblasti Runx1. Kolem 4-5 dnů po fertilizaci (dpf) dochází u embrya zebřičky k přesunu krvetvorby do ledvin, čímž se zakládá definitivní hematopoéza. Hematopoetické buňky dospělých zebřiček se včleňují mezi renální tubuly ve dřev ledvin. Zebřička má dva typy granulocytů, z nichž jeden je podobný savčím neutrofilům s tím rozdílem, že jádro neutrofilů zebřiček má pouze dva nebo tři segmenty, kdežto ty lidské jich mají čtyři nebo pět. Druhý buněčný typ je specifický pro rybu a má charakteristiky savčích eozinofilů i bazofilů (Zon 2005, review).

U savců jsou prekurzory destiček megakaryocyty, což jsou vícejaderné velké buňky, které se nachází v kostní dřev. Savčí megakaryocyty a erytrocyty vznikají ze společného bipotentního progenitoru, který se nazývá megakaryo-erytroidní progenitor (MEP) (Svoboda and Bartunek

2015, review), viz obr. 1. Mnoho transkripčních faktorů důležitých pro vývoj megakaryocytů však bylo nalezeno také v zebřičce, jmenovitě Fli1, Fog1, Gata1, Nfe2 a Runx1. Trombocyty zebřiček mají jádro a jsou ekvivalentem savčích krevních destiček. Jejich funkcí je zachování hemostázy, usnadňují tvorbu sraženin (Zon 2005, review). Ptáci a zebřičky mají ekvivalent savčího MEP a tím jsou bipotentní progenitory trombocytů a erytrocytů (TEPs), které dávají vzniknout trombocytům a červeným krvinkám (Svoboda, Stachura et al. 2014).

Adaptivní imunitní systém se skládá u všech obratlovců z B buněk, které produkují protilátky, a T buněk, které nesou antigen specifické T buněčné receptory. U lidí, myši a zebřiček dochází ke zrání T buněk v thymu. Vývoj B buněk zebřiček se uskutečňuje ve dřeni ledvin (Zon 2005, review).

Krevní buňky disponují širokou škálou rozdílných nepostradatelných funkcí, všechny však vznikají z HSCs. Porozumění diferenciaci HSCs do různých buněčných typů je naprosto zásadní pro případnou terapeutickou manipulaci. Možná vysvětlení diferenciaci HSCs předkládá hned několik modelů, z nichž asi nejvíce zastávaným je klasický hierarchický model, který předpokládá již v časných stádiích hematopoézy rozdělení na dvě samostatné větve – lymfoidní a myeloerytroidní linii. Alternativním modelem je například tzv. „myeloid-based“ model, podle kterého si lymfoidní buňky dokáží udržet myeloidní potenciál (Kawamoto, Wada et al. 2010, review).



**Obrázek 1 – Hierarchický model savčí hematopoézy**

Dlouhodobé hematopoetické kmenové buňky – LT-HSCs, krátkodobé hematopoetické kmenové buňky – ST-HSCs, společný myeloidní progenitor - CMP, společný lymfoidní progenitor - CLP, progenitory megakaryocytů a erytrocytů - MEPs, progenitory makrofágů a granulocytů - GMPs. Maturace erytroidních progenitorů je znázorněna na levé straně schématu. Nejčasnější progenitor je nazýván „burst forming unit erythroid“ – BFU-E, ze kterého vznikají unipotentní kmenové buňky – CFU-E, z nichž vzniká červená krevní řada: proerythroblasty - ProE, bazofilní erythroblasty - BasoE, polychromatické erythroblasty - PolyE, ortochromatické erythroblasty - OrthoE. Později dochází k odstranění jádra a vzniku retikulocytů - Retic, které jsou uvolněny do cirkulace a maturují do červených krvinek - RBCs (převzato z (Sankaran and Weiss 2015, review)).

### 3. Erytropoéza

K započetí erytropoézy je vyžadována interakce mezi mesodermálními a endodermálními buňkami. Mesodermální buňky, které migrují do žloutkového vaku, formují krevní ostrůvky obsahující nejen červené krvinky, ale také endoteliální buňky. Krevní ostrůvky žloutkového vaku obsahují primitivní erytrocyty, které jsou detekovatelné u lidských embryí kolem 16.-20. dne vývoje a v myších embryích v E7,5. Základními buňkami dospělé erytroidní linie jsou HSCs, které jsou odvozeny od endoteliálních buněk. První savčí dospělé HSCs vznikají v AGM. U obojživelníků a ptáků dochází k prvnímu vzniku hematopoetických buněk v extraembryonálním žloutkovém vaku (Dzierzak and Philipsen 2013, review). U ryb vznikají primitivní hematopoetické kmenové buňky intraembryonálně v ICM (Zon 2010, review), přičemž Runx1- a C-myb- pozitivní buňky, které jsou definitivními HSCs, se objevují v aorta-gonad-mesonephros (AGM) oblasti po 30 hodinách od fertilizace. Stejně jako u savců se i u *D. rerio* mohou definitivní HSCs diferencovat do všech krevních linií (Taylor and Zon 2011, review).

Primitivní erytrocyty savců vznikají časně ve žloutkovém vaku, kdežto definitivní erytrocyty vznikají z endoteliálně derivovaných HSCs. Ještě před HSC jsou generovány definitivní erytroyeloidní progenitory. Multipotentní hematopoetické progenitory se nachází v AGM, pravděpodobně v hematopoetických klastrech. Od okamžiku narození se změnilo místo erytropoézy na kostní dřeň a slezinu. Definitivní erytropoéza u lidí probíhá hlavně v kostní dřeni, kdežto u myši zůstává důležitým erytropaetickým orgánem během života slezina. V případě erytroidního stresového stavu (např. anémie) je slezina u myši i člověka využívána k rozšíření erytroidní kapacity (Dzierzak and Philipsen 2013, review). Zebřičky mají jako ekvivalent savčích krevních ostrůvků žloutkového vaku buňky ICM, které diferencují do endoteliálních buněk a proerytroblastů a 24 hpf vstupují do cirkulace. První cirkulující primitivní erytrocyty jsou nakonec nahrazeny novými erytroidními buňkami, které se vyvíjí později. Přibližně v 5 dpf začíná druhá vlna erytropoézy (Zon 2005, review).

Ačkoliv jsou erytroidní buňky odvozeny z HSCs, přesná cesta diference zatím není zcela objasněna. Ze savčích megakaryo-erytroidních progenitorů (MEPs) pak vznikají megakaryocyty a erytrocyty, obdobně u nesavčích obratlovců vznikají z bipotentních trombo-erytroidních progenitorů (TEPs) trombocyty a erytrocyty. Nezralé erytroidní progenitory jsou nazývány burst forming unit-erytroid (BFU-E) a vedou ke vzniku mnohočetných kolonií, které obsahují několik tisíc hemoglobinizovaných buněk. Jejich růst je závislý na několika faktorech, důležité z nich jsou stem cell factor (SCF), trombopoetin (TPO), interleukin 3 a interleukin 11. Více maturované

erytroidní progenitory, tzv. colony-forming units-erythroid (CFU-E) se skládají z malých kolonií o 16-125 buňkách. Na rozdíl od BFU-E se ale CFU-E nevyskytují v krevním oběhu. Vůbec nejdůležitějším faktorem regulujícím erythropoézu je erythropoetin (EPO), který podporuje sebeobnovu erytroidních progenitorů a jejich diferenciaci (Dzierzak and Philipsen 2013, review, Svoboda and Bartunek 2015, review).

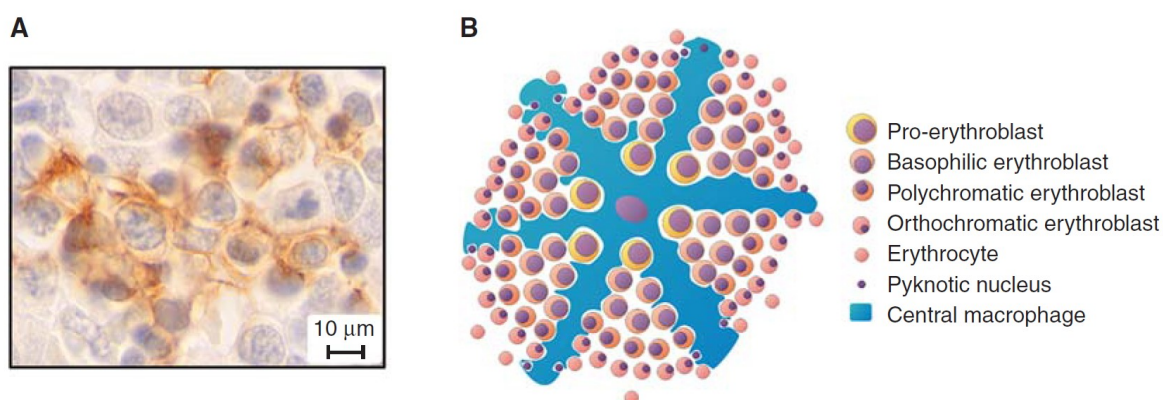
### 3.1 Erytrocyty

Erytrocyty jsou nejběžnějším typem buněk lidské krve, která jich obsahuje přibližně  $5 \times 10^6 / \mu\text{l}$ . Tyto buňky žijí zhruba 120 dnů. Nové erytrocyty neustále vznikají v kostní dřeni. Erytroidní buňky savců se v konečných stádiích diferenciaci zbavují jádra, endoplazmatického retikula a mitochondrií, a proto nejsou schopny další proliferace. Nové buňky vstupující do oběhu mají stále aktivní proteosyntézu a nazývají se retikulocyty. K vývoji retikulocytu z proerytoblastu jsou nutná rychlá dělení, s čímž souvisí redukce buněčné velikosti. Zralé erytrocyty mají v průměru 6-8  $\mu\text{m}$ . Jejich malá velikost a bikonkávní tvar vytváří velký povrch pro výměnu plynů a dovolují buňkám vstoupit mikrokapilárami do tkání. Primární odpovědí na hypoxický stres je zvýšení produkce červených krvinek (Dzierzak and Philipsen 2013, review).

Samotná definitivní erythropoéza se mezi obratlovci moc neliší. Můžeme si povšimnout spíše morfologických rozdílů mezi maturovanými erytrocyty. Erytroidní prekurzory si však jsou velmi podobné. Terminálně diferencované savčí erytrocyty si nezachovávají jádro a mají klasický bikonkávní diskoidní tvar (Zon 2005, review). Savčí definitivní erytrocyty vypuzují jádra před vstupem do oběhu a buňky jsou menší než primitivní erytrocyty. Uvolněné jádro obsahuje velmi nízkou hladinu adenosin trifosfátu (ATP) a důsledkem toho se na jeho povrchu začíná odhalovat fosfatidylserin. Povrchové odhalení fosfatidylserinu je časná událost v apoptóze a slouží jako „eat me“ signál pro apoptotické buňky, stejně tak je signálem pro pohlcení vypuzeného jádra makrofágy (Yoshida, Kawane et al. 2005).

Maturované erytrocyty zebřiček mají eliptický tvar a zůstává jim jádro. Primitivní erytrocyty jsou morfologicky jiné než erytrocyty dospělých jedinců, které mají méně cytoplasmy a jádro je protáhlejší. Během prvních čtyř dnů vývoje jsou primitivní erytrocyty jediné cirkulující erytroidní buňky. Primitivní erytroblasty vstupují do oběhu a v průběhu další diferenciaci exprimují erytroidně specifické geny, které jsou nezbytné pro syntézu hemoglobinu - konkrétně se jedná o  $\alpha$  a  $\beta$  embryonální globinové řetězce, *alas2*, *fch* a *urod*. Primitivní erytroblasty exprimují DMT1, důležitý pro příjem železa a skládání proteinů typu  $\beta$ -spectrin, a protein 4.1R, který zajišťuje membránovou stabilitu (Zon 2005, review).

Ostrůvky erytroblastů jsou strukturální jednotkou v kostní dřeni a místem konečné erytroidní diferenciaci. Skládají se z centrálních makrofágů, které jsou obklopeny diferencujícími erytroidními progenitory, viz obr. 2. Makrofágy jsou nezbytné pro určení role buněk primitivní hematopoézy. Několik proteinů na povrchu makrofágů a erytroblastů zprostředkovává interakci mezi makrofágy a erytroblasty a mezi erytroblasty navzájem. Erythroblast-macrophage protein (EMP) a macrophage-erythroblast attacher (MAEA) jsou proteiny, které jsou na obou buněčných typech a zprostředkovávají adhezi mezi těmito dvěma buněčnými typy. MAEA je vyžadován pro organizaci erytroblastických ostrůvků a pro účinné odstranění jádra z erytroblastů (Dzierzak and Philipsen 2013, review).



**Obrázek 2 – Ostrůvek erytroblastů**

A) Fetální játra E13.5 – ostrůvek erytroblastů. Hněď jsou zbarveny centrální makrofágy, které jsou obklopeny erytroidními buňkami v různých stádiích diferenciaci. B) Schématická kresba erytroblastického ostrůvku (převzato z (Dzierzak and Philipsen 2013, review)).

### 3.1.1 Hemoglobin

Naivní erythrocyty jsou charakterizovány expresí embryonálních globinů, které vytváří u člověka hemoglobinové tetramery. Bezprostřední přechod mezi fetálním a dospělým globinem nastává s počátkem definitivní erythropoézy. Expresí specifického fetálního  $\gamma$ -globinu je rysem antropoidních primátů. Hemoglobinové tetramery se skládají z  $\alpha$ - a  $\gamma$ -globinových řetězců ( $2\alpha 2\gamma$ ) a u lidí jsou známé jako fetální hemoglobin (HbF). Tento typ hemoglobinu dovoluje vyvíjejícímu se plodu získat z mateřské krve kyslík efektivněji.

V dospělé erythropoéze je exprese fetálního globinu umlčena. Hemoglobinové tetramery skládající se z  $\alpha$ - a  $\beta$ -globinů ( $2\alpha 2\beta$ , HbA1) tvoří 97% veškerého hemoglobinu v dospělých erythrocytech. HbA2 ( $2\alpha 2\delta$ ) tvoří z celkového počtu hemoglobinu 2% a HbF 1% ve většině dospělých jedinců (Dzierzak and Philipsen 2013, review). Stejně jako ostatní vyšší obratlovci, zebřička exprimuje hemoglobin s kvartérní strukturou ( $\alpha_2, \beta_2$ ) a podstupuje globinové přepnutí z primitivního embryonálního hemoglobinu na dospělý (Zon 2005, review).

### 3.2 Hlavní regulátory erythropoézy

Gata1 je ústředním regulátorem vývoje erytrocytů. Tento transkripční faktor je důležitý pro diferenciaci proerytroblastů do maturovaných erytrocytů. Přítomnost Gata1 potlačuje expresi myeloidně-specifických genů, jako *Pu.1*, *Mpo* či *L-plastin*, a podporuje expresi genů erytroidně-specifických (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review).

Runx1 je důležitý pro celkovou definitivní hematopoézu, tedy pro tvorbu erytroidních, myeloidních i lymfoidních buněk. Runx1 knock-down vede také ke snížení exprese C-myb, jenž náleží do myb rodiny proto-onkogenů. C-myb hraje významnou roli v definitivní hematopoéze. Po provedení knockoutu C-myb u myši dochází k jejich smrti v důsledku selhání erythropoézy ve fetálních játrech (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review).

Faktor Gata2 je vyžadován pro udržování a proliferaci hematopoetických progenitorových buněk. Vyřazení funkce genu (knockout) Gata2 v myších je embryonálně letální z důvodu těžkých anémií (Jagannathan-Bogdan and Zon 2013, review). Gata1 a Gata2 se v primitivní erythropoéze funkčně překrývají. U myšičho embrya se současným vyřazením Gata1 a Gata2 dochází k selhání erytroidní diferenciaci, expanze progenitorů a defektům tvorby primitivních erytroidních buněk (Fujiwara, Chang et al. 2004).

Transkripční faktor KLF1 je vyžadován pro terminální erytroidní diferenciaci. Expresi KLF1 je převážně omezena na erytroidní buněčnou linii. KLF1 se konkrétně váže na sekvenci CCACACCCT v promotorech cílových genů (Dzierzak and Philipsen 2013, review). Pacienti s  $\beta$ -thalasémií, kteří nesou mutaci v KLF1 vazebném místě v  $\beta$ -globinovém promotoru vykazují silně sníženou expresi  $\beta$ -globinu (Faustino 1996). KLF1 dokonce aktivuje mnoho erytroidně specifických genů pro proteiny, které jsou důležité pro funkci a stabilitu erytrocytů. KLF1 má také roli v buněčném cyklu – zastavuje proliferaci, což je nutné pro terminální diferenciaci (Dzierzak and Philipsen 2013, review). U některých pacientů se srpkovitou anémií byla nalezena haploinsuficience pro KLF1. U těchto pacientů se projevovala vysoká hladina HbF a měli mírný fenotypový projev onemocnění (Borg, Papadopoulos et al. 2010). Na druhé straně missense mutace v promotoru, na který se váže KLF1 může mít dominantní fenotyp s těžkými následky (Arnaud, Saison et al. 2010).



## 4. Anémie

Anémie můžeme dělit z mnoha pohledů. Pro přehlednost jsem jedno z těchto rozdělení (Klener et al. 2011) vybrala a rozhodla jsem se jej použít také v této práci. V tomto přehledu jsou též zmíněny anémie, které zde dále již nerozebírám - to jsou např. anémie z krevních ztrát, autoimunitní hemolytické anémie atd. Tato práce pojednává především o dědičných anémiích, které jsou způsobeny např. poruchou složení erytrocytární membrány, poruchou enzymatického vybavení erytrocytu či poruchou tvorby hemoglobinu.

Anémie z poruchy tvorby prekurzorů erytrocytů

- Kongenitální dyserythropoetické anémie
- Anémie z poruchy hemoglobinizace erytrocytů

Anémie z nedostatku látek nutných pro normální proliferaci a maturaci erytrocytů

- Anémie z nedostatku železa – sideropenické anémie
- Anémie z nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové
- Anémie při chronickém onemocnění

Anémie ze zvýšeného zániku erytrocytů

- Korpuskulární hemolytické anémie
  - Hemolytické anémie z poruchy struktury erytrocytární membrány
  - Hemolytické anémie z poruchy enzymatické výbavy erytrocytů
  - Hemolytické anémie z poruchy tvorby hemoglobinu
- Extrakorpuskulární hemolytické anémie
  - Autoimunitní hemolytické anémie
  - Neimunitní hemolytické anémie

Anémie z krevních ztrát

Anémie nastává obecně, pokud selžou homeostatické mechanismy zodpovědné za rovnovážnou produkci červených krvinek. Jak bylo již zmíněno v úvodu, příčiny anémie postihující červené krvinky jsou popsány tři: snížení produkce erytrocytů, zvýšení jejich destrukce (hemolýza) či jejich ztráta (krvácení). Mnoho anémií spojených s hemolýzou je zapříčiněno mutacemi, které snižují produkci či funkci třech hlavních tříd proteinů: glykolytický nebo hexosový monofosfátový enzym (jako je tomu u deficiencie glukosa-6-fosfát dehydrogenázy),

membránové komponenty erytrocytů (dědičná sférocytóza) a hemoglobin (srpkovitá anémie (SCD) a thalasémie) (Sankaran and Weiss 2015, review).

Na tomto místě je vhodné poznamenat, že anémie je celosvětově hlavním zdrojem morbidit a mortality. Kassebaum et al. udělali jedinečnou kompletní analýzu anémií od roku 1990 do roku 2010, kde zahrnuli 187 zemí, obě pohlaví a 20 věkových skupin. Rozšíření anémie se snížilo ze 40,2 % v roce 1990 na přibližně jednu třetinu z celosvětové populace v roce 2010 (Kassebaum, Jasrasaria et al. 2014).

#### 4.1 Hemolytické anémie z poruchy tvorby hemoglobinu

Do této skupiny patří srpkovitá anémie (SCD) a  $\beta$ -thalasémie, které jsou velmi rozšířené (Kassebaum, Jasrasaria et al. 2014).  $\beta$ -thalasémie je způsobena mutacemi  $\beta$ -globinových genů, které snižují produkci  $\beta$ -globinových polypeptidů. Následně vznikají volné  $\alpha$ -globinové molekuly, které tvoří nerozpustné agregáty a poškozují erytroidní prekurzory (Khandros, Thom et al. 2012). Za nepatologického stavu dochází v pozdních stádiích maturace erytoblastů k transportu HSP70 do jádra, kde brání kaspáze-3, aby štěpila GATA1. U nemocných  $\beta$ -thalasémií se nadbytek  $\alpha$ -globinu váže v cytoplazmě na chaperon HSP70, čímž jej dočasně vyřadí. Tato událost destabilizuje hlavní transkripční faktor erytropoézy GATA1, což změní genovou expresi a přispívá k defektní erytropoéze (Arlet, Ribeil et al. 2014). Dále Khandros et al. při pokusech na  $\beta$ -thalasémických myších zjistili, že systémová inhibice proteasomu vede k aktivaci autofágie a ubiquitinem zprostředkované proteolýzy, které odstraní volné  $\alpha$ -globiny (Khandros, Thom et al. 2012).

V případě SCD jsou erytrocyty deformovány do srpkovitého tvaru. Patologický hemoglobin S (HbS) vzniká substitucí kyseliny glutamové valinem v 6. pozici  $\beta$ -řetězce globinu. Dochází tak k záměně polární aminokyseliny za nepolární, což vede ke snížené rozpustnosti hemoglobinu s tendencí k jeho polymerizaci v redukováném stavu, v oxidovaném stavu brání polymerizaci vazba kyslíku. Erytrocyt má porušenou propustnost membrány, intracelulárně se hromadí vápník a dochází ke zvýšené autooxidaci hemoglobinu s uvolněním železa (Klener et al. 2011).

U SCD dochází k rozpadu červených krvinek, což způsobuje uvolnění hemoglobinu (Hb) do plasmy, následně volný Hb degraduje vasodilatátor NO. Hb propustí volné hemy, které aktivují neutrofile (Sankaran and Weiss 2015, review). U mnoha hemolytických onemocnění jako je SCD vyvolává volný hemoglobin poškození cév. Možný terapeutický potenciál zde mají endogenní plasmatické proteiny haptoglobin a hemopexin, které vycytávají cirkulující Hb a hemy (Deuel, Vallelian et al. 2015). Další terapeutickou možností jsou stálé transfuze erytrocytů, které však

zapříčiňují zahlcení železem a poškození mnoha orgánů. Úspěšná transplantace kmenových buněk je vhodná pro SCD i  $\beta$ -thalasémie, ale je omezena toxicitou a dostupností dárce (Locatelli, Kabbara et al. 2013). Stále se tedy hledají další možnosti léčby.

Poměrně zajímavá je spojitost mezi srpkovitou anémií a malárií. V tropických a subtropických oblastech mají výhodu heterozygotní jedinci, kteří mají pouze tzv. charakter srpkovité anémie. Evolučně se zde SCD vyvinula, protože poskytuje jedincům rezistenci proti malárii. HbS změní tvar krvinek a jeho zvyšující se hladina brání růstu *P. falciparum*, prvoku způsobujícímu malárii (LaMonte, Philip et al. 2012, Elguero, Delicat-Loembet et al. 2015).

## 4.2 Fanconiho anémie

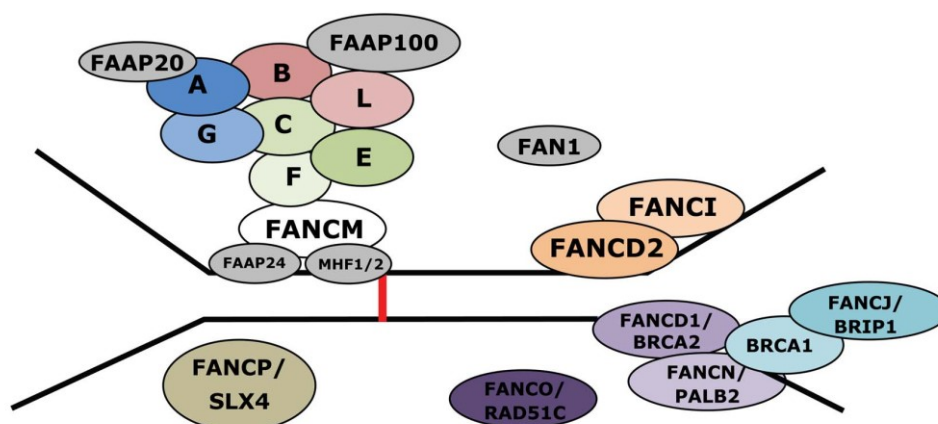
Fanconiho anémie (FA) je vzácné autozomální (výjimečně X-vázané) genetické onemocnění spojené se selháním kostní dřeně, vývojovými defekty a zvyšující se náchylností k rakovině, především k nádorům gynekologické povahy a nádorům hlavy a krku. Proteiny, které jsou kódovány tzv. geny FA, opravují poškození DNA a zachovávají stabilitu genomu. Hlavní funkcí dráhy Fanconiho anémie (tzv. dráhy FA-BRCA) je řídit opravu mezivláknových křížení DNA (ICLs) (Mamrak, Shimamura et al. 2016, review). Dráha Fanconiho anémie má však další důležitou funkci - kontroluje segregaci chromozomů během mitózy a předchází aneuploidii (Nalepa, Enzor et al. 2013). Nedávno bylo také prokázáno, že DNA-RNA hybridy vznikající z poškozené transkripce či střetnutím replikace a transkripce, taktéž aktivují dráhu Fanconiho anémie (Schwab, Nieminuszczy et al. 2015). FA nastává tehdy, pokud dojde k mutaci v jednom z genů dráhy FA, kterých je v současné době identifikováno a blíže zkoumáno 21. Průměrná délka života pacientů s FA je přibližně 33 let (Mamrak, Shimamura et al. 2016, review).

Vzhledem k široké škále fenotypového projevu je poměrně těžké toto onemocnění diagnostikovat. Současný diagnostický test pro FA je založen na cytogenetické kvantifikaci chromosomálních zlomů v odpovědi na diepoxybutan (DEB) či mitomycin C (MMC) (Shimamura, Montes de Oca et al. 2002).

### 4.2.1 Molekulární podstata dráhy Fanconiho anémie

Jádro komplexu dráhy Fanconiho anémie se skládá ze tří subkomplexů. FANCA-FANCG-FAAP20 tvoří první subkomplex, dalším subkomplexem je FANCB-FANCL-FAAP100 poskytující monoubiquitinylační katalytickou aktivitu a poslední je subkomplex FANCC-FANCE-FANCF (Huang, Leung et al. 2014). FANCM kotvící komplex podporuje posilnění chromatinu jádra komplexu Fanconiho anémie (Coulthard, Deans et al. 2013). FANCD2 a FANCI vytváří heterodimer známý jako ID2. Monoubiquitinylovaný ID2 pak asociuje na chromatinu s proteiny DNA opravy. Během poslední fáze ICL opravy BRCA2/FANCD1,

BRIP1/FANCI, PALB2/FANCD1, RAD51C/FANCD2, BRCA1/FANCD1, RAD51/FANCD1 a XRCC2/FANCD1 spolupracují na opravě zlomeného duplexu prostřednictvím homologní rekombinace (Mamrak, Shimamura et al. 2016, review), viz obr. 4.



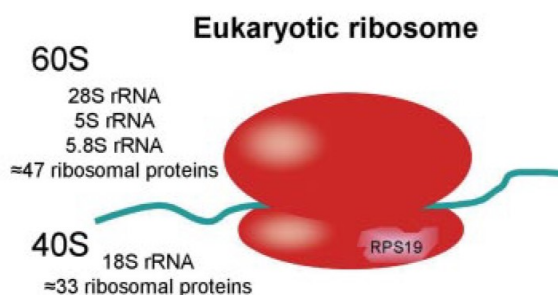
**Obrázek 4 – Dráha Fanconiho anémie**

Ubiquitinylace FANCD2 a FANCI je zásadní událostí dráhy Fanconiho anémie. Tato ubiquitinylační reakce je katalyzována jádrem komplexu FA. FANCD2 a FANCI doplňují ostatní faktory této dráhy (FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCP/SLX4...) v opravě poškození DNA. Proteiny asociující s jádrem komplexu FA se nazývají proteiny asociované s Fanconiho anémií (FAAP) a jsou to FAAP20, FAAP100, FAAP24, MHF1/2. FAN1 je nukleáza asociovaná s FANCD2/FANCI (převzato z (Haitjema, Brandt et al. 2013)).

#### 4.3 Diamondova-Blackfanova anémie

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je vzácná dědičná anémie. Většina pacientů s DBA má autosomální dominantní mutace v jednom z nejméně 12 genů kódujících ribosomální proteiny (Sankaran and Weiss 2015, review). Jedná se o čistě dědičné onemocnění, které způsobuje aplazii červených krvinek. Obvykle se projevuje do jednoho roku po narození. Pacienti s DBA mají snížený výskyt prekurzorů červených krvinek v kostní dřeni, což je způsobeno apoptózou či blokadí jejich diferenciací. Tento stav může být doprovázen zvýšením krevních destiček a snížením počtu leukocytů (Taylor and Zon 2011, review). Jako první byla identifikována mutace v genu RPS19, která se vyskytuje u 25% pacientů s DBA, viz obr. 5. RPS19 má funkci v erythropoéze a embryogenezi (Draptchinskaja 1999). Onemocnění je doprovázeno různými typy mutací - nonsense, missense, frameshift či splice site mutace. Stále je poměrně nejasné, proč se pacienti se stejnou mutací jako někteří členové jejich rodiny liší v symptomech i vážnosti onemocnění. Pacienti vždy nesou i jednu wild-type kopii daného ribosomálního proteinu, což ukazuje na haploinsuficienci (Taylor and Zon 2011, review).

Léčení pacientů s DBA zahrnuje kortikosteroidy a transfuzní terapie. Ne vždy je však léčba účinná a může docházet k návratu chorobného stavu. Další možností léčby je transplantace hematopoetických kmenových buněk (Taylor and Zon 2011, review).

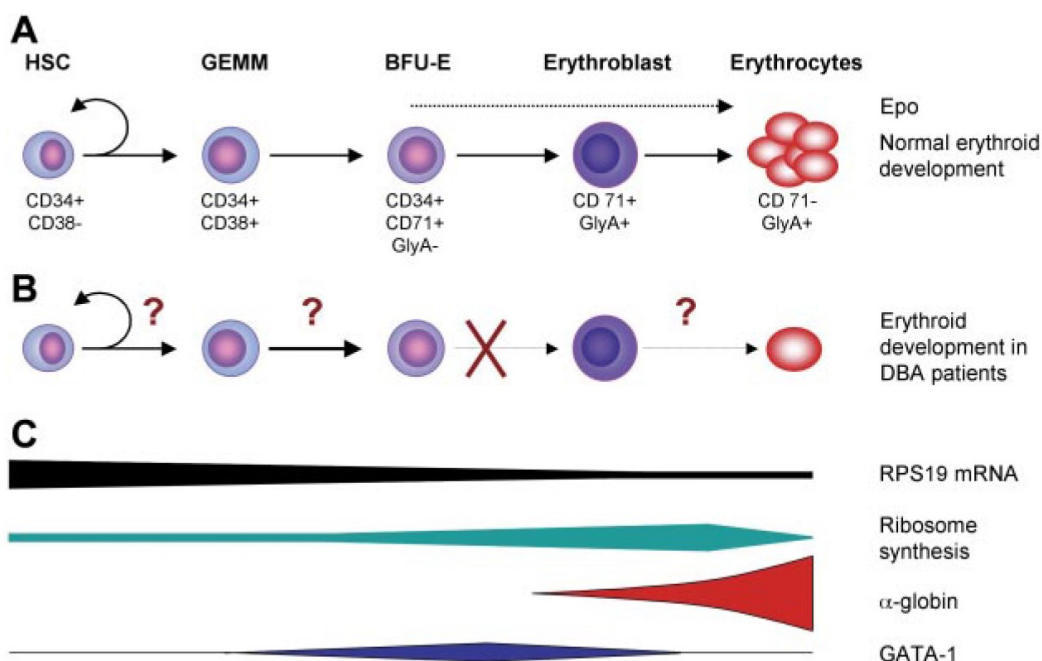


**Obrázek 5 – Eukaryotický ribozom a RPS19**

Eukaryotický ribozom se skládá z ribozomálních proteinů a ribozomální RNA. Ribozom a jeho podjednotky jsou označeny v jednotkách Svedberg (S). Malá podjednotka je označena jako 40S, velká podjednotka 60S a celý ribozom jako 80S. 40S je makromolekula, která se skládá z 18S rRNA a 33 ribozomálních proteinů. Jeden z těchto proteinů se nazývá RPS19 (převzato z (Flygare and Karlsson 2007, review)).

#### 4.3.1 Patologie DBA

Pokud jsou ribozomální proteiny mutovány nebo je snížen jejich počet, dochází k poruše biogeneze ribozomů a rRNA zpracování. Vztah mezi mutacemi ribozomálních proteinů a symptomy DBA zůstávají neznámé. Podle jedné z hypotéz tyto mutace vedou k celkovým defektům translace, což může zapříčinit poškození mnoha různých tkání. Erytroidní linie je více náchylná k těmto defektům, protože červené krvinky vyžadují vysokou hladinu syntézy proteinů a zejména globinu. Snížení hladiny globinu může vést k nadbytku volného hemu, což může mít roli v patologii tohoto onemocnění (Taylor and Zon 2011, review). Další hypotéza pak tvrdí, že defekty v biogenezi ribozomů, které jsou zapříčiněny mutacemi ribozomálních proteinů, mohou zprostředkovat fenotyp DBA. Defekty v biogenezi ribozomů mohou způsobit spuštění dráhy jaderného stresu, která zahrnuje dráhu p53. Nahromadění p53 redukuje množství erytrocytů. Přesný mechanismus translačních defektů ale není doposud jasný (McGowan, Li et al. 2008). Jedním obecným mechanismem však může být snížení translace GATA1 mRNA, která kóduje esenciální erytroidní transkripční faktor (Ludwig, Gazda et al. 2014), viz obr. 6.



**Obrázek 6 – Normální a DBA erythropoéza**

A) Na tomto obrázku vidíme sérii diferenačních procesů během vývoje červené krvinky. Hlavní regulátor terminální erythropoézy je EPO. Pod buňkami jsou uvedeny obecné buněčné markery. B) V pacientech s DBA je erytroidní vývoj značně omezen. Erytroidní defekt nastává v Epo závislých stádiích po BFU-E stádiu, ale mohou být postiženy i časnější progenitory. C) Expze RPS19 je vysoká v časných progenitorových buňkách a snižuje se ve více maturovaných erytroidních buňkách. Na rozdíl od časných progenitorů mají maturované erytroidní prekurzory velmi vysokou rychlost ribozomální syntézy. Obrázek znázorňuje načasování expze erytroidních transkripčních faktorů. Epo – erythropoetin, HSC – hematopoetická kmenová buňka, GEMM – jednotky tvořící kolonie granulocytů, erytrocytů, makrofágů, megakaryocytů, BFU-E – erythrocyt burst-forming unit, CD34 je pozitivní buněčný marker pro hematopoetické progenitorové buňky, CD38 je negativní buněčný marker pro časné hematopoetické progenitorové buňky, CD71 je transferinový receptor, GlyA je glykoforin A (převzato z (Flygare and Karlsson 2007, review)).

#### 4.3.2 Souvislost s výskytem rakoviny

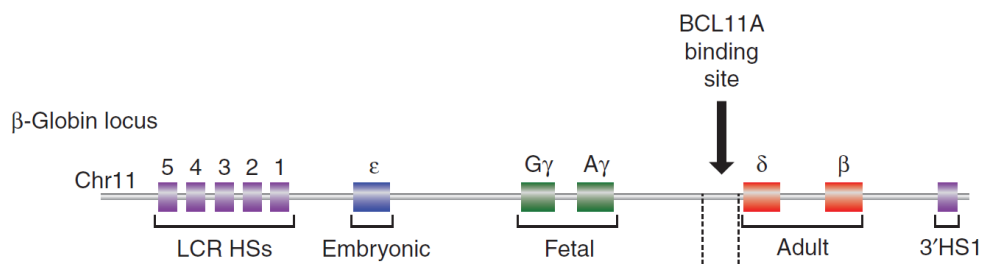
Zebříčky poskytly bezprostřední důkaz, že mutace v ribozomálních proteinech způsobují náchylnost k rakovině (Danilova, Sakamoto et al. 2008). V tom má pravděpodobně důležitou roli p53. Mutace v p53 u rybích homozygotů způsobuje zhoubný tumor periferních nervů. Hladina proteinu p53 se snižuje, ale hladina RNA zůstává nedotčena. Jelikož celková hladina proteinů není v těchto tumorech nijak postižena, zřejmě není defektní celková translace. Ribozomální proteinové mutace v dospělých heterozygotech zapříčiňují specifické snížení translace p53. Pro pochopení tohoto problému je důležité porozumět tomu, jak probíhá translace p53 v nádorových a krevních buňkách (Taylor and Zon 2011, review).

#### 4.4 Léčba anemických onemocnění

Slibným prostředkem pro léčbu anémií a onemocnění s neúčinnou erythropoézou by mohl být sotatercept, který vyvolává poměrně velké zvýšení množství Hb a RBCs (Sherman, Borgstein et al. 2013). Sotatercept byl původně vytvořen k léčbě úbytku kostní hmoty, ale klinické studie odhalily zvyšující hematokrit a hladinu hemoglobinu. Molekulární podstata tohoto účinku je ovšem nejasná a vyžaduje další zkoumání (Dussiot, Maciel et al. 2014).

HbF se skládá ze dvou  $\alpha$ - a dvou  $\gamma$ -globinových řetězců, podporuje transport kyslíku ve fétu. Přepnutí z fetálního na dospělý hemoglobin se začíná uskutečňovat během narození, což je důvod, proč se u lidí  $\beta$ -thalasémie a SCD projevují až v pozdním dětství (Sankaran and Weiss 2015, review). Výzkum přepnutí hemoglobinu je důležitý pro vývoj terapeutických přístupů, jejichž cílem je navození fetálního hemoglobinu v  $\beta$ -hemoglobinopatiích. Mutace v regulačních oblastech  $\beta$ -globinového lokusu, která inhibuje přepnutí z  $\gamma$ - na  $\beta$ -globin, má za následek zvýšenou hladinu HbF během života jedince. Tento stav se označuje jako dědičné přetrvání fetálního hemoglobinu (HPFH) (Sankaran 2011). Zablokování přechodu z  $\gamma$ - na  $\beta$ -globin pomocí léčiv či genetických manipulací může být efektivním nástrojem pro léčbu SCD a  $\beta$ -thalasémie. Jedinci se samotným HPFH jsou bez symptomů, což poukazuje na skutečnost, že přetrvání vysoké hladiny HbF v dospělých jedincích nemá žádné nepříznivé důsledky (Sankaran and Orkin 2013, review).

Rozdílná množství HbF v dospělosti ovlivňují závažnost SCD a  $\beta$ -thalasémie. Transkripční faktor BCL11A ovlivňuje hladinu HbF, a proto jej Sankaran et al. zkoumali jako potenciální regulátor HbF exprese, viz obr. 7. V primitivní erythropoéze je omezena exprese plnodélkového BCL11A, což umožňuje vysokou hladinu HbF. Potlačení exprese BCL11A v dospělých erytroidních buňkách vede k masivní expresi HbF (Sankaran 2008). BCL11A mění  $\beta$ -globinový klastr tvorbou chromosomální smyčky. BCL11A, SOX6 a GATA1 spolupracují při umlčení transkripce  $\gamma$ -globinu v dospělých erytroidních progenitorech (Xu, Sankaran et al. 2010). Zvýšení hladiny fetálního hemoglobinu snižuje závažnost  $\beta$ -thalasémie, což se jeví jako výzva pro genovou terapii cílící na zesílení HbF. Pro tuto studii byly využity lentivirové vektory kódující lidský  $\gamma$ -globinový gen a syntetický transkripční faktor interagující s promotory  $\gamma$ -globinového genu či krátká vlásenka RNA zasahující BCL11A. Genetická reaktivace  $\gamma$ -globinových genů má potenciál poskytnout dostatečnou hladinu HbF pro pacienty s nedostatkem  $\beta$ -globinu. BCL11A se tak stává farmakologickým cílem (Wilber, Hargrove et al. 2011).



**Obrázek 7 – Model regulace umlčení  $\gamma$ -globinu v lidském  $\beta$ -globinovém lokusu**

Tento obrázek ukazuje lidský  $\beta$ -globinový lokus s oblastí o velikosti 3 kb upstream od  $\gamma$ -globinového genu. BCL11A se váže na chromatin v této 3 kb dlouhé oblasti a přispívá k umlčení transkripce  $\gamma$ -globinu. Tzv. „Oblast kontrolující lokus“ (LCR) je enhancerem  $\beta$ -globinového lokusu společně s hypersensitivními místy pro DNAsu I (HSs) (převzato z (Sankaran and Orkin 2013, review)).

Dalším a lépe uskutečnitelným cílem může být inhibice asociovaných enzymů transkripčních faktorů, které regulují genovou expresi modifikací histonů a dalších jaderných proteinů. Například histon deacetylázy (HDACs) jsou jaderné proteiny, které asociují s transkripčními faktory regulujícími expresi HbF. Prototypem inhibitorů histon deacetyláz je butyrát, který reaktivuje umlčené geny vyvoláním epigenetických modifikací. Butyrát spouští produkci fetálního hemoglobinu u pacientů s poruchami dospělého hemoglobinu, ale mechanismus indukce zatím není zcela znám. Methylace DNA je důležitá pro umlčení  $\beta$ -globinových genů v neerytroidních hematopoetických buňkách. Epigenetické modifikace mají obrovskou roli v regulaci exprese globinových genů, což může být dalším farmakologickým cílem (Fathallah, Weinberg et al. 2007). Chemický a RNAi screening ukázal, že inhibice HDAC1 a HDAC2 způsobuje tvorbu HbF v primárních lidských erytroblastech (Bradner, Mak et al. 2010). Nevýhodou epigenetických enzymů je, že jsou exprimovány všudypřítomně a mají různé funkce, a proto jejich dlouhodobá inhibice může být toxická.

Nejtěžší forma  $\beta$ -thalasémie vyžaduje stálou transfuzi erytrocytů, která však vede ke zmiňovanému přetížení železem. Nicméně i další formy  $\beta$ -thalasémie vedou k přesycení železem v důsledku nefunkční erytropoézy, což způsobuje supresi syntézy hepcidinu, jehož funkcí je snižovat příjem železa ze stravy a podporovat recyklaci železa makrofágy. Bylo však prokázáno, že suprese membránově vázané serinové proteázy TMPRSS6 exprimované v hepatocytech stimuluje produkci hepcidinu, který může být terapeuticky využíván k redukci zahlcení železem v důsledku transfuzí (Raffaella 2007, Schmidt 2013).

Kongenitální formy anémie jako například  $\beta$ -hemoglobinopatická onemocnění jsou rozšířeny celosvětově (Kassebaum, Jasarasia et al. 2014).  $\beta$ -thalasémie a SCD jsou způsobeny mutacemi v jednom genu, jsou tedy dobře přístupné pro genovou terapii. Hematopoetické kmenové a progenitorové buňky (HSPCs) jsou vyjmuty z pacienta, je modifikována exprese  $\beta$ -globinového proteinu v erytroidních prekurzorech a nakonec jsou HSPCs vráceny zpět.



Pozměněné HSCs znovu vytvoří hematopoetický systém včetně normálních erytrocytů (Sankaran and Weiss 2015, review). Potenciál genové terapie v  $\beta$ -hemoglobinopatiích dále dokázal Cavazzana-Calvo et al., když se po přenosu lentivirového vektoru s  $\beta$ -globinovým genem do dospělého pacienta s těžkou  $\beta^E/\beta^0$ -thalasémií závislého na měsíčních transfuzích, stal tento pacient na transfuzích nezávislý (Cavazzana-Calvo, Payen et al. 2010).

Dalším ideálním cílem pro léčbu genovou terapií jsou monogenická erytroidní onemocnění jako je Diamondova-Blackfanova anémie (DBA). Konkrétně pro tuto práci byly použity  $CD34^+$  buňky periferní krve transdukované onkoretrovirovým vektorem s kočičí endogenní retrovirovou obálkou. Vektory obsahovaly dva různé promotory s rozdílnou hladinou exprese RPS19. Tyto transdukované buňky byly transplantovány do myši pro zhodnocení terapeutického efektu in vivo. Pro opravu erytroidního vývoje je vyžadována vysoká hladina exprese RPS19 (Flygare, Olsson et al. 2008).

Sankaran et al. po sekvenování dvou sourozenců s neznámou mutací pro DBA ukázali, že DBA může být také způsobena mutacemi v hematopoetickém transkripčním faktoru GATA1. Tato mutace se nacházela v sestřihovém místě genu *GATA1* a zabraňovala tvorbě jeho plné délky (Sankaran, Ghazvinian et al. 2012). Translace GATA1 mRNA byla poškozena selektivně v erytroblastech pacientů s DBA, kteří nesli mutace v genech pro ribozomální proteiny. Defektní hematopoéza pozorovaná u pacientů s DBA, která je zapříčiněna haploinsuficiencí ribozomálních proteinů, by tak mohla být částečně překonána zvyšující se hladinou GATA1 (Ludwig, Gazda et al. 2014). Vektor, který kóduje GATA1 tak může představovat všestrannější přístup genové terapie pro některé formy DBA.

Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (HiPSCs) derivované z pacienta mají obrovský potenciál pro vývoj nových buněčných a genových terapií. Nedávný vývoj genomové editace nabízí nové přístupy. Mutace SCD a  $\beta$ -thalasémií mohou být napraveny genovou editací v pluripotentních kmenových buňkách (Sun and Zhao 2014). Oprava mutací zapříčiněnými  $\beta$ -thalasémií v iPSCs může obnovit normální funkci a poskytnout bohatý zdroj buněk pro transplantaci. V této studii použil Xie et al. k účinné opravě mutací hemoglobinového beta genu od pacienta derivovaných iPSCs nejnovější nástroj genové editace CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 technologii kombinovanou s piggyBac transpozonom. Tím ukázali významný krok k budoucí aplikaci genové terapie založené na kmenových buňkách (Xie, Ye et al. 2014). Technologicky propracované, ale drahé přístupy jako genová terapie či infuze léčiv však nejsou z ekonomických důvodů aplikovatelné v rozvojových zemích, kde jsou SCD a  $\beta$ -thalasémie běžné (Kassebaum, Jasrasaria et al. 2014). Je tedy potřeba najít léčbu, která může být široce využívána.

## 5. Modely pro studium anemických onemocnění

### 5.1 Lidský buněčný model

#### 5.1.1 Indukované pluripotentní kmenové buňky

iPSCs nesoucí monogenické mutace mají obrovský potenciál pro modelování onemocnění, screening látek a také buněčnou terapii. Přístupem založeným na homologní rekombinaci byly opraveny SCD mutace v iPSCs pacientů se dvěma mutovanými  $\beta$ -globinovými alelami. Pro získání daných klonů byl použit plasmid obsahující rezistentní genovou kazetu s loxP místy, které později odstranila Cre rekombináza. Po genové opravě byly získány heterozygotní  $\beta^S/\beta^A$  iPSCs, které exprimují 25-40% wild-type transkriptu, pokud se diferencují do erytrocytů (Zou, Mali et al. 2011). Lidské iPSCs nabízí perspektivy pro buněčnou terapii a jsou modelem pro zkoumání onemocnění.

Kobari et al. jako model pro normální a patologickou erytroidní diferenciaci použili iPSCs zdravých pacientů a pacientů s SCD. Populace erytroblastů vytvořené z normálních a patologických iPSCs byla vpravena do imunodeficientních myší k pochopení in vivo maturace hemoglobinu. Dokázali, že lidské iPSCs mohou dosáhnout terminální erytroidní maturace. Takový výzkum otevírá cestu funkční opravy červených krvinek z indukovaných pluripotentních kmenových buněk SCD bez potřeby jakýchkoliv léků (Kobari, Yates et al. 2012). Ex vivo genová oprava HSCs získaných od pacienta následovaná autologní transplantací může být využívána k léčbě SCD či  $\beta$ -thalasémie. Pro tuto práci byl použit CRISPR/Cas9 systém genové editace, který kombinuje Cas9 ribonukleoproteiny a adeno-asociovaný virový vektor figurující jako homologní donor vykonávající homologní rekombinaci  $\beta$ -globinového genu v HSCs. Prokázala se účinná oprava Glu6Val mutace SCD použitím kmenových a progenitorových buněk získaných od pacientů, které po diferenciaci do erytrocytů exprimovaly dospělou  $\beta$ -globinovou mRNA. To potvrzuje neporušenou transkripční regulaci opravených alel  $\beta$ -globinových genů. Metody založené na CRISPR se stávají pro  $\beta$ -hemoglobinopatie terapií nové generace (Dever, Bak et al. 2016).

Myší model Fanconiho anémie se neprojevoval aplázií kostní dřeně jako tomu je u lidí, a proto byl vhodný jiný model – lidské buňky. V současné době je možné získat iPSC z konkrétního pacienta za účelem výzkumu. Lidské embryonální kmenové buňky a lidské iPSCs s FANCC deficiencí jsou schopné hematopoetické diferenciaci, ale byla detekována zvýšená apoptóza progenitorů v kultuře. Lidské embryonální kmenové buňky jsou užitečným modelovým systémem pro zkoumání časných událostí specifikace hematopoetických kmenových buněk (Yung, Tilgner

et al. 2013). Osborn et al. využili fibroblasty derivované z pacienta s Fanconiho anémií jako model pro testování schopnosti CRISPR/Cas9 nukleázového systému vytvořit genovou korekci. Prokázali, že Cas9 nukleáza a nikáza způsobují genové opravy, ale nikáza přednostně zprostředkovává homologickou opravu, což vede k vyšší frekvenci opravených klonálních izolátů (Osborn, Gabriel et al. 2015).

### 5.1.2 Objasnění funkce RPS19 v hematopoéze

Umlčení RPS19 snižuje kapacitu proliferace hematopoetických progenitorů, což vede k defektům ve vývoji hematopoézy. Ke studiu účinku RPS19 deficiencie v hematopoéze sloužily transdukované pupečnickové krevní buňky a buňky kostní dřeně pozitivní na CD34 (marker hematopoetických kmenových a progenitorových buněk). Vzorky pupečnickové krve a kostní dřeně byly odebrány od zdravých dárců. K umlčení RPS19 byly použity tři lentivirové vektory, které kódovaly siRNA proti RPS19 a směsný kontrolní vektor. Hladina umlčení RPS19 mRNA korelovala s mírou erytroidních defektů. Těmto erytroidním defektům lze zabránit expresí RPS19 transkriptu rezistentního k siRNA (Flygare, Kiefer et al. 2005).

## 5.2 *Mus musculus*

Myš je nepostradatelným savčím modelem pro studium hematopoézy. Na tomto modelu došlo k odhalení sebeobnovujících se multipotentních kmenových buněk a je nástrojem pro porozumění diferenciační kapacity časných hematopoetických progenitorů. Genetické technologie posilují užití myších modelů pro identifikaci kritických cest v hematopoéze. Hlavní genetické a buněčné procesy hematopoézy byly identifikovány tkáňově specifickou genovou delecí, genetickými nadexpresními modely či modely, u kterých došlo k vyrušení funkce genu v celém organismu (knockout). Genetická přístupnost myši jakožto savčího systému umožňuje identifikaci klíčových regulátorů hematopoetického vývoje a výhodou je i její blízký evoluční vztah k lidem. Vznik krve jako jediné kmenové buňky derivující linii byl objasněn až v 60. letech 20. století s využitím transplantace u myších modelů. In utero vývoj ovšem neumožňuje snadnou manipulaci s myším embryem.

### 5.2.1 Genetické manipulace v *M. musculus*

Myší modely pro  $\beta$ -thalasémii jsou získány delecí  $\beta$ -globinových genů, ale absence  $\beta$ -globinové exprese vede ke smrti homozygotních myší in utero, což činí tento model pro pokračující studie nevhodným. Heterozygotní zvířata odvozená z myších embryonálních kmenových buněk, které mají delecí obou dospělých  $\beta$ -globinových genů, jsou těžce anemická (Ciavatta 1995). Myši nemají typický ekvivalent lidského HbF, a proto běžný myší model neexprimuje klasický přechod z HbF na HbA jako tomu je u lidí. Huo et al. proto vytvořili

humanizovaný myší model pro zkoumání  $\beta$ -thalasémie, který blízce napodobuje přepnutí z fetálního do dospělého hemoglobinu (McConnell, Huo et al. 2011).

S příchodem technologie Cre rekombináz může být studována genová funkce v tkáňově specifickém kontextu. Když zkřížíme myší linii s genem našeho zájmu obklopeným loxP místy, daný genový segment je v konkrétní tkáni vyrušen (Bunting 1999). Důležitou aplikací Cre-Lox systému je určení buněčného osudu (Zambrowicz 1997), například porozumění místu vzniku definitivních HSCs. Cre rekombinázový systém byl využit ke specifickému vyrušení Runx1 exprese v endoteliálním a hematopoetickém kontextu, kdy bylo pozorováno, že jeho endoteliální exprese je kritická pro vznik HSCs (Chen, Yokomizo et al. 2009).

Další technologií, která se velmi rychle uchytila je CRISPR/Cas9 systém genomové editace. Cas9 nukleáza je směřována krátkými RNA (sgRNA), které navodí přesné rozštěpení endogenního místa genomu v myších a lidských buňkách (Cong 2013). Wand et al. ukázali, že CRISPR/Cas9 genová editace dovoluje současné přerušení pěti genů v myších embryonálních kmenových buňkách s vysokou účinností. CRISPR/Cas9 systém tak dovoluje jednokrokové vytvoření mutací ve více genech a stává se cestou urychlující in vivo studium interakce genů (Wang, Yang et al. 2013).

Lei et al. vytvořili metodu pro kontrolu genové exprese založenou na Cas9, RNA-guided DNA endonukleáze typu II CRISPR systému, která se nazývá CRISPR interference (CRISPRi) (Lei 2013). Spojení tzv. dCas9 (mutantní Cas9 bez endonukleázové aktivity) s transkripční represorovou doménou může robustně umlčet expresi mnoha endogenních genů. RNA-seq analýza ukazuje, že transkripční represe pomocí CRISPRi je vysoce specifická. CRISPRi je silným nástrojem pro přesnou regulaci genové exprese v eukaryotických buňkách (Gilbert 2013).

### 5.2.2 Možné využití v klinické praxi

Genová terapie spočívající v kombinaci CRISPR/Cas9 a technologie iPSCs se jeví jako vhodná možnost léčby pacientů s  $\beta$ -thalasémií. Technika CRISPR/Cas9 skýtá velký potenciál pro léčbu genetických onemocnění. Indukované pluripotentní kmenové buňky vznikají ze somatických buněk pacienta. Pomocí CRISPR/Cas9 došlo k opravě mutací  $\beta$ -thalasémie v iPSCs, ze kterých se derivovaly HSCs a ty byly injikovány do subletálně ozářených NOD-scid-IL2Rg<sup>-/-</sup> (NSI) myší. Exprese  $\beta$ -hemoglobinu byla pozorována v těchto HSCs po hematopoetické diferenciaci v NSI myších. Důležité je, že deset týdnů po implantaci HSCs do NSI myší nebyl zjištěn tumorový potenciál. Při tomto zkoumání byly použity NSI myši s těžkým poškozením imunitního systému, které byly vhodné pro xenotransplantace a allotransplantace (Ou, Niu et al. 2016).

Jackson et al. ukázali mnohostní a neinvazivní preklinické zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) pro zhodnocení  $\beta$ -thalasémie v  $\gamma\beta^0/\gamma\beta^A$  humanizovaných myších modelech. U  $\beta$ -thalasémie můžeme pozorovat těžké zvětšení srdce, jater a sleziny. Získaná data ukazují vysokou citlivost k přesycení železem a silný vztah mezi kvantitativní regenerační dobou MRI a obsahem železa v játrech. Tyto změny předchází náporu přesycení železem a slouží jako časný biomarker průběhu onemocnění (Jackson, Vlachodimitropoulou et al. 2017).

Na vystopování klonálních potomků buněk se používají retrovirové vektory se značkou nahodilé sekvence neboli „barcode“, které jsou unikátní a dědičnou známkou integrovanou do genomu buňky. Tyto buněčné barcody dovolují jednoduché a citlivé zhodnocení klonality a jsou slibné také pro genové terapie. Po transdukcii jsou buňky kostní dřeně myši transplantovány do letálně ozářených myší s následným vyhodnocením. Aplikace metody buněčného „barcodingu“ nám může pomoci porozumět klonální dynamice transplantace kostní dřeně (Gerrits, Dykstra et al. 2010).

Jak je zřejmé ze zmíněných studií, myší systém jakožto model blízký člověku, je enormně důležitý v našem porozumění hematopoézy a biologie HSCs ve vyšších obratlovcích.

### 5.3 *Gallus gallus*

Ačkoliv byl ptačí model na poli hematopoetického vývoje naprosto průkopnickým, v oblasti výzkumu anémie se zdaleka tak neuplatňuje a je nahrazován jinými modely. Na tomto modelu byly učiněny zcela zásadní hematopoetické objevy jako například identifikace viru ptačí erytroblastózy. Tento retrovirus v sobě nese virové onkogeny *v-erbA* a *v-erbB*, které zapříčiňují erytroblastózu, rakovinu a sarkomy v kuřatech, dále transformují erytroidní progenitory a fibroblasty kuřecích embryí *in vitro* (Graf and Beug 1978, Bister 1979). Vzhledem k těmto skutečnostem jej zde stručně zmiňuji. I když tedy tento model není hojně využíván ke studiu anémie, je využíván ke studiu hematopoézy, jejíž pochopení je podstatné právě pro výzkum hematopoetických onemocnění.

### 5.4 *Xenopus laevis*

Ač není *X. laevis* typickým hematopoetickým modelem, má zajímavé využití ve studiu Fanconiho anémie (FA). Jak myší, tak i lidský buněčný model mají pro zkoumání FA určitá omezení. Vzhledem k tomu, že onemocnění není tak časté, počet lidských buněčných linií s FA je poměrně omezen. U myšího modelu Fanconiho anémie nedochází ke spontánnímu selhání kostní dřeně a neshrnuje tedy zcela fenotypy pacientů.

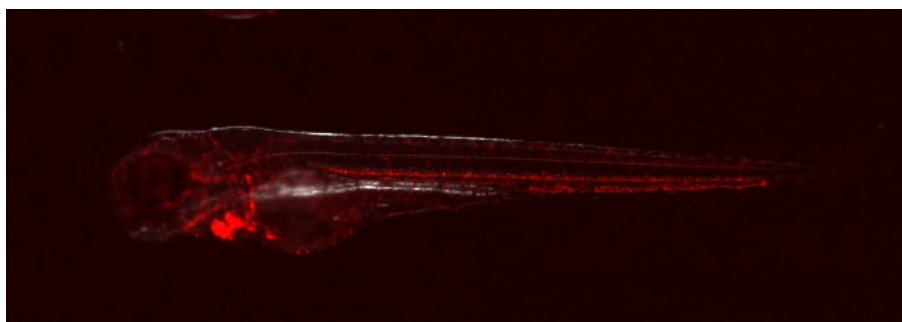
Výhodné se zdá být využití oocytů z *X. laevis*, které prokázaly aktivní mechanismus oprav ICLs, což je kovalentní spojení mezi vlákny dvoušroubovice DNA, které je pro buňku cytotoxické

a k jeho opravě jsou potřeba právě produkty genů FA (Raschle, Knipscheer et al. 2008). U obratlovců se nachází hlavní dráha opravy ICLs v S fázi buněčného cyklu. Tento děj vyžaduje dráhu Fanconiho anémie, strukturně specifické endonukleázy, přepisující DNA polymerázy a rekombinázy. Zatímco u jiných modelů bylo prokázáno, že ke spuštění opravy DNA stačí, když jedna replikační vidlička narazí na ICL, u vajíček modelu *X. laevis* bylo nutné střetnutí dvou replikačních vidliček s ICL (Zhang, Dewar et al. 2015).

### 5.5 *Danio rerio*

Zebřička je výborným modelem pro studium vývoje krve. Výhodou tohoto modelu je, že vývojová stádia jsou velmi přesně charakterizována. K oplodnění dochází zevně a embrya zůstávají průsvitná, což umožňuje jednoduché analýzy fenotypů již ve velmi časných stádiích. Navíc se embrya vyvíjejí mnohem rychleji než u savčích modelů. Primitivní červené krvinky mohou být pozorovány in vivo již 48 hodin po fertilizaci (Taylor and Zon 2011, review).

Regulace genové exprese je u modelu zebřičky vysoce konzervována se savčími systémy, zvláště u hematopoetických tkání. Velkou výhodou *D. rerio* pro studium anémií jsou in vivo zobrazovací techniky. Průhledná linie Casper umožňuje in vivo zobrazování i v pozdějších stádiích, kdy už se vyvíjí pigment (od 48 hpf) (White 2008). Pro sledování hladiny genové exprese lze použít metodu in situ hybridizace na celých embryích. Vývoj krevního systému se dá pozorovat v čase, což může být užitečné pro identifikaci rozhodujících stádií erytroidních poruch. K označení tkáně našeho zájmu mohou být použity fluorescenční transgenní reportérové linie (Taylor and Zon 2011, review), viz obr. 8.



**Obrázek 8 – Exprese transkripčního faktoru Gata1 v časném vývoji *D. rerio***

Tato fotografie zachycuje expresi Gata1 u *D. rerio* ve 48 hpf. Jedná se o stabilní transgenní reportérovou linii Gata1:DsRed (zdroj: Odd. buněčné diferenciace, ÚMG AV ČR).

Podstatná výhoda genetického screeningu v zebřičce je produkce velkého počtu potomků. Pro studium genů, pro něž zatím nebyla vytvořena mutantní linie, lze použít techniku morfolino antisense oligonukleotidů, která umožňuje transientní knock-down genu. Tuto metodu je ale vhodné doplnit dalšími přístupy, aby byly vyloučeny nespecifické efekty morfolino antisense oligonukleotidů (Blum, De Robertis et al. 2015, Kok, Shin et al. 2015). Případně lze injikovat do

embryí také DNA či RNA pro studie nadexprese genů, nebo pro vytvoření stabilních transgenních linií (Taylor and Zon 2011, review).

Pro identifikaci nových látek, které by mohly být užitečné v léčbě anémie, byly vytvořeny mutanty zebřiček jako modely lidských anemických onemocnění. Například mutant merlot, který se projevuje těžkou hemolytickou anémií, nese mutaci v genu kódující erytroidně specifický membránový protein 4.1R. Červené krvinky těchto mutantů mají membránové abnormality stejně jako je tomu u lidí (Shafizadeh 2002).

Kromě klasických genetických manipulací může být zebřička také využívána v chemických genetických studiích. Knihovny malých molekul mohou být testovány na rybích embryích v esejích vyvinutých specificky za účelem identifikace modulátorů HSCs, rakoviny či regenerace. Díky těmto chemickým screeningům lze lépe popsat dráhy vedoucí k vývoji konkrétních buněčných typů a tkání, v některých případech i identifikovat látky s možným léčebným potenciálem (Taylor and Zon 2011, review).

Dosud nevyřešeným problémem rybího modelu je, že není snadné provést analýzu na proteinové úrovni, jelikož polyklonální protilátky, které fungují dobře v jiných modelových organismech, v zebřičce obvykle nefungují. Tvorba specificky rybíh protilátek je přitom extrémně náročná a pracná z důvodu silné imunitní reakce proti glykosidům přítomným na povrchu většiny rybíh proteinů (Traver, Paw et al. 2003, Deflorian, Cinquanta et al. 2009).

### 5.5.1 Knock-down ribozomálních proteinů v *D. rerio*

Mutace ribozomálních proteinů mohou poškodit vznik HSCs. Knock-down 21 různých ribozomálních proteinů v zebřičkách vedl k hypoplasiím žloutkového vaku a těžkým morfologickým defektům v hlavové oblasti a v některých případech i k defektům krevního oběhu. U morfantů bylo možné pozorovat opoždění v cirkulaci červených krvinek a lišili se také ve schopnosti oběh obnovit. Morfanti měli také postižený vývoj mozku, ale vážnost a přesné místo defektu se lišilo. Knock-down genů ribozomálních proteinů je velmi důležitý pro studium role ribozomů v onemocnění člověka (Uechi, Nakajima et al. 2006).

*RPS19* byl první identifikovaný gen spojený s DBA a mutace v něm je u pacientů vůbec nejčastější. Nedostatek *RPS19* poškozuje ribozomální biogenezi, ale zůstává nejasné, jak toto poškození vede k DBA či rakovině. *Rps19* morfanti mají specifické defekty v oblasti přední části mozku a v oblasti očí, mají srdeční defekty a projevují se u nich symptomy edému. Tyto morfologické defekty mohou být zvráceny injikací mRNA pro *rps19*. Červené krvinky jsou u morfantů očividně dysregulovány, jejich množství se zvyšuje, ale hladina hemoglobinu je snížena. Hladina erytroidně specifického transkripčního faktoru *gata1* RNA je v krevních progenitorech

v 18 hpf běžná až do doby cirkulace a ačkoliv jsou červené krvinky stále přítomny, tak nejsou plně diferencovány. Gata1 má vliv na expresi globinových genů. Tento fenotyp je podobný erytroidnímu zablokování u DBA pacientů (Long, Mend et al. 1997, Danilova, Sakamoto et al. 2008). Morfanti mají poškozenou ribozomální výrobu, hladina 18S rRNA je snížena, zvyšuje se četnost buněčné smrti a dochází ke zvýšení exprese genů *p21* a *bax* p53 dráhy. Také další mutace ribozomálních proteinů (S8, S11a S18) vedou k upregulaci dráhy p53. Novým terapeutickým cílem se tak jeví někteří členové rodiny p53 (Danilova, Sakamoto et al. 2008).

*Rpl11* je další obvyklý gen spojený s DBA. Morfanti jsou menší a žloutek není plně formován. Poškozena je konkrétně přední i zadní část mozku a oblast uší. Morfanti vykazují rozsáhlou apoptózu v hlavové oblasti. Po knock-downu *rpl11* v zebřičce, byla analyzována aktivace p53 dráhy. Současný knock-down genu p53 ochránil morfanty od vývojových defektů a apoptózy (Chakraborty, Uechi et al. 2009).

### 5.5.2 Budoucí směry výzkumu DBA v *D. rerio*

Aktuálním problémem modelování DBA mutací je haploinsuficience u pacientů, pro kterou se zatím nepodařilo vytvořit vhodný model. Knockout jedné alely *Rps19* u myši je bez fenotypu, zatímco homozygoti jsou embryonálně letální. Zebřička ale umožňuje škálovatelné snížení funkce genu in vivo (knock-down), takže je vhodnou alternativou pro podobné případy. Porovnávání hladin ribozomálních proteinů je důležité také pro porozumění toho, jak pacienti z jedné rodiny se stejnou mutací mohou mít různé symptomy. Ukazuje se, že wild-type alela může být upregulována, aby vykompenzovala mutovanou alelu.

Ke generování mutací DBA genů se používají metody editace genomu jako CRISPR/Cas9. Díky těmto nástrojům je možné vytvořit knihovnu mutací ribozomálních proteinů a analyzovat poškození v různých typech mutací a jejich role v patogenezi DBA. Tento postup může přispět ke zjištění, proč jsou některé ribozomální proteiny v pacientech mutovány s větší frekvencí (Taylor and Zon 2011, review).

Charakteristickým znakem, který přispívá k patofyziologii DBA, je zvýšení exprese adenosin deaminasy (ADA) zapříčiňující změny v metabolismu nukleotidů – např. vyčerpání ATP. Danilova et al. zkoumali roli DNA poškození a možné terapeutické cíle pro léčbu DBA prostřednictvím *Rps19* morfantů, kteří byly *Rps19*-deficientní a *rpl11* mutantů. V zebřičkách, které jsou deficientní na ribozomální proteiny (RP) dochází ke zvýšené expresi ribonukleotid reductázy, což způsobí nadbytek deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs) a následně inhibici jejich syntézy. V HSCs zebřiček a lidí, které jsou RP deficientní dochází k aktivaci p53 dráhy přes signalizaci ATM/ATR. V zebřičkách deficientních pro RP snížily inhibitory kináz zapojených do DNA poškození zvýšenou expresí p53, apoptózu a zlepšily hematopoézu. Po podání exogenních



nukleosidů došlo v embryích deficientních pro RP zebřiček ke snížené aktivaci p53, snížení apoptózy a obnovení hematopoézy, a proto se mohou stát nukleosidové doplňky další možností v léčbě DBA (Danilova, Bibikova et al. 2014).

## 6. Diskuze a závěr

Anémie se celosvětově řadí mezi hlavní zdroje morbidity a mortality. V roce 2010 byla zasažena anémií přibližně jedna třetina celosvětové populace. Vzhledem k frekvenci výskytu tohoto onemocnění, a to především v rozvojových zemích, je nutné tuto nemoc dále studovat na modelových organismech a hledat další terapeutické cíle. Technologicky sofistikované expanzivní přístupy jako genová terapie či infuze určitých léčiv nejsou vhodné pro velký počet lidí z rozvojových zemí, kde je např.  $\beta$ -thalasémie či SCD rozšířenou nemocí (Kassebaum, Jasrasaria et al. 2014). Vzhledem k tomuto faktu je nutné hledat terapii, která bude optimální pro velký počet lidí, což jsou například ústně podávaná léčiva, jejichž výroba není tak nákladná.

Vhodných modelů pro studium anemických onemocnění je hned několik, přičemž každý má své výhody a nevýhody. *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* a *Danio rerio* jsou velmi užitečnými modelovými organismy, ale je nutné mít na paměti odlišnosti oproti lidské hematopoéze, které se ukazují například u některých myších modelů, jež nesou stejnou mutaci, ale neodrážejí fenotyp pacientů. Vzhledem k této skutečnosti se zdá být značně užitečný lidský buněčný model. Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (HiPSCs) derivované z pacienta mají obrovský potenciál pro vývoj nových buněčných a genových terapií. Oprava mutací v těchto buňkách může navrátit jejich původní funkci, čímž získáme bohatý zdroj pro transplantaci. Napříč modely je velmi hojně využívána technologie CRISPR/Cas9, která je mocným nástrojem genomové editace.

Genetická přístupnost *M. musculus* jakožto savčího systému umožňuje identifikaci klíčových regulátorů hematopoetického vývoje. Ke studiu anemických onemocnění se hojně využívá tkáňově specifická genová delece, nadexpresní modely či knock-out myši. Využití *G. gallus* je v této oblasti zcela minoritní, ale jeho příspěvky k objasnění pochodů krvetvorby u obratlovců byly v minulosti zcela zásadní. *X. laevis* je využíván zejména při studiu Fanconiho anémie. Zatímco u ostatních modelů dochází při mezivláknových překříženích DNA k aktivaci i jiných opravných drah, zde tomu tak není.

Velmi důležitým modelem pro studium anémie je *Danio rerio*, na kterém se provádí chemické screeniny vedoucí k identifikaci látek s možným léčebným potenciálem. V zebříčce lze relativně snadno otestovat mutaci jakéhokoli genu, protože je poměrně snadno geneticky manipulovatelná. Na druhou stranu přináší i některé nevýhody jako je duplikace některých genů během evoluce. Duplikované geny pak často funkčně divergovaly a mohou se tak ve svém účinku doplňovat nebo mít rozdílnou tkáňovou expresi.

V mechanismech některých chorob a jejich souvislostech s fenotypovými projevy u pacientů stále zůstává mnoho nejasností. Není zřejmé, jak se jedinci nemocní Diamondovou-Blackfanovou anémií, trpící stejnou mutací jako někteří členové jejich rodiny, mohou projevat různými symptomy a dokonce se lišit v závažnosti onemocnění. Vztah mezi mutacemi ribozomálních proteinů a symptomy DBA tak zůstávají neznámé. Podle jedné z hypotéz tyto mutace vedou k celkovým defektům translace, což může zapříčinit poškození mnoha různých tkání.

V současné době je mnoho pacientů s Fanconiho anémií, kteří stále nebyli zařazeni do některé z již existujících skupin z hlediska mutace v určitém genu, což naznačuje, že zatím nebyly objeveny všechny geny účastníci se dráhy Fanconiho anémie. Vzhledem k široké škále fenotypových projevů, které jsou pravděpodobně důsledkem velkého množství genů, jejichž mutace vede k FA, není jednoduché tuto anémii diagnostikovat.

Fanconiho a Diamondovu-Blackfanovu anémii spojuje právě skutečnost, že jsou způsobeny mutacemi v mnoha různých genech, což zřejmě vysvětluje rozsáhlé fenotypové projevy a nejasnosti v mechanismech těchto onemocnění. Pro otestování vlivu mutací na úrovni celého organismu je potřeba robustního a snadno geneticky manipulovatelného modelu, aby bylo ověřeno, že mutace je skutečně příčinou dané choroby. Technologií CRISPR/Cas9 lze za využití modelového organismu *D. rerio* vyřadit funkci genu, napodobit konkrétní mutace či provést nadexpresi lidské mutantní alely pro ověření dominantně negativního efektu mutace.

Důležitým se zdá být výzkum přepnutí hemoglobinu z fetálního na dospělý, především z hlediska vývoje nových terapeutických přístupů, které by navodily expresi fetálního hemoglobinu u jedinců trpících hemoglobinopatií. Genetická reaktivace  $\gamma$ -globinových genů má potenciál poskytnout dostatečnou hladinu HbF pro pacienty s nedostatkem  $\beta$ -globinu. Právě proto dochází k intenzivnímu studiu molekul hrajících roli v umlčování HbF a hledání jejich inhibitorů. Slibným cílem se tak stávají jaderné proteiny histon deacetylázy, které asociují s transkripčními faktory regulujícími expresi HbF. Inhibitory HDACs spouští produkci fetálního hemoglobinu, ale mechanismus indukce zatím není zcela objasněn. BCL11A je kritickým mediátorem přepnutí z fetálního na dospělý hemoglobin a funguje jako faktor umlčující  $\gamma$ -globinové geny v dospělých jedincích. Potlačení exprese BCL11A v dospělých erytroidních buňkách se tak nabízí jako další farmakologický cíl.

Pro další objasnění mechanismů anémií je však důležité studium normální (funkční) krvinek nejen u lidí, ale právě také u modelových organismů. Stále se objevují nové přístupy, které umožňují překonat rozdíly mezi krvinek modelů a lidí, a pomáhají tak zvýšit jejich přístupnost pro studium těchto závažných onemocnění. Modelové organismy jsou proto nepostradatelným nástrojem výzkumu stejně jako nově využívaný lidský buněčný model.

## 7. Literatura

- 1) Arlet, J. B., J. A. Ribeil, F. Guillem, O. Negre, A. Hazoume, G. Marcion, Y. Beuzard, M. Dussiot, I. C. Moura, S. Demarest, I. C. de Beauchene, Z. Belaid-Choucair, M. Sevin, T. T. Maciel, C. Auclair, P. Leboulch, S. Chretien, L. Tchertanov, V. Baudin-Creuzat, R. Seigneuric, M. Fontenay, C. Garrido, O. Hermine and G. Courtois (2014). "HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia." Nature **514**(7521): 242-246.
- 2) Arnaud, L., C. Saison, V. Helias, N. Lucien, D. Steschenko, M. C. Giarratana, C. Prehu, B. Foliguet, L. Montout, A. G. de Brevern, A. Francina, P. Ripoche, O. Fenneteau, L. Da Costa, T. Peyrard, G. Coghlan, N. Illum, H. Birgens, H. Tamary, A. Iolascon, J. Delaunay, G. Tchernia and J. P. Cartron (2010). "A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia." Am J Hum Genet **87**(5): 721-727.
- 3) Bister, K. (1979). "Structure and specific sequences of avian erythroblastosis virus RNA: Evidence for multiple classes of transforming genes among avian tumor viruses." Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- 4) Blum, M., E. M. De Robertis, J. B. Wallingford and C. Niehrs (2015). "Morpholinos: Antisense and Sensibility." Dev Cell **35**(2): 145-149.
- 5) Borg, J., P. Papadopoulos, M. Georgitsi, L. Gutierrez, G. Grech, P. Fanis, M. Phylactides, A. J. Verkerk, P. J. van der Spek, C. A. Scerri, W. Cassar, R. Galdies, W. van Ijcken, Z. Ozgur, N. Gillemans, J. Hou, M. Bugeja, F. G. Grosveld, M. von Lindern, A. E. Felice, G. P. Patrinos and S. Philipsen (2010). "Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin." Nat Genet **42**(9): 801-805.
- 6) Bradner, J. E., R. Mak, S. K. Tanguturi, R. Mazitschek, S. J. Haggarty, K. Ross, C. Y. Chang, J. Bosco, N. West, E. Morse, K. Lin, J. P. Shen, N. P. Kwiatkowski, N. Gheldof, J. Dekker, D. J. DeAngelo, S. A. Carr, S. L. Schreiber, T. R. Golub and B. L. Ebert (2010). "Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(28): 12617-12622.
- 7) Bunting, M. (1999). "Targeting genes for self-excision in the germ line " Genes Dev. .
- 8) Cavazzana-Calvo, M., E. Payen, O. Negre, G. Wang, K. Hehir, F. Fusil, J. Down, M. Denaro, T. Brady, K. Westerman, R. Cavalleco, B. Gillet-Legrand, L. Caccavelli, R. Sgarra, L. Maouche-Chretien, F. Bernaudin, R. Girot, R. Dorazio, G. J. Mulder, A. Polack, A. Bank, J. Soulier, J. Larghero, N. Kabbara, B. Dalle, B. Gourmel, G. Socie, S. Chretien, N. Cartier, P. Aubourg, A. Fischer, K. Cornetta, F. Galacteros, Y. Beuzard, E. Gluckman, F. Bushman, S. Hacein-Bey-Abina and P. Leboulch (2010). "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia." Nature **467**(7313): 318-322.
- 9) Ciavatta, D. J. (1995). "Mouse model of human  $\beta^0$  thalassemia: Targeted deletion of the mouse  $\beta$ maj- and  $\beta$ min-globin genes in embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci USA.
- 10) Cong, L. (2013). "Multiplex genom engineering using CRISPR/Cas systems " Science.
- 11) Coulthard, R., A. J. Deans, P. Swuec, M. Bowles, A. Costa, S. C. West and N. Q. McDonald (2013). "Architecture and DNA recognition elements of the Fanconi anemia FANCM-FAAP24 complex." Structure **21**(9): 1648-1658.

- 12) Danilova, N., E. Bibikova, T. M. Covey, D. Nathanson, E. Dimitrova, Y. Konto, A. Lindgren, B. Glader, C. G. Radu, K. M. Sakamoto and S. Lin (2014). "The role of the DNA damage response in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan anemia." Dis Model Mech **7**(7): 895-905.
- 13) Danilova, N., K. M. Sakamoto and S. Lin (2008). "Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family." Blood **112**(13): 5228-5237.
- 14) Deflorian, G., M. Cinquanta, C. Beretta, A. Venuto, C. Santoriello, D. Baldessari, F. Pezzimenti, M. Aliprandi, M. Mione and A. de Marco (2009). "Monoclonal antibodies isolated by large-scale screening are suitable for labeling adult zebrafish (*Danio rerio*) tissues and cell structures." J Immunol Methods **346**(1-2): 9-17.
- 15) Deuel, J. W., F. Vallelian, C. A. Schaer, M. Puglia, P. W. Buehler and D. J. Schaer (2015). "Different target specificities of haptoglobin and hemopexin define a sequential protection system against vascular hemoglobin toxicity." Free Radic Biol Med **89**: 931-943.
- 16) Dever, D. P., R. O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C. E. Nicolas, M. Pavel-Dinu, N. Saxena, A. B. Wilkens, S. Mantri, N. Uchida, A. Hendel, A. Narla, R. Majeti, K. I. Weinberg and M. H. Porteus (2016). "CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells." Nature **539**(7629): 384-389.
- 17) Draptchinskaia, N. (1999). "The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia " Nature.
- 18) Dussiot, M., T. T. Maciel, A. Fricot, C. Chartier, O. Negre, J. Veiga, D. Grapton, E. Paubelle, E. Payen, Y. Beuzard, P. Leboulch, J. A. Ribeil, J. B. Arlet, F. Cote, G. Courtois, Y. Z. Ginzburg, T. O. Daniel, R. Chopra, V. Sung, O. Hermine and I. C. Moura (2014). "An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia." Nat Med **20**(4): 398-407.
- 19) Dzierzak, E. and S. Philipsen (2013). "Erythropoiesis: development and differentiation." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(4): a011601.
- 20) Elguero, E., L. M. Delicat-Loembet, V. Rougeron, C. Arnathau, B. Roche, P. Becquart, J. P. Gonzalez, D. Nkoghe, L. Sica, E. M. Leroy, P. Durand, F. J. Ayala, B. Ollomo, F. Renaud and F. Prugnolle (2015). "Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(22): 7051-7054.
- 21) Fathallah, H., R. S. Weinberg, Y. Galperin, M. Sutton and G. F. Atweh (2007). "Role of epigenetic modifications in normal globin gene regulation and butyrate-mediated induction of fetal hemoglobin." Blood **110**(9): 3391-3397.
- 22) Faustino, P. (1996). " $\beta$ -thalassemia mutation at -90C  $\rightarrow$  T impairs the interaction of the proximal CACCC box with both erythroid and nonerythroid factors." Blood.
- 23) Flygare, J. and S. Karlsson (2007). "Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation." Blood **109**(8): 3152-3154.
- 24) Flygare, J., T. Kiefer, K. Miyake, T. Utsugisawa, I. Hamaguchi, L. Da Costa, J. Richter, E. J. Davey, H. Matsson, N. Dahl, M. Wiznerowicz, D. Trono and S. Karlsson (2005). "Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia." Blood **105**(12): 4627-4634.
- 25) Flygare, J., K. Olsson, J. Richter and S. Karlsson (2008). "Gene therapy of Diamond Blackfan anemia CD34(+) cells leads to improved erythroid development and engraftment following transplantation." Exp Hematol **36**(11): 1428-1435.

- 26) Fujiwara, Y., A. N. Chang, A. M. Williams and S. H. Orkin (2004). "Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development." Blood **103**(2): 583-585.
- 27) Gerrits, A., B. Dykstra, O. J. Kalmykova, K. Klauke, E. Verovskaya, M. J. Broekhuis, G. de Haan and L. V. Bystrikh (2010). "Cellular barcoding tool for clonal analysis in the hematopoietic system." Blood **115**(13): 2610-2618.
- 28) Gilbert, L. A. (2013). "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes " Cell.
- 29) Graf, T. and H. Beug (1978). "Avian leukemia viruses interaction with their target cells in vivo and in vitro." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **516**(3): 269-299.
- 30) Haitjema, A., B. W. Brandt, N. Ameziane, P. May, J. Heringa, J. P. de Winter, H. Joenje and J. C. Dorsman (2013). "A protein prioritization approach tailored for the FA/BRCA pathway." PLoS One **8**(4): e62017.
- 31) Huang, Y., J. W. Leung, M. Lowery, N. Matsushita, Y. Wang, X. Shen, D. Huong, M. Takata, J. Chen and L. Li (2014). "Modularized functions of the Fanconi anemia core complex." Cell Rep **7**(6): 1849-1857.
- 32) Chakraborty, A., T. Uechi, S. Higa, H. Torihara and N. Kenmochi (2009). "Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response." PLoS One **4**(1): e4152.
- 33) Chen, M. J., T. Yokomizo, B. M. Zeigler, E. Dzierzak and N. A. Speck (2009). "Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter." Nature **457**(7231): 887-891.
- 34) Jackson, L. H., E. Vlachodimitropoulou, P. Shangaris, T. A. Roberts, T. M. Ryan, A. E. Campbell-Washburn, A. L. David, J. B. Porter, M. F. Lythgoe and D. J. Stuckey (2017). "Non-invasive MRI biomarkers for the early assessment of iron overload in a humanized mouse model of beta-thalassemia." Sci Rep **7**: 43439.
- 35) Jagannathan-Bogdan, M. and L. I. Zon (2013). "Hematopoiesis." Development **140**(12): 2463-2467.
- 36) Kassebaum, N. J., R. Jasrasaria, M. Naghavi, S. K. Wulf, N. Johns, R. Lozano, M. Regan, D. Weatherall, D. P. Chou, T. P. Eisele, S. R. Flaxman, R. L. Pullan, S. J. Brooker and C. J. Murray (2014). "A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010." Blood **123**(5): 615-624.
- 37) Kawamoto, H., H. Wada and Y. Katsura (2010). "A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model." Int Immunol **22**(2): 65-70.
- 38) Khandros, E., C. S. Thom, J. D'Souza and M. J. Weiss (2012). "Integrated protein quality-control pathways regulate free alpha-globin in murine beta-thalassemia." Blood **119**(22): 5265-5275.
- 39) Kobari, L., F. Yates, N. Oudrhiri, A. Francina, L. Kiger, C. Mazurier, S. Rouzbeh, W. El-Nemer, N. Hebert, M. C. Giarratana, S. Francois, A. Chapel, H. Lapillonne, D. Luton, A. Bennaceur-Griscelli and L. Douay (2012). "Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model." Haematologica **97**(12): 1795-1803.
- 40) Kok, F. O., M. Shin, C. W. Ni, A. Gupta, A. S. Grosse, A. van Impel, B. C. Kirchmaier, J. Peterson-Maduro, G. Kourkoulis, I. Male, D. F. DeSantis, S. Sheppard-Tindell, L. Ebarasi, C. Betsholtz, S. Schulte-Merker, S. A. Wolfe and N. D. Lawson (2015). "Reverse genetic

- screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish." Dev Cell **32**(1): 97-108.
- 41) LaMonte, G., N. Philip, J. Reardon, J. R. Lacsina, W. Majoros, L. Chapman, C. D. Thornburg, M. J. Telen, U. Ohler, C. V. Nicchitta, T. Haystead and J. T. Chi (2012). "Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance." Cell Host Microbe **12**(2): 187-199.
  - 42) Lei, S. Q. (2013). "Repurposing CRISPER as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression." Cell.
  - 43) Locatelli, F., N. Kabbara, A. Ruggeri, A. Ghavamzadeh, I. Roberts, C. K. Li, F. Bernaudin, C. Vermylen, J. H. Dalle, J. Stein, R. Wynn, C. Cordonnier, F. Pinto, E. Angelucci, G. Socie, E. Gluckman, M. C. Walters, V. Rocha, Eurocord, B. European and g. Marrow Transplantation (2013). "Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling." Blood **122**(6): 1072-1078.
  - 44) Long, Q., A. Mend, H. Wang, J. Jessen, M. Farrell and S. Lin (1997). "GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene." Development.
  - 45) Ludwig, L. S., H. T. Gazda, J. C. Eng, S. W. Eichhorn, P. Thiru, R. Ghazvinian, T. I. George, J. R. Gotlib, A. H. Beggs, C. A. Sieff, H. F. Lodish, E. S. Lander and V. G. Sankaran (2014). "Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia." Nat Med **20**(7): 748-753.
  - 46) Mamrak, N. E., A. Shimamura and N. G. Howlett (2016). "Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia." Blood Rev.
  - 47) McConnell, S. C., Y. Huo, S. Liu and T. M. Ryan (2011). "Human globin knock-in mice complete fetal-to-adult hemoglobin switching in postnatal development." Mol Cell Biol **31**(4): 876-883.
  - 48) McGowan, K. A., J. Z. Li, C. Y. Park, V. Beaudry, H. K. Tabor, A. J. Sabnis, W. Zhang, H. Fuchs, M. H. de Angelis, R. M. Myers, L. D. Attardi and G. S. Barsh (2008). "Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects." Nat Genet **40**(8): 963-970.
  - 49) Nalepa, G., R. Enzor, Z. Sun, C. Marchal, S. J. Park, Y. Yang, L. Tedeschi, S. Kelich, H. Hanenberg and D. W. Clapp (2013). "Fanconi anemia signaling network regulates the spindle assembly checkpoint." J Clin Invest **123**(9): 3839-3847.
  - 50) Orkin, T. a. (1997). "Transcription factor GATA-2 is required for proliferation or survival of early hematopoietic cells and mast cell formation - but not for erythroid and myeloid terminal differentiation." American Society of Hematology.
  - 51) Osborn, M. J., R. Gabriel, B. R. Webber, A. P. DeFeo, A. N. McElroy, J. Jarjour, C. G. Starker, J. E. Wagner, J. K. Joung, D. F. Voytas, C. von Kalle, M. Schmidt, B. R. Blazar and J. Tolar (2015). "Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system." Hum Gene Ther **26**(2): 114-126.
  - 52) Ou, Z., X. Niu, W. He, Y. Chen, B. Song, Y. Xian, D. Fan, D. Tang and X. Sun (2016). "The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human beta-thalassemia in Mice." Sci Rep **6**: 32463.
  - 53) Raffaella, O. (2007). "Liver iron concentrations and urinary hepcidin in  $\beta$ -thalassemia." Haematologica.
  - 54) Raschle, M., P. Knipscheer, M. Enoiu, T. Angelov, J. Sun, J. D. Griffith, T. E. Ellenberger, O. D. Scharer and J. C. Walter (2008). "Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair." Cell **134**(6): 969-980.

- 55) Rieger, M. A. and T. Schroeder (2012). "Hematopoiesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).
- 56) Sankaran, V. G. (2008). "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A." Science.
- 57) Sankaran, V. G. (2011). "A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing " The new england journal of medicine.
- 58) Sankaran, V. G., R. Ghazvinian, R. Do, P. Thiru, J. A. Vergilio, A. H. Beggs, C. A. Sieff, S. H. Orkin, D. G. Nathan, E. S. Lander and H. T. Gazda (2012). "Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia." J Clin Invest **122**(7): 2439-2443.
- 59) Sankaran, V. G. and S. H. Orkin (2013). "The switch from fetal to adult hemoglobin." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(1): a011643.
- 60) Sankaran, V. G. and M. J. Weiss (2015). "Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies." Nat Med **21**(3): 221-230.
- 61) Shafizadeh, E. (2002). "Characterization of zebrafis merlot/chablis as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency." Development.
- 62) Sherman, M. L., N. G. Borgstein, L. Mook, D. Wilson, Y. Yang, N. Chen, R. Kumar, K. Kim and A. Laadem (2013). "Multiple-dose, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of sotatercept (ActRIIA-IgG1), a novel erythropoietic agent, in healthy postmenopausal women." J Clin Pharmacol **53**(11): 1121-1130.
- 63) Shimamura, A., R. Montes de Oca, J. L. Svenson, N. Haining, L. A. Moreau, D. G. Nathan and A. D. D'Andrea (2002). "A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway." Blood **100**(13): 4649-4654.
- 64) Schmidt, P. J. e. a. (2013). "An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe<sup>-/-</sup> mice and ameliorates anemia and iron overload in murine  $\beta$ -thalassemia intermedia " Blood
- 65) Schwab, R. A., J. Nieminuszczy, F. Shah, J. Langton, D. Lopez Martinez, C. C. Liang, M. A. Cohn, R. J. Gibbons, A. J. Deans and W. Niedzwiedz (2015). "The Fanconi Anemia Pathway Maintains Genome Stability by Coordinating Replication and Transcription." Mol Cell **60**(3): 351-361.
- 66) Sun, N. and H. Zhao (2014). "Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs." Biotechnol Bioeng **111**(5): 1048-1053.
- 67) Svoboda, O. and P. Bartunek (2015). "Origins of the Vertebrate Erythro/Megakaryocytic System." Biomed Res Int **2015**: 632171.
- 68) Svoboda, O., D. L. Stachura, O. Machonova, P. Pajer, J. Brynda, L. I. Zon, D. Traver and P. Bartunek (2014). "Dissection of vertebrate hematopoiesis using zebrafish thrombopoietin." Blood **124**(2): 220-228.
- 69) Taylor, A. M. and L. I. Zon (2011). "Modeling Diamond Blackfan Anemia in the Zebrafish." Seminars in Hematology **48**(2): 81-88.
- 70) Traver, D., B. H. Paw, K. D. Poss, W. T. Penberthy, S. Lin and L. I. Zon (2003). "Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants." Nat Immunol **4**(12): 1238-1246.



- 71) Uechi, T., Y. Nakajima, A. Nakao, H. Torihara, A. Chakraborty, K. Inoue and N. Kenmochi (2006). "Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish." PLoS One **1**: e37.
- 72) Vogeli, K. M., S. W. Jin, G. R. Martin and D. Y. Stainier (2006). "A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula." Nature **443**(7109): 337-339.
- 73) Wang, H., H. Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlaty, A. W. Cheng, F. Zhang and R. Jaenisch (2013). "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering." Cell **153**(4): 910-918.
- 74) White, R. M. (2008). "Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis." Cell Stem Cell.
- 75) Wilber, A., P. W. Hargrove, Y. S. Kim, J. M. Riberdy, V. G. Sankaran, E. Papanikolaou, M. Georgomanoli, N. P. Anagnou, S. H. Orkin, A. W. Nienhuis and D. A. Persons (2011). "Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of beta-thalassemic CD34+ cells after lentiviral vector-mediated gene transfer." Blood **117**(10): 2817-2826.
- 76) Xie, F., L. Ye, J. C. Chang, A. I. Beyer, J. Wang, M. O. Muench and Y. W. Kan (2014). "Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac." Genome Res **24**(9): 1526-1533.
- 77) Xu, J., V. G. Sankaran, M. Ni, T. F. Menne, R. V. Puram, W. Kim and S. H. Orkin (2010). "Transcriptional silencing of  $\gamma$ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6." Genes Dev **24**(8): 783-798.
- 78) Yoshida, H., K. Kawane, M. Koike, Y. Mori, Y. Uchiyama and S. Nagata (2005). "Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells." Nature **437**(7059): 754-758.
- 79) Yung, S. K., K. Tilgner, M. H. Ledran, S. Habibollah, I. Neganova, C. Singhapol, G. Saretzki, M. Stojkovic, L. Armstrong, S. Przyborski and M. Lako (2013). "Brief report: human pluripotent stem cell models of fanconi anemia deficiency reveal an important role for fanconi anemia proteins in cellular reprogramming and survival of hematopoietic progenitors." Stem Cells **31**(5): 1022-1029.
- 80) Zambrowicz, B. P. (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells " Proc Natl Acad Sci U S A.
- 81) Zhang, J., J. M. Dewar, M. Budzowska, A. Motnenko, M. A. Cohn and J. C. Walter (2015). "DNA interstrand cross-link repair requires replication-fork convergence." Nat Struct Mol Biol **22**(3): 242-247.
- 82) Zon, J. a. (2005). "Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis." Annu. Rev. Genet.
- 83) Zon, P. a. (2010). "Hematopoietic development in the zebrafish."
- 84) Zou, J., P. Mali, X. Huang, S. N. Dowey and L. Cheng (2011). "Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease." Blood **118**(17): 4599-4608.

#### **Knižní zdroje:**

- 1) Klener, P. et al. (2011): Vnitřní lékařství, Galén a Karolinum, kapitola 14.2