Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

MUDr. Michal Zápotocký

Cílená léčba AML1-ETO pozitivní akutní myeloidní leukémie inhibitory deacetyláz histonů

Targeted therapy of AML1-ETO positive acute myeloid leukemia with histone deacetylase inhibitors

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Júlia Starková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 10.7.2013

MICHAL ZÁPOTOCKÝ

Podpis

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za odborné vedení v tomto projektu a za umožnění práce v Laboratoři molekulární genetiky Kliniky dětské hematologie a onkologie. Klíčovou a nezastupitelnou roli v mém projektu odehrála Mgr. Julia Starková, Ph.D., jejíž rady a nápady pro mne měly neocenitelný přínos. Dále mé poděkování patří doc. MUDr. Bertě Otové, CsC., která mě ještě jako pregraduálního studenta přivedla na pole vědy v medicíně. MUDr. Ester Mejstříková, Ph.D. mi byla velmi nápomocna v experimentech s průtokovým cytometrem. Prof. MUDr. Karlu Smetanovi, DrSc. děkuji za extenzivní vyšetření nukleární a nukleolární morfologie u našich vzorků. Celé pracovní skupině Childhood Leukemia Investigation Prague (CLIP) děkuji za přátelské pracovní prostředí. MUDr. Ester Zápotocké patří velký dík za inspirující domácí prostředí.

Identifikační záznam:

ZÁPOTOCKÝ, Michal. *Cílená léčba AML1-ETO pozitivní akutní myeloidní leukémie inhibitory deacetyláz histonů. [Targeted therapy of AML1-ETO positive acute myeloid leukemia with histone deacetylase inhibitors]*. Praha, 2013. Počet stran 60, počet příloh 5. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Školitel prof. MUDr. Jan Trka, Ph.D., školitel konzultant Mgr. Júlia Starková, Ph.D.

Obsah

Prohlášení: 2
Poděkování 3
1. Úvod 7
1.1. Akutní myeloidní leukémie 7
1.2. Klasifikace akutní myeloidní leukémie 8
1.3. Imunofenotypizace 10
1.4. Biologie akutní myeloidní leukémie 11
1.4.1. Chromozomální aberace a genové mutace 11
1.4.2. Teorie mutací I. a II. typu 13
1.5. AML1-ETO 14
1.6. Histonové modifikace jako regulační mechanizmus genové exprese 18
1.7. HDAC a jejich role v rozvoji maligních onemocnění 19
1.8. Inhibitory deacetyláz histonů 21
2. Hypotézy a cíle práce 23
3. Materiál a metodika 25
3.1. Buněčné linie a pacientské vzorky 25
3.2. Analýza buněčného cyklu 26
3.3. Detekce diferenciace vyšetřením průtokovou cytometrií 26
3.4. Analýza fází buněčného cyklu zároveň s povrchovými markery 27
3.5. Kvantifikace genové exprese na úrovni mRNA pomocí real-time kvantitativní reverzní transkriptázové PCR (qRT-PCR) 27
3.6. Soubor pacientů 28
3.7. Statistika 29
4. Výsledky 30
4.1. Valproová kyselina indukuje apoptózu v buňkách akutní myeloidní leukémie bez ohledu na genotypovou podskupinu 30
4.2. Diferenciace charakterizována změnami v imunofenotypu 31
4.3. Vztah mezi fázemi buněčného cyklu a diferenciací, apoptózou a diferenciací. 33
4.4. VPA obnovuje expresi AML1 cílových genů u AML1-ETO pozitivních buněk 36
4.5. VPA indukuje změny v buněčném cyklu a v imunofenotypu primárních blastů získaných od pacientů s AML1-ETO pozitivní AML 36
4.6. Analýza přežití AML1-ETO pozitivních dětských pacientů s AML 39

5. Diskuse a závěry 41
6. Souhrn 44
7. Summary 45
8. Seznam použitých zkratek 46
9. Použitá literatura 49
Publikace 59

1. Úvod

1.1. Akutní myeloidní leukémie

Nádorová onemocnění u dětí jsou vzácná, třebaže jejich incidence v posledních 30 letech narůstá. Přesto jsou malignity druhou nejčastější příčinou úmrtí v dětském věk (Orkin SH, 2008). Leukémie jsou skupinou nejčastějších zhoubných nádorových onemocnění dětského věku, kdy přestavují celkem 25-30% ze všech malignit. Leukémie se podle průběhu dělí na chronické a akutní. Chronické leukémie se vyskytují zejména u dospělých, u dětí je vzácně diagnostikována chronická myeloidní leukémie. Většina leukémií u dětí připadá na akutní typ onemocnění, u kterého 80% představuje ALL (akutní lymfoblastická leukémie) a v 20% se jedná o AML (akutní myeloidní leukémie) (Mayer, 2002). AML zahrnuje heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby charakterizovanou zástavou diferenciace a maligní klonální transformací hematopoetické kmenové buňky nebo myeloidního progenitoru. Následkem je akumulace myeloidních leukemických blastů v kostní dřeni, jejich vyplavování do periferní krve a infiltrace extramedulárních orgánů. K diagnóze AML je zapotřebí, aby byla detekována infiltrace kostní dřeně nejméně 20% myeloidními blasty. AML u dětí je vzácné onemocnění (v ČR je ročně diagnostikováno kolem 10 nových případů) v porovnání s dospělými, u kterých se incidence AML udává až 2,7 na sto tisíc obyvatel. Pro AML dětského věku je charakteristická bimodální distribuce výskytu s vyšší incidencí u dětí mladších dvou let a poté u dospívajících (15 až 19 let) (Ries LAG. et al., 2007). AML představuje 16% dětských leukémií ve věkové skupině do 15 let a 36% u dospívajících ve věku 15 až 19 let. Dětská AML má horší prognózu než ALL a to i přes daleko intenzivnější a toxičtější léčbu založenou na podávání vysokodávkovaného cytarabinu a antracyklinů. Kvůli heterogenní povaze AML je obtížné najít léčebné schéma, které by efektivně vyléčilo většinu pacientů. Výrazný pokrok v léčbě AML je datován zhruba do poloviny sedmdesátých let minulého století, kdy se začala léčba organizovat v rámci mezinárodních klinických studií. V současnosti lze vyléčit přibližně dvě třetiny dětských pacientů s AML s udávanou pravděpodobností pětiletého OS (celkového přežití) kolem 70% v závislosti na použitém léčebném protokolu. Konkrétně pracovní skupina BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), jejíž součástí jsou i dětská hematologická centra v ČR, publikovala výsledky léčby dětské AML s pravděpodobností celkového pětiletého OS 66% (Creutzig et al., 2006). Obdobných výsledků dosahuje v léčbě dětských AML i protokol vyvinutý v SJRCH (Saint Jude Research Childrens Hospital) v USA s pravděpodobností pětiletého OS 70% (Rubnitz et al., 2010).

Zatím nejlepší léčebné výsledky zaznamenala japonská pracovní skupina s protokolem AML99 a pravděpodobností pětiletého OS 75% (Tsukimoto et al., 2009).

Nejdůležitějšími prognostickými faktory u dětské AML jsou časná odpověď na léčbu, cytogenetická a molekulárně genetická charakteristika leukemických blastů. Podle těchto kritérií jsou pacienti stratifikování do rizikových skupin v současně používaném mezinárodním léčebném protokolu AML-BFM 2004. Do skupiny standardního rizika jsou zařazeni pacienti s nálezem fúzního genu *PML-RARα, AML1-ETO, CBFB-MYH11* za předpokladu dobré léčebné odpovědi s redukcí blastů v kostní dřeni pod 5% dva týdny od zahájení léčby.

1.2. Klasifikace akutní myeloidní leukémie

V praxi se paralelně používají dva klasifikační systémy. První představuje konsenzus francouzských, amerických a britských (FAB) odborníků z roku 1976 (Bennett et al., 1976), který je založen na morfologickém a cytochemickém hodnocení blastů (Tab. 1) a koreluje s úrovní, na které došlo k bloku diferenciace. Konkrétně M0 označuje nediferencovanou AML, M1 bez vyzrávání a M2 s vyzráváním, M3 akutní promyelocytární AML, M4 myelomonocytární AML a M5 monocytární AML. Jako M6 a M7 se označují akutní erytroleukémie a akutní megakaryocytární leukémie. Oproti FAB klasifikaci zohledňuje WHO klasifikace z roku 2008 vedle morfologie i klinická a imunofenotypizační kritéria a současně i cytogenetické a molekulárně genetické změny v AML blastech, které spolehlivěji korelují s prognózou pacientů (Tab. 2) (Bennett, 2000; Vardiman et al., 2002). V této klasifikaci jsou pod názvem AML s rekurentními genetickými změnami zastoupeny leukémie s přestavbami t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), t(15;17)(q22;q12) a s přestavbami genu *MLL*. Tyto leukémie se vyskytují přibližně u poloviny pacientů a zahrnují tři typy AML s nejlepší prognózou. Jedná se o APL (akutní promyelocytární leukémie) s t(15;17)(q22;q21) a dále o AML s translokacemi zasahujícími geny pro beta podjednotku CBF (core binding factor), který je jedním z transkripčních faktorů hrající klíčovou roli v hematopoéze. Sem spadají translokace t(8;21)(q22;q22) a inv(16)(p13;q22) či t(16;16)(p13;q22). Pro stanovení diagnózy AML s rekurentními genetickými abnormalitami je dostačující záchyt příslušné fúze, přičemž dosažení arbitrárně stanovené hodnoty 20 % blastů v kostní dřeni není podmínkou. Doplněná WHO klasifikace z roku 2008 rozšířila skupinu s rekurentními genetickými abnormalitami o další translokace, ale také zahrnula specifické mutace genů

C/EBPα (CCAAT enhancer binding protein alpha) a *NMP1* (nucleophosmin1) (Arber DA, 2008).

M0	**AML bez diferenciace**
M1	**AML bez vyzrávání**
M2	**AML s vyzráváním**
M3	**Akutní promyelocytární leukémie**
M4	**Akutní myelomonocytární leukémie**
M4eo	**Akutní myelomonocytární, s eozinofílií**
M5	**Akutní monocytární leukémie**
M6	**Akutní erytroleukémie**
M7	**Akutní megakaryocytární leukémie**

Tabulka č. 1 – Morfologická klasifikace AML podle FAB (1976)

Akutní myeloidní leukémie s rekurentními genetickými změnami
AML s balancovanými translokacemi / inverzemi:
AML s t(8;21)(q22;q22), fúzní gen AML1–ETO
AML s inv(16)(p13.1;q22) nebo t(16;16) (p13.1;q22), fúzní gen CBFβ–MYH11
APL, AML s t(15;17)(q22;q21), fúzní gen PML–RARα
AML s t(9;11) (p22;q23), fúze zahrnuje MLL gen
AML s t(6;9)(p22;q34), fúzní gen DEK-NUP214
AML s inv(3)(q21;q26.2, fúzní gen RPN1-EVI1
AML s t(1;22)(p13;q13), fúzní gen RBM15-MKL1
Akutní myeloidní leukémie s myelodysplastickými změnami
Akutní myeloidní leukémie po léčbě (cytotoxickými látkami, radioterapií)
Akutní myeloidní leukémie jinak blíže nespecifikovaná
AML s minimální diferenciací
AML bez vyzrávání
AML s vyzráváním
Akutní myelomonocytární leukémie
Akutní monoblastická a monocytární leukémie
Akutní erytroleukémie
Akutní megakaryoblastická leukémie
Akutní basofilní leukémie
Akutní panmyelóza s myelofibrózou
Myeloidní sarkom
Myeloidní proliferace při Downově syndrome
Neoplazie z blastických plazmatických dendritických buněk

Tabulka č. 2 – Revidovaná klasifikace AML podle WHO (2008) – zjednodušený přehled

1.3. Imunofenotypizace

Kromě klasické diagnostiky a rozdělení AML na základě morfologie je důležitá detekce povrchových a intracelulárních znaků (tzv. imunofenotyp) průtokovým cytometrem, která využívá změn v expresi povrchových znaků označovaných jako CD (cluster of differentiation) v průběhu diferenciace hematopoetických buněk. Metoda umožňuje rozlišit jednotlivé podtypy leukémií a navíc z důvodu aberantní exprese povrchových znaků na leukemických buňkách je zároveň odliší od normálních blastů přítomných v kostní dřeni (Macedo et al., 1995). Aberantní exprese na AML blastech je popsána jako přítomnost exprese tzv. nemyeloidních znaků (CD19, CD56), asynchronní exprese časných znaků (např. CD34) dohromady s pozdními znaky diferenciace jako je CD15. Zároveň je charakteristická signifikantně vyšší exprese daného znaku, než je detekováno u normálního myeloidního progenitoru (San Miguel et al., 1997; Sievers et al., 2003).

Monoklonální protilátky konkrétně používané v diagnostice AML jsou cílené proti povrchovým proteinům CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD34, CD41, CD42, CD61, glykoforin A, HLA-DR a CD117 (van Dongen et al., 2012; Wells et al., 1996). V průběhu normální hematopoézy jsou časné myeloidní prekurzory charakterizované expresí CD13, CD33, CD34 a CD117. V průběhu myeloidní diferenciace se ztrácí exprese CD34 a CD117, klesá exprese CD33 a naopak stoupá exprese CD11b a CD15. Pokud buňky diferencují směrem k monocytární linii, exprimují znak CD14, který je také vhodným znakem k identifikaci akutní myelomonocytární (M4) a monocytární (M5) leukémie. Pro erytroidní diferenciaci je typický vzestup exprese glykoforinu A, který je nalézán na povrchu blastů u akutní erytroleukémie (M6). Akutní megakaryocytární leukémie je definována přítomností znaků asociovaných s trombocyty CD41, CD42 a CD61. Na základě kombinace výše popsaných znaků lze průtokovým cytometrem odlišit ALL od AML ve více než 90% procentech případů (Harada et al., 1994; Tucker et al., 1990). Méně než 5% akutních leukémií je charakterizováno paralelní expresí myeloidních a lymfoidních znaků. Tato podskupina leukémií se nejnověji nazývá MPAL (akutní leukémie se smíšeným fenotypem) (Mejstrikova et al., 2010). MPAL dále zahrnuje tzv. bilineární leukémii, u které jsou přítomny dvě subpopulace blastů, jedna lymfoidní a druhá myeloidní (Gerr et al., 2010).

1.4. Biologie akutní myeloidní leukémie

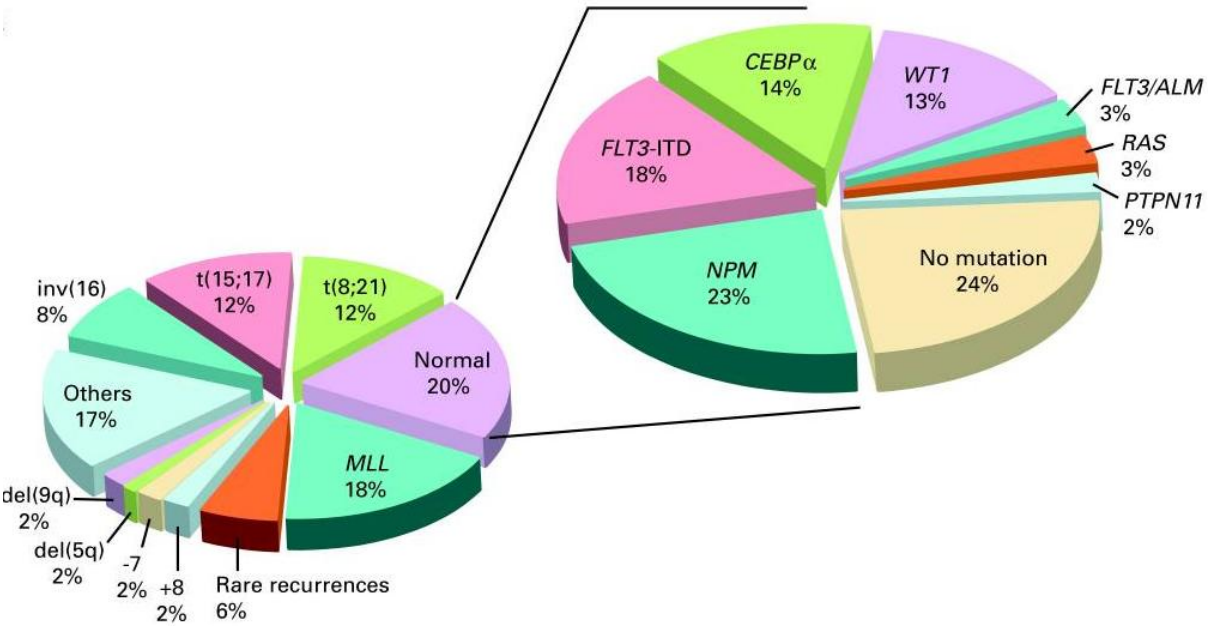
Analýza rekurentních chromozomálních abnormit a molekulárních změn u pacientů s AML má hluboký dopad v oblasti porozumění podstaty tohoto onemocnění. Přestože bylo detailně zkoumáno mnoho z identifikovaných molekulárních změn, žádná není schopna samostatně způsobit leukémii. V současné době lze u 90% případů dětské AML detekovat alespoň jednu genomickou abnormalitu (Pui et al., 2011) (Obrázek.č. 1).

1.4.1. Chromozomální aberace a genové mutace

Klonální chromozomální abnormality jsou identifikovány u zhruba 75% dětí s AML a jsou důležitým diagnostickým a prognostickým znakem (Grimwade et al., 1998; von Neuhoff et al., 2010). Translokace t(8;21)(q22;q22) je asociovaná s M2 podtypem AML a je spojena s dobrou prognózou s pravděpodobností celkového pětiletého přežití 80-90% (Harrison et al., 2010; von Neuhoff et al., 2010). Také AML s inv(16)(p13;q22) je považována za AML s dobrou prognózou a vyskytuje se výhradně u M4eo podtypu podle FAB. Inv(16)(p13;q22) je zodpovědná za fúzi jaderného vazebného faktoru CBF a MYH11 (myosin haevy chain 11). Přítomnost translokace t(15;17)(q22;q21) přináší svému nositeli dobrou prognózu díky diferenciační léčbě pomocí ATRA (all-*trans*-retinová kyselina) (Mistry et al., 2003). Citlivost k ATRA je dána zahrnutím receptoru pro retinovou kyselinu do této fúze. Abnormality chromozomu 5 vyskytující se u 2% dětských AML a chromozomu 7 u 4% případů jsou asociované se špatnou prognózou (Hasle et al., 2007; Wells et al., 2002). Chromozom 3 je alterován v inv(3)(q21;q26) neboli t(3;3)(q21;q26), což vede ke zvýšené expresi genu EVI1 (ecotropic virus integration site 1) lokalizovaného na 3q26 (Balgobind et al., 2010). Další vzácnější abnormalitou je t(6;9)(p23;q34) formující fúzní gen DEK-NUP214 (DEK oncogene-nucleoporin 214kDa). Při přítomnosti této fúze je popisováno větší riziko léčebného selhání a relapsu AML (Harrison et al., 2010). Pro akutní megakaryocytární leukémii u dětí, které nemají Downův syndrom, je charakteristická translokace t(1;22)(p13;q13) predisponující k horší prognóze (Ma et al., 2001). Velkou skupinou aberací jsou translokace postihující lokus chromozomu 11q23, které se vyskytují zejména u M4 a M5 podtypu AML a jsou typické pro akutní leukémie kojeneckého věku. V oblasti 11q23 se nachází gen *MLL* (mixed lineage leukemia), ke kterému bylo identifikována řada fúzních partnerů. Analýzou souboru 756 pacientů s 11q23 přestavbami bylo zjištěno, že podskupina s t(1;11)(q21;q23) je

charakterizována lepší prognózou. Naopak pacienti s prokázanou t(6;11)(q27;q23) nebo t(10;11)(p12;q23) se vyznačovali vyšším rizikem léčebného selhání. Přežití velké skupiny pacientů s t(9;11)(p22;q23) se neliší od průměrného celkového přežití dětí s AML (Balgobind et al., 2009).

V AML blastech se také nacházejí specifické mutace hrající roli v patogenezi, jelikož ovlivňují proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Bialelická mutace *C/EBPα*, transkripčního faktoru regulujícího myeloidní diferenciaci, byla identifikována u zhruba 4% případů dětské AML (Ho et al., 2009; Kirstetter et al., 2008). Tumor supresorový gen *WT1* (Wilms´tumor 1), který byl původně popsán v patogenezi Wilmsova tumoru, hraje důležitou roli i v hematopoetické kmenové buňce. Inaktivační mutace ve *WT1* jsou nalézány u 8 až 12% případů dětské AML. Jejich prognostická významnost zůstává nejistá a je pravděpodobně závislá na použitém léčebném protokolu (Hollink et al., 2009). GATA1 (GATA-binding factor 1) je kritický regulátor diferenciace erytroidní a megakaryocytární linie. Mutace v genu *GATA1* jsou detekovány u akutní megakaryocytární leukémie u dětí s Downovým syndromem. U tohoto podtypu leukémie je mutace *GATA1* identifikována jako první zásah v leukemogenezi a je detekována i prenatálně (Crispino, 2005). Aktivační mutace *FLT3-ITD* způsobená vnitřní tandemovou duplikací vede ke konstitutivní aktivaci FLT3 (fms-related tyrosin kinase 3) a vyskytuje se u 10% pacientů. Zvýšený alelický poměr *FLT3-ITD* k „wild type“ *FLT3* znamená horší prognózu pro svého nositele. Bodová mutace v aktivační „loop“ doméně (FLT3-ALM) oproti tomu nevede k horší prognóze a vyskytuje se u 6 až 8% AML (Meshinchi et al., 2006). Mutace v *c-kit* se vyskytují častěji u pacientů s CBF AML, kde zaujímají až 25% případů (Cairoli et al., 2006; Schnittger et al., 2006) a nyní jsou vedeny studie, které mají ukázat její prognostický význam. U 10% dětí s AML se také vyskytuje mutace v genu *RAS* (Rat Sarcoma) a její přítomnost je po dle některých autorů spojována s vyšším rizikem pozdních relapsů (Sano et al., 2012). Mutace v *NPM1* jsou asociovány s dobrou prognózou u dětské AML. Častěji se vyskytují u AML s normálním karyotypem, kde představují 20% mutací (Brown et al., 2007). Mutace v *DNMT3A* (DNA metyltransferase 3A) byly identifikovány u 20% dospělých pacientů a jsou spojovány se špatnou prognózou. Oproti tomu u dětí se ukazuje, že tato alterace je velmi vzácná (Ho et al., 2011; Ley et al., 2010). Dále byly u 4% dětských pacientů identifikovány mutace v genech pro *IDH1, 2* (izocitrát dehydrogenáza) (Ho et al., 2011).



Obrázek č. 1 Zastoupení jednotlivých chromozomálních abnormalit a specifických genových mutací u dětské AML. Převzato z Pui *et al*., 2011.

1.4.2. Teorie mutací I. a II. typu

Gilliland a další (Frohling et al., 2005; Gilliland, 2002; Gilliland et al., 2004) popsali komplexní model leukemické transformace u AML založené na podkladě specifických mutací, které působí paralelně a ovlivňují přežití buněk, diferenciaci a mechanizmus sebeobnovy neboli „self-renewal“. K transformaci jsou potřeba minimálně dvě různé mutace ze dvou popsaných tříd mutací. Mutace z I. třídy často postihují receptor signalizační dráhy nebo tyrozinové kinázy a tím podporují proliferační výhodu buněk a schopnost vyhnout se buněčné smrti. Oproti tomu mutace II. třídy způsobují zástavu diferenciace nebo umocňují schopnost sebeobnovy, samotné však neposkytují buňce proliferační výhodu. Přestože se tento model dvou zásahů zdá atraktivní, na základě nových poznatků je pravděpodobně příliš zjednodušený. Další mutace, které postihují klíčové regulační dráhy, jsou nutné k rozvoji leukemogeneze. Konkrétně jsou popsány mutace ve *Wnt* (wingless, *drosophila* int1) dráze (Simon et al., 2005), *NOTCH1* (notch homolog 1) (Palomero et al., 2006) a v genech *HOX* (homeodomain box) rodiny (Rice and Licht, 2007). Klíčový tumor supresor p53 pravděpodobně také hraje důležitou roli v leukemické transformaci (Pedersen-Bjergaard et al., 2006).

Jako první zástupci mutací I. třídy byly popsány mutace v RAS rodině skládající se z izoforem NRAS, KRAS, HRAS, které všechny působí jako GTP (guanosin nukleotid

trifosfát) vážící proteiny (Frohling et al., 2005). Mutace v KIT způsobuje aktivaci nezávislou na ligandu a vede k růstu nezávislému na růstových faktorech (Ikeda et al., 1991). Delece a inserční mutace *KIT* byly detekovány v blastech AML pacientů, často v asociaci s abnormalitami v CBF, např. inv(16)(p13;q22) nebo t(8;21)(q23;q22) (Pollard et al., 2010). Gen *FLT3* kóduje tyrozinkinázový receptor, který je exprimován v časných hematopoetických progenitorech. Aktivace FLT3 u FLT3-ITD pozitivních pacientů ovlivňuje několik jiných drah včetně již zmiňované RAS dráhy, dále způsobuje inhibici apoptózy mediované kaspázami přes stimulaci PI3K (phosphatidyl inositol triphosphate) a AKT (akt kinase) (Mizuki et al., 2000).

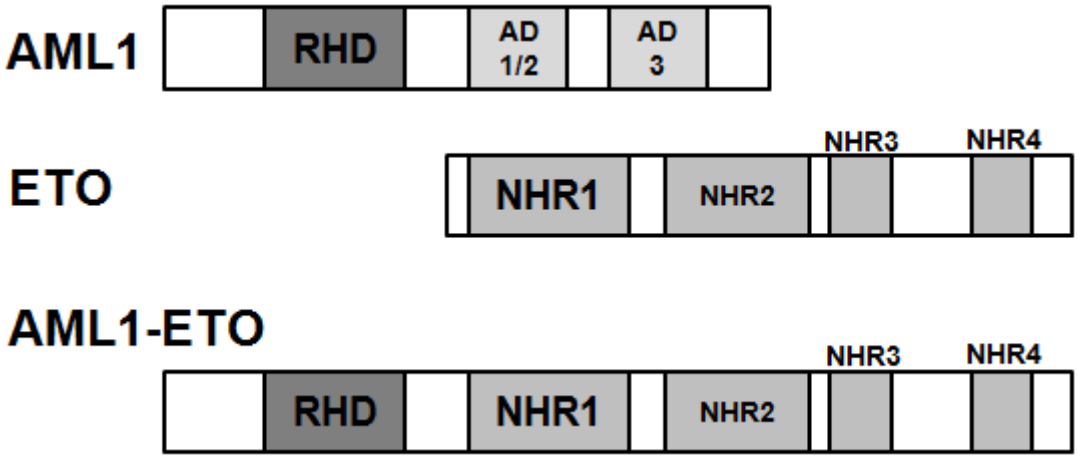
Mutace II. třídy většinou fungují jako transkripční represory, což způsobuje inhibici diferenciace normálních hematopoetických buněk. Typickými zástupci této třídy jsou translokace zahrnující CBF komplex, např. t(8;21)(q23;q22) generující chimérický protein AML1-ETO a inv(16)(p13;q22), kde fúzuje CBFβ s MYH11. APL je molekulárně definována přítomností translokace obsahující RARα (receptor pro retinovou kyselinu alfa) nacházející na chromozomu 17. Většina případů APL je spjata s t(15;17), která dává podklad chimérickému proteinu PML-RARα, který způsobuje blok myeloidní diferenciace na úrovni promyelocytu (Mistry et al., 2003). Translokace části chromozomu 11 obsahující oblast q23 se nejčastěji vyskytuje u akutních leukémií kojeneckého věku. Translokace obsahující *MLL* gen způsobují zvýšení exprese některých genů s homeoboxovou doménou (HOXA9, HOXA7) (Armstrong et al., 2002; Ayton and Cleary, 2001). Existují studie, které prokazují, že overexprese genů HOX rodiny způsobuje maligní transformaci hematopoetických buněk u AML (Kroon et al., 2001; Roche et al., 2004).

1.5. AML1-ETO

Translokace t(8;21)(q22;q22) se zlomy na chromozomech 8q22 a 21q22.3 vede ke vzniku fúzního genu *AML1-ETO*, který je možné v literatuře najít pod názvy *RUNX1-MTG8, AML1-MTG8* nebo *RUNX1-RUNX1T1*. Translokace byla poprvé detekována v roce 1973 během analýzy vzorku pacienta s AML (Rowley, 1973). Gen *AML1* (acute myeloid leukemia 1) je uložen na chromozomu 21, skládá se z 9 exonů a je přepisován do tří různých izoforem (Miyoshi et al., 1995). Exprese *AML1* je regulována dvěma promotory a alternativním sestřihem. Gen *ETO* (eight-twenty one) lokalizován na chromozomu 8 se skládá ze 13 exonů rozložených v lokusu o velikosti 87 kb a také má alternativní sestřihové formy (Wolford and

Prochazka, 1998). Zlomy v genu *AML1* jsou nahromaděny v oblasti intronu 5 se třemi zlomovými místy BCR (breakpoint cluster regions) (Zhang et al., 2002). Oproti tomu zlomy v genu *ETO* byly identifikovány ve dvou intronech s jedním BCR v exonu 1a a třemi BCR v exonu 1b (Xiao et al., 2001).

AML1 je členem genové rodiny RUNX, která obsahuje *AML1* (*RUNX1, CBFα2*), *AML2* (*RUNX3, CBFα3*) a *AML3* (*RUNX2, CBFα1*). Všechny RUNX proteiny obsahují Runt homologní DNA vazebnou doménu (RHD), která je vysoce homologní s Runt proteinem *drosophily*. U octomilek je protein Runt zodpovědný za regulaci segmentace a sexuální determinace (Duffy et al., 1991; Kania et al., 1990). Kromě Runt domény obsahuje AML1 také transaktivační doménu (Kurokawa et al., 1996; Meyers et al., 1995) a dvě inhibiční domény (Kanno et al., 1998; Levanon et al., 1998). Navíc AML1 tvoří heterodimer s CBFβ, což umožňuje efektivní vazbu na DNA (Ogawa et al., 1993). V translokaci t(8;21)(q22;q22) je z genu AML1 obsažena N-koncová oblast obsahující RHD (Obrázek č. 2), čímž je umožněna vazba chimérického proteinu AML1-ETO na promotory AML1 cílových genů. Zároveň je AML1-ETO schopen interakce s dalšími transkripčními faktory pomocí vazby přes intaktní RHD. První a nejlépe známý AML1 vazebný protein je CBFβ (core binding factor beta), s kterým AML1 tvoří heterodimer a zajišťuje efektivní vazbu AML1 na DNA a plnou funkci transaktivační domény (Ogawa et al., 1993; Wang et al., 1996b). Další protein-proteinové interakce byly identifikovány kvůli blízkosti DNA vazebného motivu AML1 s vazebnými motivy pro další transkripční regulátory, jako například LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1), C/EBPα, PU.1 a GATA1. AML1 asociuje s těmito transkripčními faktory a podporuje jejich interakci s DNA. (Elagib et al., 2003; Gu et al., 2000; Li et al., 2004; Libermann et al., 1999; Petrovick et al., 1998; Zhang et al., 1996). AML1 je klíčový transkripční faktor nezastupitelný v rozvoji definitivní hematopoézy. K potvrzení této role byly použity myší modely s knock-out exonu 4 RHD části genu *AML1*. Homozygotní myši s $AML1^{-/-}$ uhynuly *in utero* 12. den embryonálního vývoje bez známek definitivní hematopoézy a s četným krvácením do CNS (Wang et al., 1996a).



Obrázek č. 2 Schématické znázornění vnitřní architektury genů *AML1, ETO* a *AML1-ETO*. Gen *AML1* se skládá z RHD a aktivačních domén 1, 2 a 3 (AD), gen *ETO* obsahuje NHR 1, 2, 3 a 4. Fúzní gen se skládá z N terminálního konce genu *AML1* a téměř celého genu *ETO*. Převzato z Peterson *et al.* , 2004.

ETO neboli *MTG8* (myeloid translocation gene 8) gen patří do ETO rodiny, která dále obsahuje *ETO2* (*MTG16*) a *MTGR1* (MTG8-related protein 1) (Calabi and Cilli, 1998; Kitabayashi et al., 1998). Všichni tři členové této genové rodiny mají evolučně konzervované NHR (Nervy homology domain) 1 až 4 založené na jejich homologii k proteinu Nervy octomilek, který se účastní neuronálního vývoje v průběhu segmentace (Feinstein et al., 1995). NHR1 má homologii s TAF110 (TATA asociovaný faktor 110) a s dalšími TAF u *Drosophila melanogaster* (Erickson et al., 1996). NHR2 doména obsahuje sekvenci hydrofobních aminokyselin, která je důležitá pro heterodimerizaci mezi proteiny ETO rodiny (Zhang et al., 2001). NH3 obsahuje NH3 „predicted coiled coil“ strukturu a NH4 doménu se dvěma motivy zinkových prstů, které slouží interakci mezi proteiny (Gross and McGinnis, 1996). Studie na kvasinkách ukázaly, že NHR4 „zinc-finger" doména proteinu ETO je schopna vázat jaderný korepresor NCor (nuclear corepressor) a SMRT (silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor) (Gelmetti et al., 1998). NCoR a SMRT jsou jaderné korepresory, které se uvolňují z intracelulárního estrogenového hormonálního receptoru po vazbě ligandu a tím umožňují aktivaci transkripce (Shibata et al., 1997). Je známo, že tyto korepresorové proteiny asociují s dalšími proteiny zahrnutými v represi transkripce jako mSin3a a HDAC (deacetylázy histonů) (Li et al., 1997). Z toho vyplývá, že AML1-ETO společně se SMRT, NCoR a HDAC mohou vytvořit represorový komplex v AML1 cílových regulačních oblastech a negativně tak ovlivňovat genovou expresi. Hlavní funkční charakteristikou AML1-ETO proteinu je jeho schopnost vázat DNA v oblastech

obsahujících AML1 vazebný motiv charakterizovaný sekvencí $TG^{T}/_{C}GGT$ (Meyers et al., 1993). Řada studií používajících ektopicky exprimovaný fúzní gen ukázala, že AML1-ETO negativně reguluje AML1 cílové geny, mezi které patří gen *MDR1* (Multidrug resistence 1), *GM-CSFR* (receptor pro granulocytární a monocytární faktor stimulující tvorbu kolonií) a *IL-3* (interleukin-3) (Bakshi et al., 2010; Hines et al., 2007; Liu et al., 2007). U dalších genů byla prokázána vazba AML1-ETO do jejich regulačních oblastí. Použitím chromatinové imunoprecipitace byly identifikovány geny IGFBP7 (insulin-like growth factor binding protein 7) a BPI (bactericidal/permeability increasing), do jejichž promotorových oblastí se protein AML1-ETO váže a potlačuje jejich expresi (Dunne et al., 2006).

K porozumění mechanizmu leukemogenního potenciálu t(8;21) byl studován vliv AML1-ETO na buněčné procesy s použitím hematopoetických buněčných liniích nebo primárních lidských nebo myších buněk z kostní dřeně. V knock-in buněčných liniích se stabilně transfekovaným AML1-ETO (K562, U937, 32D, L-G, MEL) bylo prokázáno, že tento chimérický protein blokuje myeloidní nebo erytroidní diferenciaci (Amann et al., 2001; Burel et al., 2001; Kitabayashi et al., 1998; Kohzaki et al., 1999; Shimizu et al., 2000). V L-G a 32D buňkách způsobuje AML1-ETO zástavu diferenciace a indukuje G-CSF dependentní proliferaci (Shimizu et al., 2000). Naopak v U937 je blok diferenciace doprovázen sníženou expresí C/EBPα (Burel et al., 2001; Pabst et al., 2001). V retrovirově transdukovaných primárních lidských CD34 pozitivních buňkách podporuje protein AML1-ETO proces sebeobnovy následovaný zástavou formace kolonií. Důležité zjištění je, že takto transfekované CD34 pozitivní buňky nejsou samostatně schopny vyvolat leukémii po xenotransplantaci NOD/SCID myším (Mulloy et al., 2003; Mulloy et al., 2002). Podobný efekt na růst a myeloidní diferenciaci byl pozorován v *in vitro* esejích primárních myších buněk z kostní dřeně (Hug et al., 2002). Navíc se ukázalo, že k tomuto efektu jsou nezbytně potřebné domény NHR2 a NHR4 proteinu ETO. V experimentu se ztrátou funkce těchto domén byl účinek AML1-ETO eliminován (Hug et al., 2002). Shrnuto dohromady z uvedeného vyplývá, že AML1-ETO rozvine svůj onkogenní potenciál mechanizmem zástavy diferenciace a iniciací sebeobnovy (self-renewal) v hematopoetických kmenových buňkách a časných myeloidních progenitorech. K rozvoji leukémie samotná přítomnost AML1-ETO nestačí a je potřeba dalšího zásahu (de Guzman et al., 2002; Grisolano et al., 2003; Schwieger et al., 2002; Yuan et al., 2001b).

1.6. Histonové modifikace jako regulační mechanizmus genové exprese

Epigenetika se zabývá přenosem informací, které nejsou zakódovány v nukleotidové sekvenci DNA. Tyto informace jsou přenášeny především ve struktuře a modifikacích histonů, chemických modifikacích DNA a RNA molekulách. Je již delší dobu známo, že histony, tedy bazické nukleoproteiny, zajišťují sbalení DNA do nukleozomů a organizaci chromatinu vyššího řádu (Van Holde et al., 1974). Histony podstupují posttranslační modifikace, které ovlivňují jejich interakci s DNA a nukleárními proteiny. Histony H3 a H4 mají četné výběžky bohaté na lyzin a arginin nesoucí kladný náboj. Tyto aminokyseliny jsou přístupné modifikacím, jako jsou acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinylace a další. Histonové modifikace ovlivňují řadu biologických procesů, jakými jsou regulace genové exprese, oprava DNA, chromozomální kondenzace a spermatogeneze (meiosis). Acetylace a metylace histonů jako posttranslační úpravy a jejich možná úloha v regulaci genové exprese byla popsána před téměř půl stoletím (Allfrey and Mirsky, 1964). Teprve později v devadesátých letech bylo zjištěno, že kombinace histonových modifikací dávají základ tzv. histonovému kódu. Histonový kód je tedy určitý vzorec modifikací, který podmiňuje sílu vazby histonů k DNA a tím pádem aktivitu chromatinu v daném místě (Jenuwein and Allis, 2001).

Při acetylaci a deacetylaci histonů jsou histony acetylovány a deacetylovány na N-koncových částech za katalytického působení enzymů histonové acetyltransferázy (HAT) a deacetylázy histonů (HDAC). Přenesení acetylového negativně nabitého zbytku na lyzin neutralizuje kladný náboj a tím zruší vazbu s DNA, což vede k relaxaci chromatinu a zvýšení přístupnosti transkripčních faktorů k promotorům cílových genů. Naopak HDAC odstraněním acetylového zbytku způsobí obnovení kladného náboje, posílí vazbu histonu k DNA v rámci daného nukleozomu a způsobí represi transkripce (Struhl, 1998). Relaxovaná, transkripčně aktivní DNA je referována jako euchromatin, oproti tomu kondenzovaná DNA je označována jako heterochromatin.

Kromě kovalentních histonových modifikací existují i ATP-dependentní histonové modifikační komplexy (Saha et al., 2006), které získávají energii hydrolýzou ATP. Mezi nejlépe prostudované patří SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) remodelační komplex. Tento komplex obsahuje tzv. bromodoménu, která se váže na acetylovaný lyzin histonových výběžků. SWI/SNF komplexy reorganizují nukleozomy tak, aby byla DNA dostupná transkripčním faktorům (Gangaraju et al., 2007). Tím se podílejí na regulaci řady

buněčných procesů, jako je oprava DNA, diferenciace, sestřih RNA, replikace DNA a regulace buněčného cyklu. (Hassan et al., 2002).

1.7. HDAC a jejich role v rozvoji maligních onemocnění

V poslední dekádě začalo být evidentní, že patogeneze nádorů se také kromě genových mutací účastní epigenetické změny (Esteller, 2008). V rozvoji a výzkumu nových cílených léčiv se HDAC staly novým cílem pro léčbu nádorových onemocnění a dalších nemocí. Inhibice HDAC aktivity vede k acetylaci histonů a nehistonových proteinů. Na základě homologních sekvencí se HDAC rodina skládá z nejméně 18 členů rozdělených do dvou rodin (klasická a sirtuin) a čtyř tříd. HDAC jsou rozděleny do třídy I (HDAC1, 2, 3 a 8), která je podobná kvasinkovému proteinu RPD3 (reduced potassium dependency 3), třídy IIa (HDAC4, 5, 7 a 9), třídy IIb (HDAC6 a 10), třídy III (SIRT) a třídy IV (HDAC11) (Balasubramanian et al., 2009). HDAC třídy I a II mají zinek jako kofaktor a jsou zahrnuty v patogenezi různých nádorů. Třída I HDAC se vyskytuje výhradně v jádře a je typicky nalézána v korepresorových komplexech s N-CoR, mSin3a, SMRT, stejně tak i s methyl vážícím proteinem jakým je MeCP2 (methyl CpG binding protein 2). Třída II HDAC je podobná kvasinkovému proteinu HDA1 (histone deacetylase 1) a má unikátní N terminální sekvence, které umožňují transport mezi jádrem a cytoplasmou. Zajímavé je, že se HDAC exprimují stabilně bez ohledu na nádorovou transformaci, HDAC I ubikviterně, HDAC II více tkáňově specificky (Verdel and Khochbin, 1999; Zhou et al., 2000).

V aktivitě HAT a HDAC musí existovat určitá rovnováha a její změny mohou mít dramatické konsekvence ve smyslu změn buněčného fenotypu. Nejpodrobněji jsou tyto změny rovnováhy v nádorových buňkách popsány díky studiím u leukémií. APL byla prvním modelovým maligním onemocněním, kde byla demonstrována role HDAC (Minucci et al., 2001). Tato leukémie je charakterizována zástavou diferenciace ve stádiu promyelocytů, což je způsobeno fúzním proteinem obsahující receptor pro retinovou kyselinu alpha (RARα). V 95% případů fúzuje RARα s PML (promyelocytic leukemia) a zhruba v 5% s PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) nebo vzácněji s dalšími proteiny. Pacienti s APL a fúzí PML-RARα odpovídají na léčbu retinovou kyselinou (RA). Na buněčné úrovni je tato odpověď způsobena obnovením diferenciačního programu leukemických buněk, které projdou granulocytární diferenciací a podstoupí apoptózu (Warrell et al., 1991). V průběhu myeloidní diferenciace funguje RARα jako transkripční faktor, který hraje roli v regulaci

transkripce cílových genů RA. Bez přítomnosti RA se RARα váže k DNA „response elementům“ RA-regulovaných genů a je asociován s komplexy obsahujícími HDAC, což způsobuje útlum transkripce. Při fyziologických koncentracích RA dochází ke změně konformace RARα, k uvolnění HDAC a navázání transkripčních koaktivátorů včetně HAT a následné transkripční aktivaci (Minucci and Pelicci, 1999). U APL si fúzní geny (např. PML-RARα) zachovávají schopnost vazby v promotorové oblasti RA-cílových genů, ale navíc zůstávají komplexy s HDAC navázány i při fyziologických koncentracích RA (Lin et al., 1999). Navíc PML-RARα oligomerizuje přes „self-associating“ doménu, což vede ke zvýšené vazbě k HDAC a k prohloubení transkripčního útlumu (Lin and Evans, 2000). Oproti tomu farmakologické dávky RA (10 až 100 krát vyšší koncentrace než fyziologické) jsou schopné vyvolat disociaci komplexů s HDAC a způsobit proteozomální degradaci fúzního proteinu, což vede k diferenciaci promyelocytů. APL s fúzí PLZF-RARα je rezistentní k farmakologickým dávkám RA z důvodu neschopnosti disociace HDAC komplexů. Experimentálně je dokázáno, že ATRA v kombinaci s inhibitory deacetyláz histonů (HDACi) jsou schopné zvrátit diferenciační blok a obnovit expresi RA-cílových genů v podmínkách *in vitro* i *in vivo* u tohoto nepříznivého podtypu AML (He et al., 2001).

Důkazy o porušené rovnováze mezi HAT a HDAC existují i u solidních nádorů. Specifické HAT (p300 a CREB-vážící protein (CBP)) jsou cílem virových onkoproteinů (adenovirový E1A, E6 lidského papilomaviru, T antigen SV40) (Eckner et al., 1994). Monoalelické germinální mutace p300 a CBP jsou nalézány u kongenitálního Rubinstein-Taybi syndromu. Pacienti s tímto syndromem mají vývojové vady a mají predispozici k nádorovým onemocněním (Iyer et al., 2004). Dále bylo prokázáno, že HDAC2 funkčně interaguje s Wnt signalizační dráhou. Byla prokázána overexprese HDAC2 u myších tumorů, kterým chybí tumor supresorový gen APC (adenomatous polyposis coli). Také RNA interferencí mediovaný knockdown HDAC2 u buněk kolorektálního karcinomu indukoval apoptózu, což ukázalo na funkci HDAC2 v ochraně nádorových buněk proti apoptóze (Zhu et al., 2004). Rozsáhlá analýza panelu normální tkáně, buněčných linií a primárních nádorových buněk ukázala ztrátu acetylace na lyzinu na N-terminálním konci v pozici 16 (K16) a trimetylace na lyzinu K20 histonu H4 u množství nádorů (Fraga et al., 2005).

1.8. Inhibitory deacetyláz histonů

HDACi jsou potencionální protinádorové látky, které jsou schopny reaktivovat genovou expresi a obnovit schopnost maligních buněk podstoupit buněčnou smrt. Je známa řada přírodních a syntetických látek, které inhibují aktivitu HDAC. Jelikož mají HDACi různou afinitu k různým HDAC, můžeme je rozdělit na neselektivní a selektivní inhibitory (Balasubramanian et al., 2009). Podle chemické struktury se rozdělují na hydroxamové kyseliny (trichostatin A, vorinostat, dacinostat, a panobinostat), pyroxamové kyseliny (PXD101 a CRA-026440), karboxylové kyseliny (VPA, butyrát sodný), benzoamidy (entinostat a mocetinostat) a cyklické tetrapeptidy (trapoxin, romidepsin, depsipeptid a spiruchostatin A). Hydroxamové a pyroxamové kyseliny působí jako nespecifické inhibitory všech HDAC již v nanomolárních koncentracích, oproti tomu karboxylové kyseliny, benzoamidy a cyklické tetrapeptidy mají specifický účinek v inhibici aktivity třídy I HDAC (Marks and Xu, 2009; Xu et al., 2007). V současnosti je nejméně 15 HDACi testováno v klinických studiích v monoterapii nebo v kombinaci s dalšími cytostatiky. Například neselektivní inhibitor panobinostat je v perorální formě testován u několika hematologických malignit. Vorinostat, jehož účinek byl ověřen v rozsáhlé klinické studii fáze II, byl schválen americkou agenturou pro kontrolu léčiv FDA (Food and Drug Association) k použití u pacientů s periferním kožním T buněčným nehodgkinským lymfomem (Olsen et al., 2007). Intravenózně podávaný HDACi specifický pro třídu I romidepsin také ukázal slibný efekt u kožního T lymfomu, kdy byla dosažena celková odpověď na léčbu u 32% pacientů (Coiffier et al., 2012). Další selektivní inhibitor dostupný v perorální formě mocetinostat byl testován u mnoha solidních i hematologických malignit (Siu et al., 2008).

Přes výše uvedené účinky HDACi na nádorové buňky je působení na zdravé tkáně bez signifikantního efektu, jak ukázala Starkova et al (Starkova et al., 2007) na modelu lidských lymfocytů. Působením HDACi VPA nebylo dosaženo změny imunofenotypu ani indukce apoptózy. Předpokládá se, že produkce kyslíkových radikálů (ROS) hraje úlohu v HDACi indukované apoptóze. Normální netransformované lidské fibroblasty akumulují po léčbě HDACi přirozený ROS „scavenger“ thyreoredoxin (TXN) (Rosato et al., 2003; Shao et al., 2004). Tudíž může být akumulace ROS eliminována v normálních buňkách pomocí TXN, kdežto transformované buňky podlehnou buněčné smrti, protože neexprimují TXN. To bylo potvrzeno studií s knockdownem TXN v normálních buňkách, což po podání HDACi způsobilo akumulaci ROS a indukci buněčné smrti (Ungerstedt et al., 2005).

Valproová kyselina (VPA) neboli 2-propyl-pentanová kyselina je mastná kyselina s krátkým řetězcem, která byla poprvé syntetizována Burtonem v roce 1882 (Burton, 1882). Po dobu téměř celého století byla používána jako fyziologicky inertní organické rozpouštědlo. Až v roce 1963 byly zjištěny její antikonvulzivní vlastnosti (Meunier et al., 1963). Od té doby se VPA používá k léčbě epilepsie, neuropatických bolestí a bipolární poruchy. Tyto účinky jsou dány potenciací inhibiční aktivity kyseliny gama-aminomáselné (GABA), ovlivněním přenosu na excitačních synapsích a modifikací monoaminů (Mesdjian et al., 1982; Zeise et al., 1991). Na konci 90. let minulého století se ukázalo, že VPA je v terapeutických koncentracích schopna inhibovat HDAC. VPA specificky inhibuje HDAC I. třídy (HDAC 1, 2, 3) a třídy IIa (HDAC 4, 5, 7) (Gottlicher et al., 2001). Aktivita HDAC 6, 8 a 10 není působením VPA ovlivněna (Bradbury et al., 2005). Bylo zjištěno, že VPA významným způsobem ovlivňuje AML blasty zprostředkovaně inhibicí HDAC I. třídy (Gurvich et al., 2004). Tento efekt je doprovázen zvýšenou koncentrací acetylovaných histonů H3 a H4 v *in vitro* i *in vivo* podmínkách (Gottlicher et al., 2001; Liu et al., 2007). Experimentální léčba VPA navíc způsobuje proteozomální degradaci HDAC2 (Kramer et al., 2003). Poté, co byla VPA prokázána jako potentní agens způsobující apoptózu u buněčných linií odvozených od AML (Kawagoe et al., 2002; Sasaki et al., 2008), byla testována v klinických studiích I. a II. fáze u myelodysplastického syndromu (MDS) a AML u starších pacientů. Přestože iniciální výsledky s 30% MDS pacientů odpovídajících na léčbu VPA v monoterapii nebo v kombinaci s ATRA byly slibné (Kuendgen et al., 2004), studie s AML pacienty ukázala pouze 5% odpovědí (nebo 16% odpovědí hodnocených podle kritérií mezinárodní pracovní skupiny pro MDS) (Kuendgen et al., 2006). V dalších několika studiích byla VPA použita v kombinaci s ATRA podávané konkomitantně nebo sekvenčně v klinických studiích u pacientů s refrakterní AML nebo AML vysokého rizika. V první studii tato léčebná kombinace indukovala vylepšení hematologických parametrů (definované jako nižší závislost na transfuzích, počet blastů neovlivněn) u dvou z osmi pacientů (Cimino et al., 2006). V dalších dvou studiích byly pozorovány odpovědi u tří pacientů z jedenácti (včetně jedné kompletní remise (CR)) (Raffoux et al., 2005) a u tří pacientů z devatenácti (Bug et al., 2005). Zmíněné výsledky naznačují, že existuje skupina pacientů, kteří odpovídají na léčbu VPA a proto je nutné identifikovat tu podskupinu pacientů, která bude mít z diferenciační léčby největší přínos.

2. Hypotézy a cíle práce

Akutní myeloidní leukémie s t(8;21) tvoří 12-14% všech dětských AML a je pokládána za leukémii s dobrou prognózou. I přesto někteří pacienti s tímto podtypem AML prodělají relaps onemocnění, jak ukázaly výsledky léčby podle mezinárodního protokolu BFM AML 98, kde byla pozorována kumulativní incidence relapsu (CIR) 16±5% a pravděpodobnost pětiletého přežití bez události (EFS) 81±5%. Navíc v rámci protokolu BFM AML 2004 existovala snaha tento podtyp leukémie léčit méně intenzivně, což vedlo ke zhoršení léčebných výsledků. Vynecháním jednoho bloku chemoterapie obsahující vysokodávkovaný cytarabin a antracyklin mitoxantron se ve srovnání s předchozím protokolem zvýšila CIR na 28±6% a pětiletý EFS poklesl na 66±6% (Creutzig et al., 2006). Tudíž excelentní prognóza tohoto podtypu AML je zachována pouze za předpokladu podání plné intenzivní chemoterapie. Z toho důvodu je nutné hledat nové, cílené léky, které přidáním do kombinace cytostatik umožní redukovat léčbu se zachováním dobrých léčebných výsledků. Jak již bylo popsáno v úvodu, t(8;21) dává vzniknout chimérickému proteinu AML1-ETO, který cestou aberantní vazby HDAC způsobuje zablokování myeloidní diferenciace, tudíž by užití HDACi mohlo být efektivní léčbou.

Předpokládaným cílem této práce bylo modelování terapie pomocí VPA, která má vlastnosti inhibitoru deacetyláz histonů a jejíž účinek by měl vést k potlačení represivního vlivu proteinů AML1-ETO na expresi cílových genů. Předpokládali jsme také zvrácení patologického diferenciačního bloku způsobeného přítomností proteinu AML1-ETO.

Cíle jsme rozdělili do těchto bodů:

- ověření efektu VPA na AML1-ETO pozitivní buňky sledováním změn exprese diferenciačních znaků myeloidních buněk pomocí průtokové cytometrie a v porovnání s jinými podtypy AML. Porovnáním imunofenotypově identických buněčných linií s a bez přítomnosti chimérického proteinu AML1-ETO jsme chtěli prokázat specificitu účinku VPA danou inhibicí HDAC.
- analýza změn v buněčném cyklu vybraných buněčných linií odvozených od AML
- korelace změn v imunofenotypu indukovaných VPA s jednotlivými fázemi buněčného cyklu

- potvrzení předpokládané obnovy exprese známých a kandidátních AML1 cílových genů u AML1-ETO pozitivních buněk léčených VPA
- ověření účinnosti VPA na primárních pacientských blastech získaných z kostní dřeně pacientů v den diagnózy

3. Materiál a metodika

3.1. Buněčné linie a pacientské vzorky

Buněčné linie odvozené z lidské akutní myeloidní leukémie Kasumi-1, MV4;11, K562 (DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Německo) a Kasumi-6 (ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) byly kultivovány v médiu RPMI1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) obohaceném o fetální kravské sérum (FBS – Gibco BRL, Carlsbad, TX, USA) o koncentraci 10% (Kasumi-6, MV4;11 a K562) a 20% (Kasumi-1) s přidanými antibiotiky (1% penicilin-streptomycin) za standardních podmínek při 37°C v atmosféře s 5% oxidu uhličitého. Navíc byl k linii Kasumi-6 přidáván růstový faktor GM-CSF o koncentraci 2ng/ml podle doporučení prodejce buněčné linie ATCC. Buňky byly léčeny VPA (Sigma) o koncentraci 0,5 mM a 1,0 mM a TPA (12-0-tetra-tetradecanoylphorbol-13-acetate - Sigma) o koncentraci 1,62 μM po dobu 24 a 48 hodin. TSA (Trichostatin A) byl použit jako pozitivní kontrola u linie Kasumi-1 o koncentraci 120 nM s délkou působení 24 a 48 hodin. ATRA byla použita jako další diferenciační agens u linie Kasumi-1 o koncentraci 1 μM. Kaspázový inhibitor Z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone; Sigma) byl použit 1 hodinu před aplikací VPA k zablokování apoptózy u linie Kasumi-1 o koncentracích 20 μM a 100 μM.

K validaci dat získaných z experimentů na buněčných liniích byly ve finálním experimentu použity blasty od čtyř dětských pacientů s AML M2 podle FAB klasifikace: dvou AML1-ETO negativních (pacient číslo 1 s karyotypem 46,XX, dívka, infiltrace 65% atypickými blasty v kostní dřeni v den diagnózy; pacient číslo 2 s karyotypem 46,XY, chlapec, infiltrace 73% v kostní dřeni) a dvou AML1-ETO pozitivních (pacient číslo 3 s karyotypem 46,XX,t(8;21) (q23;q22), dívka, infiltrace 75% v kostní dřeni a pacient číslo 4 s karyotypem 46,XY,t(8;21)(q23;q22), chlapec, infiltrace 60% v kostní dřeni). Blasty byly odebrány z kostní dřeně aspirací v den diagnózy a kryoprezervovány v tekutém dusíku podle institucionálního protokolu po odsouhlasení etickou komisí. Informované souhlasy byly získány od zákonných zástupců, jak to nařizuje Helsinská deklarace. V době experimentu byly vzorky rychle rozmraženy na teplotu 37°C a přidáním média IMDM (Iscoves Modified Dulbecco´s medium (Sigma)) o teplotě 37°C byl odmytý dimethyl sulfoxid (DMSO, Sigma) centrifugací 1000 otáček za minutu (rpm) po dobu 5 minut. Vzorky byly kultivovány v médiu

IMDM obohaceném o 30% FBS (Gibco) a směs cytokinů TPO (trombopoetin), IL-6 (interleukin-6), SCF (stem cell factor) a FLT3-L (fms-related tyrosine kinase 3 ligand) (Sigma) o koncentraci 2 ng/ml při 37°C v atmosféře s 5% oxidu uhličitého. Po 24 hodinách kultivace byla přidána VPA o koncentraci 1,0 mM na dobu 24 a 48 hodin.

3.2. Analýza buněčného cyklu

K analýze množství DNA v jádře byl použit CycleTEST^{TM} PLUS DNAReagent Kit (Becton Dickinson Immunometry Systems, CA, USA) fungující na principu vazby propidium jodidu k DNA. Po 24 a 48 hodinové kultivaci buněčných linií a pacientských vzorků s VPA a TPA byla připravena suspenze buněk, které byly značeny podle návodu od výrobce (62 µl reagencie A, inkubace 10 minut na temném místě, 50 µl reagencie B, 10 minut inkubace na temném místě, 50 µl reagencie C a 10 minut inkubace v chladu). Propidium jodid navázaný na DNA byl měřen a kvantifikován jako množství oranžové fluorescence pomocí průtokového cytometru LSR II (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San Jose, CA, USA). Distribuce v rámci buněčného cyklu byla analyzována softwarem FlowJo 8.1.1. (Treestar, Ashland, OR, USA) a Modfit (Verity House, ME, USA).

3.3. Detekce diferenciace vyšetřením průtokovou cytometrií

Průtokový cytometr LSR II (BD Biosciences) byl použit k detekci exprese povrchových markerů. K detekci diferenciace byly použity mnohobarevné kombinace s použitím protilátek proti povrchovým znakům CD11a, CD11b, CD15, CD38, CD33, CD34, CD117, CD14, HLA-DR, CD45 a GPA (glycophorin A) (BD Biosciences a Immunotech, Marseille, Francie). Protilátky konjugované s fluorescenčními barvami (FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythin), PC7 (phycoerythrin cyanin 7), APC (allphycocyanin), PerCP (peridinin chlorophyll protein complex), A680 (alexa680)) byly použity v následujících kombinacích: Kasumi-1 první kombinace obsahovala CD15 FITC, CD117 PE, CD34 PC7, CD38 A680, druhá kombinace s CD11a FITC, CD11b PE, CD14 PC7, CD33 APC; buňky Kasumi-6 byly značeny CD11b FITC, CD117 PE, CD14 PC7, CD33 APC a CD34 PerCP5.5. U MV4;11 byly použity stejné dvě kombinace jako u Kasumi-1, pouze místo CD11a FITC v druhé kombinaci byla použita protilátka proti HLA-DR FITC. K562 buňky byly značeny kombinací

protilátek GPA FITC, CD11b PE, CD33 APC, CD45 PerCP, CD34 PC7. Po sklizení byly buňky (buněčných linií a pacientské blasty) resuspendovány v 50 µl PBS, označeny kombinací protilátek (5 µl), inkubovány 30 minut v temnu a promyty. K odlišení mrtvých buněk byl přidán 2-(4-amidinofenyl)-6-indolkarbamidin dihydrochlorid (DAPI; Sigma) bezprostředně před měřením. Vzorky byly takto měřeny v mnohobarevných kombinacích pomocí LSR II. Analýza byla provedena pomocí softwaru FlowJo (Treestar).

3.4. Analýza fází buněčného cyklu zároveň s povrchovými markery

K ozřejmění změn v imunofenotypu v různých fázích buněčného cyklu u buněk Kasumi-1 po aplikaci VPA 1,0 mM jsme použili Vybrant DyeCycle Violet (DCV) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) společně s protilátkami proti povrchovým znakům CD33 APC, CD117 PE a CD11b FITC. K buňkám kultivovaným v 24 jamkových destičkách o koncentraci $1x10^6$/ml byl přidán DCV 1µl na jamku 30 minut před sklizením. Poté byly buňky sesbírány a značeny protilátkami, jak bylo popsáno výše. Souběžně byly kultivovány buňky Kasumi-1 ovlivněné VPA 1,0 mM, ke kterým nebyl přidán DCV, a které byly značeny pomocí Annexin V (BD Bioscience) podle návodu od výrobce a protilátkami proti povrchovým znakům CD33 APC, CD117 PE a CD11b FITC Buňky připravené oběma způsoby byly změřeny průtokovým cytometrem LSR II.

3.5. Kvantifikace genové exprese na úrovni mRNA pomocí real-time kvantitativní reverzní transkriptázové PCR (qRT-PCR)

Celková RNA byla izolována z léčených a kontrolních buněk Kasumi-1, Kasumi-6, K562 a Mv4;11 s použitím RNeasy Mini Kit s přidáním DNase Reaction Kit na odstranění zbytkové genomické DNA (Qiagen, Hilden, Německo). Kvalita a koncentrace RNA byla ověřena kapilární elektroforézou na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer s použitím RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Boblingen, Německo). cDNA byla syntetizována z celkové RNA pomocí iScript cDNA Synthesis Kitu obsahujícím oligo(dT) a purifikovanou MMLV RNA H+ reverzní transkriptázu (Bio-Rad Laboratories, Velká Británie). Ke kvantifikaci cDNA v reálném čase byl použit systém SYBRGreen, který využívá vazby pouze do oblastí dvouvláknové DNA. Tím pádem je specificita PCR reakce dána pouze použitými primery (viz Tabulka č. 3). V PCR reakcích byly použity primery (syntetizované firmou TIB Molbiol, Berlín, Německo) pro geny *PU.1, CEBP/α, BPI, IGFBP7* a housekeeping geny β2-

mikroglobulin a *GAPDH* (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza). Vlastní kvantitativní PCR byla provedena přístrojem LightCycler480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) s použitím výrobcem připraveného PCR mixu PowerSYBRGreen PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), kromě kvantifikace exprese genu β2-mikroglobulin, která byla provedena systémem hybridizačních sond. Měření bylo prováděno v triplikátu a naměřené hodnoty genové exprese vyšetřovaných genů byly děleny naměřenými hodnotami exprese housekeeping genů k zajištění normalizace hodnot.

Tabulka č. 3 Sekvence oligonukleotidů použitých jako primery a hybridizační sondy při qRT-PCR.

Název oligonukleotidu	**Sekvence od 5´k 3´**
PU1 fw	CAGGGGATCTGACCGACTC
PU1 rev	GCACCAGGTCTTCTGATGG
CEBPA fw	GGAGCTGAGATCCCGACA
CEBPA rev	TTCTAAGGACAGGCGTGGAG
IGFBP fw	GAAGTAACTGGCTGGGTGCTG
IGFBP rev	GCTGATGCTGAAGCCTGTCC
BPI fw	TGCAGCAGCCACATCAACA
BPI rev	GTTGGATCAGCCACCCGAC
B2m 3FL	TTCTTCAGTAAGTCAACTTCAATGTCGGA
B2m 5LC	ATGAAACCCAGACACATAGCAATTCAG
B2m A	GATGCTGCTTACATGTCTCG
B2m F	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC
gapdh_8 f	AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG
gapdh_193 r	CGTTCTCAGCCTTGACGGTG

3.6. Soubor pacientů

Do souboru byli zařazeni všichni pacienti (ve věku od 0-18 let) z České Republiky s AML diagnostikovanou *de novo* za období leden 1994 až prosinec 2005, u kterých byla detekována translokace t(8;21) nebo molekulárně geneticky prokázán fúzní gen AML1-ETO . V tomto období bylo v ČR diagnostikováno 143 pacientů s AML, z nichž 16 mělo leukemické blasty nesoucí AML1-ETO fúzi. Cytogenetické vyšetření včetně metody FISH (fluorescence *in situ* hybridization) bylo provedeno v jednotlivých laboratořích spolupracujících s dětskými hematologickými centry. Molekulární vyšetření AML1-ETO bylo provedeno v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze nebo na Interní hematoonkologické klinice Fakultní

nemocnice v Brně. Pacienti byli léčeni podle tří po sobě jdoucích mezinárodních léčebných protokolů AML-BFM 93, AML-BFM 98 a AML-BFM 04.

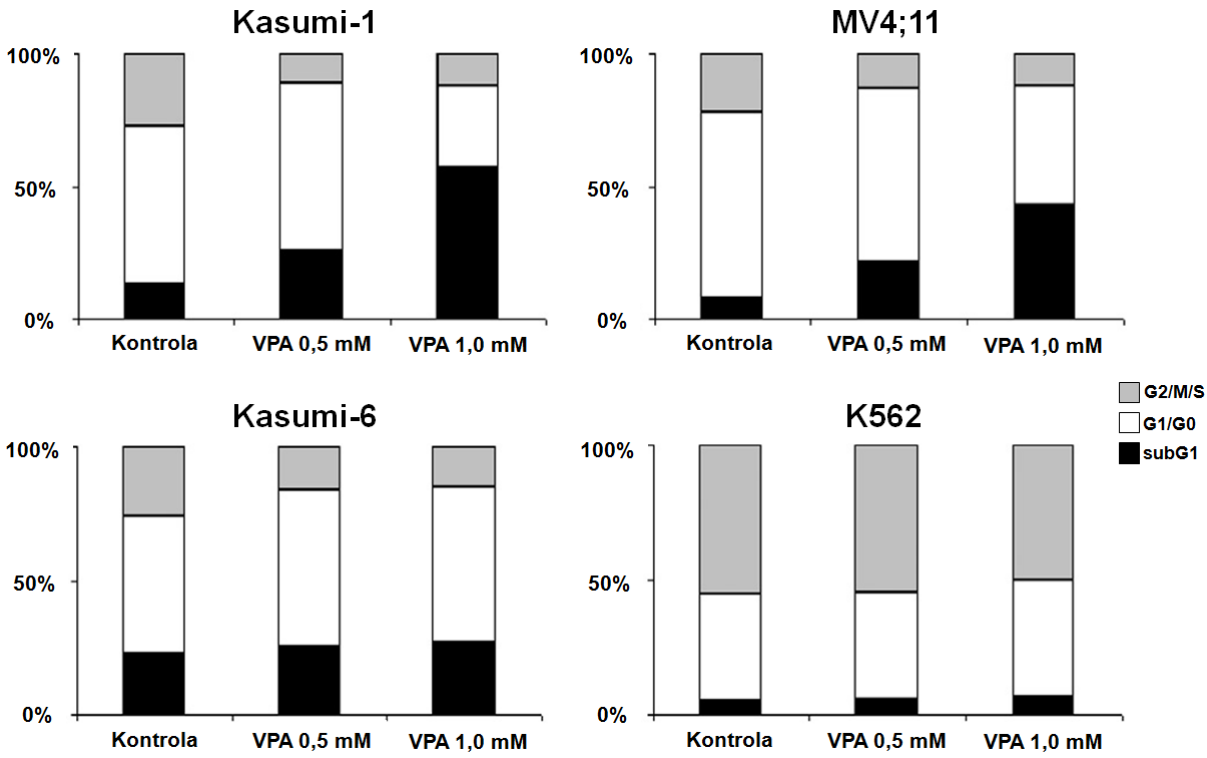
3.7. Statistika

Mann-Whitney test a *t*-test byly použity ke stanovení signifikance rozdílu mezi kontrolními a léčenými vzorky. Analýza přežití pacientů byla stanovena Kaplan-Meierovou metodou, byla vypočítána pravděpodobnost celkového pětiletého přežití (OS) a pravděpodobnost pětiletého přežití bez události (EFS). Mezi události bylo zahrnuto úmrtí, relaps leukémie, sekundární malignita. K provedení statistických testů byl použit software StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA).

4. Výsledky

4.1. Valproová kyselina indukuje apoptózu v buňkách akutní myeloidní leukémie

Studovali jsme změny v buněčném cyklu po léčbě VPA o koncentracích 0,5 a 1,0 mM na buněčných linií odvozených z myeloidních malignit: Kasumi-1 (M2 podle FAB, AML1-ETO pozitivní), Kasumi-6 (M2 podle FAB, AML1-ETO negativní), MV4;11 (M4 podle FAB, MLL-AF4 pozitivní) a K562 (erytroleukémie – blastický zvrat CML, BCR-ABL pozitivní). Účinek VPA na buněčný cyklus se lišil u různých linií. Nejvýraznější indukce apoptózy byla pozorována u Kasumi-1 AML1-ETO pozitivní linie po 48 hodinovém působení 1,0 mM VPA dosahující 56%±3,2% buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu. U MV4;11 linie bylo detekováno 43,0%±1,0% apoptotických buněk. Pouze minimální indukce apoptózy byla detekována u linie K562, kde procento buněk v sub-G1 fázi bylo nalezeno na úrovni 6,1%±1,1%. U Kasumi-6 léčba VPA 1,0 mM vyvolala apoptózu u 20,8%±0,4% v porovnání s kontrolními vzorky, kde bylo naměřeno 16,6%±0,3% buněk v sub-G1 fázi z důvodu zvýšené tvorby debrisu během kultivace. Také další změny v buněčném cyklu byly pozorovány po aplikaci VPA. Snížená proliferační aktivita byla detekována u tří ze čtyř testovaných buněčných linií. Po VPA o 1,0 mM koncentraci se snížilo procento proliferujících buněk reprezentovaných G2/M/S fází buněčného cyklu u Kasumi-1 linie z 27%±2,3% na 12%±1,8% po 48 hodinách inkubace. Pokles proliferující frakce buněk z 22,3%±2,1% na 10%±0,9% byl pozorován u MV4;11 a z 23,8%±0,5% na 17,7±0,6% u Kasumi-6. Navíc byla VPA o koncentraci 0,5 mM schopna indukovat zástavu v G1/G0 fázi buněčného cyklu u Kasumi-1 se vzestupem percentuálního zastoupení buněk na 63%±2,6% v porovnání s 58,5%±3,1% u kontrolních neléčených buněk (Obrázek č. 3). Tyto výsledky prokazují nejvýraznější účinky VPA na změny v buněčném cyklu u Kasumi-1 reprezentující model AML1-ETO pozitivní akutní myeloidní leukémie.



Obrázek č. 3 Vyšetření buněčného cyklu. Grafy znázorňují proporcionální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu u čtyř buněčných linií Kasumi-1, Kasumi-6, MV4;11 a K562, které byly kultivovány 48 hod s VPA o koncentracích 0,5 mM a 1,0 mM. Buněčná smrt je charakterizovaná subG1 fází, proliferující buňky se nachází v G2/M/S fázi buněčného cyklu a klidové buňky jsou nalézány v G1/G0 fázi.

4.2. Diferenciace charakterizována změnami v imunofenotypu

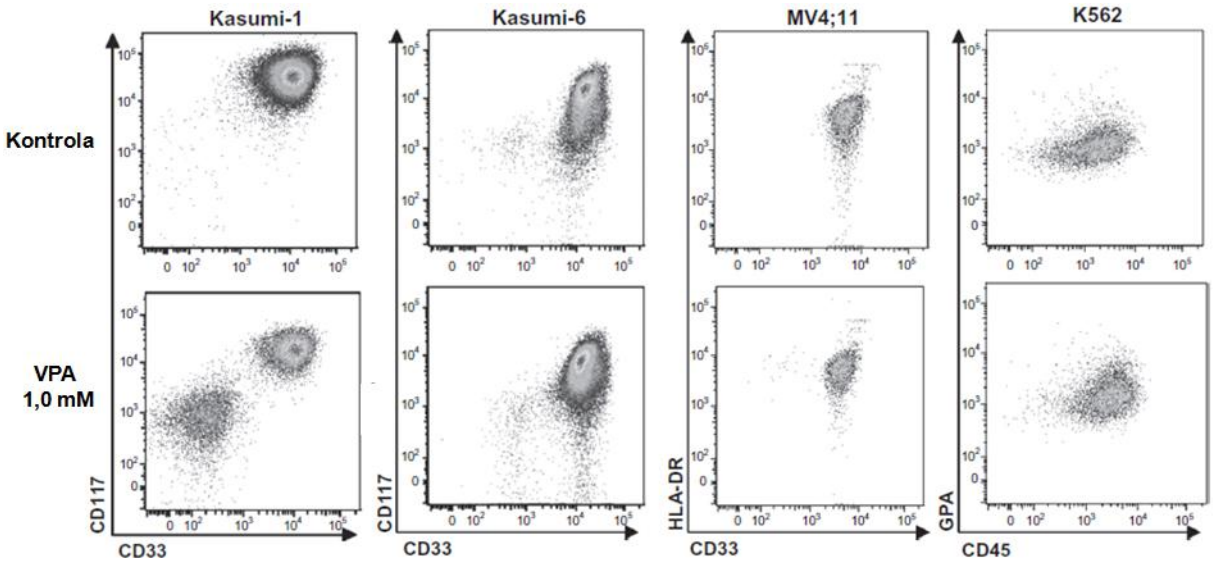
Diferenciace může být charakterizována průtokovou cytometrií jako nenáhodné změny v expresi povrchových znaků. Testované buněčné linie jsou z hlediska imunofenotypu jednoznačně charakterizovány: Kasumi-1 a Kasumi-6 jako zástupci M2 AML s přítomností povrchových znaků CD34, CD38, CD33, CD117 a CD15; linie MV4;11 je charakterizována přítomností HLA-DR, CD33, CD117, CD15 a CD13; K562 exprimuje CD33, CD71, CD15 a CD235a. Abychom zjistili, zda je VPA schopna indukovat diferenciaci v buňkách odvozených od myeloidní leukémie, kultivovali jsme linie Kasumi-1, Kasumi-6, MV4;11 a K562 s přítomností VPA o koncentracích 0,5 mM a 1,0 mM po dobu 24 a 48 hodin. Změny v imunofenotypu byly hodnoceny pouze na živých DAPI negativních buňkách. Kasumi-1 buňky zareagovaly na léčbu VPA (1,0 mM po dobu 48 hodin) snížením exprese povrchových znaků typických pro myeloidní progenitory CD33 ($p<0,001$), CD34 ($p=0,003$), CD117

(p<0,001), CD38 (p=0,005) a zvýšením exprese znaků myeloidní diferenciace CD11a (p=0,001) a CD11b (p=0,007) v porovnání s kontrolními vzorky představovanými neléčenými buňkami Kasumi-1. Exprese znaků CD15 a CD14 nebyla působením VPA ovlivněna (p=0,09 a p=0,32). Takto vyjádřenou diferenciaci jsme detekovali u 38,2% buněk Kasumi-1 po 24 hodinách a u 57% po 48 hodinách. U fenotypově identické (M2 AML) buněčné linie Kasumi-6 bez přítomnosti AML1-ETO fúze jsme po ovlivnění VPA nepozorovali statisticky signifikantní změny u žádného z vyšetřovaných povrchových znaků (CD33 (p=0,13), CD117 (p=0,09), CD11b (p=0,27), CD34 (p=0,32), CD14 (p=0,16)). Stejně tak u MV4;11 a K562 jsme nepozorovali změny, které by odpovídaly diferenciaci. Konkrétně exprese sledovaných znaků linie MV4;11 zůstala nezměněna (CD11b (p=0,12), CD45 (p=0,14), CD117 (p=0,34), CD14 (p=0,12), HLA-DR (p=0,26)). Vyjímkou byl znak CD33, u kterého jsme zaznamenali hraničně signifikantní pokles (p=0,05). U linie K562 se zvýšila exprese časných myeloidních znaků CD117 (p=0,02) a CD33 (p=0,05). Exprese znaků, jejichž vzestup bychom předpokládali v průběhu erytroidní diferenciace, zůstala nezměněna (GPA (p=0,23), CD45 (p=0,12), CD71 (p=0,21)) (Obrázek č. 4).

Po zjištění specifického efektu VPA na Kasumi-1 v porovnání s linií Kasumi-6 bylo nutné ověřit schopnost Kasumi-6 diferencovat. K tomuto účelu jsme použili diferenciační agens TPA o koncentraci 1,62 μM. Použití TPA způsobilo diferenciaci Kasumi-6, jak bylo ověřeno průtokovou cytometrií s poklesem exprese CD33, CD117 a CD34 a vzestupem exprese CD11b. Oproti tomu překvapivě TPA způsobilo pouze minimální změny v imunofenotypu Kasumi-1, kde byla diferenciace přítomna pouze u 17% buněk v porovnání s 57% po léčbě VPA. Při použití kombinace TPA a VPA u Kasumi-1 se procento diferencujících buněk vyšplhalo na úroveň 86% ze všech DAPI negativních buněk.

Další diferenciační agens TSA o koncentraci 120 nM bylo použito jako pozitivní kontrola v experimentu s Kasumi-1. Po 48 hodinách kultivace byla pozorována diferenciace 66,5% z celkového počtu živých DAPI negativních buněk. Diferenciace byla charakterizovaná vzestupem exprese CD11b (p=0,001) a poklesem CD117 (p=0,002), CD34(p=0,007) a CD33(p=0,004).

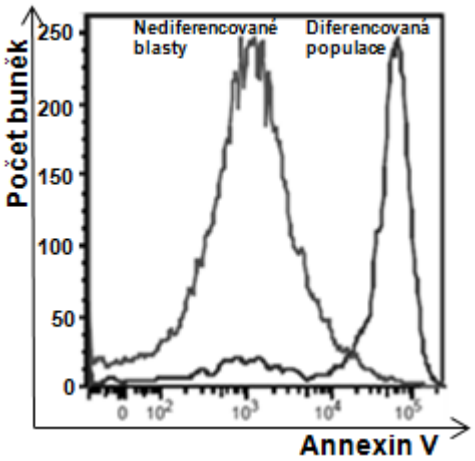
Vzhledem k použití ATRA v kombinaci s VPA v klinických studiích, byla i ATRA testována u AML1-ETO pozitivní linie Kasumi-1. Samotná ATRA nezpůsobila změny v imunofenotypu (CD33 (p=0,13), CD117 (p=0,1), CD34 (p=0,08), CD11b (p=0,21)), což je v souladu s publikovanými výsledky (Ferrara et al., 2007). Kombinace VPA 1,0 mM a ATRA 1 μM oproti tomu indukovala diferenciaci u 74,7% Kasumi-1 buněk.



Obrázek č. 4 Hodnocení diferenciace průtokovým cytometrem. Grafy znázorňují míru exprese vybraných povrchových znaků u čtyř buněčných linií kultivovaných po dobu 48 hodin s VPA o koncentraci 1,0 mM. U linie Kasumi-1 je zřetelná diferencovaná populace buněk, která je charakterizovaná úbytkem exprese CD33 a CD117. U linií Kasumi-6, MV4;11, K562 nejsou detekovány změny v imunofenotypu charakteristické pro diferenciaci.

4.3. Vztah mezi fázemi buněčného cyklu a diferenciací, apoptózou a diferenciací.

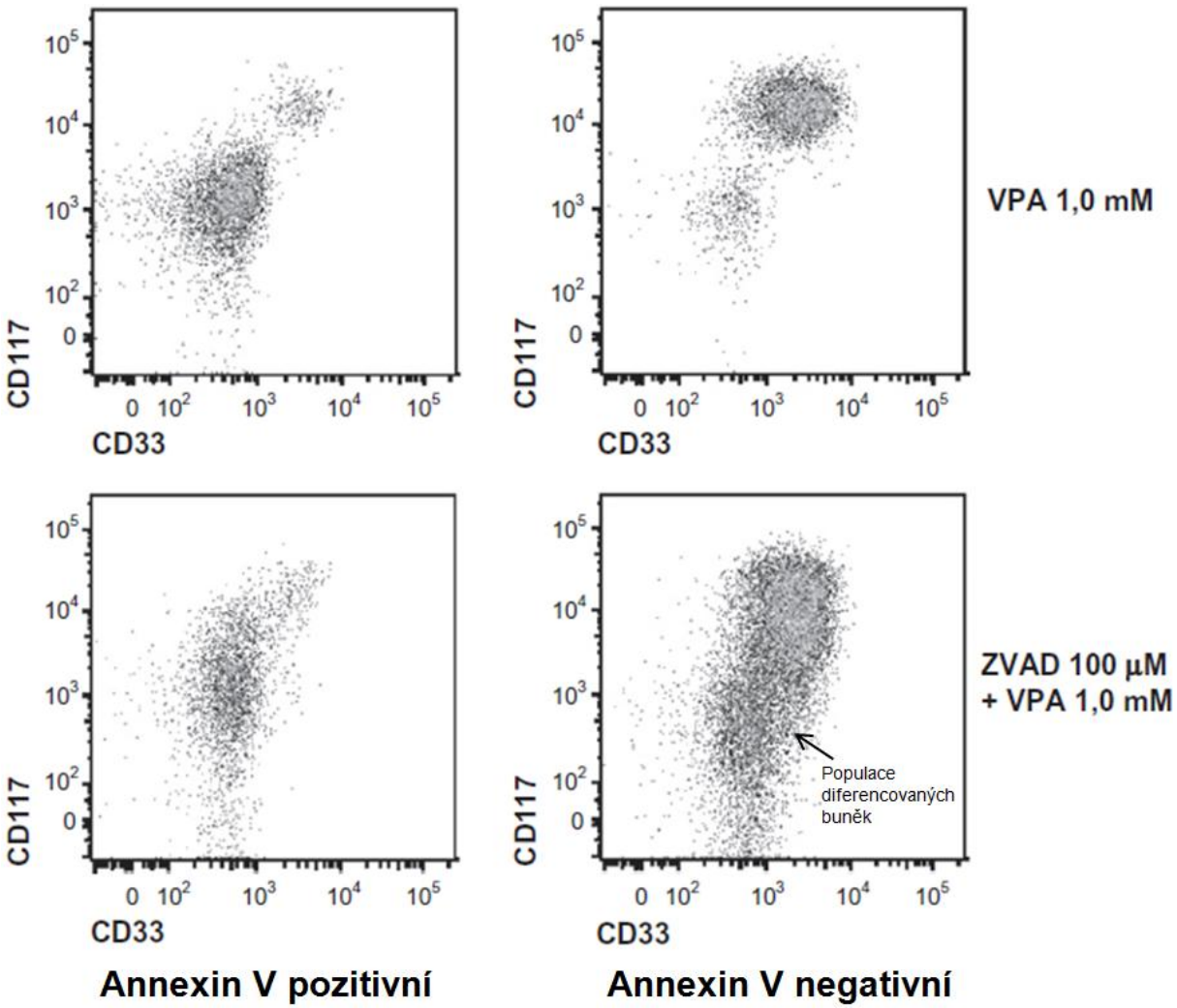
Prokázali jsme, že diferenciace je specifická pro AML1-ETO pozitivní AML buňky. Zároveň u tohoto podtypu AML došlo k největším změnám v buněčném cyklu po podání VPA. Proto jsme se rozhodli zhodnotit vztah mezi diferenciací a jednotlivými fázemi buněčného cyklu a zároveň vztah mezi diferenciací a apoptózou. K ověření schopnosti diferenciace proliferujících a klidových buněk, jsme použili DyeCycle Violet barvení v kombinaci s protilátkami proti povrchovým CD znakům měřených průtokovým cytometrem. Tento postup nám umožnil analyzovat buňky v G1/G0 fázi a G2/M/S fázi odděleně a tím vyšetřit i jejich diferenciační status. Zjistili jsme, že 68% proliferujících buněk a 29,3% buněk v klidové fázi buněčného cyklu diferencovalo po podání VPA. Diferenciace byla charakterizována vzestupem exprese CD11b a poklesem exprese CD117 a CD33. Toto zjištění potvrzuje, že klidové i proliferující buňky jsou schopny diferenciace po podání VPA.



Obrázek č. 5 Vztah diferenciace a apoptózy. Graf ukazuje vztah mezi diferenciací a Annexin V pozitivitou u Kasumi-1 buněčné linie léčené VPA 1,0 mM po dobu 48 hodin. Differencovaná populace buněk se barví jako Annexin V pozitivní („peak“ vpravo) a nediferencované blasty zůstávají Annexin V negativní („peak“ vlevo).

Dále jsme použili značení Annexin V k detekci časných fází apoptózy a protilátky proti povrchovým znakům, abychom určili osud diferencovaných buněk. Tímto vyšetřením se ukázala být většina diferencovaných buněk Annexin V pozitivních oproti nediferencovaným buňkám Kasumi-1, které zůstaly Annexin V negativní (Obrázek č. 5). Tato data naznačují, že diferencované buňky ač DAPI negativní, procházejí časnou fází apoptózy. Abychom zjistili vztah mezi apoptózou a diferenciací, použili jsme kaspázový inhibitor Z-VAD-fmk společně s VPA. U takto ošetřených buněk jsme analyzovali buněčný cyklus pomocí průtokového cytometru. U inhibitoru Z-VAD-fmk o koncentraci 20 μM byla pozorována pouze mírná redukce buněk v subG1 fázi a tudíž tato koncentrace nebyla schopna účinně zablokovat buněčnou smrt. Konkrétně se po podání 20 μM Z-VAD-fmk snížilo procento buněk v subG1 fázi z 34% na 29% po 24 hodinách a z 54% na 35% po 48 hodinách působení VPA 1,0 mM. Oproti tomu Z-VAD-fmk o koncentraci 100 μM byl schopný účinně inhibovat apoptózu se snížením procentuálního zastoupení buněk v subG1 z 34% na 6,5% po 24 hodinách a z 56,6% na 11% po 48 hodinách. Kombinované značení buněk pomocí Annexin V, DAPI a protilátkami proti povrchovým znakům (CD33, CD117 a CD11b) nám umožnilo analyzovat chování buněk po zablokování apoptózy po léčbě VPA 1,0 mM. I po zablokování apoptózy je VPA schopna indukovat diferenciaci u Kasumi-1. Diferencované buňky jsou navíc po konkomitantním podávání VPA a Z-VAD-fmk negativní při barvení Annexinem V (Obrázek č. 6). Tímto jsme potvrdili, že změny v imunofenotypu během VPA léčby nejsou pouze

nespecifickými změnami v průběhu apoptózy. Zároveň tato data ukazují, že apoptóza bezprostředně navazuje na diferenciaci u Kasumi-1 po ovlivnění VPA.



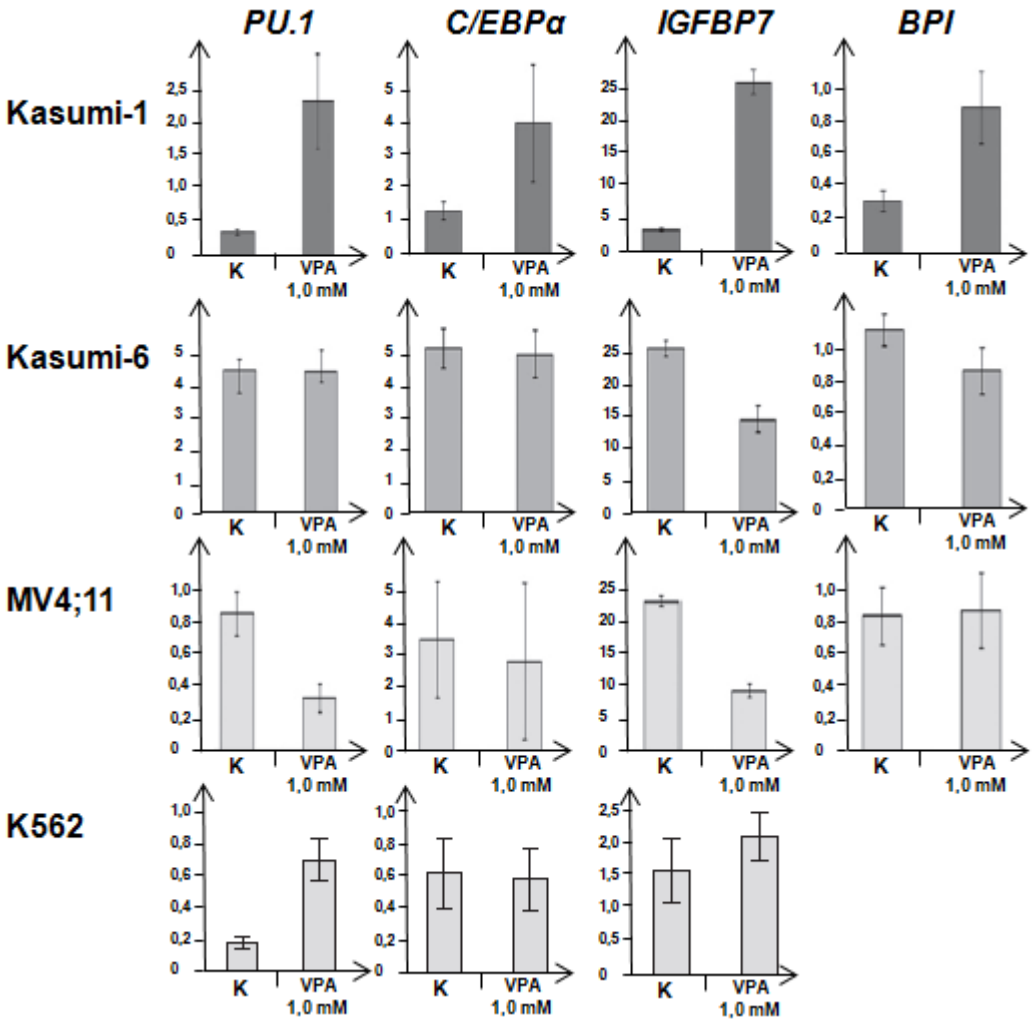
Obrázek č. 6 Diferenciace po zablokování apoptózy kapsázovým inhibitorem Z-VAD-fmk. Horní řádek zobrazuje diferenciaci po podání VPA vyjádřenou poklesem exprese CD33 a CD117. Jak bylo ukázáno dříve, diferencovaná populace je detekována jako Annexin V pozitivní a původní blastická populace Annexin V negativní. Ve spodních grafech je demonstrováno, že přidáním Z-VAD-fmk k VPA je diferenciace zachována a většina diferencovaných buněk se nebarví Annexinem V.

4.4. VPA obnovuje expresi AML1 cílových genů u AML1-ETO pozitivních buněk

Dále jsme hodnotili, zda je VPA indukovaná diferenciace doprovázená změnami exprese AML1 cílových genů a genů důležitých v myeloidní diferenciaci. Jednotlivé geny byly vyšetřovány qRT-PCR po izolaci RNA a přepisu na cDNA ze vzorků ovlivněných VPA a vzorků kontrolních pocházejících z linií Kasumi-1, Kasumi-6, MV4;11 a K562. Kvantifikovali jsme expresi následujících genů: *PU.1*, který je AML1 cílovým genem, *C/EBPα* důležitého regulátoru myeloidní diferenciace, který je downregulován u AML1-ETO pozitivních pacientů, *BPI* a *IGFBP7,* u nichž je prokázáno přímé umlčení exprese chimérickým proteinem AML1-ETO. U Kasumi-1 ovlivněných VPA 1,0 mM bylo naměřeno zvýšení exprese genu *PU.1* 6,2x ($p<0,01$), zvýšení exprese *C/EBPα* 3,0x ($p<0,01$), zvýšení exprese *BPI* 2,6x ($p<0,01$) a zvýšení exprese *IGFBP7* 7,0x ($p<0,01$). Oproti tomu u M2 AML AML1-ETO negativní buněčné linie (Kasumi-6) nebyla v porovnání s kontrolami pozorována změna exprese *C/EBPα* ($p=0,26$) a *PU.1* ($p=0,42$) a exprese genů *BPI* a *IGFBP7* byla po léčbě VPA snížena 1,3x ($p<0,01$) a 1,7x ($p<0,01$). U vzorků linie MV4;11 ovlivněných VPA byla v porovnání s kontrolou snížena exprese *PU.1* 2,5x ($p=0,01$) a exprese *IGFBP7* snížena 2,4x ($p=0,01$), exprese genů *C/EBPα* ($p=0,32$) a *BPI* ($p=0,75$) zůstala nezměněna. V linii K562 nebyla detekována exprese *BPI* na mRNA úrovni, exprese *PU.1* genu byla zvýšena 3,7x ($p<0,01$) a exprese genů *C/EBPα* a *IGFBP7* zůstala nezměněna ($p=0,46$ a $p=0,1$) (Obrázek č. 7). Podání VPA obnovuje expresi AML1 cílových genů u Kasumi-1 v porovnání s ostatními zkoumanými buněčnými liniemi, kde tento efekt pozorován nebyl.

4.5. VPA indukuje změny v buněčném cyklu a v imunofenotypu primárních blastů získaných od pacientů s AML1-ETO pozitivní AML

K ověření výsledků získaných na buněčných liniích pomocí experimentu na primárních pacientských blastech bylo potřeba optimalizovat krátkodobou kultivaci pacientských blastů z kostní dřeně ze dne diagnózy. K optimalizaci bylo použito několik režimů s nebo bez kokultivace se stromálními buňkami. Ke kultivaci v 24 jamkových destičkách (koncentrace buněk $5x10^5$/ml) bez podpory stromálními buňkami byla postupně použita následující média: RPMI1640 obohacené 20% FCS, dále RPMI1640 s 20% FCS,

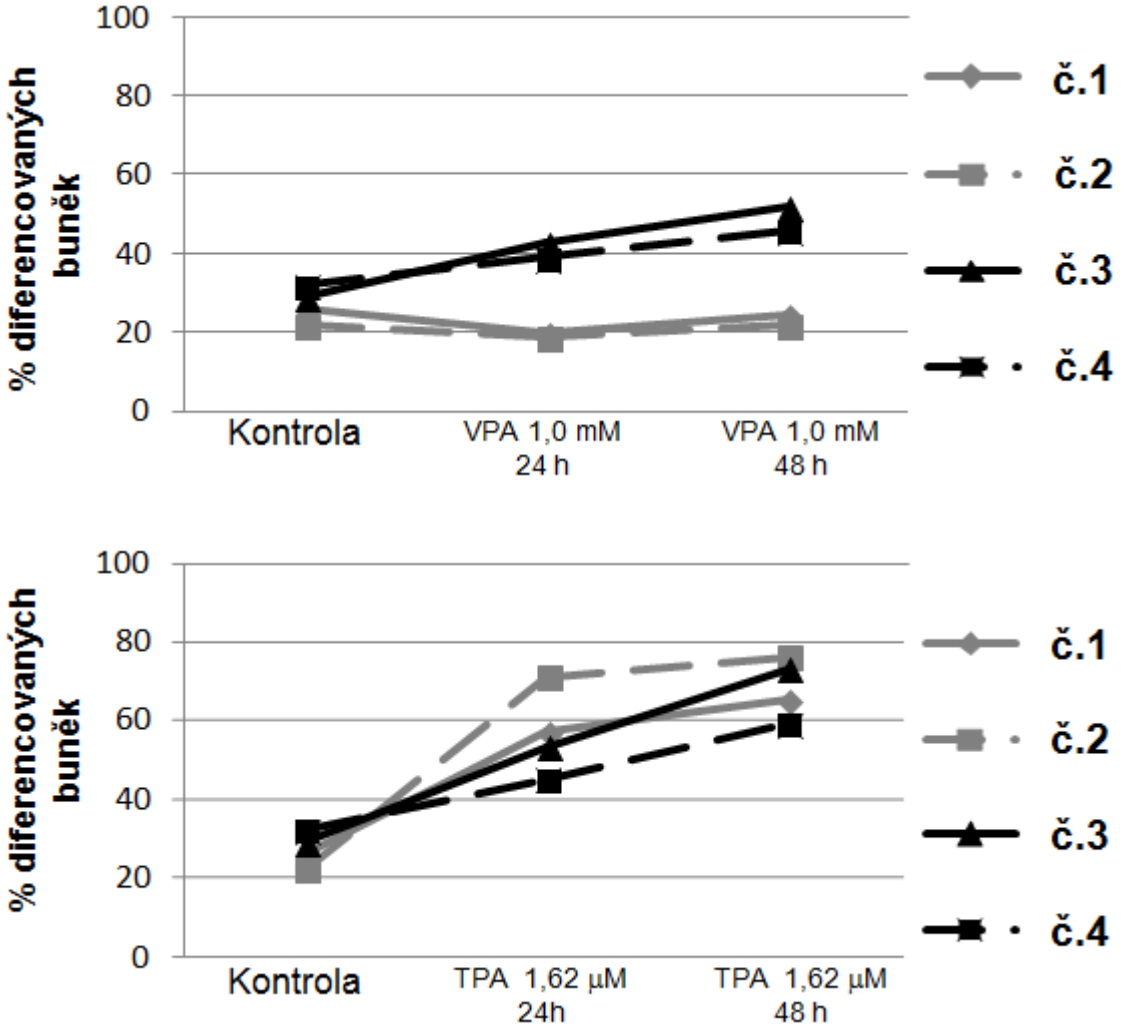


Obrázek č. 7 Změny genové exprese po léčbě VPA. Grafy ukazují normalizovanou expresi genů *CEBP/α, PU.1*, *IGFBP7* a *BPI* u čtyř linií kultivovaných s VPA o koncentraci 1 mM po dobu 48 hodin. Osa y vyjadřuje hodnoty relativní exprese genů normalizované k hodnotám relativní exprese housekeeping genu *GAPDH*.

inzulinem o koncentraci 250 ug/ml a transferinem o koncentraci 250 ug/ml. Poslední použitý režim se skládal z IMDM média obohaceného o 30% FCS se směsí cytokinů SCF, IL-6, TPO, FLT3-L o koncentraci 2 ng/ml. Ke kokultivaci byly použity imortalizované stromální buněčné linie HS-5 a HS-27 (DSMZ, Německo). Pro linii HS-5 je charakteristická produkce cytokinů (G-CSF, GM-CSF, IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8 a další). Oproti tomu HS-27 linie secernuje pouze malé množství cytokinů, ale naopak exprimuje na svém povrchu adhezivní molekuly (Roecklein et al., 1995). Stromální buňky o koncentraci $1x10^5$/ml byly kultivovány v médiu RPMI1640 s 20% FCS po dobu 48 hodin k vytvoření jednobuněčné vrstvy na dně kultivační misky. Poté bylo médium vyměněno a byly přidány rozmražené pacientské blasty o koncentraci $5x10^5$/ml. Díky těmto optimalizačním experimentům se nám podařilo určit

nejlepší režim ke krátkodobé kultivaci pacientských blastů. V médiu IMDM s 30% FBS a přidanými cytokiny (FLT3-L, TPO, SCF, IL-6) se podařilo udržet procento živých a částečně proliferujících buněk na úrovni 50-70% po 72 hodinách kultivace, což se ukázalo dostatečné pro účely našeho experimentu a proto byl tento režim k experimentu vybrán. Použity byly blasty od pacientů, od nichž máme dostatek materiálu zamraženého v tekutém dusíku a u kterých byla při diagnóze zachycena nejméně 60% infiltrace kostní dřeně. Blasty od dvou AML1-ETO pozitivních a dvou AML1-ETO negativních pacientů s AML byly kultivovány v přítomnosti VPA 1,0 mM a TPA 1,62 μM po dobu 24 a 48 hodin. Po léčbě VPA jsme detekovali pokles proliferační aktivity blastů a zvýšení procenta buněk podstupujících buněčnou smrt ve všech čtyřech pacientských vzorcích. U pacienta č. 1 narostlo procento buněk v subG1 fázi po podání VPA z 20% na 30,9%, u pacienta č. 2 z 18,4% na 32,2%, u pacienta č. 3 z 14,2% ma 28,6% a u pacienta č. 4 z 29,7% na 51,9%.

Diferenciační agens TPA indukovalo diferenciaci charakterizovanou poklesem CD33 a/nebo CD117 bez ohledu na genotypové pozadí blastů. Konkrétně u pacienta číslo 1 se zvýšilo procento CD117 negativních / CD33 negativních a CD117 negativních buněk po 48 hodinách působení TPA z 25,4% na 66%, u pacienta číslo 2 z 22% na 76%, u pacienta číslo 3 z 30% na 73,3% a u pacienta číslo 4 z 37% na 60%. Jiná situace nastala po ovlivnění pacientských blastů pomocí VPA, kdy se procento diferencujících buněk zvýšilo pouze u AML1-ETO pozitivních pacientů. U pacienta číslo 3 se zvýšilo zastoupení CD117-/CD33- a CD117- z 30% na 52,5% a u pacienta číslo 4 z 37% na 46%. Oproti tomu u AML1-ETO negativních pacientů (pacienti číslo 1 a 2) nezpůsobila VPA signifikantní změny v imunofenotypu (Obrázek č. 8). Výsledky tohoto experimentu ukazují efekt VPA na pacientské blasty a dále umocňují hypotézu o specifickém působení VPA na AML1-ETO pozitivní blasty. VPA indukovala diferenciaci pouze v blastech, které jsou charakterizované přítomností AML1-ETO.

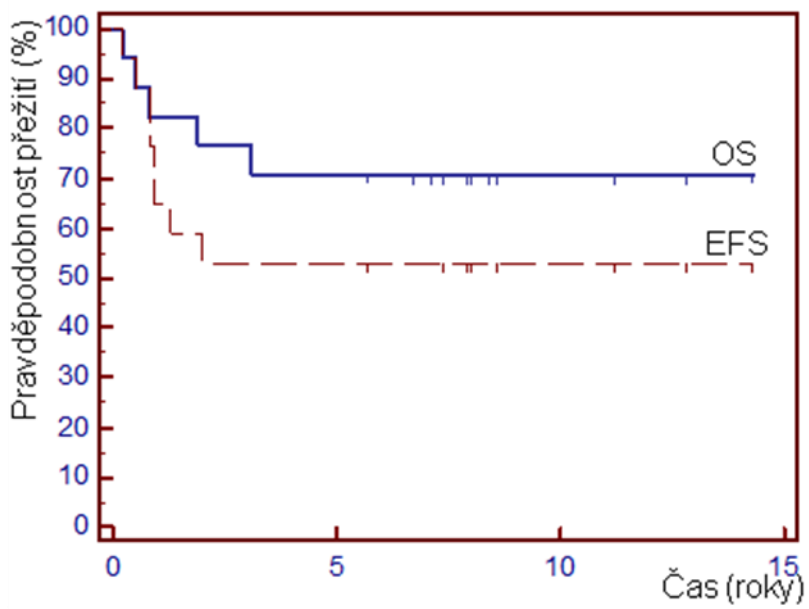


Obrázek č. 8 Kultivace AML1-ETO pozitivních (číslo 3 a 4) a negativních (číslo 1 a 2) primárních pacientských blastů s VPA a TPA. Grafy znázorňují procento diferencovaných blastů po 24 a 48 hodinách kultivace s VPA 1,0 mM a TPA 1,62 µM. Blasty od AML1-ETO negativních pacientů diferencovaly po podání TPA, ale nikoliv po léčbě VPA. Oproti tomu AML1-ETO pozitivní blasty diferencovaly po TPA i VPA.

4.6. Analýza přežití AML1-ETO pozitivních dětských pacientů s AML

K ověření, zda mají AML1-ETO pozitivní pacienti v ČR lepší prognózu, jsme analyzovali výsledky léčby u 16 AML1-ETO pozitivních pacientů léčených v období od roku 1994 až 2005. Těchto 16 pacientů představovalo celkem 11,2% z celkového počtu 143 pacientů s AML. Poměr dívek k chlapcům byl 1:1, medián věku při diagnóze 12,8 roku (rozsah 3,7 až 17,7 let). Hyperleukocytóza s počtem leukocytů nad 10 tisíc v mikrolitru v době diagnózy byla detekována u 7 z 16 pacientů. Pouze jeden pacient nedosáhl kompletní remise (CR)

v kostní dřeni po prvním bloku chemoterapie, která byla definovaná jako přítomnost méně než 5% blastů v kostní dřeni 28 dní po zahájení léčby. Tento pacient dosáhl kompletní remise po druhém bloku chemoterapie, později ovšem zrelaboval. Dva pacienti z 16 zemřeli v CR na infekční komplikace v průběhu chemoterapie. Celkem 6 pacientů z 16 prodělalo relaps onemocnění s mediánem doby od diagnózy do relapsu 0,9 roku (0,8 až 2 roky). Pět z šesti relabujících pacientů dosáhlo CR a podstoupilo alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Pacient, který nedosáhl CR, zemřel. Dva pacienti z pěti transplantovaných zemřeli z důvodu druhého a třetího relapsu AML. U žádného z našich AML1-ETO pozitivních pacientů se neobjevila sekundární malignita. Shrnuto a analyzováno Kaplan-Meierovou analýzou pravděpodobnost pětiletého OS v našem souboru AML1-ETO pozitivních pacientů je 70,6% (SE ± 11,1%) a pravděpodobnost pětiletého EFS je 52,9% (SE ± 12,1%) (Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9 Kaplan-Meierova analýza přežití AML1-ETO pozitivních pacientů. V grafu jsou vyznačeny křivky celkového přežití (OS) a přežití bez události (EFS).

5. Diskuse a závěry

U VPA byl popsán protinádorový efekt u několika lidských malignit, včetně neuroblastomu, AML, ALL, karcinomů a gliomů centrálního nervového systému (Cinatl et al., 1997; Driever et al., 1999; Erlich et al., 2009). Přestože bylo popsáno několik mechanizmů možného účinku VPA, včetně acetylace histonů, modulace ERK (extracellular signal-regulated kinase) forforylace, regulace Wnt dráhy, přesný mechanizmus protinádorového účinku není zcela pochopen (Gottlicher et al., 2001; Wiltse, 2005; Yuan et al., 2001a). Významná pozornost byla věnována studiu apoptózy indukované VPA u buněčných linií odvozených od lidských malignit. Bylo popsáno, že VPA spouští apoptózu různými mechanizmy a to jak vnitřní tak vnější kaspázovou dráhou. (Kawagoe et al., 2002; Sasaki et al., 2008) . Několik klinických studií prokázalo přechodný účinek VPA u některých pacientů, když byla použita v monoterapii u hematologických malignit. Přesto chybí informace o podskupinách pacientů, kterým by léčba VPA přinesla největší benefit.

V této studii, jsme testovali efekt VPA na AML buněčné linie a primární pacientské blasty s různým genotypovým pozadím. Naše data potvrzují protinádorový efekt VPA u AML buněk a ukazují, že množství detekované apoptózy se liší mezi jednotlivými genotypově charakterizovanými AML podskupinami. V souladu s našimi výsledky byly publikovány práce, které potvrzují VPA indukovanou apoptózu u linií Kasumi-1 a MV4;11. V našem experimentu byla VPA schopna snížit proliferační aktivitu u Kasumi-6 a zároveň indukovat zástavu v G1/G0 fázi buněčného cyklu. U linie K562 jsme nepozorovali navození apoptózy po léčbě VPA. Publikované práce nehovoří jednoznačně o schopnosti VPA indukovat buněčnou smrt u K562 buněk. Někteří autoři popisují apoptózu po ovlivnění VPA (Tang et al., 2004) a naopak jiní apoptózu nepozorovali. Například Iacomino *et al.* pozoroval, že VPA samotná není schopna indukovat apoptózu, ale že zvyšuje citlivost buněk K562 k jiným apoptotickým signálům jako je TRAIL/Apo2L (TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) (Iacomino et al., 2008). Tyto rozporuplné výsledky by mohly být následkem použití rozdílných subklonů K562 linie během experimentů.

Diferenciaci jsme demonstrovali pomocí analýzy průtokovým cytometrem se značením buněk širokým panelem protilátek proti povrchovým myeloidním znakům. Toto pozorování bylo potvrzeno morfologicky sledováním změn v nukleární a nukleolární morfologii (Smetana et al., 2007). Z testovaných linií byla VPA indukovaná diferenciace detekována pouze u AML1-ETO pozitivní buněčné linie, což potvrzuje hypotézu o specifickém působení

VPA na AML buňky s tímto genotypovým pozadím. Diferenciace u linie Kasumi-1 nesla identické změny v imunofenotypu jako diferenciace po použití TSA jako pozitivní kontroly. Specifitu účinku VPA působící přes patologický gen AML1-ETO jsme potvrdili pozorováním imunofenotypově identických buněčných liniích, které se liší pouze přítomností AML1-ETO (Kasumi-1 a Kasumi-6). Použití diferenciačního agens TPA potvrdilo, že linie Kasumi-6, ačkoliv nereagují na léčbu VPA, je schopna diferenciace po jiném stimulu. Překvapivě jsme pozorovali zcela minimální indukci diferenciace pomocí TPA u Kasumi-1, kdy pouze 17% AML1-ETO pozitivních buněk diferencovalo. Naproti tomu léčba kombinací TPA a VPA indukovala diferenciaci ve vyšší míře, než vyplývá z pouhého součtu účinků těchto dvou látek, proto lze předpokládat synergistický efekt. Tento mechanizmus může být vysvětlen tím, že při léčbě samotným TPA přetrvává diferenciační blok zprostředkovaný aberantní vazbou HDAC k AML1-ETO a proto je efekt TPA na diferenciaci minimální. Až v kombinaci TPA s VPA jsou inhibovány HDAC v korepresorovém komplexu asociovaném s AML1-ETO a diferenciace může proběhnout. Velmi podobně jsme experimentem s ATRA a kombinací ATRA a VPA u Kasumi-1 potvrdili známý fenomén necitlivosti AML1-ETO pozitivních buněk k ATRA. Tato rezistence je dána vazbou a inhibičním účinkem AML1-ETO proteinu a represorového komplexu v oblasti promotoru RARα a následným zablokováním diferenciačního efektu farmakologických dávek ATRA. Až konkomitantní podání VPA ruší inhibiční efekt HDAC v rámci represorového komplexu asociovaného s AML1-ETO a umožní ATRA indukovat diferenciaci (Cimino et al., 2006).

Dále jsme poskytli cenné informace o tom, že jak buňky v klidovém stádiu, tak i buňky proliferující, jsou schopné podstoupit diferenciaci. Navíc jsme demonstrovali, že diferenciace předchází apoptózu. Tato souslednost byla prokázána v experimentech se zablokováním apoptózy pomocí kaspázového inhibitoru Z-VAD-fmk. Inhibitor zablokoval buněčnou smrt, ale VPA indukovaná diferenciace u AML1-ETO pozitivních buněk nebyla ovlivněna. Specifický účinek VPA byl doprovázen vzestupem hladin mRNA AML1 cílových genů (*PU.1, IGFBP7, BPI*), což nastalo pouze u AML1-ETO pozitivních buněk. Exprese genu *CEBPα,* který je důležitým regulátorem myeloidní diferenciace a je výrazně downregulovaný u AML1-ETO pozitivní leukémie, také vzrostla po podání VPA. K ověření našich výsledků a přiblížení celého experimentálního designu k *in vivo* podmínkám jsme provedli experimenty na primárních pacientských blastech odebraných z kostní dřeně v den diagnózy. Tím jsme vytvořili relevantní model léčby VPA u AML1-ETO pozitivních a AML1-ETO negativních pacientů a potvrdili jsme, že ač VPA indukuje apoptózu u všech testovaných vzorků, diferenciace je jev specifický pouze pro AML1-ETO pozitivní blasty. TPA byl schopný

navodit diferenciaci bez ohledu na přítomnost AML1-ETO fúze. Zároveň je nutno doplnit, že kapacita diferenciace u pacientských blastů je nižší než v případě Kasumi-1 buněčné linie, čemuž odpovídá minimální změna s expresi CD11b. Analýza přežití našich pacientů s AML a přítomností fúzního genu AML1-ETO prokázala lepší prognózu s pravděpodobností pětiletého OS 70,2% v porovnání s celým souborem našich léčených AML pacientů, kde OS dosahuje 63% (Starý et al, 2008).

U dětí je VPA běžně používána v léčbě epilepsie (firemní názvy: Depakote, Depakine, Orfiril) a terapeutické koncentrace dosahují hodnot použitých i v našich experimentech. Přestože byla VPA testována jako inhibitor HDAC v klinických studiích u dospělých, není myslitelné, aby byla použita v monoterapii či bez konvenční chemoterapie v moderních klinických studiích zabývajících se léčbou dětské AML. Existují data, která naznačují synergistický účinek VPA s konvenčními cytostatiky jako je cytarabin, což je důležité cytostatikum v léčbě AML. Xie *et al.* ukázal, že AML1-ETO pozitivní buňky jsou z testovaných podskupin AML nejvíce citlivé ke kombinaci VPA s cytarabinem (Xie et al., 2010). Cílem velkých mezinárodních skupin pro léčbu dětské AML je individualizovat terapii podle zjištěných genotypových změn v pacientských blastech. Recentně byla spuštěna klinická studie fáze III zabývající se léčbou dětské AML v St. Jude Reasearch Children's Hospital (clinicaltrials.gov, NCT00703820). Pacienti zařazeni do skupiny vysokého rizika bez přítomnosti FLT3-ITD jsou randomizováni ke kombinované léčbě VPA s intenzivní chemoterapií (cytarabin, daunorubicine, etoposid) v rámci druhého indukčního bloku. Bohužel je velmi nepravděpodobné, že by AML1-ETO pozitivní pacienti byli do této podskupiny zařazeni. I v Evropě v rámci připravovaného mezinárodního protokolu pro léčbu dětské AML – BFM 2012 bude snaha implementovat cílenou terapii do léčebných schémat. Konkrétně se plánuje přidat u c-kit mutovaných AML tyrozinkinázový inhibitor dasatinib, u pacientů s nadměrnou expresí genu *CXC4R* (chemokine receptor 4) pleraxifor a pacientům s FLT3-ITD se ke konvenční chemoterapii přidá kinázový inhibitor sorafenib. Jelikož naše výsledky jasně naznačují specificitu efektu inhibitoru HDAC VPA u AML1-ETO pozitivních blastů, předpokládáme, že přidání VPA k léčbě této podskupiny dětí s AML, by mohlo přinést významný benefit.

6. Souhrn

Akutní myeloidní leukémie (AML) je heterogenní skupina maligních onemocnění charakterizovaná blokem diferenciace myeloidních progenitorů, proliferační výhodou a ztrátou schopnosti apoptózy. Léčba AML se v průběhu posledních dekád vylepšila, přesto lze vyléčit pouze část pacientů kombinací toxických cytostatik. V leukemogenezi t(8;21) pozitivní leukémie se předpokládá, že represorový komplex asociovaný s chimérickým proteinem AML1-ETO váže deacetylázy histonů (HDAC), inhibuje expresi AML1 cílových genů a tím způsobuje blok v myeloidní diferenciaci. Valproová kyselina (VPA) je schopna inhibovat HDAC a proto by mohla být vhodným kandidátem v léčbě AML1-ETO pozitivní AML. Hlavním cílem práce bylo charakterizovat diferenciační efekt VPA na AML1-ETO pozitivní leukemické buňky a určit změny v expresi AML1 cílových genů. Kasumi-1 (M2 AML1-ETO pozitivní), Kasumi-6 (M2 AML1-ETO negativní), MV4-11 (MLL-AF4 pozitivní) a K562 buňky byly léčeny VPA a 12-0-tetra-decanoylforbol-13-acetátem (TPA) a vyšetřeny průtokovou cytometrií a qRT-PCR. AML1-ETO pozitivní a negativní primární pacientské blasty ze dne diagnózy byly ovlivněny VPA a TPA k potvrzení *in vitro* zjištění. VPA indukovala apoptózu u AML1-ETO pozitivních a MLL-AF4 pozitivních buněk. Změny v imunofenotypu prokazující diferenciaci byly pozorovány pouze u AML1-ETO pozitivních buněk (pokles exprese CD33/34/117 a nárust CD11a/11b). Ukázalo se, že diferencované buňky jsou také AnnexinV pozitivní, tudíž jsme dále zkoumali vztah mezi diferenciací a buněčnou smrtí. Apoptóza byla zablokována kaspázovým inhibitorem a přesto zůstala diferenciace nezměněna. TPA bylo použito k vyloučení neschopnosti AML1-ETO negativní linie diferencovat a zjistili jsme, že tato linie podstoupí po léčbě TPA monocytární diferenciaci. Pomocí kvantifikace mRNA jsme prokázali, že léčba VPA zvýšila expresi genů *PU.1, IGFBP7, BPI a C/EBPα* pouze u AML1-ETO pozitivní linie a nikoliv u ostatních testovaných linií. U všech pacientských vzorků z kostní dřeně byla indukována apoptóza bez ohledu na genotyp, ale změny v imunofenotypu ve smyslu diferenciace se ukázaly být specifické pouze pro blasty s fúzí AML1-ETO. Poskytli jsme validní důkaz diferenciace specifické pro AML1-ETO pozitivní buňky doprovázené vzestupem exprese původně epigeneticky umlčených genů. Naše zjištění týkající se diferenciace následované apoptózou vneslo nový pohled na mechanizmus účinku starého léku. Navíc naše data podporují hypotézu, že AML1-ETO pozitivní pacienti by mohli mít z léčby VPA největší benefit.

7. Summary

In t(8;21) acute myeloid leukaemia (AML), the leukemogenesis is supposed to be promoted by interference with expression of AML1 target genes. Repressor complex associated with AML1-ETO fusion protein recruits class I histone deacetylases (HDAC). Valproic acid (VPA) was found to have an extensive effect on AML blasts, via inhibition of class I HDAC. We aimed to characterize the differentiation effect of VPA on AML1-ETO-positive leukemic cells and to determine the expression pattern of AML1 target genes. Kasumi-1 (M2 AML1-ETO-positive), Kasumi-6 (M2 AML1-ETO-negative), MV4-11 (MLL-AF4-positive) and K562 cells were treated with VPA and 12-0-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) and examined by flow cytometry and qRT-PCR. Two AML1-ETO-positive and two negative patients' bone marrow diagnostic samples were treated with VPA and TPA to confirm *in vitro* findings. Valproic acid induced apoptosis in AML1-ETO-positive and MLL-AF4-positive cells in dose dependent manner. But changes of immunophenotype proving the differentiation were observed purely in AML1-ETO-positive cell line (decreased CD33/34/117 and increased CD11a/11b expression). However, differentiated cells exhibited positivity of AnnexinV; hence the relationship between cell death and differentiation had to be evaluated. Apoptosis was blocked by caspase inhibitor ZVAD, but the differentiation was still detected in the same extent. Conversely changes in immunophenotype were not detected in either of control cells. TPA was used to exclude incapability of cells to differentiate, induced monocytic differentiation in both AML1-ETO-positive and negative cells. As quantified by qRT-PCR, VPA treatment increased expression of genes *PU.1*, *IGFBP7*, *BPI* and *C/EBPα* in AML1-ETO-positive cells. No significant changes were detected in AML1-ETO-negative cells. Specific effect was confirmed in patients' bone marrow samples. All samples exhibited changes of immunophenotype after TPA treatment while VPA treatment induced similar changes but only in AML1-ETO-positive samples. Taken together, we provide a valid evidence of differentiation specific for AML1-ETO-positive cells accompanied with the increase of the repressed genes´ expression. Our findings of differentiation immediately followed by apoptosis bring a new insight to the biological effect of an old drug. Our data suggest that AML1-ETO-positive AML patients might have the benefit of HDAC inhibitors in treatment.

8. Seznam použitých zkratek

A680 – Alexa 680

ABL – Abl kinase

AHL – Akutní hybridní leukémie

AKT – Akt kinase

ALL - Akutní lymfoblastická leukémie

AML - Akutní myeloidní leukémie

APC – Adenomatous polyposis coli

APC - Allphycocyanin

APL – Akutní promyelocytární leukémie

ATRA – all-*trans* retinová kyselina

BCR – Break cluster region

BFM – Berlin – Frankfurt - Münster

BPI – Bactericidal/permeability increasing

CBF – Core binding factor

CD – Cluster of differentiation

C/EBPα – CAAT enhacer binding protein alfa

CIR – Cumulative incidence of relace

CR – Complete response¨

CXCR4 - Chemokine receptor 4

SCF – Stem cell factor

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCV – DyeCycle Violet

DEK - DEK oncogene

DMSO – Dimethylsulfoxide

DNMT3A - DNA metyltransferase 3A

EFS – Event free survival

ERK - Extracellular signal-regulated kinase

ETO – Eight-twenty-one

ETS-1 - External Transcribed Spacer Region 1

EVI-1 - Ecotropic virus integration site 1

FAB – French – American – British klasifikace

FACS – Fluorescence-activated cell sorter

FBS – Fetal bovine serum

FDA – Food and Drug Association

FISH – Fluorescence *in situ* hybridization

FITC - Fluorescein isothiocyanate

FLT3 – Fms-like tyrosine kinase 3

GABA – Gamma aminobutyric acid

GAP – GTPase activating protein

GAPDH - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GATA1 - GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)

G-CSF – Granulocyte colony stimulating factor

GM-CSF – Granulocyte monocyte colony stimulating factor

GPA – Glycophorin A

HAT – Histonová acetyltransteráza

HDAC – Deacetyláza histonů

HDACi – Inhibitor deacetyláz histonů

HOX – Homeodomain box

ChIP – Chromatinová imunoprecititace

IDH – Izocitrát dehydrogenáza

IGFBP7 – Insulin-like growth factor binding protein 7

IL - Interleukin

IMDM - Iscoves modified Dulbecco´s medium

KIT - Tyrosine-protein kinase KIT

LEF-1 – Lymphoid enhancer-binding factor 1

MDR1 – Multidrug resistence protein 1

MDS – Myelodysplastický syndrom

MeCP2 - methyl CpG binding protein 2

MLL – Mixed lineage leukemia

MPAL – Mixed phenotype acute leukemia

MTGR1 – MTG8-related protein 1

MYH11 – Myosin heavy chain 11

mSin3a - SIN3 transcription regulator homolog A

NCoR – Nuclear corepressor

NHR – Nervy homology region

NOD/SCID – Nonobese diabetic/severe combined immunodefficiency

NOTCH1 - Notch Homolog 1

NPM1 – Nucleophosmin 1

NUP214 - Nucleoporin 214kDa

OS – Overall survival (celkové přežití)

PC7 - Phycoerythrin cyanin 7

PE – Phycoerythin

PerCP - Peridinin chlorophyll protein complex

PI3K – Phophatidylinositol 3 kinase

PLZF – Promyelocytic leukemia zinc finger

PML – Promyelocytic leukemia protein

PTPN11 - Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11

PU.1 - Hematopoietic transcription factor PU.1

qRT-PCR – Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce

RA – Retinová kyselina

RHD – Runt homology domain

AML1 – Acute myeloid leukemia 1

RARα – Receptor pro retinovou kyselinu alfa

RAS – Rat sarcoma kinase

ROS – Reactive oxygen species

RPD3 - Reduced potassium dependency 3

rpm – Rounds per minute

SE – Standard Error

SIRT – Sirtuin

SJRCH – St. Jude Research Childrens Hospital

SMRT - Silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors

TAF – TATA associated factor

TPA - 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TPO - Thrombopoietin

TXN - Thyreoredoxin

TRAIL/Apo2L - TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand

TSA – Trichostatin A

VPA – Valproová kyselina

WHO – Světová zdravotnická organizace

Wnt – Wingless

WT1 - Wilms' Tumor 1

Z-VAD-fmk - Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone

9. Použitá literatura

1) Allfrey VG, Mirsky AE. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. Science 1964; 144: 559.
2) Amann JM, Nip J, Strom DK, Lutterbach B, Harada H, Lenny N, et al. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. Mol Cell Biol 2001; 21: 6470-83.
3) Arber DA VJ, Brunning RD. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol 4th Edition. Lyon: France: International Agency for Research on Cancer, 2008.
4) Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet 2002; 30: 41-7.
5) Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. Oncogene 2001; 20: 5695-707.
6) Bakshi R, Hassan MQ, Pratap J, Lian JB, Montecino MA, van Wijnen AJ, et al. The human SWI/SNF complex associates with RUNX1 to control transcription of hematopoietic target genes. J Cell Physiol 2010; 225: 569-76.
7) Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? Cancer Lett 2009; 280: 211-21.
8) Balgobind BV, Lugthart S, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, van Wering ER, de Graaf SS, et al. EVI1 overexpression in distinct subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. Leukemia 2010; 24: 942-9.
9) Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. Blood 2009; 114: 2489-96.
10) Bennett JM. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. Int J Hematol 2000; 72: 131-3.
11) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976; 33: 451-8.
12) Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. Leukemia 2005; 19: 1751-9.
13) Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. Blood 2007; 110: 979-85.
14) Bug G, Ritter M, Wassmann B, Schoch C, Heinzel T, Schwarz K, et al. Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. Cancer 2005; 104: 2717-25.
15) Burel SA, Harakawa N, Zhou L, Pabst T, Tenen DG, Zhang DE. Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. Mol Cell Biol 2001; 21: 5577-90.
16) Burton B. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. American Chemical Journal 1882; 3: 385–395.

17) Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. Blood 2006; 107: 3463-8.
18) Calabi F, Cilli V. CBFA2T1, a gene rearranged in human leukemia, is a member of a multigene family. Genomics 1998; 52: 332-41.
19) Cimino G, Lo-Coco F, Fenu S, Travaglini L, Finolezzi E, Mancini M, et al. Sequential valproic acid/all-trans retinoic acid treatment reprograms differentiation in refractory and high-risk acute myeloid leukemia. Cancer Res 2006; 66: 8903-11.
20) Cinatl J, Jr., Cinatl J, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, et al. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. Anticancer Drugs 1997; 8: 958-63.
21) Coiffier B, Pro B, Prince HM, Foss F, Sokol L, Greenwood M, et al. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. J Clin Oncol 2012; 30: 631-6.
22) Creutzig U, Zimmermann M, Lehrnbecher T, Graf N, Hermann J, Niemeyer CM, et al. Less toxicity by optimizing chemotherapy, but not by addition of granulocyte colony-stimulating factor in children and adolescents with acute myeloid leukemia: results of AML-BFM 98. J Clin Oncol 2006; 24: 4499-506.
23) Crispino JD. GATA1 mutations in Down syndrome: implications for biology and diagnosis of children with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer 2005; 44: 40-4.
24) de Guzman CG, Warren AJ, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, et al. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. Mol Cell Biol 2002; 22: 5506-17.
25) Driever PH, Knupfer MM, Cinatl J, Wolff JE. Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma. Klin Padiatr 1999; 211: 323-8.
26) Duffy JB, Kania MA, Gergen JP. Expression and function of the Drosophila gene runt in early stages of neural development. Development 1991; 113: 1223-30.
27) Dunne J, Cullmann C, Ritter M, Soria NM, Drescher B, Debernardi S, et al. siRNA-mediated AML1/MTG8 depletion affects differentiation and proliferation-associated gene expression in t(8;21)-positive cell lines and primary AML blasts. Oncogene 2006; 25: 6067-78.
28) Eckner R, Arany Z, Ewen M, Sellers W, Livingston DM. The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional coactivator and belongs to an evolutionarily conserved family. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994; 59: 85-95.
29) Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. Blood 2003; 101: 4333-41.
30) Erickson PF, Dessev G, Lasher RS, Philips G, Robinson M, Drabkin HA. ETO and AML1 phosphoproteins are expressed in CD34+ hematopoietic progenitors: implications for t(8;21) leukemogenesis and monitoring residual disease. Blood 1996; 88: 1813-23.
31) Erlich RB, Rickwood D, Coman WB, Saunders NA, Guminski A. Valproic acid as a therapeutic agent for head and neck squamous cell carcinomas. Cancer Chemother Pharmacol 2009; 63: 381-9.
32) Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med 2008; 358: 1148-59.
33) Feinstein PG, Kornfeld K, Hogness DS, Mann RS. Identification of homeotic target genes in Drosophila melanogaster including nervy, a proto-oncogene homologue. Genetics 1995; 140: 573-86.

34) Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet 2005; 37: 391-400.
35) Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. J Clin Oncol 2005; 23: 6285-95.
36) Gangaraju VK, Bartholomew B. Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. Mutat Res. 2007 May 1;618(1-2):3-17.
37) Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. Mol Cell Biol 1998; 18: 7185-91.
38) Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig WD, Bradtke J, et al. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. Br J Haematol 2010; 149: 84-92.
39) Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. Semin Hematol 2002; 39: 6-11.
40) Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004: 80-97.
41) Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. Embo J 2001; 20: 6969-78.
42) Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 1998; 92: 2322-33.
43) Grisolano JL, O'Neal J, Cain J, Tomasson MH. An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFbetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 9506-11.
44) Gross CT, McGinnis W. DEAF-1, a novel protein that binds an essential region in a Deformed response element. Embo J 1996; 15: 1961-70.
45) Gu TL, Goetz TL, Graves BJ, Speck NA. Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). Mol Cell Biol 2000; 20: 91-103.
46) Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. Cancer Res 2004; 64: 1079-86.
47) Harada N, Okamura S, Kubota A, Shimoda K, Ikematsu W, Kondo S, et al. Analysis of acute myeloid leukemia cells by flow cytometry, introducing a new light-scattering classification. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120: 553-7.
48) Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DK, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. J Clin Oncol 2010; 28: 2674-81.
49) Hasle H, Alonzo TA, Auvrignon A, Behar C, Chang M, Creutzig U, et al. Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. Blood 2007; 109: 4641-7.
50) Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, et al. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. Cell 2002; 111: 369-79.
51) He LZ, Tolentino T, Grayson P, Zhong S, Warrell RP, Jr., Rifkind RA, et al. Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. J Clin Invest 2001; 108: 1321-30.

52) Hines R, Boyapati A, Zhang DE. Cell type dependent regulation of multidrug resistance-1 gene expression by AML1-ETO. Blood Cells Mol Dis 2007; 39: 297-306.
53) Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Pollard J, Stirewalt DL, Hurwitz C, et al. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. Blood 2009; 113: 6558-66.
54) Ho PA, Kutny MA, Alonzo TA, Gerbing RB, Joaquin J, Raimondi SC, et al. Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer 2011; 57: 204-9.
55) Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Zimmermann M, Balgobind BV, Arentsen-Peters ST, Alders M, et al. Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. Blood 2009; 113: 5951-60.
56) Hug BA, Lee SY, Kinsler EL, Zhang J, Lazar MA. Cooperative function of Aml1-ETO corepressor recruitment domains in the expansion of primary bone marrow cells. Cancer Res 2002; 62: 2906-12.
57) Iacomino G, Medici MC, Russo GL. Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. Anticancer Res 2008; 28: 855-64.
58) Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. Blood 1991; 78: 2962-8.
59) Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. p300/CBP and cancer. Oncogene 2004; 23: 4225-31.
60) Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science 2001; 293: 1074-80.
61) Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, Gergen JP. The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. Genes Dev 1990; 4: 1701-13.
62) Kanno T, Kanno Y, Chen LF, Ogawa E, Kim WY, Ito Y. Intrinsic transcriptional activation-inhibition domains of the polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor alpha subunit revealed in the presence of the beta subunit. Mol Cell Biol 1998; 18: 2444-54.
63) Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. Leuk Res 2002; 26: 495-502.
64) Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, Moore S, Dvinge H, Kurz E, et al. Modeling of C/EBPalpha mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. Cancer Cell 2008; 13: 299-310.
65) Kitabayashi I, Ida K, Morohoshi F, Yokoyama A, Mitsuhashi N, Shimizu K, et al. The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. Mol Cell Biol 1998; 18: 846-58.
66) Kohzaki H, Ito K, Huang G, Wee HJ, Murakami Y, Ito Y. Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. Oncogene 1999; 18: 4055-62.
67) Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, et al. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. Embo J 2003; 22: 3411-20.
68) Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. Embo J 2001; 20: 350-61.
69) Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination

with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. Cancer 2006; 106: 112-9.
70) Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Bernhardt A, Hildebrandt B, Haas R, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. Blood 2004; 104: 1266-9.
71) Kurokawa M, Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Mitani K, Yazaki Y, et al. Overexpression of the AML1 proto-oncoprotein in NIH3T3 cells leads to neoplastic transformation depending on the DNA-binding and transactivational potencies. Oncogene 1996; 12: 883-92.
72) Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S, et al. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 11590-5.
73) Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2010; 363: 2424-33.
74) Li FQ, Person RE, Takemaru K, Williams K, Meade-White K, Ozsahin AH, et al. Lymphoid enhancer factor-1 links two hereditary leukemia syndromes through core-binding factor alpha regulation of ELA2. J Biol Chem 2004; 279: 2873-84.
75) Li H, Leo C, Schroen DJ, Chen JD. Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT. Mol Endocrinol 1997; 11: 2025-37.
76) Libermann TA, Pan Z, Akbarali Y, Hetherington CJ, Boltax J, Yergeau DA, et al. AML1 (CBFalpha2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter. J Biol Chem 1999; 274: 24671-6.
77) Lin RJ, Egan DA, Evans RM. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. Trends Genet 1999; 15: 179-84.
78) Lin RJ, Evans RM. Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. Mol Cell 2000; 5: 821-30.
79) Liu S, Klisovic RB, Vukosavljevic T, Yu J, Paschka P, Huynh L, et al. Targeting AML1/ETO-histone deacetylase repressor complex: a novel mechanism for valproic acid-mediated gene expression and cellular differentiation in AML1/ETO-positive acute myeloid leukemia cells. J Pharmacol Exp Ther 2007; 321: 953-60.
80) Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, et al. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. Nat Genet 2001; 28: 220-1.
81) Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Martinez A, et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. Leukemia 1995; 9: 993-8.
82) Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. J Cell Biochem 2009; 107: 600-8.
83) Mayer J. Leukémie. Praha: Grada Publishing, 2002.
84) Mejstrikova E, Volejnikova J, Fronkova E, Zdrahalova K, Kalina T, Sterba J, et al. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. Haematologica 2010; 95: 928-35.
85) Mesdjian E, Ciesielski L, Valli M, Bruguerolle B, Jadot G, Bouyard P, et al. Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1982; 6: 223-33.
86) Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. Blood 2006; 108: 3654-61.

87) Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. Therapie 1963; 18: 435-8.
88) Meyers S, Downing JR, Hiebert SW. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. Mol Cell Biol 1993; 13: 6336-45.
89) Meyers S, Lenny N, Hiebert SW. The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. Mol Cell Biol 1995; 15: 1974-82.
90) Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, Pelicci PG. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? Oncogene 2001; 20: 3110-5.
91) Minucci S, Pelicci PG. Retinoid receptors in health and disease: co-regulators and the chromatin connection. Semin Cell Dev Biol 1999; 10: 215-25.
92) Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. Blood Rev 2003; 17: 71-97.
93) Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. Nucleic Acids Res 1995; 23: 2762-9.
94) Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood 2000; 96: 3907-14.
95) Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, Wu K, Zhou P, Comenzo RL, et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element. Blood 2003; 102: 4369-76.
96) Mulloy JC, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. Blood 2002; 99: 15-23.
97) Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, et al. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. Virology 1993; 194: 314-31.
98) Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. J Clin Oncol 2007; 25: 3109-15.
99) Orkin SH ND, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE. . Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood.: Sanders, 2008.
100) Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. Nat Med 2001; 7: 444-51.
101) Palomero T, McKenna K, J ON, Galinsky I, Stone R, Suzukawa K, et al. Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. Leukemia 2006; 20: 1963-6.
102) Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Leukemia 2006; 20: 1943-9.
103) Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE. Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. Mol Cell Biol 1998; 18: 3915-25.

104) Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Zeng R, Ravindranath Y, et al. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. Blood 2010; 115: 2372-9.
105) Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. J Clin Oncol 2011; 29: 551-65.
106) Raffoux E, Chaibi P, Dombret H, Degos L. Valproic acid and all-trans retinoic acid for the treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. Haematologica 2005; 90: 986-8.
107) Rice KL, Licht JD. HOX deregulation in acute myeloid leukemia. J Clin Invest 2007; 117: 865-8.
108) Roche J, Zeng C, Baron A, Gadgil S, Gemmill RM, Tigaud I, et al. Hox expression in AML identifies a distinct subset of patients with intermediate cytogenetics. Leukemia 2004; 18: 1059-63.
109) Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. Blood. 1995 Feb 15;85(4):997-1005.
110) Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. Cancer Res 2003; 63: 3637-45.
111) Rowley JD. Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. Ann Genet 1973; 16: 109-12.
112) Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. Lancet Oncol 2010; 11: 543-52.
113) Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: 437-47.
114) San Miguel JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzalez M, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. Blood 1997; 90: 2465-70.
115) Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, et al. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Int J Hematol 2012; 95: 509-15.
116) Sasaki K, Yamagata T, Mitani K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid circumvent apoptosis in human leukemic cells expressing the RUNX1 chimera. Cancer Sci 2008; 99: 414-22.
117) Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. Blood 2006; 107: 1791-9.
118) Schwieger M, Lohler J, Friel J, Scheller M, Horak I, Stocking C. AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. J Exp Med 2002; 196: 1227-40.
119) Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 18030-5.

120) Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, et al. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. Recent Prog Horm Res 1997; 52: 141-64; discussion 164-5.
121) Shimizu K, Kitabayashi I, Kamada N, Abe T, Maseki N, Suzukawa K, et al. AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the up-regulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon. Blood 2000; 96: 288-96.
122) Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, Gerbing RB, Bernstein ID, Smith FO, et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. Blood 2003; 101: 3398-406.
123) Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. Oncogene 2005; 24: 2410-20.
124) Siu LL, Pili R, Duran I, Messersmith WA, Chen EX, Sullivan R, et al. Phase I study of MGCD0103 given as a three-times-per-week oral dose in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol 2008; 26: 1940-7.
125) Smetana K, Zapotocky M, Starkova J, Trka J. Effect of histone deacetylase inhibitors on the cell nucleus and nucleolus of leukemic myeloblasts in vitro - a cytochemical study. Acta Histochem 2007; 109: 413-9.
126) Starkova J, Madzo J, Cario G, Kalina T, Ford A, Zaliova M, et al. The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells. Clin Cancer Res 2007; 13: 1726-35.
127) Starý J., Vávra V., Gajdoš P., Hrstková H., Kopečná L., Štěrba J., Dembická D., Mendelová D., Mihál V., Pospíšilová D., Novák Z., Blažek B., Ptoszková H., Hak J., Toušovská K., Procházková D., Černá Z., Jabali Y., Timr P., Smíšek P., Zdráhalová K., Sedláček P., Šrámková L., Keslová P., Formánková R., Komrska V., Mejstříková E., Vrzalová A., Kramarzová K., Michalová K., Zemanová Z., Jarošová M., Housková J., Zámková A., Zuna J., Hrušák O., Trka J., Schwarz J., Creutzig U. Druhá celostátní léčebná studie AML-BFM 98 zvýšila úspěšnost v dosažení remise a zlepšila celkové přežití dětí s akutní myeloidní leukemií v České republice. Transfuze Hematol. dnes, 2008, 14, No. 4, p. 166-174.
128) Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev 1998; 12: 599-606.
129) Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O, et al. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. Leukemia 2004; 18: 1246-51.
130) Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, et al. Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. J Clin Oncol 2009; 27: 4007-13.
131) Tucker J, Dorey E, Gregory WM, Simpson AP, Amess JA, Lister TA, et al. Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome. Hematol Oncol 1990; 8: 47-58.
132) Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 673-8.
133) van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional

flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia 2012; 26: 1908-75.
134) Van Holde KE, Sahasrabuddhe CG, Shaw BR. A model for particulate structure in chromatin. Nucleic Acids Res 1974; 1: 1579-86.
135) Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002; 100: 2292-302.
136) Verdel A, Khochbin S. Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. J Biol Chem 1999; 274: 2440-5.
137) von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, Zimmermann M, Bradtke J, Betts DR, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. J Clin Oncol 2010; 28: 2682-9.
138) Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1996a; 93: 3444-9.
139) Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, et al. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. Cell 1996b; 87: 697-708.
140) Warrell RP, Jr., Frankel SR, Miller WH, Jr., Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). N Engl J Med 1991; 324: 1385-93.
141) Wells RJ, Arthur DC, Srivastava A, Heerema NA, Le Beau M, Alonzo TA, et al. Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 213. Leukemia 2002; 16: 601-7.
142) Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC. CD117/CD34 expression in leukemic blasts. Am J Clin Pathol 1996; 106: 192-5.
143) Wiltse J. Mode of action: inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin--developmental effects of valproic acid. Crit Rev Toxicol 2005; 35: 727-38.
144) Wolford JK, Prochazka M. Structure and expression of the human MTG8/ETO gene. Gene 1998; 212: 103-9.
145) Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith MT, Segal MR, Dicks BM, et al. Molecular characterization of genomic AML1-ETO fusions in childhood leukemia. Leukemia 2001; 15: 1906-13.
146) Xie C, Edwards H, Xu X, Zhou H, Buck SA, Stout ML, et al. Mechanisms of synergistic antileukemic interactions between valproic acid and cytarabine in pediatric acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2010; 16: 5499-510.
147) Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. Oncogene 2007; 26: 5541-52.
148) Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. J Biol Chem 2001a; 276: 31674-83.
149) Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, et al. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 2001b; 98: 10398-403.
150) Zeise ML, Kasparow S, Zieglgansberger W. Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro. Brain Res 1991; 544: 345-8.

151) Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, et al. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. Mol Cell Biol 1996; 16: 1231-40.
152) Zhang J, Hug BA, Huang EY, Chen CW, Gelmetti V, Maccarana M, et al. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. Mol Cell Biol 2001; 21: 156-63.
153) Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, et al. Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 3070-5.
154) Zhou X, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA. Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 1056-61.
155) Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. Cancer Cell 2004; 5: 455-63.

Publikace související s dizertační prací s IF:

Zapotocky M, Mejstrikova E, Smetana K, Stary J, Trka J, Starkova J. Valproic acid triggers differentiation and apoptosis in AML1/ETO-positive leukemic cells specifically. *Cancer Lett.* 2012 Jun 28;319(2):144-53. (IF 4.258)

Smetana K, Zápotocký M, Starková J, Trka J. Effect of histone deacetylase inhibitors on the cell nucleus and nucleolus of leukemic myeloblasts in vitro - a cytochemical study. *Acta Histochem*. 2007;109(5):413-9. (IF 1.608)

Smetana K., Kuzelova K., Zapotocky M., Starkova J., Hrkal Z., Trka J.; Mean diameter of nucleolar bodies in cultured human leukemic myeloblasts is mainly related to the S and G2 phase of the cell cycle. *Eur J Histochem*. 2007 Oct-Dec;51(4):269-74. (IF 2.412)

Smetana K, Zápotocky M, Starková J, Trka J.; To the nucleolar density and size in apoptotic human leukemic myeloblasts produced in vitro by Trichostatin A. *Eur J Histochem*. 2008 Jul-Sep;52(3):143-8. (IF 2.412)

Smetana K, Zápotocký M. The effect of a histone deacetylase inhibitor - valproic Acid - on nucleoli in human leukaemic myeloblasts. *Folia Biol* (Praha). 2010;56(5):201-5. (IF 1.219)

Publikace bez souvislosti s dizertační prací s IF:

Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, Zapotocky M, Starkova J, Hrusak O, Horak J, Trka J. ETV6-AML1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood.* 2011 Jan 6;117(1):368-9. (IF 9.06)

Zápotocký M, Hanzalová J, Starková J, Votruba I, Holý A, Otová B. Experimental therapy with 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurine (PMEDAP): origin of resistance. *Folia Biol* (Praha). 2007;53(3):79-84. (IF 1.219)

Publikace bez souvislosti s dizertační prací bez IF:

Starková J., Zápotocký M., Trka J.; Potenciál inhibitorů deacetyláz histonů (HDACi) v léčbě dětské TEL/AML1 pozitivní akutní lymfoblastické leukémie. *Transfuze Hematol. dnes, 14, 2008, No. 2, p. 50–54.* (bez IF)

Michal Zápotocký, David Sumerauer, Hubert Mottl; Pokročilý germinální tumor varlete u dospívajícího chlapce. *Onkologie* 2009; 3(1). (bez IF)