

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**Mgr. Kateřina Rejlová**

Regulace exprese *HOX* genů v hematopoéze a leukemogenezi

*HOX gene expression regulation in hematopoiesis and leukemogenesis*

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Júlia Starková Ph.D.

Praha, 2019

## **Prohlášení**

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

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

V Praze, 18. 7. 2019

Kateřina Rejlová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Júlii Starkové, Ph.D. za odborné vedení projektu a prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D. za možnost účasti na výzkumu v oblasti dětských leukémií. Děkuji celé laboratoři CLIP při Klinice dětské hematologie a onkologie (UK 2. LF a FN Motol) za velmi přátelské pracovní prostředí a motivaci, bez které by tato práce nevznikla. Velké díky patří zejména místnosti 444: Mgr. Martině Slámové, MUDr. Olze Zimmermannové, Mgr. Violetě Bakardjieva-Mihaylové a Mgr. Lence Hovorkové za psychickou podporu a pomoc při časově náročných experimentech. Velké poděkování věnuji také RNDr. Karolině Škvárové Kramarzové, Ph.D., doc. MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. a prof. MUDr. Janu Zunovi, Ph.D. za pomoc při dokončování této dizertační práce. Největší dík však patří celé mé rodině za nepostradatelnou podporu během celého mého studia.

**Identifikační záznam:**

REJLOVÁ, Kateřina. *Regulace exprese HOX genů v hematopoéze a leukemogenezi. [HOX gene regulation in hematopoiesis and leukemogenesis]*. Praha, 2019, 76 stran, 2 přílohy (27 stran). Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie, Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Júlia Starková Ph.D.

**Klíčová slova:** AML, *HOX* geny, PML-RAR $\alpha$ , chromatinové modifikátory, histondemethylázy, JMJD3

**Keywords:** AML, *HOX* genes, PML-RAR $\alpha$ , chromatin modifiers, histondemethylases, JMJD3

## OBSAH

<b>Abstrakt</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Přehled literatury</b> .....	<b>11</b>
2.1 Akutní myeloidní leukémie .....	11
2.1.1. AML - rozdělení .....	12
2.1.2. AML - terapie .....	12
2.1.3. AML - typické molekulárně-genetické aberace .....	14
2.2 PML-RAR $\alpha$ .....	15
2.3 Homeoboxové geny.....	16
2.3.1 Epigenetická regulace <i>HOX</i> genů.....	17
2.3.1.1 Kovalentní modifikace histonů .....	17
2.3.1.2 Methylace DNA .....	18
2.3.2 <i>HOX</i> geny v hematopoéze .....	19
2.3.3 <i>HOX</i> geny v leukemogenezi.....	20
<b>3 Cíle</b> .....	<b>22</b>
<b>4 Metody</b> .....	<b>23</b>
4.1 Kultivace buněčných linií.....	23
4.2 Sortování vzorků kostní dřeně zdravých dárců a pacientů s AML .....	23
4.3 Kvantitativní real-time PCR.....	23
4.5 Analýza mutací.....	24
4.6 Western blot .....	24
4.6 Chromatinová imunoprecipitace s následnou kvantitativní real-time PCR .....	25
4.7 Chromatinová imunoprecipitace s následným sekvenováním nové generace (ChIP-seq) .....	26
4.8 Analýza dat z metody ChIP-seq .....	26
4.9 Morfologie buněk .....	27
4.10 Průtoková cytometrie .....	27
4.11 Bisulfitové sekvenování .....	27
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>28</b>
5.1 Expresní profil <i>HOX</i> genů v sortovaných subpopulacích zdravé kostní dřeně reprezentujících různá stádia myelopoézy .....	28
5.2 Expresní profil <i>HOX</i> genů u vzorků kostní dřeně dětských pacientů s AML .....	29
5.3 Vliv molekulárních aberací na expresi <i>HOX</i> genů u různých subtypů AML.....	31

5.4 Vliv přítomnosti mutace <i>FLT3/ITD</i> na expresi <i>HOX</i> genů u leukemických buněk s fúzním genem <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> .....	32
5.5 Srovnání expresního profilu <i>HOX</i> genů ve vývojových stádiích zdravé hematopoézy a maligních blastech.....	34
5.6 Expresní profil modifikátorů chromatinu a jejich role v regulaci exprese <i>HOX</i> genů .....	36
5.7 Význam <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> v regulaci exprese <i>HOX</i> genů a genů pro histon demethylázy.....	39
5.8 Role <i>JMJD3</i> v regulaci exprese <i>HOX</i> genů u <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> + buněk .....	44
5.9 Celkové změny histonového kódu u <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> + buněk.....	45
5.10 Změny histonového kódu na promotorech <i>HOX</i> genů u <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> + buněk .....	46
5.11 Efekt inhibice <i>JMJD3</i> na ATRA-řízenou diferenciaci u <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> + buněk .....	53
5.12 Role methylace DNA v transkripční regulaci <i>HOX</i> genů u <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> + buněk.....	54
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>56</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>61</b>
<b>8 Přehled publikací a přednášek.....</b>	<b>62</b>
<b>9 Seznam zkratk .....</b>	<b>63</b>
<b>10 Reference.....</b>	<b>65</b>
<b>11 Přílohy .....</b>	<b>76</b>

## Abstrakt

Exprese homeoboxových (*HOX*) genů je během hematopoézy přísně regulována a v průběhu diferenciace hematopoetických buněk dochází postupně k jejímu snižování. Naopak u leukemických buněk je exprese těchto genů velmi často narušena. U akutní myeloidní leukémie (AML) byla popsána rozdílná exprese *HOX* genů mezi jednotlivými subtypy definovanými dle cytogenetického a molekulárně-genetického vyšetření. V naší práci byla pomocí metody nesupervidovaného hierarchického klastrování podle hladiny exprese *HOX* genů rozdělena kohorta dětských pacientů s AML do 5 klastrů, které jsou charakterizovány přítomností nebo absencí typických molekulárních aberací. Zároveň byla vyšetřena exprese *HOX* genů ve zdravých populacích hematopoetických buněk, které odpovídají jednotlivým morfologickým stádiím leukemických buněk. Na základě výsledků lze konstatovat, že exprese *HOX* genů nekopíruje pouze vývojové/morfologické stádium, ve kterém byla leukemická buňka zastavena v průběhu maligního zvratu, ale změněná hladina *HOX* genů se přímo nebo nepřímo podílí na procesu leukemogeneze. Prokázali jsme, že hladina exprese *HOX* genů je také závislá na přítomnosti molekulárních aberací. Pro další studium jsme si vybrali AML pacienty s fúzním genem *PML-RAR $\alpha$* , kteří mají celkově nejnižší expresi *HOX* genů. Zajímala nás regulace exprese *HOX* genů v této geneticky charakterizované podskupině. Na expresi *HOX* genů neměla u tohoto subtypu vliv přítomnost mutace *FLT3/ITD*, která je celkově spojována s vysokou expresí *HOX* genů, z čehož usuzujeme, že snížený expresní vzorec *HOX* genů bude závislý na přítomnosti fúzního proteinu *PML-RAR $\alpha$* . U *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních pacientů jsme prokázali asociaci nízké hladiny *HOX* genů s nízkou expresí histon demethyláz (*JMJD3* a *UTX*) a zároveň s vysokou expresí *de novo* DNA methyltransferáz. Pomocí látky ATRA degradující protein *PML-RAR $\alpha$*  a specifického inhibitoru *JMJD3* jsme ukázali, že exprese *HOX* genů je regulována přes *PML-RAR $\alpha$* /*JMJD3*. Využitím chromatinové imunoprecipitace (ChIP) a ChIP s následnou sekvenací nové generace jsme dále stanovili konkrétní *HOX* geny, které jsou u *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních leukemických buněk takto regulovány. V neposlední řadě jsme zjistili, že kombinace ATRA a *JMJD3* specifického inhibitoru způsobila synergický apoptotický efekt u ATRA senzitivní i ATRA rezistentní buněčné linie. Tento apoptotický efekt naznačuje možnost budoucího terapeutického využití u ATRA rezistentních *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních pacientů.

## Abstract

*HOX* gene expression is tightly regulated during hematopoiesis and it is gradually decreased during the differentiation of hematopoietic cells. By contrast in case of leukemic blasts the expression of *HOX* genes is often disrupted and dysregulated. Especially in acute myeloid leukemia (AML) different expression of *HOX* genes was described between different subtypes classified according to cytogenetics and molecular genetics. In this study, the cohort of childhood AML patients were screened for *HOX* gene expression and based on these values divided into five clusters using unsupervised hierarchical clustering characterized mainly by presence or absence of the typical molecular aberrations. *HOX* gene expression was also tested in the healthy counterpart of hematologic cells equivalent to the particular morphological stages of leukemic cells. Based on these results, *HOX* gene expression directly or indirectly participate in leukemogenesis and it not only copies the developmental/morphological stage in which the hematopoietic cell was stopped during differentiation. In this thesis/study it was concluded that the *HOX* gene expression is dependent on the presence of specific molecular aberration. In the second part of our study, we investigated the *HOX* gene transcription regulation in AML patients with *PML-RAR $\alpha$*  fusion gene with the overall lowest expression of *HOX* genes. We determined that the presence of *FLT3/ITD* mutation usually connected with the high expression of *HOX* genes had no effect on the level of *HOX* genes in *PML-RAR $\alpha$*  positive cases which means that the *HOX* gene expression profile is dependent mainly on *PML-RAR $\alpha$*  fusion genes. In *PML-RAR $\alpha$*  positive patients the low expression of *HOX* genes was associated with low expression of histone demethylases (*JMJD3* and *UTX*) and high expression of DNA methyltransferases. We showed using ATRA, causing degradation of *PML-RAR $\alpha$*  fusion protein, and *JMJD3* specific inhibitor that *HOX* gene expression is regulated by *PML-RAR $\alpha$ /JMJD3*. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) and ChIP followed by next-generation sequencing we identified *HOX* genes, which are regulated by *PML-RAR $\alpha$ /JMJD3* pathway. Furthermore, we observed the synergistic apoptotic effect of ATRA a *JMJD3* specific inhibitor on ATRA-sensitive but also on ATRA-resistant cell lines. This apoptotic effect shows potential future therapeutic usage in *PML-RAR $\alpha$*  ATRA-resistant patients.



## 1 Úvod

Leukémie, která se vyznačuje maligní transformací hematopoetických buněk, patří mezi nejčastější maligní onemocnění u dětí. U pacientů s diagnostikovanou leukémií je v určitém stádiu blokován vývoj hematopoetických buněk a vzniklé blasty jsou poté šířeny do krve, lymfatických uzlin jater a dalších orgánů. Tyto leukemické blasty vznikají vícestupňovým procesem přes preleukemický klon, u něhož se předpokládá vznik více jednotlivých změn genomu, vedoucích pomocí pozitivní selekce k tvorbě leukemického klonu. Leukemické buněčné klony, které se projevují ztrátou diferenciaci při zachování proliferace a zároveň defekty v apoptóze, postupně vytěsňují zdravou populaci hematopoetických buněk (Mayer J, 2002).

Leukémie se dělí dle průběhu onemocnění na akutní s prudkým nástupem a chronické s typickým pomalejším průběhem. Akutní leukémie jsou dále členěny dle vývojové řady, ze které pocházejí, na myeloidní a lymfoblastické. V této práci jsme se zaměřili na dětskou akutní myeloidní leukémii (AML), která je méně častým typem akutní leukemie u dětí, avšak s výrazně horší prognózou oproti častější akutní lymfoblastické leukémii (Appelbaum et al., 2006; Gibson et al., 2011). V dalším výzkumu jsme se specializovali na akutní promyelocytární leukémii s diferenciacním blokem v promyelocytárním stádiu myeloidního vývoje, charakterizovanou přítomností fúzního genu *PML-RAR $\alpha$* . Tento subtyp vyžaduje specifický léčebný protokol, který zahrnuje od začátku léčby pacienta zvýšené dávky ATRA (all-trans retinoic acid), což způsobuje uvolnění diferenciacního bloku a degradaci *PML-RAR $\alpha$*  fúzního proteinu (Gregory et al., 2009; Testi et al., 2005).

*HOX* geny, které jsme se rozhodli u dětských AML studovat, jsou velmi důležité pro vývoj hematopoetických buněk neboli hematopoézu. Nejvyšší exprese *HOX* genů je detekována u kmenových a časných progenitorových hematopoetických buněk, přičemž během maturace se postupně snižuje. Nejnižší expresi pak mají diferencované hematopoetické buňky. Exprese *HOX* genů během maturace hematopoetických buněk je přísně regulována. Narušení této regulace se může podílet na procesu maligní transformace (Argiropoulos and Humphries, 2007; Sauvageau et al., 1994). Dosud však nebylo objasněno, zda je aberantní exprese *HOX* genů u jednotlivých subtypů leukémie způsobená aberantní expresí jejich transkripčních regulátorů, nebo pouze kopíruje expresní profil *HOX* genů zdravého protějšku, zastaveného v konkrétních fázích diferenciaci.

Za tímto účelem jsme na kohortě dětských pacientů vyšetřili expresi *HOX* genů na mRNA úrovni u rozdílných subtypů AML a sortovaných myeloidních diferenciacních stádií

zdravé kostní dřeně. Na základě těchto výsledků jsme prokázali, že aberantní exprese v rámci subtypů AML je vázaná na konkrétní molekulárně-genetické aberace a není daná pouze diferenciačním stádiem leukemické buňky.

Z hlediska regulace exprese na epigenetické úrovni mají *HOX* geny bivalentní charakter. Na promotorech těchto genů se nachází jak represní, tak aktivační histonové značky, reprezentované specifickými histonovými modifikacemi. Množství těchto značek, a tím také exprese *HOX* genů, je dynamicky regulována methyltransferázami a demethylázami histonů.

V této práci jsme prokázali významnou roli demethylázy JMJD3 v regulaci exprese *HOX* genů u PML-RAR $\alpha$  pozitivní leukémie. Hladina exprese vybraných *HOX* genů u tohoto typu leukémie korelovala pozitivně s expresí a enzymatickou aktivitou JMJD3 a zároveň negativně s přítomností represní histonové značky (H3K27me3). Propojení této regulační kaskády s PML-RAR $\alpha$  fúzním proteinem jako transkripčním faktorem prokázala přímá vazba proteinu PML-RAR $\alpha$  na promotorovou oblast genu pro *JMJD3* (Martens et al., 2010). Zároveň jsme na modelových PML-RAR $\alpha$  pozitivních buněčných liniích detekovali cytotoxický efekt kombinace ATRA se specifickým inhibitorem enzymatické aktivity JMJD3, a to jak u ATRA-senzitivních, tak i u ATRA-rezistentních linií. Tato skutečnost by mohla v budoucnu sloužit jako potenciální cíl k rozšíření terapie u PML-RAR $\alpha$  pozitivních pacientů s vyvinutou rezistencí k léčbě ATRA.

## 2. Přehled literatury

### 2.1 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je méně častým subtypem leukémie dětského věku, která bývá diagnostikována v 15-20% případů. Nejvyšší incidence AML je u dětí detekována v 1. roce života, zatímco u dospělých pacientů se zvyšuje počet diagnostikovaných AML s rostoucím věkem (Appelbaum et al., 2006; Puumala et al., 2013). Celkově je u AML ve srovnání s častěji diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) pozorována horší prognóza. Dětské AML pacienti (do věku 18 let) mají výrazně lepší prognózu s pravděpodobností přežití až 75% všech případů, naopak u dospělých pacientů se přežití snižuje až na 45%. Tato skutečnost je spojena s celkově nižším podílem relapsů u AML pacientů dětského věku, čemuž odpovídají více senzitivní leukemické blasty na chemoterapeutickou léčbu, nižší komorbidita, a tudíž i vyšší tolerance k léčbě (Appelbaum et al., 2006; Burnett et al., 2010; Gibson et al., 2011; Juliusson et al., 2009).

Základní diagnostika všech dětských akutních leukémií se opírá o imunologická, cytogenetická, morfologická a molekulárně genetická vyšetření, která se v první řadě zabývají rozlišením ALL a AML dle daných kritérií (viz Tab. 1), což je velmi důležité pro následnou léčbu pacientů.

	ALL	AML
<b>morfologie</b>	žádná granula žádné Auerovy tyče	obvykle se mohou vyskytovat Auerovy tyče
<b>imunofenotyp</b>	B-řada: CD19+, CD10+ T-řada: cyCD3+, CD7+	panmyeloidní antigeny CD13+, CD33+, CD65+
<b>karyotyp</b>	t(8;14) (B-ALL) t(9;22) t(1;19) (preB-ALL) t(11;14) (T-ALL) t(4;11) (proB-ALL)	t(8;21) (FAB M2) t(15;17) (FAB M3) t(9;11) (FAB M5) t(16) (FAB M4eo) monozomie 7, trizomie 8

Tab. 1: Rozdílné znaky AML a ALL (převzato z Mayer, Starý et al 2002)

### 2.1.1. AML - rozdělení

AML je vysoce heterogenní skupinou onemocnění, protože postihuje všechny myeloidní hematopoetické progenitory, mezi něž patří progenitory erytroidní, granulocytární, monocytární a megakaryocytární hematopoetické řady. Již od roku 1976 se standardně používá rozdělení dle French-American-British (FAB) pracovní skupiny (Bennett et al., 1976). FAB klasifikace rozděluje AML do 8 subtypů zohledňujících stupeň vyzrávání a typ myeloidní řady, ze kterých jsou leukemické blasty derivovány (viz Tab. 2). Dnes však lze AML charakterizovat detailněji a to na základě molekulárně-genetické analýzy. Právě zavedením diagnostických metod zaměřených na stanovení přítomnosti molekulárně-genetických aberací mohou nejnovější léčebné protokoly zohlednit další typ klasifikace AML, navržený v roce 2002 Světovou zdravotnickou organizací (WHO), která rozděluje AML dle molekulárně-genetického a cytogenetického vyšetření (Sandahl et al., 2015; Vardiman et al., 2002).

FAB subtyp	Charakteristika	Zastoupení
<b>AML M0</b>	akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciací (tzv. časná myeloidní leukémie)	3 %
<b>AML M1</b>	akutní myeloidní leukémie bez vyzrávání	15 - 20 %
<b>AML M2</b>	akutní myeloidní leukémie s vyzráváním	25 - 30 %
<b>AML M3</b>	akutní promyelocytární leukémie (APL) + podskupina AML M3v (mikrogranulární leukémie)	5 - 10 %
<b>AML M4</b>	akutní myelomonocytární leukémie + podskupina AML M4eo s eozinofilií	25 - 30 %
<b>AML M5</b>	akutní monocytární leukémie	6 %
<b>AML M6</b>	erythroleukémie	3 - 5 %
<b>AML M7</b>	akutní megakaryoblastická leukémie	3 %

Tab. 2: Subtypy AML podle FAB rozdělení (převzato z Mayer, Starý et al 2002)

### 2.1.2. AML - terapie

Po stanovení diagnózy a zahájení indukční léčby AML zejména na základě morfologie a dále také průtokové cytometrie je pacient léčen podle standardních léčebných protokolů odpovídajících leukemickému subtypu. Následně je pomocí těchto metod sledována tzv.

minimální reziduální nemoc (MRN), která je v případě AML diagnóz s jasným molekulárně genetickým cílem sledována také pomocí molekulárně genetických metod, konkrétně qPCR (kvantitativní PCR v reálném čase). Tato zbytková leukemická populace zůstává v těle pacienta a její hladina v přesně stanovených časových bodech léčby rozřazuje pacienty do rozdílných skupin dle rizika následného relapsu (Inaba et al., 2012; Sievers et al., 2003). U pacientů, kteří spadají do vysokého rizika, zahrnuje běžný léčebný protokol na bázi chemoterapie také transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation), využívající kromě samotné eliminace maligních buněk a nahrazení zdravými krvetvornými buňkami také reakce štěpu proti leukémii jako významného benefitu (Hasle, 2014). Většina AML je léčena nejprve indukční terapií na bázi antracyklinů jako je idarubicin a daunorubicin (Creutzig et al., 2005). U dospělých pacientů s AML zahrnuje indukční terapie také cytarabin, který prokazatelně u této kohorty pacientů zlepšuje celkovou prognózu (Weick et al., 1996). Po indukční terapii následuje konsolidační terapie s 2 – 5 cykly, které jsou přizpůsobené dle konkrétních léčebných protokolů. Následující fází je jednoletá udržovací terapie, jejíž součástí bývá také imunologická léčba. Jejím příkladem imunologické léčby může být interleukin 2, který stimuluje proliferaci antigen-specifických T-lymfocytů, zvyšuje aktivitu NK (natural killers) buněk proti AML blastům a způsobuje uvolnění TNF (tumor necrosis factor) a IFN $\gamma$  (interferon gamma) z aktivovaných lymfocytů (Lange et al., 2011; Toren et al., 1995).

V rámci jednotlivých subtypů AML se z hlediska léčby odlišuje skupina pacientů s diagnózou Downova syndromu. U těchto pacientů je preferována terapie s nižšími léčebnými dávkami bez následné SCT (Sorrell et al., 2012). Dalším výrazně se vymezujícím subtypem AML dle léčebného protokolu je akutní promyelocytární leukémie (APL, dle FAB AML M3). Léčebný protokol APL zahrnuje již v indukční léčbě podání ATRA (all-trans-retinoic-acid), která je nezbytná pro úspěšnou léčbu těchto pacientů. Následná konsolidační i udržovací terapie zahrnuje v různých léčebných protokolech, lišících se geograficky a věkově, podání ATRA mnohdy v kombinaci s ATO (arsenic trioxide). Z důvodu odlišného léčebného protokolu je pro úspěšnou léčbu nutná včasná diagnostika APL, která odliší tento subtyp od ostatních AML (Testi et al., 2005).

### 2.1.3. AML - typické molekulárně-genetické aberace

U AML je ve srovnání se solidními nádory detekováno výrazně méně strukturálních a numerických aberací. Nejčastěji se vyskytující aberace lze rozdělit obecně do dvou skupin. Pro první skupinu abnormalit, které se označují jako třída I, jsou typické mutace dodávající leukemickým buňkám proliferační výhodu bez ovlivnění jejich diferenciačního potenciálu. Mezi takové aberace patří mutace v genech kódujících receptorové kinázy jako je *FLT3* (fms (Feline McDonough Sarcoma) - related tyrosine kinase 3), fosfatázy *PTPN11* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor 11) nebo aktivační mutace onkogenů jako jsou *KIT* (kit oncogene) nebo *RAS* (RASA1 p21 protein activator (GTPase activating protein) 1). Genetické aberace třídy II mají naopak blokační efekt, který se projevuje narušením diferenciace a následně také apoptózy při maligní transformaci hematopoetických buněk. Mezi takové aberace patří translokace vedoucí ke vzniku fúzních genů. Protože se většina těchto translokovaných genů řadí mezi transkripční faktory, dochází následně k aberantní expresi cílových genů (Kelly and Gilliland, 2002; Kaspers and Zwaan, 2007). Oba typy mutací, jak třídy I tak i třídy II, se u AML vyskytují velmi často současně. Tato skutečnost podporuje teorii vzniku leukémie na základě minimálně dvou zásahů do genomu v podobě mutací (Greaves, 1997; Mayer J, 2002).

Mutace v receptorové kináze FLT3, mezi které patří nejčastěji bodové mutace nebo duplikace typu ITD (internal tandem duplication), jsou detekovány u téměř třetiny pacientů s diagnózou AML. Tyto mutace způsobují konstitutivní aktivaci signálních drah přes RAS protein a následně také blokují myeloidní diferenciaci. Mutace v genu *FLT3* jsou asociovány s AML s normálním karyotypem a zároveň s proliferativní AML vykazující vyšší procento blastů a současně také s vyšším rizikem relapsu (Ravandi et al., 2010; Yamamoto et al., 2001).

Mezi nejčastější chromozomální přestavbu, která se vyskytuje u AML, patří translokace t(8;21)(q22;q22) generující fúzní gen *AML1*(RUNX1 - runt-related transcription factor 1) -*ETO* (RUNX1T1 - runt-related transcription factor; translocated to 1(cyclin related)). Přítomnost tohoto fúzního genu u AML blastů, která bývá spojována s dobrou prognózou, spadá nejčastěji do subtypu AML M2 (Peterson and Zhang, 2004). Pokud se ale u leukémií s tímto fúzním genem vyskytuje zároveň mutace v onkogenu *KIT* (až 31% AML1-ETO pozitivních případů), zvyšuje se riziko relapsu u těchto pacientů až na 70% (Schnittger et al., 2006). Transkripční faktor AML1-ETO inhibuje transkripci cílových genů svou korepresorovou funkcí, a podílí se tak na inhibici diferenciace myeloidních prekurzorů přes p53 tumor supresorovou odpověď (Linggi et al., 2002).

Translokace obsahující gen *MLL* (mixed lineage leukemia), asociované se subtypy AML M4 a M5, jsou u dětských leukémií spojovány se střední až horší prognózou. Konkrétní prognóza je velmi často závislá na translokačních partnerech genu *MLL*, mezi něž se řadí geny sdílející transkripční jádro jako je *AF4* (MLLT2, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 2) *t(4;11)(q21;q23)* a *AF9* (MLLT3, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3) *t(9;11)(p22;q23)*. Teorie vzniku těchto translokací se opírá o bezprostřední blízkost těchto genů během transkripce, které sdílejí transkripční faktory a zároveň také o vysokou senzitivitu genu *MLL* k Dnázě I, která způsobuje zlomy na úrovni DNA (Cowell et al., 2012). Zlomy a následně fúzní geny vznikají u dětských leukémií zejména prenatalně, a to vnější expozicí plodu inhibitorům topoizomerázy II, která je prenatalně vysoce exprimována a je nezbytná pro udržení chromozomální integrity (Ross, 2000; Zandvliet et al., 1996).

U subtypu AML M4 s abnormální eozinofilií a relativně dobrou prognózou je nejčastěji detekován fúzní gen *CBFβ* (core-binding factor β)/*MYH11* (myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle), který vzniká inverzí chromozomu 16 *inv(16)*, nebo translokací *t(16;16)(p13;q22)* (Shurtleff et al., 1995). Tento fúzní protein v komplexu s dalšími proteiny funguje v jádře jako transkripční represor a blokuje myeloidní diferenciaci (Hiebert et al., 2001; Kundu and Liu, 2001).

## 2.2 PML-RAR $\alpha$

Subtypu AML M3 odpovídá akutní promyelocytární leukémie (APL) s nejčastěji detekovaným fúzním genem *PML* (promyelocytic leukemia) – *RAR $\alpha$*  (retinoic acid receptor  $\alpha$ ) vznikajícím translokací *t(15;17)(q22;q12-22)*. PML-RAR $\alpha$  fúzní protein blokuje myeloidní diferenciaci v promyelocytárním stádiu a zvyšuje proliferaci leukemických buněk (Ferrucci et al., 1997). Fyziologicky tvoří monomerní neaktivní transkripční faktor RAR $\alpha$  společně s proteinem RXR (retinoid X receptor) aktivní heterodimer. Ten se váže na specifická RARE (retinoic acid response elements), nebo RXRE (retinoid X receptor elements) místa v promotorech cílových genů myeloidní diferenciaci, čímž reguluje jejich transkripci (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Pokud se na heterodimerní komplex nenaváže do ligand-specifického vazebného místa ligand, dochází k navázání korepresorových proteinů NCoR (nuclear receptor corepressor) a SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor), což vede následně k inhibici transkripce cílových genů deacetylací chromatinu pomocí histon deacetyláz (Horlein et al., 1995). Naopak, pokud se na RAR $\alpha$  naváže retinová

kyselina, která má vysokou afinitu k vazebnému místu na  $RAR\alpha$  receptoru, způsobí rekrutování enzymů (histon acetyltransferáz) vedoucích k aktivaci transkripce cílových genů zodpovědných za myeloidní diferenciaci (Kishimoto et al., 2006). Vznik  $PML-RAR\alpha$  fúzního proteinu způsobuje zablokování myeloidní diferenciaci skrze narušení fyziologické pro-diferenciační signalizace, neboť fúzní protein nereaguje na fyziologické koncentrace retinové kyseliny. Diferenciační blok může být uvolněn zvýšenými dávkami ATRA (all-trans retinoic acid), což zároveň vede také k degradaci fúzního proteinu, následnému snížení proliferace a zvýšení apoptózy u těchto myeloidních buněk (Raelson et al., 1996; Yoshida et al., 1996). ATRA byla zavedena jako nutná hlavní složka léčebného protokolu pro APL  $PML-RAR\alpha$  pozitivní pacienty, díky čemuž se špatná prognóza těchto pacientů vylepšila na velmi dobrou (Grignani et al., 1993; Vitaliano-Prunier et al., 2014). Stále však u určitého procenta (zhruba 15%) takto léčených pacientů dochází ke vzniku mutací E domény  $RAR\alpha$  části  $PML-RAR\alpha$  fúzního genu, která je zodpovědná za heterodimerizaci a vazbu ligandu, korepresorů a koaktivátorů. Selektivním tlakem tak dochází ke vzniku klonů rezistentních k léčbě ATRA (Ding et al., 1998; Imaizumi et al., 1998).

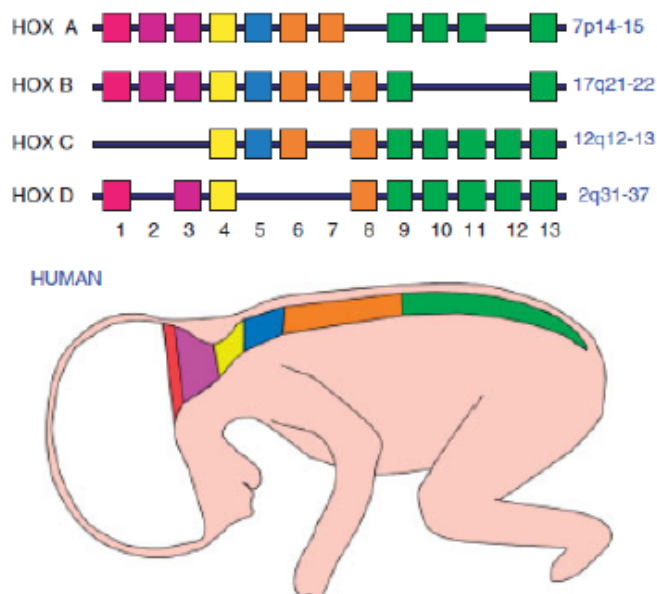
### 2.3 Homeoboxové geny

*HOX* (homeoboxové) geny, které kódují transkripční faktory nezbytné pro vývoj organismu obratlovců, se rozdělují primárně do dvou základních tříd. Všechny tyto transkripční faktory vykazují významnou podobnost v DNA-vazebné doméně o 60 aminokyselinách, které tvoří motiv helix-turn-helix. Do třídy I patří *HOX* geny rozdělené do 4 klastrů (tzv. clustered *HOX* genes) nacházejících se na 4 různých chromozomech (klastr A = chromozom 7, klastr B = chromozom 17, klastr C = chromozom, klastr D = chromozom 2). Třída II reprezentuje *HOX* geny volně umístěné po genomu (non-clustered *HOX* genes). (Argiropoulos and Humphries, 2007; Grier et al., 2005).

U klastrovaných *HOX* genů je pro správný vývoj anterior-posteriorní osy těla obratlovců během embryogeneze důležitý směr a časování exprese těchto genů. Geny pro vývoj anteriorní části, které se nacházejí na 3' konci, jsou exprimovány primárně. Následně postupuje exprese k 5' konci, na kterém se nacházejí geny zodpovědné za vývoj posteriorní části těla obratlovců (viz Obr. 1). Analogické geny s výraznou homologií se nacházejí také u *Drosophila melanogaster*, jejichž přísně časovaná a směrovaná exprese hraje ve vývoji anterior-posteriorní osy podobnou roli. Přítomnost konzervovaných sekvencí ukazuje na



vysokou homologii *HOM-C* genů u *Drosophily* a *HOX* genů obratlovců, které pravděpodobně vznikly divergencí a duplikací během evoluce (Grier et al., 2005; Mallo et al., 2010).



Obr. 1.: Expres *HOX* genů ve vývoji anterior-posteriorní osy těla (převzato z Grier, 2005)

### 2.3.1 Epigenetická regulace *HOX* genů

U *HOX* genů byla kromě tradiční regulace zprostředkované transkripčními faktory popsána velmi významná regulace na epigenetické úrovni, která způsobuje změnu exprese v závislosti na chemické modifikaci DNA nebo aminokyselin histonů. Jako součást procesu hematopoézy, embryogeneze nebo maligní transformace může změna exprese *HOX* genů na základě epigenetické regulace vést k výrazné změně produkce HOX proteinů, následně také fenotypu buňky nezávisle na změně nukleotidové sekvence genu. Mezi hlavní epigenetické regulátory exprese patří enzymy odpovědné za změny v kovalentních modifikacích histonů, mezi které patří např. methylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinylace a zároveň také methylace cytosinu na úrovni sekvence DNA.

#### 2.3.1.1 Kovalentní modifikace histonů

Na dynamické epigenetické regulaci *HOX* genů se podílejí skupiny histomethyltransferáz s opačným působením. Zatímco methyltransferáza EZH2 (enhancer of zeste 2 polycomb repressive komplex 2 subunit), která je součástí komplexu PcG (polycomb

group), udržuje nízkou expresi *HOX* genů methylací lyzinu K27 na histonu H3 v promotorové oblasti, methyltransferáza MLL jako součást proteinového komplexu TrxG (trithorax group) aktivuje expresi *HOX* genů methylací lyzinu K4 na histonu H3 (Lund and van Lohuizen, 2004; Milne et al., 2002). O nezbytnosti těchto proteinů svědčí dříve publikovaná data, tj. v případě jejich aberantní exprese a funkce dochází k poškození buněk během hematopoézy (Ono et al., 2005; Raaphorst et al., 2001). Opačně k těmto procesům působí enzymy snižující metylaci na vybraných histonech, tzv. demethylázy histonů. Demethylázy JMJD3 (KDM6B - lysine (K)-specific demethylase 6B) a UTX (KDM6A - lysine (K)-specific demethylase 6A) způsobují aktivaci chromatinu demethylací lyzinu K27 na histonu H3, zatímco demethyláza LSD1 (Lysine-specific histone demethylase 1A) udržuje neaktivní chromatin demethylací lyzinu K4 na histonu H3 (Agger et al., 2007; Jin et al., 2013). Množství represní (H3K27me3) a aktivační (H3K4me3) methylační značky na promotorech *HOX* genů se dynamicky mění působením methyltransferáz a demethyláz. Přítomnost obou těchto histonových značek v promotorových oblastech ukazuje na tzv. bivalentní charakter, který umožňuje rychlou regulaci exprese *HOX* genů nezbytnou pro diferenciaci buněk.

Epigenetické kovalentní modifikace chromatinu jsou vzájemně regulačně propojeny. Mezi nejvýznamnější příklady patří stimulace methyltransferázy MLL acetylací histonu H3, která působí všeobecně jako značka aktivovaného chromatinu stejně jako právě H3K4me3 (Milne et al., 2002). Pro finální kondenzaci a umlčení chromatinu v závislosti na přítomnosti represní histonové značky je naopak velmi důležitá (nikoli však nezbytná) přímá vazba PRC1 (Polycomb repressive complex 1) vedoucí k ubiquitinaci histonu H2A. Enzymatická aktivita komplexu PRC1 je signifikantně potencována vazbou protoonkogenního proteinu BMI1 (B-cell specific moloney murine leukemia virus integration region 1), který se tak podílí na umlčení chromatinu cílových genů. Pro správnou funkci BMI-1 a následnou represi transkripce *HOX* genů je nutná jeho vazba přes protein MLL. Pokud je však MLL mutován nebo je součástí translokace, dochází k abnormálnímu zvýšení exprese *HOX* genů právě znemožněním vazby BMI-1 na MLL (Cao et al., 2002; Endoh et al., 2012; Tan et al., 2016; van Lohuizen et al., 1991; Xia et al., 2003).

### 2.3.1.2 Methylace DNA

Methylace DNA, která je prezentována 5-methyl-cytosinem, je celkově spojována s inhibicí transkripce. Za metylaci DNA jsou odpovědné specifické DNA methyltransferázy, které lze rozdělit na udržovací, odpovědné za udržení methylace během replikace DNA a *de*

*novo*, zprostředkující metylaci za účelem cílené inhibice transkripce. DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) udržovací methyltransferáza, která je nezbytná pro správný vývoj a dělení buněk, duplikuje DNA methylační vzorec během replikace ze starého vlákna DNA na nové. Naopak *de novo* DNA methyltransferázy DNMT3a a DNMT3b (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A/B) hrají významnou roli v regulaci exprese cílových genů. V obou případech se mohou změny funkce těchto enzymů podílet na procesu maligní transformace buněk (Chen et al., 2007; Okano et al., 1999; Robertson, 2001). Epigenetické regulační mechanismy jsou vzájemně propojeny, a proto se v případě inhibice transkripce objevuje v promotorových oblastech hypermethylace DNA zároveň s hypoacetylací histonů, zvýšením množství represní methylační histonové značky a následnou kondenzací chromatinu. Fyziologicky patří *HOX* geny u kmenových a časných progenitorových buněk mezi geny s nejvíce hypomethylovanými promotory. Během diferenciaci buněk však dochází k postupnému zvyšování methylace (Laurent et al., 2010).

### 2.3.2 *HOX* geny v hematopoéze

Směřovaná a přísně časovaná exprese *HOX* genů od 3' po 5' konec je velmi důležitá také pro vývoj hematopoetických buněk. Všeobecně je nejvyšší exprese *HOX* genů detekována u hematopoetických kmenových buněk (HSC = hematopoetic stem cell), přičemž během vývoje raných hematopoetických prekurzorů se exprese *HOX* genů postupně snižuje. U terminálně diferencovaných hematopoetických buněk je naopak exprese *HOX* genů minimální. Konkrétně je u hematopoetických prekurzorů vykazujících pozitivitu CD34+ exprimováno 22 klastrovaných *HOX* genů z celkových 39, přičemž vysoká exprese anteriorních genů z 3' konce (*HOX1-6*) je detekována zejména u HSC. Postupně se exprese anteriorních *HOX* genů snižuje a naopak dochází ke zvýšení exprese posteriorních genů z 5' konce (Argiropoulos and Humphries, 2007; Sauvageau et al., 1994). V průběhu objasňování role *HOX* genů během hematopoézy bylo zjištěno, že konkrétní *HOX* geny jsou odpovědné za vývoj konkrétních hematopoetických vývojových řad. Jako gen odpovědný za vývoj erytroidní linie je považován *HOXB6*, jehož exprese je detekována zejména na buňkách erytroidní řady, a to zejména během fetálního vývoje (Zimmermann and Rich, 1997). *HOXB6* se u hematopoetických progenitorových buněk podílí také na indukcii diferenciaci do granulocytární řady (Giampaolo et al., 1994). Naopak geny *HOXA9*, *A10*, *B3*, *B7* a *B8* byly prokázány jako specifické geny pro kontrolu a vývoj myelomonocytární hematopoetické řady.

Pro vývoj lymfoidní řady jsou naopak nezbytné geny *HOXA5* a *HOXC5* (Bijl et al., 1996; Magli et al., 1997).

### 2.3.3 *HOX* geny v leukemogenezi

Aberantní exprese *HOX* genů byla prokázána u řady maligně transformovaných buněk, které způsobují vznik leukémie nebo solidních nádorů. Onkogenní potenciál narušené exprese *HOX* genů, ať už v roli přímých spouštěčů, nebo spíše vedlejších efektorů procesu maligní transformace, je podporován skutečností přísně řízené exprese *HOX* genů, která je nezbytná pro fyziologický průběh embryogeneze a hematopoézy (Cantile et al., 2012; Nguyen Kovichich et al., 2013; Zhang et al., 2013). Z dosavadních studií vyplývá, že je deregulovaná exprese *HOX* genů často způsobena kauzální mutací hlavních spouštěčů procesu maligní transformace. *HOX* proteiny se pak pravděpodobně ve většině případů jako transkripční faktory podílejí na tomto procesu, a to zejména udržováním stále proliferace a sebeobnovy buněk.

U leukémií byla detekována signifikantně aberantní exprese genů *HOX*, která dle konkrétního typu leukémie korelovala s její prognózou. Konkrétně byla nízká exprese *HOX* genů z klastru A a B u dospělých pacientů s AML spojena s dobrou prognózou stanovenou na základě cytogenetického vyšetření (Drabkin et al., 2002). Naopak u dětských pacientů s ALL byla asociována dobrá prognóza s celkovým přežitím bez relapsu s vysokou expresí *HOXA* genů (Starkova et al., 2010). U leukemických pacientů byla detekována významná změna exprese i na úrovni jednotlivých *HOX* genů z klastru A, B, C nebo D, jejichž podíl na leukemogenezi byl v řadě studií prokázán. Mezi nejznámější aberantně exprimovaný *HOX* gen z klastru A patří gen *HOXA9*, který podporuje expanzi hematopoetických buněk ve stádiu HSC a tím v případě aberantní exprese také leukemogenní proces (Thorsteinsdottir et al., 2002). Konkrétně u MLL přestavbových leukémií byla detekována zvýšená exprese genu *HOXA9* a kofaktoru MEIS1 (myeloid ecotropic viral integration site 1), které se podílejí na imortalizaci buněk. Zároveň byla na myším leukemickém modelu (*Hoxa9*<sup>-/-</sup>) s fúzním genem *MLL-ENL* (*MLLT1* - Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia; Translocated To, 1) prokázána nezbytnost genu *HOXA9* pro proces leukemogeneze (Ayton and Cleary, 2003; Horton et al., 2005; Zeisig et al., 2004). Aberantně zvýšená exprese genu *HOXA10* vedla u myších modelů k narušení myeloidní i lymfoidní diferenciaci a následně k rozvoji AML (Thorsteinsdottir et al., 1997a). Onkogenní potenciál *HOX* genů z klastru A byl prokázán také u T-ALL, kde byla detekována zvýšená exprese u subtypů s fúzními geny *CALM*

(Calmodulin)-*AF10* a *MLL*. Konkrétně bylo u T-ALL prokázáno, že *inv(7)(p15q34)* způsobuje transkripční aktivaci genů *HOXA10* a *HOXA11* (Soulie et al., 2005; Speleman et al., 2005). Mezi *HOXB* geny spojené se vznikem leukémie v případě aberantně zvýšené exprese na myších modelech patří gen *HOXB3*, který indikuje myeloproliferativní poruchy, a gen *HOXB6* vedoucí ke vzniku AML (Beslu et al., 2004; Fischbach et al., 2005).

Kromě aberantní exprese se u leukemických blastů jednotlivé *HOX* geny napříč všemi klastry často stávají translokačními partnery, čímž vytvářejí fúzní geny, které jsou specifické pro konkrétní subtypy leukémií. Nejznámějším translokačním partnerem *HOX* genů je gen *NUP98* (Nucleoporin 98kDa), který se právě ve spolupráci s *HOX* geny pravděpodobně podílí na leukemické transformaci buněk. Produkt translokace *t(7;11)(p15;p15)*, fúzní protein *NUP98-HOXA9*, je u myeloidních poruch jako jsou AML a myelodysplastický syndrom (MDS) nejčastěji popisován jako nutný první zásah při vzniku tohoto onemocnění (Kroon et al., 2001; Slape and Aplan, 2004). Naopak u CML (chronická myeloidní leukémie) je *NUP98-HOXA9* zodpovědný za přechod do blastické krize, a to prostřednictvím zastavení diferenciačního procesu u myeloidních prekurzorů (Yamamoto et al., 2000). Přítomnost fúzního genu *NUP98-HOXA9* dále způsobuje signifikantní zvýšení transkripce řady cílových genů, jež vedou následně ke zvýšení proliferace u těchto myeloidních buněk (Ghannam et al., 2004; Chung et al., 2006). U AML byl detekován také fúzní gen *NUP98-HOXD13*, který stejně jako *NUP98-HOXA9* spolupracuje na indukci a rozvoji leukemického klonu spolu s *MEIS1* (Calvo et al., 2002; Pineault et al., 2003). Mezi další *HOX* geny, které se u leukemických klonů vyskytují v translokaci spolu s *NUP98* a podílejí se na procesu leukemogeneze, patří geny *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXC11* a *HOXC13* (Pineault et al., 2004).

### 3 Cíle

Porovnání expresního profilu *HOX* genů a chromatinových modifikátorů na mRNA úrovni u granulocytárních a monocytárních vývojových stádií zdravé kostní dřeně a odpovídajících subtypů AML dle FAB klasifikace

Stanovení vlivu molekulárních aberací na expresi *HOX* genů u subtypů AML dle FAB klasifikace

Stanovení role fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$  v regulaci transkripce *HOX* genů a histon demethyláz *JMJD3* a *UTX*

Charakterizace role demethyláz histonů v regulaci exprese *HOX* genů u PML-RAR $\alpha$  pozitivních buněk pomocí studia histonových modifikací

Stanovení účinku JMJD3 inhibitoru na ATRA-řízenou diferenciaci a apoptózu/nekrózu PML-RAR $\alpha$  pozitivních buněk

## 4 Metody

### 4.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie se znaky APL (NB4, NB4-LR2, NB4-MR2) byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s 10% fetálním bovinním sérem (BioSera) a 1% penicilinem, streptomycinem a amphotericinem B (Gibco). Všechny buněčné linie byly testovány na přítomnost mykoplazmy a pouze mykoplasma-negativní linie byly použity pro experimentální část.

APL buněčné linie byly kultivovány v médiu o různých koncentracích diferenciačního činidla ATRA (Sigma Aldrich) a specifického inhibitoru GSK-J4 (Ethyl 3-((6-(4,5-dihydro-1H-benzo[d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate, Sigma Aldrich). Obě chemikálie byly rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxidmethan, Sigma Aldrich). Kontrolní vzorky byly inkubovány s adekvátním množstvím DMSO.

### 4.2 Sortování vzorků kostní dřeně zdravých dárců a pacientů s AML

Subpopulace zdravé kostní dřeně reprezentující různá vývojová stadia hematopoézy byly sortovány ze vzorků zdravých dárců nebo leukemických pacientů s negativní hladinou minimální reziduální nemoci po dlouhodobé kompletní remisi. Vzorky byly sortovány na přístroji FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Aria (BD, San Jose, CA, USA) podle znaků myeloidní diferenciace. Sortované subpopulace dle myeloidních diferenciačních stádií byly smíchány z pěti různých kontrolních vzorků a následně zpracovány izolací RNA.

Pro studii bylo použito 46 diagnostických vzorků kostní dřeně pacientů s AML, kteří byli diagnostikováni a léčeni na Klinice dětské hematologie a onkologie ve FN Motol mezi roky 1998 a 2010. Z těchto vzorků těchto pacientů byly izolovány mononukleární buňky pomocí gradientové centrifugace (Ficoll-Plaque Plus, GE Healthcare Life Sciences) a následně uskladněny v -80 °C. Pro další analýzu byla využita data z kohorty AML pacientů z ErasmusMC-Sophia Childrens Hospital, Rotterdam (NL).

### 4.3 Kvantitativní real-time PCR

Ze vzorků pacientů a zároveň také ze zdravých sortovaných kostních dření byla izolována RNA pomocí RNeasy Mini Kitu (Qiagen). V případě buněčných linií byla RNA izolována stejným kitem, avšak až ze vzorků po osmi hodinové inkubaci (ATRA -1 $\mu$ M, GSK-

J4 – 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, PMA – 20 nM, 200nM). Následně byl proveden přepis RNA do cDNA pomocí iScript kitu (Bio-Rad).

Kvantifikace genové exprese byla stanovena za použití Sybr Green master Mix (Bio-Rad) na přístroji iCycler iQ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pro detekci exprese *HOXB* genů byla kvůli velmi nízké expresi u buněčných linií využita možnost genové preamplifikace připravené cDNA pomocí Taq man PreAmp Master Mix Kit (Thermo Fisher Scientific). Navrhování použitých primerů a PCR reakčních podmínek pro geny *HOXA1*, *A3*, *A4*, *A5*, *A6*, *A7*, *A9*, *A10*, *A11*, *A13* a *HOXB1*, *B2*, *B4*, *B5*, *B6*, *B7*, *B8* a *B9*, *EZH2*, *BM11*, *MLL*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *JMJD3*, *UTX*, a *LSDI* bylo provedeno dle citovaných publikací (Das et al., 2012; Drabkin et al., 2002; Jin et al., 2013; Liu et al., 2012; Starkova et al., 2010; Yang and Fang, 2012). Exprese výše uvedených genů byla normalizována k hladině exprese genu *ABL* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), která se během vývoje myeloidních buněk nemění.

#### 4.5 Analýza mutací

U 12 pacientů, u nichž nebyla detekována žádná běžná přestavba spojená s diagnózou AML, byla následně vyšetřována přítomnost mutací v genech *NPML*, *NRAS* (N RASA1 p21 protein activator), *KRAS* (K RASA1 p21 protein activator), *CEBP $\alpha$*  (CCAAT-enhancer binding protein alpha), *c-Kit* a *FLT3*. Detekce mutací probíhala na úrovni DNA (izolace pomocí DNA Mini Kit (Qiagen)) pomocí kvalitativní PCR a následného sekvenování ampliconů pomocí specifických primerů dle citovaných publikací (Falini et al., 2005; Hollink et al., 2011; Pollard et al., 2010; Sano et al., 2012).

#### 4.6 Western blot

Z APL buněčných linií byla po osmihodinové inkubaci (ATRA -1 $\mu$ M, GSK-J4 – 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) izolována jaderná a cytoplazmatická frakce proteinů pomocí NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific). Histony, jako další jaderná proteinová frakce, byly izolovány metodou kyselého extrakce (viz Nature Protocols). Metodou western blot byly detekovány proteiny pomocí těchto protilátek: polyclonal rabbit anti-JMJD3 (3457, Cell Signaling Technology), anti-UTX (A302-374A, Bethyl), polyclonal rabbit anti-PML-RAR $\alpha$  (ab43152, Abcam), polyclonal rabbit anti-TBP (ab63766, Abcam), anti-trimethyl-histone H3 (Lys27)(07-449, Millipore), anti-methyl-histone H3 (Lys27) (07-452, Millipore), anti-dimethyl-histone H3 (Lys4) (07-030, Millipore), anti-trimethyl-histone



H3 (Lys4) (07-473, Millipore), anti-histone H3 (06-755, Millipore), anti-dimethyl-histone H3(Lys9) (07-441, Millipore), anti-acetyl-histone H3 (Lys27) (07-360, Millipore), anti-acetyl-histone H3 (Lys9) (07-352, Millipore), anti-acetyl-histone H3 (Lys14) (07-353, Millipore), a anti-acetyl-histone H4 (06-598, Millipore). Elektroforéza proteinů probíhala v komerčně připravených gelech (Bolt™, 4-12% Bis-Tris Plus, Invitrogen) a pufrech k tomu určených (MES/MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen) po dobu 90min na 90V. Elektropřenos z gelu na nitrocelulóзовou membránu probíhal za stabilních podmínek 75 V, 90 min. Blokování volné membrány probíhalo v blokovacím roztoku (5% mléko/BSA Tween (1%) + PBS 1×). Primární protilátky byly ředěny dle doporučení výrobce v blokovacím roztoku. Membrána byla v roztoku primární protilátky inkubována na míchačce ve 4 °C přes noc (cca 16 hod).

#### **4.6 Chromatinová imunoprecipitace s následnou kvantitativní real-time PCR**

APL buněčné linie byly po 8 hodinové inkubaci (ATRA -1uM, GSK-J4 – 1uM, 10uM) smíchány s 1 % (v/v) formaldehydem po dobu 1 minuty, aby došlo ke stabilizaci vazby mezi DNA a proteiny, a to vytvořením kovalentní vazby (tzv. cross-link). Poté byl na dobu 5 min k buňkám přidán glycin (0,125M). Po této inkubaci byly buňky lyzovány pomocí lyzačního pufru (1% (v/v) SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH~8)) a cross-linkovaný chromatin byl fragmentován sonikací (22 cyklů, 30 s intervaly) na sonikátoru Bioruptor 300 (Diagenode, Belgie). Fragmentovaný chromatin byl imunoprecipitován protilátkami navázanými na magnetických kuličkách (Dynabeads A a G v poměru 1:1, Invitrogen). K imunoprecipitaci byly využity protilátky: polyclonal rabbit anti-H3K27me3 (07-449, Millipore), polyclonal rabbit anti-H3K4me2 (07-030, Millipore) a rabbit anti gamma-globulin (011-000-002, Jackson ImmunoResearch) použitý jako negativní kontrola. Po 16 hodinách byl navázaný chromatin na magnetických kuličkách promyt RIPA pufrem (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.7 % (v/v) Na-deoxycholate, 1 % (v/v) NP-40, 0.5 M LiCl) a TE buffer (pH 7.6) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). K odvázní chromatinu z protilátek navázaných na kuličkách bylo dosaženo inkubací s finálním pufrem (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1 % SDS) nejprve po dobu 5 min v pokojové teplotě a následně 6 hodin při 65 °C. DNA byla z chromatinu přečištěna pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Naředěná DNA byla použita pro kvantitativní real-time PCR s PowerSYBR Green PCR Master Mix (4368 702, Life Technologies) na kvantifikaci množství kopií *HOX* genů (*HOXA1*, *A3*, *A5*, *A7*). Primery byly navrženy

k amplifikaci míst upstream od počátku transkripce. Finální data byla normalizována k inputu (celkový chromatin před imunoprecipitací) a k IgG negativní kontrole.

#### **4.7 Chromatinová imunoprecipitace s následným sekvenováním nové generace (ChIP-seq)**

APL buněčné linie byly po osmihodinové inkubaci (ATRA  $-1\mu\text{M}$ , GSK-J4  $-1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) zpracovány dle protokolu pro chromatinovou imunoprecipitaci (viz výše). Pro tento účel byla k imunoprecipitaci využita pouze protilátka polyclonal rabbit anti-H3K27me3 (07-449, Millipore). DNA knihovna vytvořená z přečištěné DNA po chromatinové precipitaci byla připravena pomocí NEBNext ChIP-Seq Library Prep Reagent Set for Illumina (E6200S, New England BioLabs) s primery Index Primers Set  $\frac{1}{2}$  E7335S/E7500S, New England BioLabs). Finální DNA knihovna byla sekvenována na sekvenátoru Illumina NextSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) metodou 70-base-pair single-read method.

#### **4.8 Analýza dat z metody ChIP-seq**

Sekvence získané NGS sekvenováním z jedné strany každého fragmentu z připravené DNA knihovny byly srovnány k referenční sekvenci lidského genomu hg19. Osekvenované fragmenty s kvalitou mapování na lidský referenční genom pod hodnotu 10 byly vyřazeny z finální analýzy dat. Analýza píků byla provedena nástrojem MACS2 s nastavením ‘-broad -nomodel -extsize 300-to-large’ na namapovaných datech, které byly během analýzy zmenšeny na 30 %, aby došlo ke snížení nespecifického pozadí v sekvenovaných vzorcích. Kontrola použitá při analýze píků byla vytvořena spojením dat z jednotlivých kontrolních vzorků (inputů), které byly zmenšeny na  $(100\% / \text{počet individuálních vzorků})\%$ . Píky detekované v obou replikátech inkubovaných vzorků, nalezené ve vzájemné vzdálenosti 2kbp, byly spojeny v tzv. společný pík. Výsledné píky byly přiřazeny k promotorovým oblastem jednotlivých genů ( $\pm 2\text{kbp}$  od počátku transkripce). Počty osekvenovaných fragmentů přiřazených k promotorovým oblastem ( $\pm 500\text{bp}$  od počátku místa transkripce) byly normalizovány k celkové velikosti knihovny.

#### 4.9 Morfologie buněk

Po osmačtyřicetihodinové inkubaci s diferenciacními činidly (ATRA – 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M; PMA – 20nM, 200nM) byly buňky fixovány pomocí cytopsinu na sklíčko. Takto připravené preparáty byly barveny pomocí May-Grunwald (MS500, Sigma Aldrich) and Giemsa (GS500, Sigma Aldrich). Změny v buněčné morfologii byly detekovány pomocí optického mikroskopu (zvětšení 50x).

#### 4.10 Průtoková cytometrie

Změny v diferenciaci po inkubaci s ATRA (48h, ATRA - 1 $\mu$ M) byly sledovány na základě exprese CD11b a CD65. Diferencované buňky byly inkubovány s protilátkami CD11b – APC (333 143, BD Biosciences) a CD65 (B36299, Beckman Coulter) po dobu 15 min v pokojové teplotě. Nenavázaná protilátka byla odmyta pomocí PBS. Procento mrtvých buněk bylo stanoveno po inkubaci dlouhé 24 a 48 hodin (ATRA – 1 $\mu$ M; GSK-J4 – 1, 2, 5 $\mu$ M) s protilátkou Annexin V-Dy647 (RC-ANXD-T100, Exbio) a propidium iodidem - PI (130-093-233, Miltenyi Biotec). Procento mrtvých buněk (Annexin V+, PI+) a míra diferenciacce byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS LSR II (BD Biosciences, USA).

#### 4.11 Bisulfitové sekvenování

Po inkubaci dlouhé 24, 48 a 72 hodin s ATRA (1 $\mu$ M) byla z buněčných linií izolována DNA pomocí DNA Mini Kit (Qiagen). Následně bylo 500 $\mu$ g DNA použito na bisulfitovou konverzi (cytosin (C)  $\rightarrow$  thymin (T)) pomocí EZ DNA Methylation-Gold Kit (D50005, Zymo Research). Konvertovaná DNA byla u genů *HOXA5* a *HOXA7* amplifikována s využitím PCR ze dvou různých míst v promotorové oblasti bohaté na cytosin a guanin (CG). PCR produkty byly zaklonovány do TOPO TA vektoru a transformovány do One Shot Top 10 chemicky kompetentních bakterií (K450001, Life Technologies). Z každého konstruktu bylo přeneseno 10 klonů s ampicilinovou rezistencí do tekutého LB média s ampicilinem (Luria Broth; Life Technologies). Po inkubaci dlouhé 16 hodin ve 37 °C byly z bakterií izolovány plazmidy pomocí Presto Mini Plazmid Kit (PDH300, KRD). Každý plazmid byl sekvenován metodou Sangerova sekvenování s využitím primerů M13, které nasedají do původního vektoru TOPO TA.

## 5 Výsledky

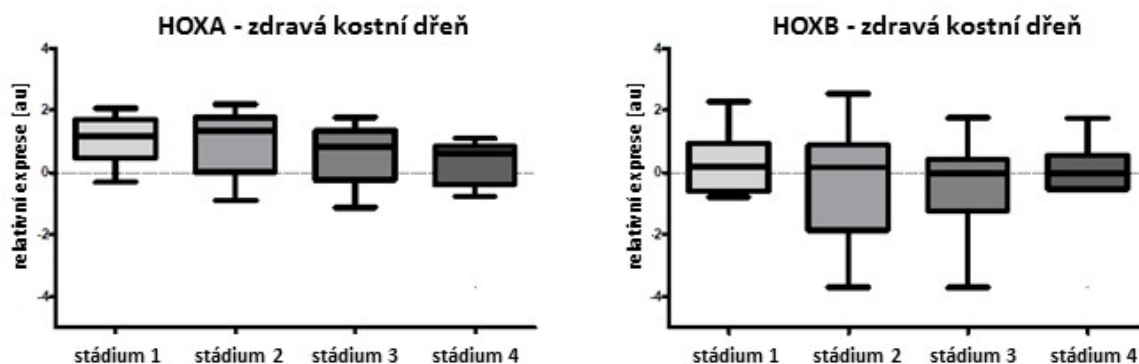
### 5.1 Expresní profil *HOX* genů v sortovaných subpopulacích zdravé kostní dřeně reprezentujících různá stádia myelopoézy

Sortováním buněk pomocí BD FACS Aria III bylo ze zdravé kostní dřeně získáno osm různých buněčných subpopulací (granulocytární – G1, G2, G3, G4; monocytární – M1, M2, M3, M4) odpovídajících různým stádiím myeloidní diferenciace. Sortování bylo provedeno na základě exprese molekul přítomných na povrchu buněk jednotlivých vývojových stádií myeloidní řady. Výběr povrchových molekul (viz Tab. 3) byl proveden na základě již dříve publikovaných dat (Kussick and Wood, 2003a, b; van Lochem et al., 2004). V případě leukemických vzorků kostní dřeně byla pozorována exprese těchto povrchových antigenů u leukemických blastů, které odpovídají jednotlivým morfologickým/vývojovým stádiím hematopoetické řady zastaveným v různých stádiích maturace.

Zdravé sortované subpopulace myeloidní linie			Odpovídající subtypy AML
<b>Granulocytární vývojová stádia</b>			
G1	myeloidní progenitor	CD117+CD15-CD11b-	AML M1, AML M2
G2	promyelocyt	CD117+CD15+CD11b-	AML M3, AML M2
G3	promyelocyt-myelocyt	CD117-CD13++CD16-	
G4	myelocyt	CD117-CD13dimCD16-	
<b>Monocytární vývojová stádia</b>			
M1	myeloblast	CD34+Ssc++HLA-DR+CD33-	AML M1-M0 AML M2
M2	myelo/monoblast	CD34+Ssc++HLA-DR+CD33+	
M3	promonocyt	CD34-FSc/SSc~monocytům CD33+CD14-	AML M4 – AML M5a
M4	monocyt	CD34-FSc/SSc~monocytům CD33+CD14+	AML M5b

Tab. 3.: Identifikace subpopulací zdravé kostní dřeně - hlavní charakteristiky vývojových stádií myeloidní diferenciace (povrchové znaky) a odpovídající morfologické subtypy AML

Pro stanovení dynamiky exprese *HOX* genů během hematopoézy byla spojena výsledná expresní data získaná kvantitativní PCR z paralelních stádií obou vývojových linií myeloidní řady (granulocytární = G a monocytární = M). Takto byla vytvořena čtyři stádia myeloidní diferenciace (stádium 1 = G1+M1, stádium 2 = G2+M2, stádium 3 = G2+M2, stádium 4 = G4+M4). U těchto stádií bylo pozorováno postupné snížení exprese *HOXA* a vybraných *HOXB* (*HOXB2* a *HOXB4*) genů v závislosti na stupni diferenciace (Obr. 2).



Obr. 2.: Hladina exprese *HOXA* a *HOXB* genů na mRNA úrovni u vývojových stádií myeloidní diferenciace zdravé kostní dřeně

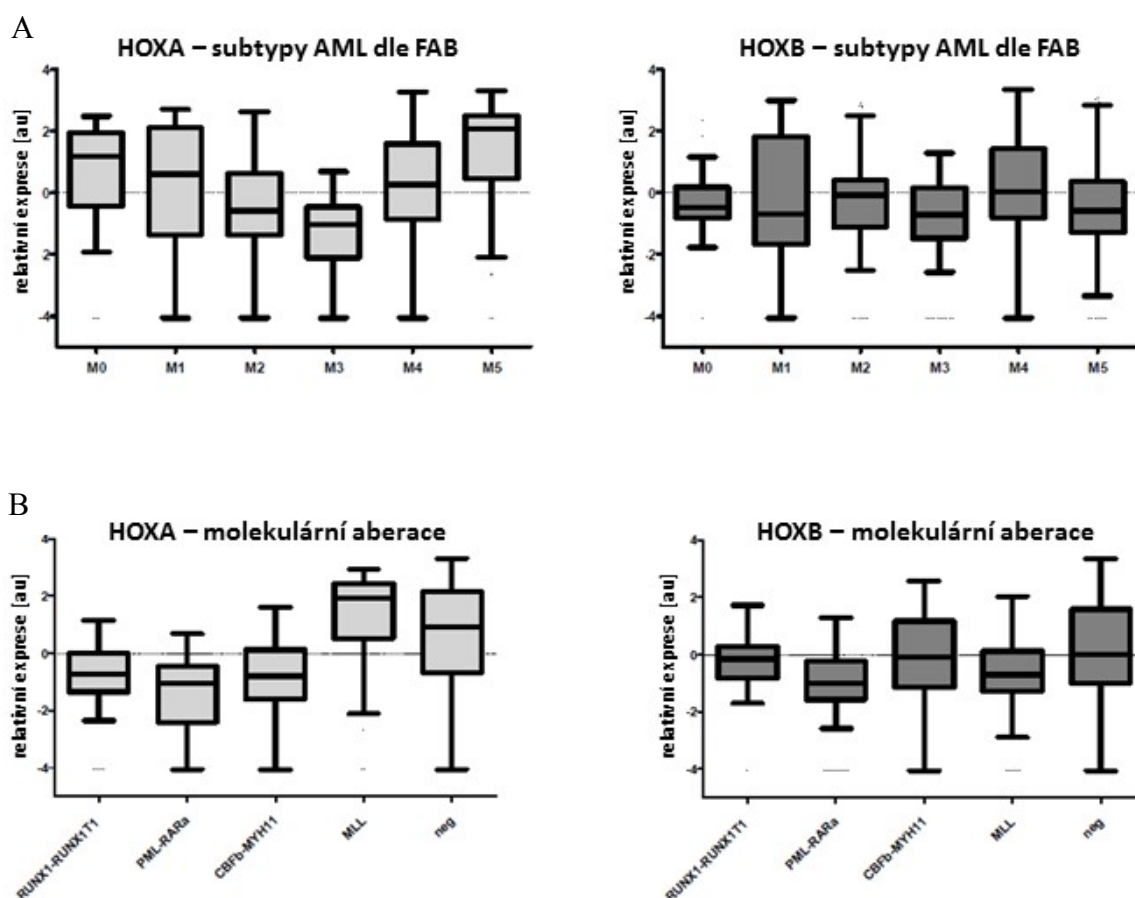
## 5.2 Expresní profil *HOX* genů u vzorků kostní dřeně dětských pacientů s AML

U dětských pacientů s AML byl detekován odlišný expresní profil *HOXA* a *HOXB* genů mezi různými morfologickými subtypy AML dle FAB klasifikace (Kruskal-Wallis test:  $p < 0.0001$  pro *HOXA*;  $p = 0.0016$  pro *HOXB*). Celkově nejnižší exprese *HOXA* a *HOXB* genů byla detekována u subtypu AML M3 ve srovnání s ostatními subtypy dle FAB. Naopak u subtypu AML M5 byla prokázána signifikantně nejvyšší exprese *HOX* genů z kladru *HOXA* (viz Obr. 3).

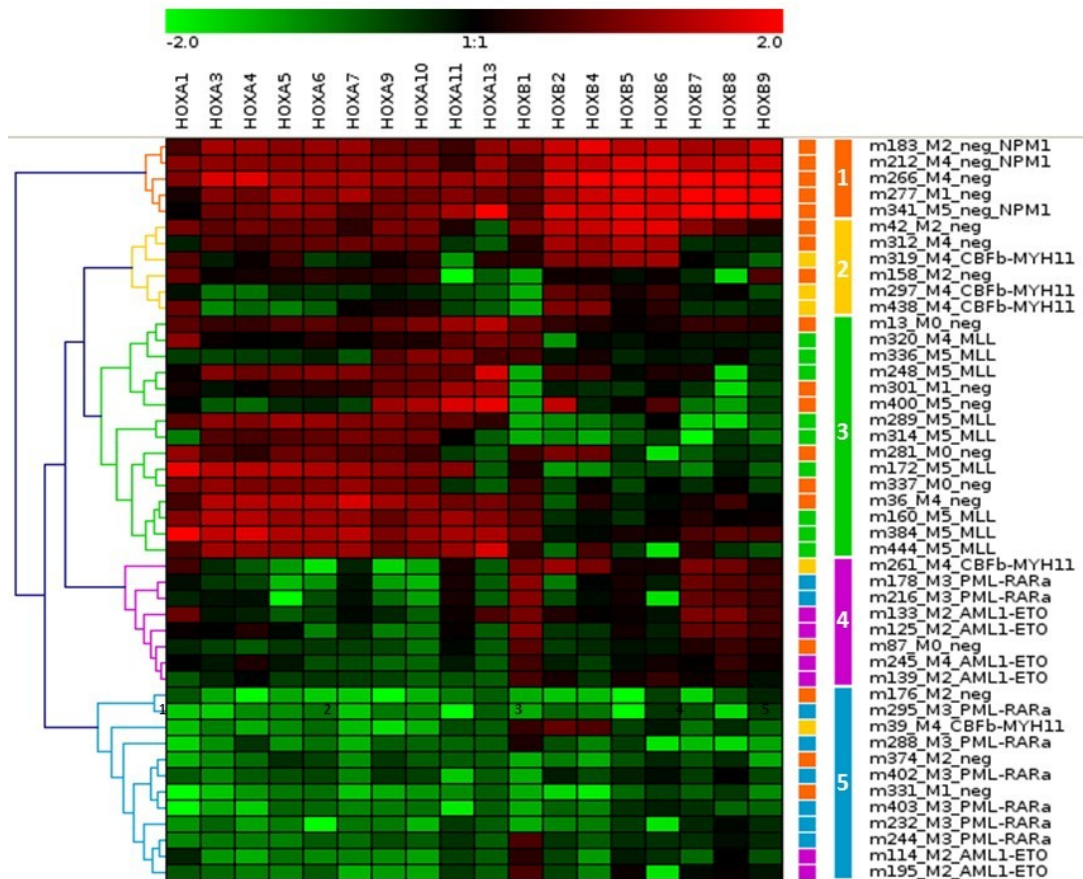
Signifikantní rozdíly byly pozorovány také mezi skupinami AML pacientů definovaných na základě molekulárních aberací (Kruskal-Wallis test:  $p < 0.0001$  pro *HOXA*;  $p = 0.0001$  pro *HOXB*). Pacienti s *PML-RAR $\alpha$*  fúzním genem vykazovali celkově nejnižší expresi *HOXA* a *HOXB* genů. Tato data odpovídají výše popsaným výsledkům u podskupin FAB, kde pacienti s *PML-RAR $\alpha$*  fúzním genem spadají právě do skupiny AML M3 s nízkou expresí *HOX* genů. Naopak u pacientů s přestavbou genu *MLL* (*KMT2A*), prevalentně řazených do subtypu AML M5, byla detekována nejvyšší exprese *HOXA* genů (viz Obr. 3).

Expresní profil *HOX* genů dle kvantitativní PCR na základě nesupervidovaného hierarchického klastrování rozdělil naši kohortu dětských AML pacientů do pěti klastrů charakterizovaných dle přítomnosti, nebo absence běžných aberací jako je *PML-RARα*, *RUNX1-RUNX1T1* (*AML1-ETO*), *CBFβ-MYH11* a přestavby genu *MLL* (viz Obr. 4). U tří pacientů z klastru 1 s celkově nejvyšší expresí *HOX* genů a bez běžných aberací byla prokázána mutace v genu *NMPI* (Nucleophosmin 1). Tato skutečnost odpovídá výsledkům již dříve publikovaným u dospělých pacientů s AML (Andreeff et al., 2008).

Dále byla detekována signifikantně zvýšená exprese vybraných *HOXA* u pacientů zařazených do vysokého rizika dle diagnostických markerů a odpovědi na léčbu (high risk - HR) ve srovnání s pacienty spadajícími do skupiny pacientů se standardním rizikem (standard risk - SR) ( $p < 0.0001$  pro *HOXA13*;  $p = 0.0004$  pro *HOXA1*). U exprese genů z klastru *HOXB* však nebyl pozorován rozdíl mezi rizikovými skupinami. Ze získaných dat zároveň nebyla prokázána asociace mezi expresí *HOX* genů a věkem dětských AML pacientů.



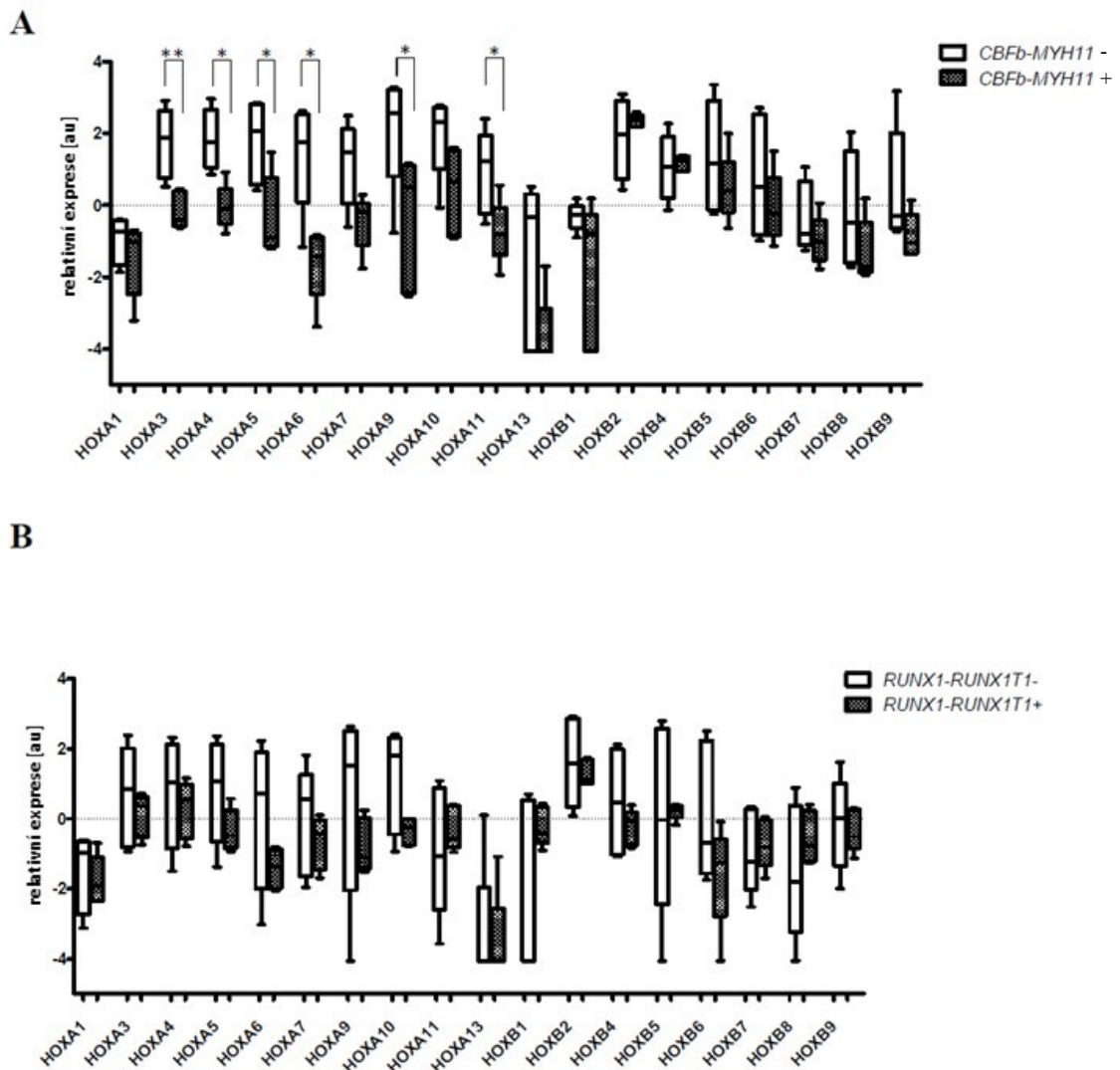
Obr. 3.: Hladina exprese *HOXA* a *HOXB* genů na mRNA úrovni  
A: u AML pacientů rozdělených dle FAB klasifikace, B: u AML pacientů s typickými molekulárními aberacemi



Obr.4 : Hladina exprese *HOXA* a *HOXB* genů na úrovni mRNA rozdělující kohortu AML pacientů na základě metody nesupervidovaného hierarchického klastrování do 5 klastrů charakterizovaných majoritní přítomností typických molekulárních aberací (klastr 1 – AML pacienti s převahou mutace v genu *NPM1*, klastr 2 – AML pacienti s převahou fúzního genu *CBFβ-MYH11*, klastr 3 – AML pacienti s převahou přestavby v genu *MLL*, klastr 4 – AML pacienti s převahou fúzního genu *AML1-ETO*, klastr 5 - AML pacienti s převahou fúzního genu *PML-RARα*)

### 5.3 Vliv molekulárních aberací na expresi *HOX* genů u různých subtypů AML

V dalších analýzách jsme se zaměřili na rozdíly v expresi *HOX* genů na mRNA úrovni v rámci jednotlivých subtypů AML dle FAB klasifikace, pro které jsou typické konkrétní molekulární aberace. Tato strategie nám umožnila lépe sledovat vliv těchto typických molekulárních aberací na expresi *HOX* genů v rámci jednotlivých AML subtypů. Konkrétně pacienti s AML M4, u kterých byla prokázána inverzí způsobená fúzním genem *CBFβ-MYH11*, vykazovali signifikantně nižší expresi *HOX* genů ve srovnání s pacienty ze stejné skupiny bez této aberace. Podobná situace byla pozorována u skupiny AML M2, kde byla přítomnost fúzního genu *RUNX1-RUNX1T1* asociována s nižší expresí *HOX* genů, zatímco u pacientů bez této translokace byla exprese *HOX* genů vyšší (viz Obr. 5).



Obr. 5: Rozdílná hladina exprese *HOXA* a *HOXB* genů na mRNA úrovni, statistická signifikance ( $* \leq 0,05$ ,  $** \leq 0,001$ )

A: u *CBFβ-MYH11*<sup>+/-</sup> pacientů se subtypem AML M4  
(*HOXA7*, *HOXA10*, *HOXB9*:  $p=0,0697$ , *HOXA13*:  $p=0,0732$ )

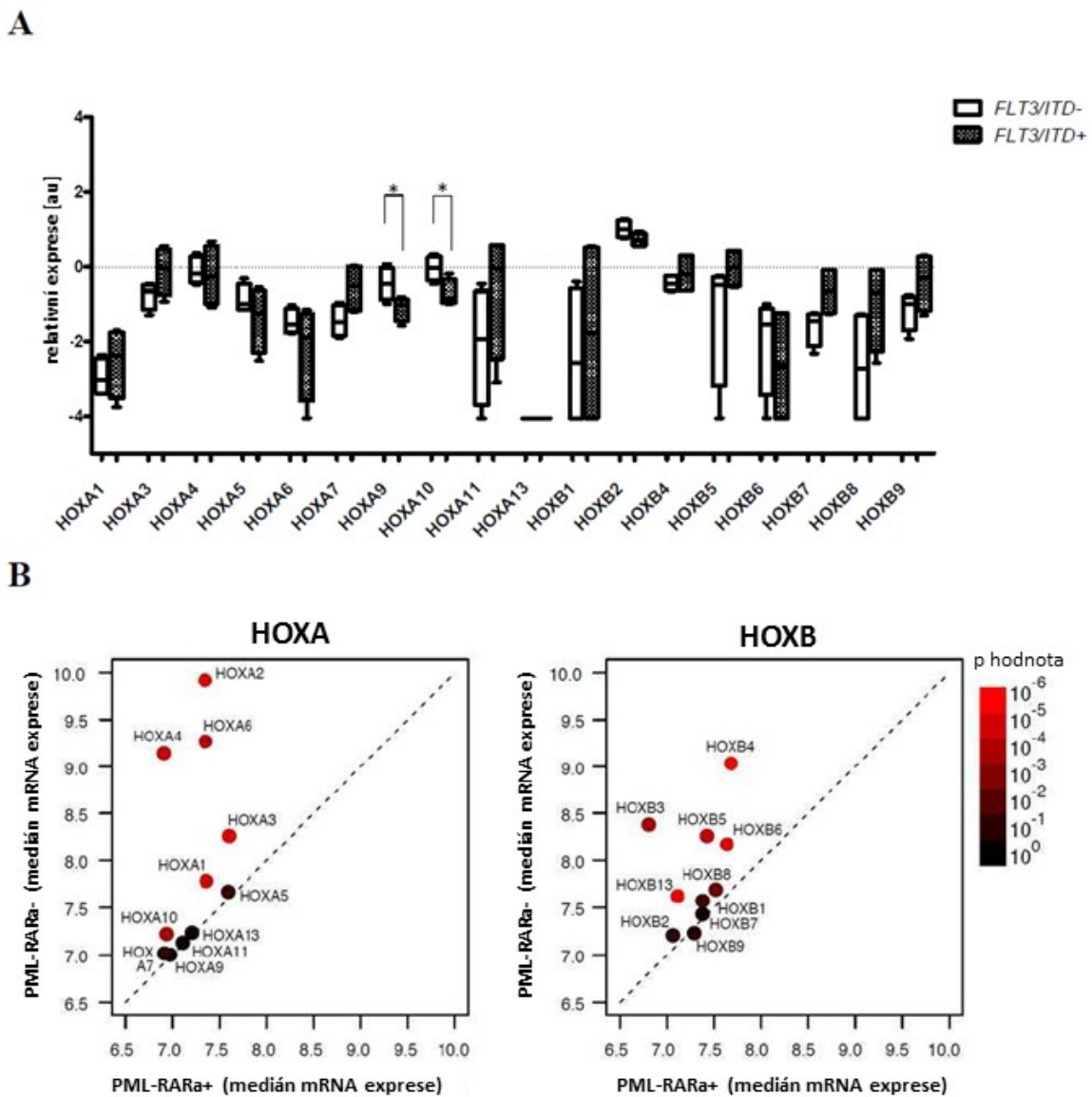
B: u *RUNX1-RUNX1T1*<sup>+/-</sup> pacientů se subtypem AML M2  
(*HOXA5*, *HOXA9*:  $p=0,1745$ , *HOXA10*:  $p=0,1172$ )

#### 5.4 Vliv přítomnosti mutace *FLT3/ITD* na expresi *HOX* genů u leukemických buněk s fúzním genem *PML-RARα*

U dospělých pacientů s AML bez typických translokací, byly mutace genu *NPM1* asociovány s vyšší expresí *HOX* genů a zároveň také se zvýšenou frekvencí mutací v genu *FLT3* (Roche et al., 2004). U naší kohorty dětských AML pacientů s *PML-RARα* fúzním genem nebyl pozorován charakteristický vliv přítomnosti *FLT3/ITD* mutace na expresi *HOX* genů (*FLT3/ITD*<sup>+</sup> (N=4), *FLT3/ITD*<sup>-</sup> (N=4)). Naopak u pacientů bez *PML-RARα* fúzního



genů byla prokázána asociace mezi *FLT3/ITD* mutací a zvýšenou expresí *HOX* genů (viz Obr. 6). Tato skutečnost byla potvrzena na nezávislé větší kohortě dětských AML pacientů (*PML-RARα+* (N=12), *PML-RARα-* (N=36)) (Hollink et al., 2011), kde byla u *PML-RARα+* pacientů s *FLT3/ITD* mutací detekována signifikantně nižší exprese *HOX* genů ve srovnání s pacienty bez tohoto fúzního genu (viz Obr.6).



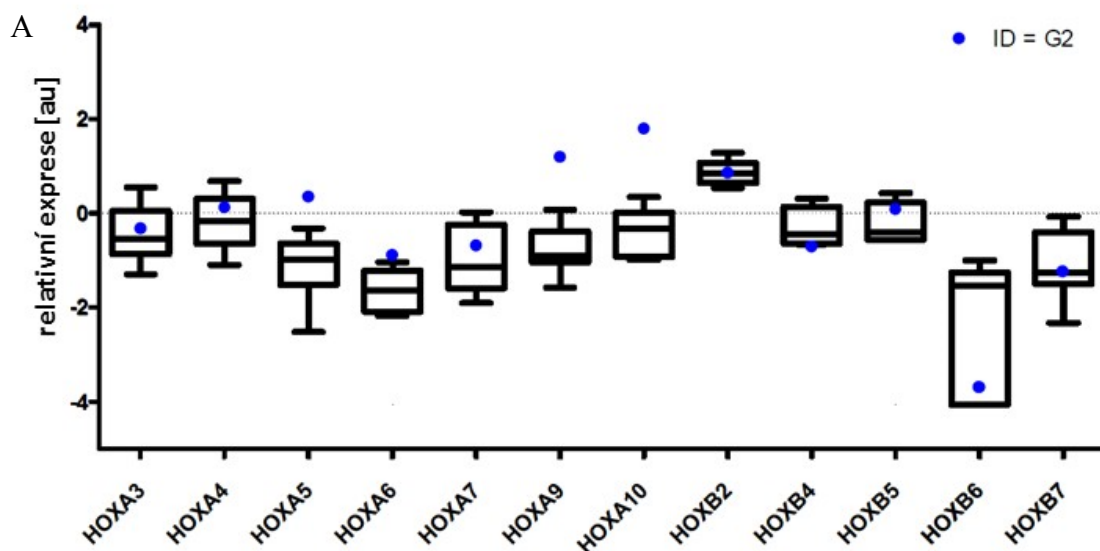
Obr. 6: Rozdílná hladina exprese *HOXA* a *HOXB* genů na mRNA úrovni u AML pacientů, statistická signifikance (\* $\leq 0,05$ , \*\* $\leq 0,001$ )

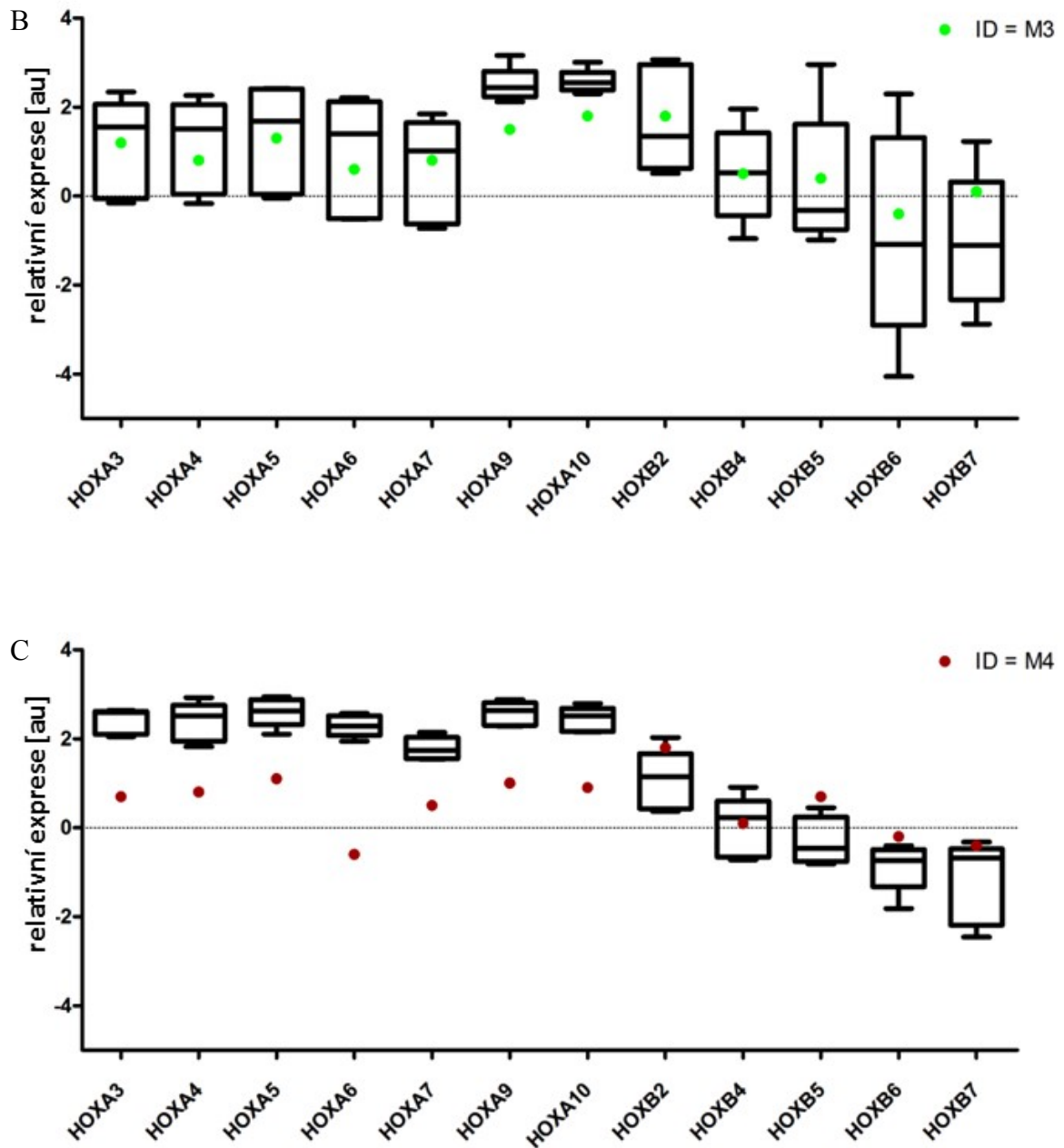
A: u *PML-RARα+* *FLT3/ITD* +/- pacientů (*HOXA7*:  $p=0,0833$ )

B: u *PML-RARα* +/- *FLT3/ITD* +, medián exprese (log<sub>2</sub>) je prezentován p hodnotami rozdílu mezi *PML-RARα+* a *PML-RARα-* pacienty

## 5.5 Srovnání expresního profilu *HOX* genů ve vývojových stádiích zdravé hematopoézy a maligních blastech

Na základě expresního profilu *HOX* genů dle kvantitativní PCR byly dále porovnány sortované subpopulace zdravé kostní dřeně a jejich leukemické protějšky odpovídajícího vývojového stádia myeloidní řady. Zajímalo nás, zda hladina exprese *HOX* genů u leukemických blastů jednotlivých subtypů AML dle FAB klasifikace nekorresponduje pouze s odpovídajícím diferenciačním stádiem, ve kterém byl leukemický blast v rámci procesu leukemogeneze zastaven. Rozdílná exprese některých *HOX* genů byla detekována u subtypu AML M3 ve srovnání s expresí *HOX* genů u zdravých promyelocytů (G2). Konkrétně se jednalo o geny *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA9*, *HOXA10* a *HOXB4* (viz Obr. 7a). Naopak expresní profil genů *HOXA3*, *HOXA4*, *HOXA7*, *HOXB2*, *HOXB5*, *HOXB6* a *HOXB7* u subtypu AML M3 odpovídal expresnímu profilu u zdravých promyelocytů (G2). Rozdíly v expresi *HOX* genů (*HOXA3*, *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXB5* a *HOXB6*) byly detekovány také mezi subtypy AML M5a a M5b a jejich sortovanými protějšky zdravé kostní dřeně – M3 a M4 (viz Obr. 7b a 7c).





Obr.7: Rozdílná hladina exprese *HOXA* a *HOXB* genů na mRNA úrovni u vývojových stádií normální myelopoézy a odpovídajících diferenačních stádií leukemických blastů  
 Expres *HOX* genů u vzorků pacientů je zobrazena box ploty  
 Expres *HOX* genů zdravých sortovaných subpopulací je zobrazena tečkami  
 A: u AML M3 a sortované subpopulace zdravé kostní dřeně (ID = G2)  
 B: u AML M5a a sortované subpopulace zdravé kostní dřeně (ID = M3)  
 C: u AML M5b a sortované subpopulace zdravé kostní dřeně (ID = M4)

## 5.6 Expresní profil modifikátorů chromatinu a jejich role v regulaci exprese *HOX* genů

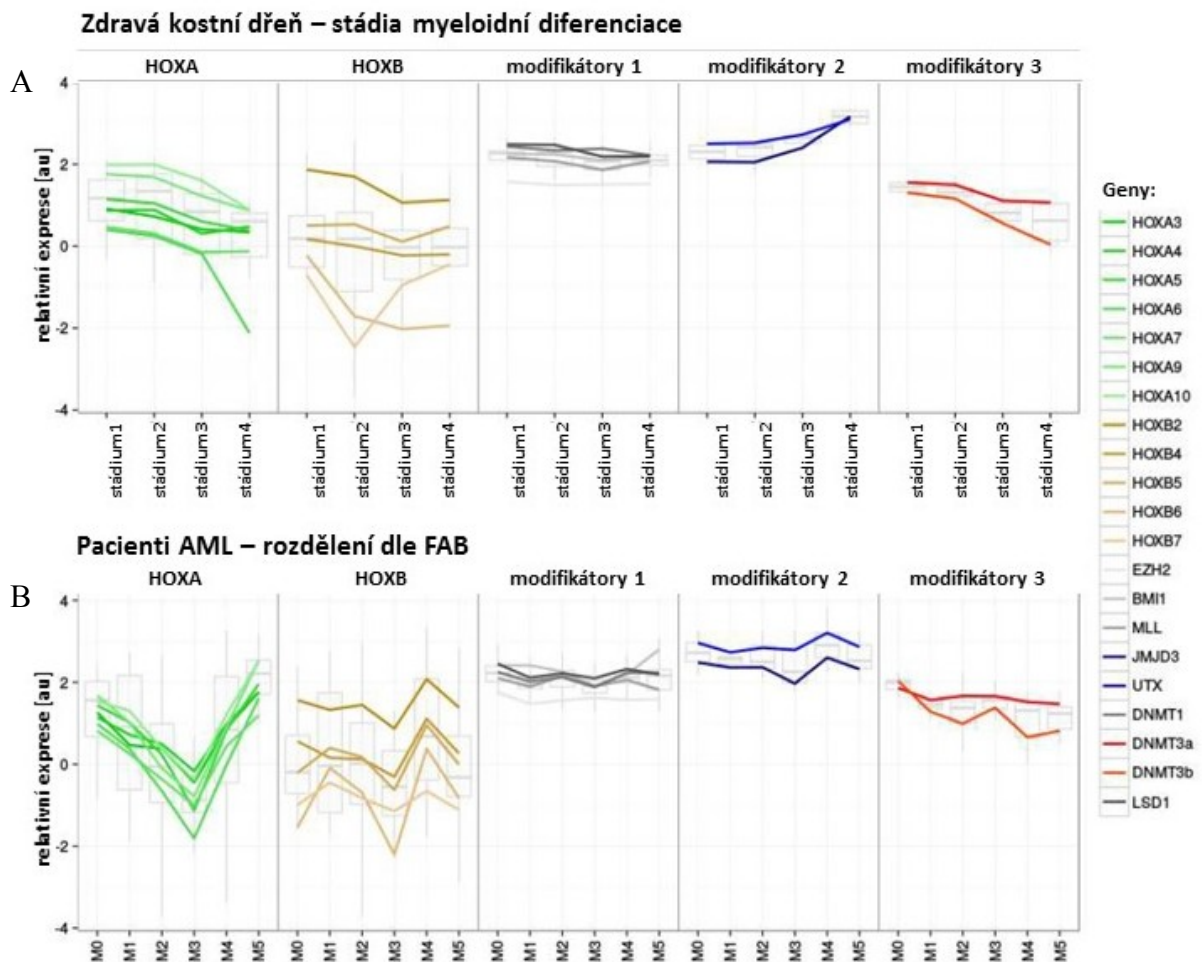
U zdravých subpopulací kostní dřeně jsme se zaměřili také na analýzu exprese modifikátorů chromatinu, u kterých byl již dříve prokázán vliv na regulaci exprese *HOXA* a *HOXB* genů během embryogeneze (Agger et al., 2007; Boyer et al., 2006; Montavon and Soshnikova, 2014). Na základě expresního profilu sortovaných subpopulací zdravé kostní dřeně byly modifikátory chromatinu rozděleny do tří skupin. Do skupiny modifikátorů č. 1 byly zařazeny geny, jejichž exprese se během diferenciací hematopoetických buněk nezměnila (*EZH2*, *BMII*, *MLL*, *LSD1* a *DNMT1*). Skupina modifikátorů č. 2 zahrnovala geny se zvyšující se expresí během hematopoézy (*JMJD3* a *UTX*). Skupina modifikátorů č. 3 (*DNMT3a* a *DNMT3b*) obsahovala geny, jejichž exprese se během diferenciací postupně snižovala, a tudíž inverzně korelovala s expresí modifikátorů č. 2 (viz Obr. 8).

U leukemických buněk byla exprese genů ze skupiny modifikátorů č. 1 podobná pro všechny subtypy AML jako protějšky zdravých sortovaných subpopulací kostní dřeně. Výjimku tvořil gen *BMII*, u kterého byla pozorována rozdílná hladina exprese v rámci jednotlivých subtypů AML (nejvyšší exprese byla detekována u AML M5). Expresí genů ze skupin modifikátorů č. 2 a č. 3 se výrazně lišila mezi jednotlivými subtypy AML. U diferenciací stádií normální hematopoézy nekorelovala hladina exprese modifikátorů č. 2 a č. 3 s hladinou exprese *HOXA* a *HOXB* genů (viz Obr. 9, 10). U jednotlivých subtypů AML korelovala exprese *HOXB* pozitivně s expresí modifikátorů ze skupiny č. 2 (*JMJD3* a *UTX* = H3K27 histondemethylázy,  $R=0,874$ ). S expresí modifikátorů skupiny č. 2 hůře korelovala exprese *HOXA* genů ( $R=0,506$ ) ve všech případech, s výjimkou AML M3. V případě modifikátorů ze skupiny č. 3 (*DNMT3a* a *DNMT3b*) byla pozorována částečná negativní korelace s expresí *HOXB* ( $R=-0,442$ ). Výrazná inverzní korelace mezi modifikátory chromatinu č. 2 a č. 3, srovnatelná s negativní korelací těchto dvou skupin u zdravých subpopulací zdravé kostní dřeně, byla detekována pouze u subtypů AML M3 a M4 (viz Obr. 8, 9).

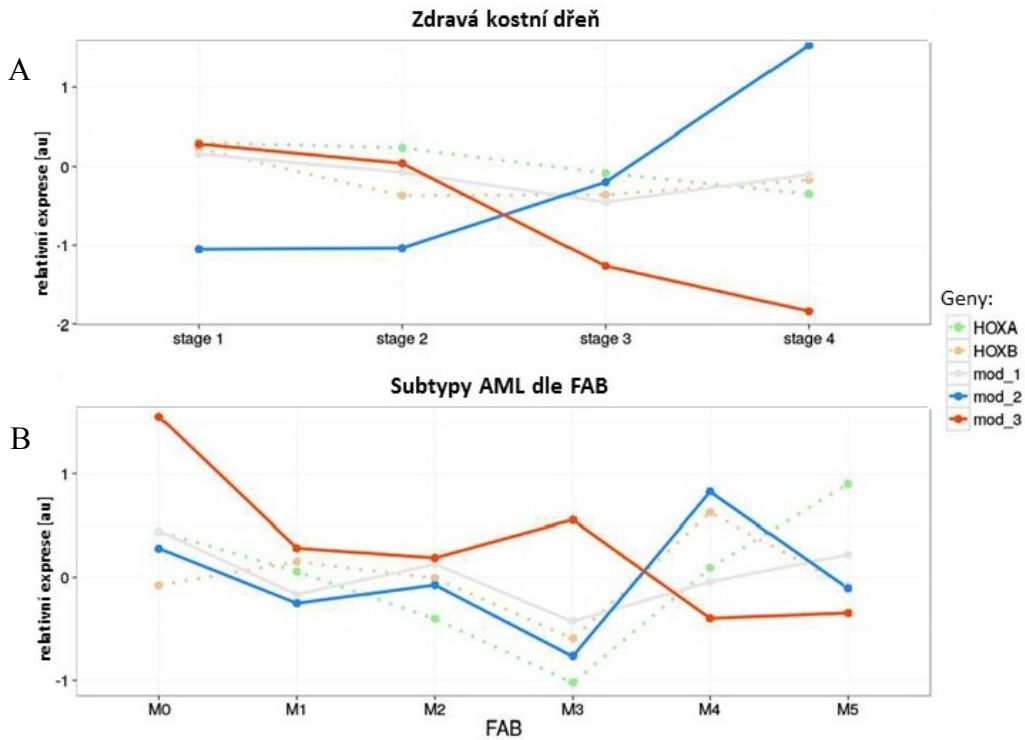
Mezi další výrazné korelace v rámci leukemických vzorků u jednotlivých genů patřila specifická pozitivní korelace exprese genů *HOXB4* a *HOXB6* s expresí demethylázy *JMJD3* ( $p=0,0012$ ). Naopak exprese genu *JMJD3* negativně korelovala s expresí *DNMT3b* (viz Obr. 8B).

Abychom zjistili, jak jsou asociovány modifikátory chromatinu s transkripční regulací *HOXA* a *HOXB* genů u AML pacientů s jednotlivými molekulárními aberacemi, porovnali jsme u těchto pacientů expresi *HOX* genů s expresí histon demethyláz (*JMJD3*, *UTX* = skupina modifikátorů č. 2) a expresí *de novo* DNA methyltransferáz (*DNMT3a*, *DNMT3b* =

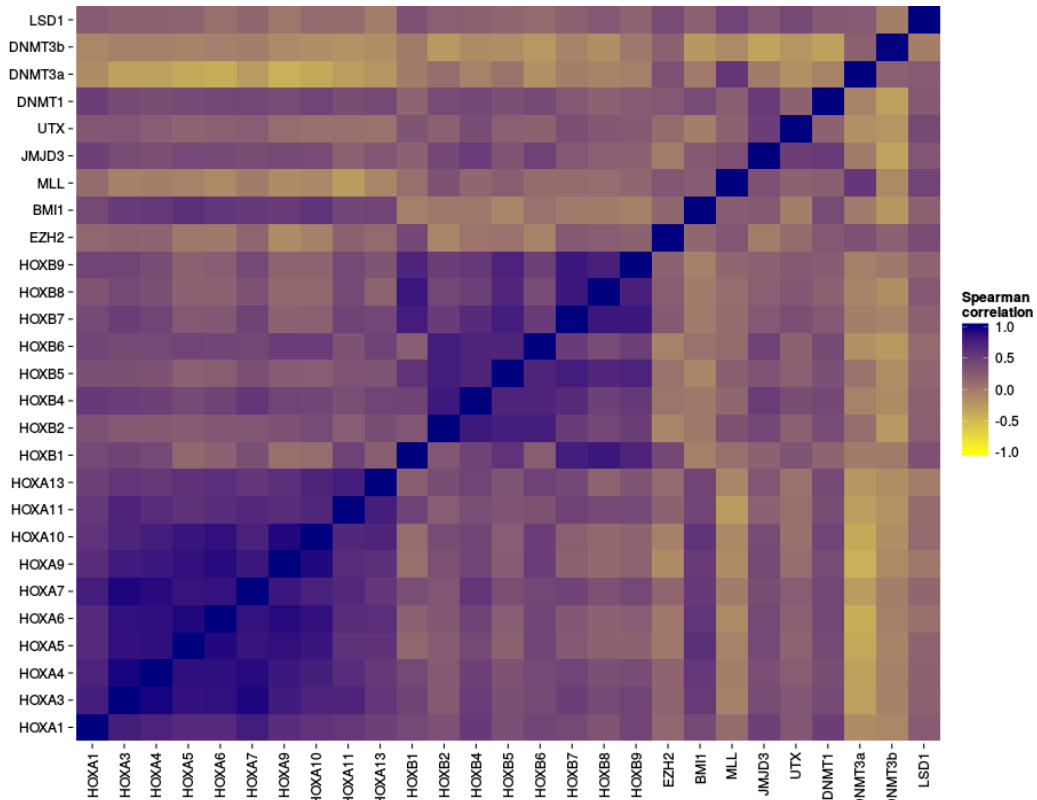
skupina modifikátorů č. 3). Expresní profil těchto genů byl zobrazen v jednotlivých grafech dle přítomnosti/absence specifické genetické aberace AML pacientů (viz Obr. 11). Nejzajímavější skupinou AML pacientů se pro nás po této analýze stala skupina pacientů s *PML-RARα* fúzním genem, která vykazovala celkově nejnižší expresi *HOXA* a *HOXB* a zároveň také celkově nejnižší expresi histondemethyláz *JMJD3* a *UTX*. U této skupiny pacientů byla současně detekována výrazně vyšší exprese *de novo* DNA methyláz *DNMT3a* a *DNMT3b*. Uvedené skutečnosti poukazyvaly na možný funkční vztah demethyláz histonů, *de novo* DNA methyltransferáz a *HOX* genů u AML pacientů s *PML-RARα* fúzním genem.



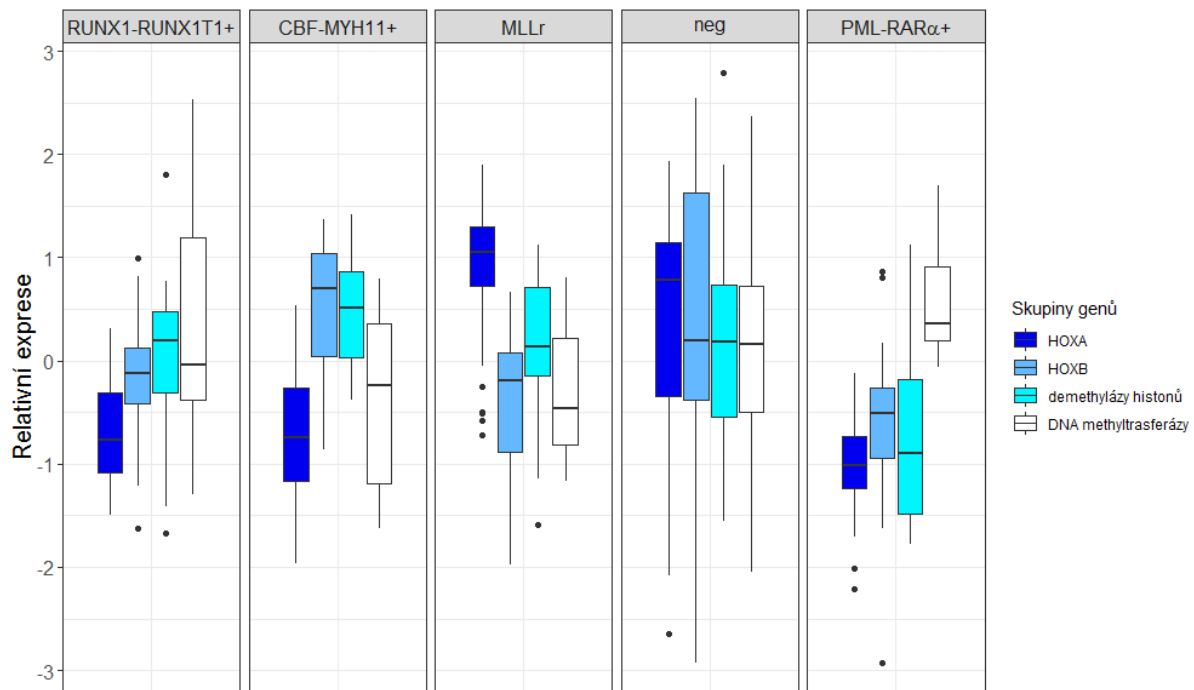
Obr. 8: Hladina exprese *HOXA*, *HOXB* genů a skupin chromatinových modifikátorů na mRNA úrovni  
A: u sortovaných subpopulací zdravé kostní dřeně  
B: u subtypů AML dle FAB klasifikace



Obr. 9: Vztah mezi expresí *HOXA*, *HOXB* genů a chromatinových modifikátorů  
 A: u sortovaných subpopulací zdravé kostní dřeně  
 B: u subtypů AML dle FAB klasifikace



Obr. 10: Korelace mezi expresí jednotlivých *HOXA* a *HOXB* genů a chromatinových modifikátorů u subpopulací zdravé kostní dřeně



Obr. 11: Expresa *HOXA*, *HOXB* genů, histon demethyláz (*JMJD3*, *UTX*) a DNA *de novo* methyltrasferáz (*DNMT3a*, *DNMT3b*) u AML pacientů rozdělených do skupin dle přítomnosti/absence typických molekulárních aberací

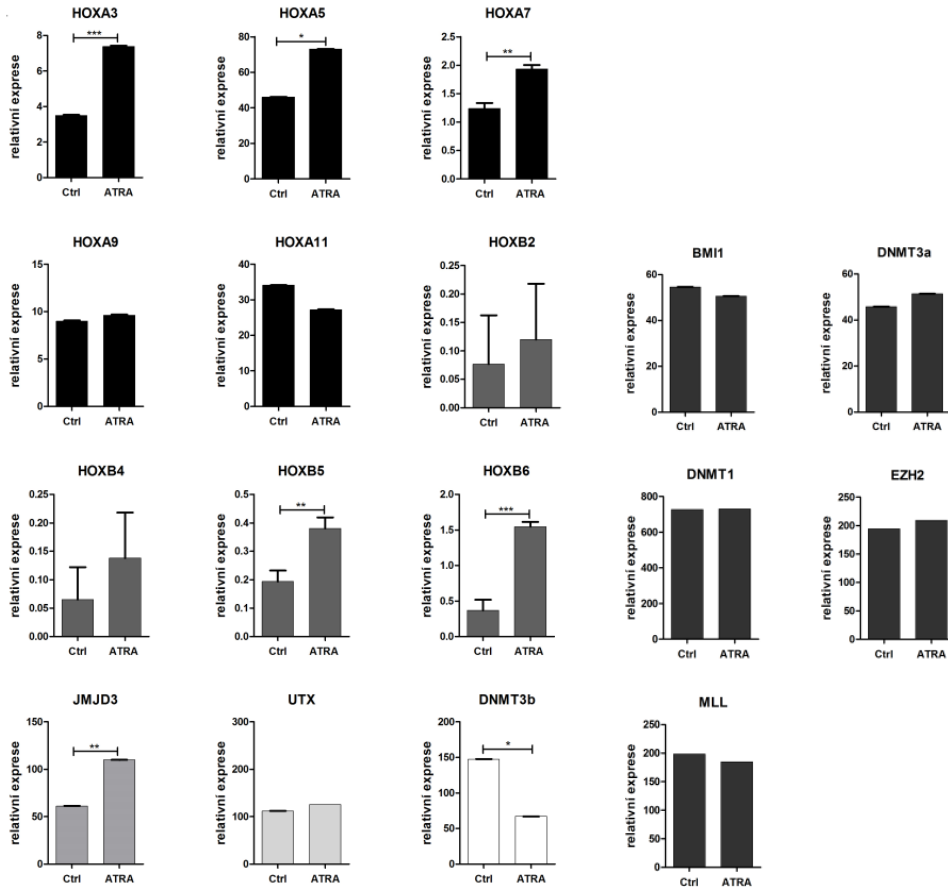
### 5.7 Význam PML-RAR $\alpha$ v regulaci exprese *HOX* genů a genů pro histon demethylázy

Abychom lépe prozkoumali vztah mezi PML-RAR $\alpha$  fúzním proteinem, expresí *HOX* genů a vybraných chromatinových modifikátorů, provedli jsme řadu experimentů na modelové buněčné linii NB4 s PML-RAR $\alpha$  fúzním genem představující leukemické promyelocytární blasty. Nejprve jsme buněčnou linii NB4 inkubovali s ATRA, o které je známo, že uvolňuje diferenační blok způsobený PML-RAR $\alpha$  fúzním proteinem a zároveň způsobuje degradaci tohoto fúzního proteinu (Degos et al., 1995; Nervi et al., 1998). Po osmi hodinách inkubace NB4 linie s ATRA bylo detekováno signifikantní zvýšení exprese *HOX* genů (*HOXA1*, *A3*, *A4*, *A5*, *A6*, *A7*, *B5* a *B6*) a histon demethylázy *JMJD3*. Naopak exprese *de novo* DNA methyltrasferázy *DNMT3b* se po inkubaci s ATRA snížila. Zvýšení exprese *JMJD3* bylo potvrzeno jak na úrovni mRNA, tak i proteinu, zatímco hladina exprese demethylázy *UTX* zůstala po inkubaci s ATRA na obou úrovních beze změny (viz obr. 12 a 13). V souladu s dříve publikovanými daty jsme po dlouhodobé inkubaci s ATRA (48 hodin) nepozorovali zvýšení exprese *HOX* genů, zatímco hladina exprese demethylázy histonů *JMJD3* zůstala zvýšena po celou dobu inkubace (viz Obr. 17) (Thompson et al., 2003). U

dalších modifikátorů chromatinu, jako jsou *EZH2*, *MLL*, *BM11* nebo *DNMT3a*, jsme změny exprese po uvolnění diferenciačního bloku nepozorovali (viz Obr. 12, 19).

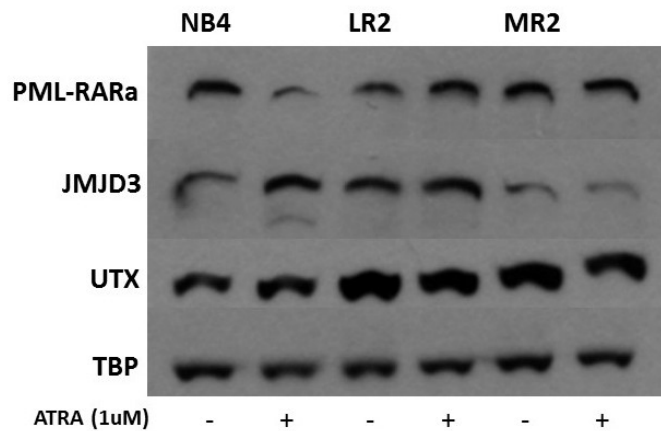
Abychom vyloučily nespecifický efekt ATRA, nezávislý na PML-RAR $\alpha$  degradaci, použili jsme ATRA-rezistentní klony NB4 buněčné linie (NB4-LR2, NB4-MR2). U těchto rezistentních klonů nedochází kvůli přítomnosti mutace v RAR $\alpha$  vazebné doméně pro retinovou kyselinu k ATRA řízenému uvolnění diferenciačního bloku. ATRA-rezistentní klony NB4-LR2 a NB4-MR2, představující ATRA-rezistentní PML-RAR $\alpha$  pozitivní pacienty, nevykazovaly po kultivaci s ATRA žádné změny exprese u výše zmíněných genů (viz Obr. 14). Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že ATRA působí specificky přes PML-RAR $\alpha$  fúzní protein. Abychom vyloučili, že se jedná jenom o obecný diferenciační ATRA, rozhodli jsme se inkubovat ATRA-senzitivní buněčnou linii NB4 a její ATRA-rezistentní klony NB4-LR2 a NB4-MR2 se všeobecným diferenciačním činidlem PMA (phorbol myristate acetate). PMA způsobilo morfologicky pozorovatelnou PML-RAR $\alpha$  nezávislou diferenciaci do monocytární linie u senzitivních i rezistentních klonů (viz Obr. 15). Oproti ATRA-řízené diferenciaci bylo po inkubaci s PMA detekováno snížení exprese *HOX* genů a zvýšení exprese *JMJD3*, které je typickým všeobecným znakem pro fyziologickou diferenciaci (viz Obr. 16). Změna exprese *HOX* genů po PMA, na rozdíl od ATRA řízené diferenciaci, navíc přetrvala i 48 hodin po přidání (viz Obr. 17).



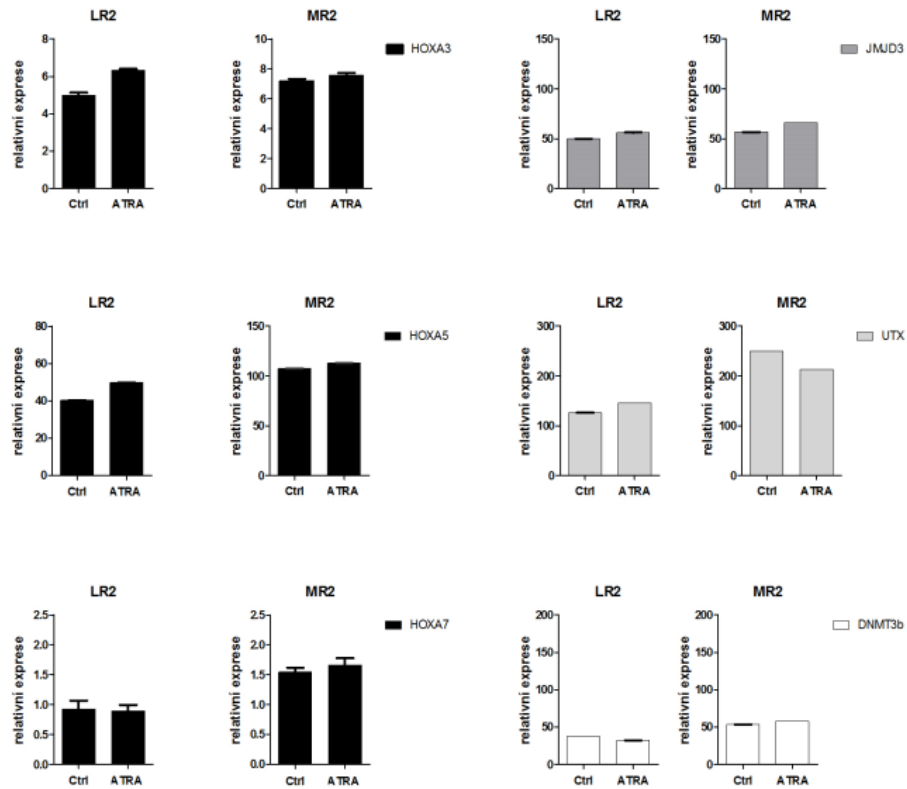


Obr. 12: Expresa *HOXA*, *HOXB* genů a chromatinových modifikátorů u ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie na mRNA úrovni po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M), graf byl vytvořen aritmetickým průměrem 3 biologických replikátů (každý ze 3 technických replikátů), statistická signifikance (\* $\leq$  0,05, \*\* $\leq$  0,001, \*\*\* $\leq$  0,0001)

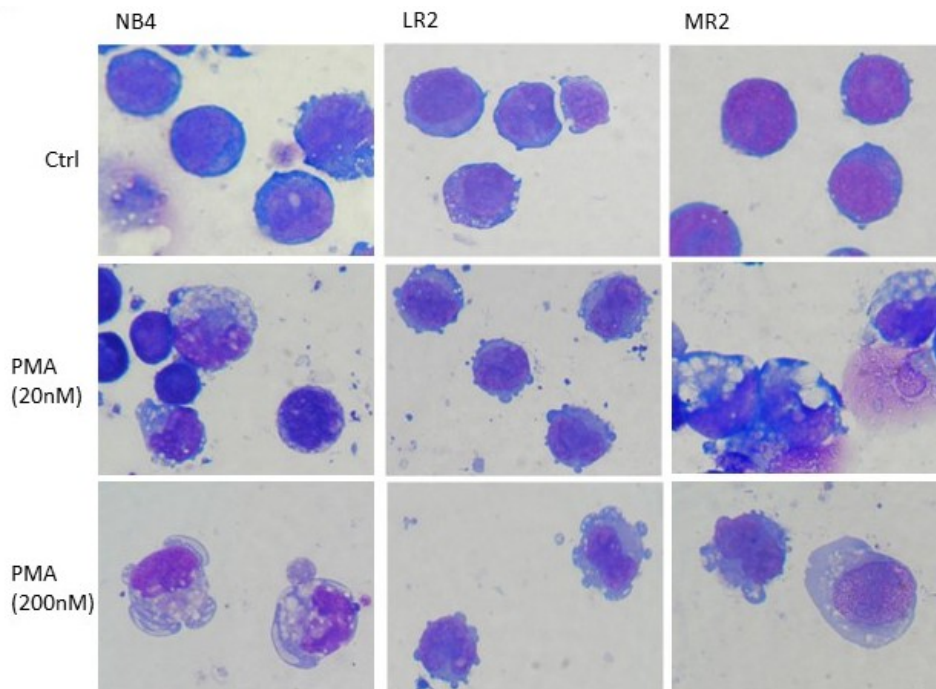
*HOXA3*: p=0,0005, *HOXA5*: p=0,0106, *HOXA7*: p=0,0028, *JMJD3*: p=0,006, *DNMT3b*: p=0,05



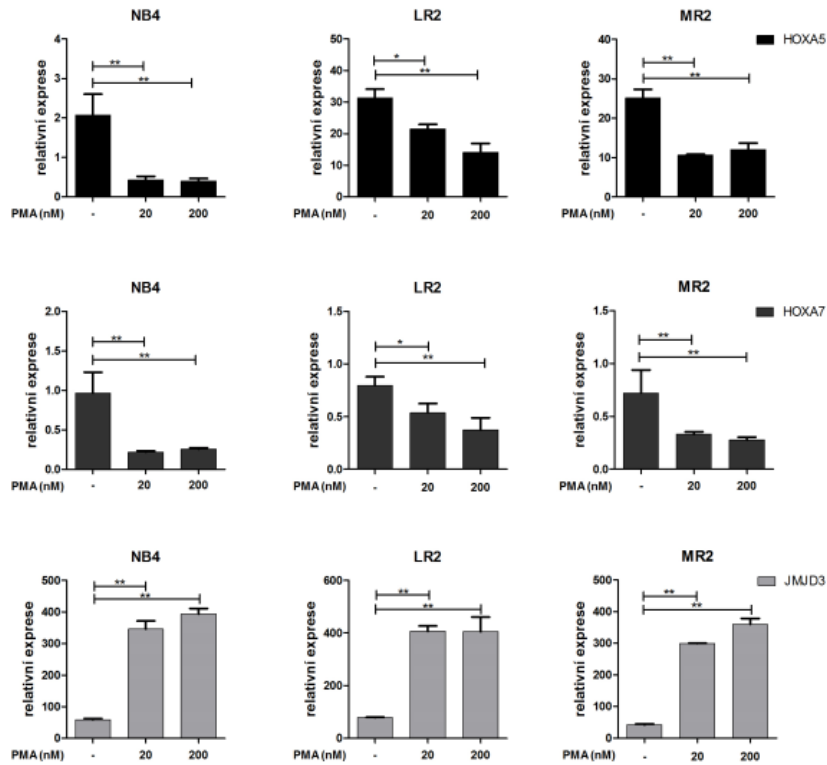
Obr 13.: Expresa PML-RAR $\alpha$ , JMJD3 a UTX u PML-RAR $\alpha$ + ATRA-senzitivní buněčné linie NB4 a ATRA-rezistentních klonů LR2 a MR2 na proteinové úrovni po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M), protein TBP (TATA binding protein) byl použit jako kontrolní protein jaderné proteinové frakce



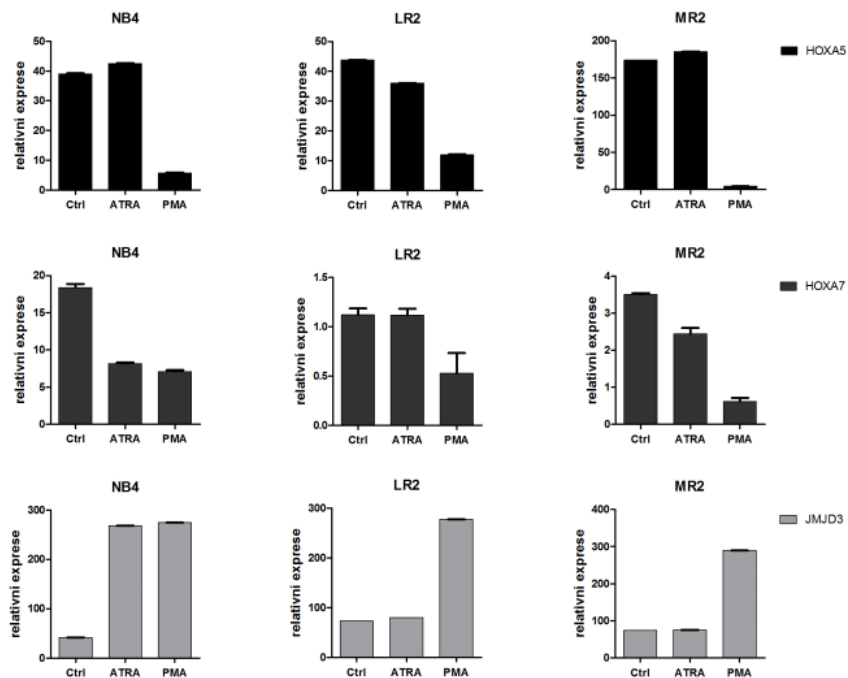
Obr. 14: Expresa vybraných *HOXA* genů a chromatinových modifikátorů u ATRA-rezistentních PML-RAR $\alpha$ + klonů LR2 a MR2 na mRNA úrovni po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M), graf byl vytvořen aritmetickým průměrem 2 biologických replikátů (každý ze 3 technických replikátů)



Obr.15 : Mikroskopické stanovení morfologie PML-RAR $\alpha$ + ATRA-senzitivní buněčné linie NB4 a ATRA-rezistentních klonů LR2 a MR2 barvením May-Grünwald, Giemsa-Romanowski po 48h inkubaci s PMA (20nM, 200nM)



Obr.16 : Expres vybraných *HOXA* genů a *JMJD3* u ATRA-rezistentních PML-RAR $\alpha$ + klonů LR2 a MR2 na mRNA úrovni po 48h inkubaci PMA (20nM, 200nM), graf byl vytvořen aritmetickým průměrem 2 biologických replikátů (každý ze 3 technických replikátů)



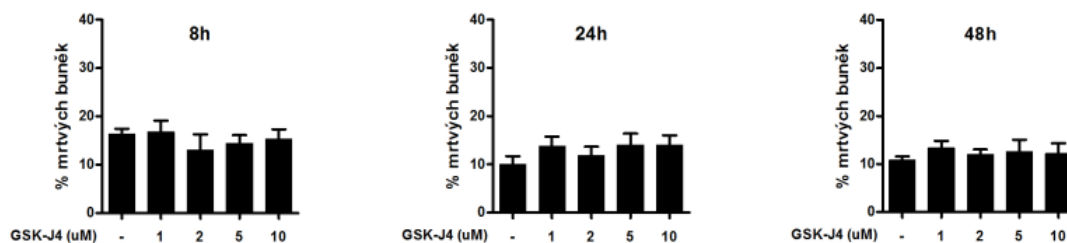
Obr.17: Expres vybraných *HOXA* genů a *JMJD3* u ATRA-rezistentních PML-RAR $\alpha$ + klonů LR2 a MR2 na mRNA úrovni po 48h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) nebo PMA (20nM), graf byl vytvořen aritmetickým průměrem 2 biologických replikátů (každý ze 3 technických replikátů)

## 5.8 Role JMJD3 v regulaci exprese *HOX* genů u PML-RAR $\alpha$ + buněk

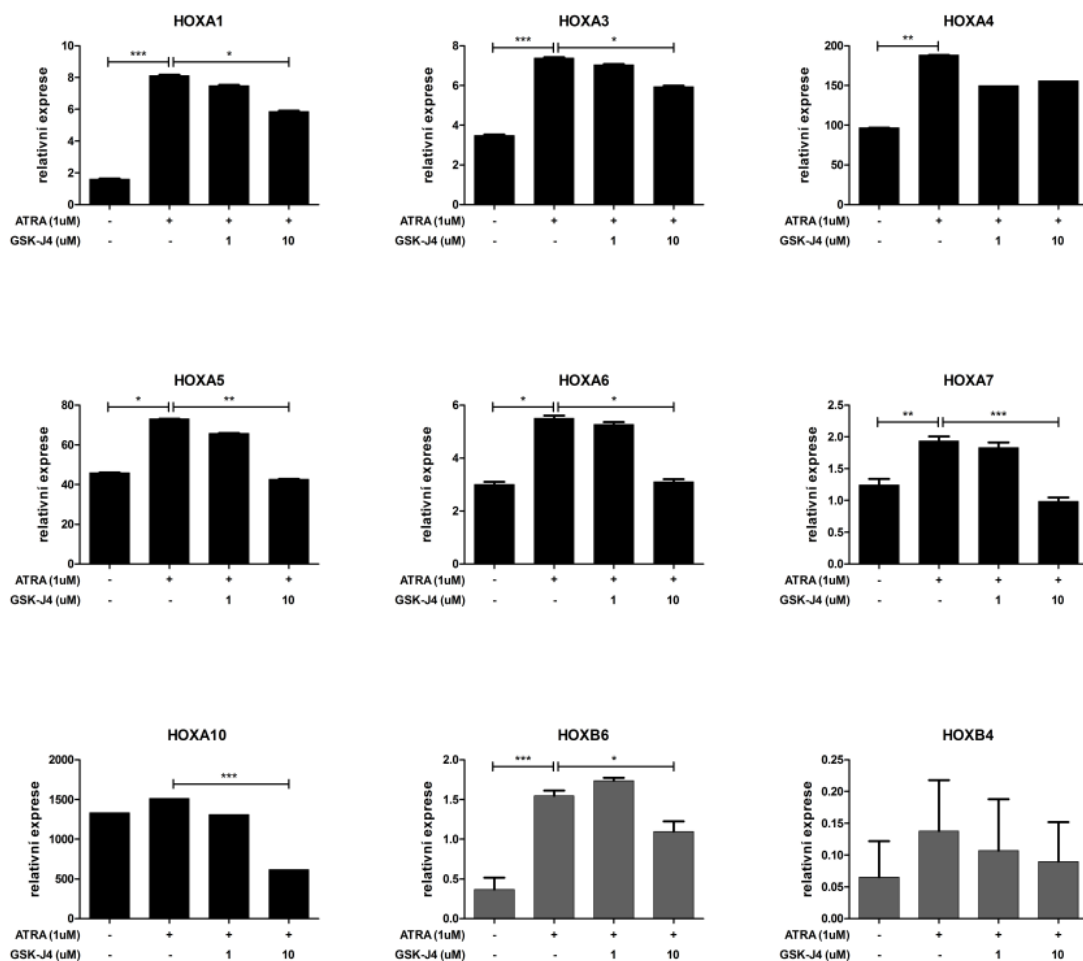
Abychom prozkoumali roli histondemethylázy JMJD3 v regulaci exprese *HOX* genů, použili jsme specifický inhibitor GSK-J4, který inhibuje enzymatickou aktivitu Jumonji demethyláz JMJD3 a UTX (Kruidenier et al., 2012). Konkrétně nás zajímalo, zda způsobuje demethylace represní histonové značky (H3K27me3) demethylázou JMJD3 zvýšení exprese *HOX* genů. Nejprve jsme pomocí metody průtokové cytometrie vybrali koncentrace GSK-J4, které neovlivňovaly viabilitu NB4 buněčné linie (viz Obr. 18).

Po osmihodinové inkubaci NB4 buněčné linie s ATRA a kombinací ATRA a specifického inhibitoru GSK-J4 jsme analyzovali expresi vybraných *HOX* genů, které byly nejvíce sníženy u PML-RAR $\alpha$  pozitivních pacientů, a to ve srovnání s ostatním geneticky charakterizovanými skupinami AML pacientů (viz výše). Signifikantně zvýšená exprese byla pozorována po inkubaci s ATRA u *HOX* genů (*HOXA1*,  $p=0,0003$ ; *HOXA3*,  $p=0,0013$ ; *HOXA4*,  $p=0,0054$ ; *HOXA5*,  $p=0,0118$ ; *HOXA6*,  $p=0,0101$ ; *HOXA7*,  $p=0,004$ ; *HOXB4*,  $p=0,0049$  a *HOXB6*,  $p<0,0001$ ). Stejný trend zvýšení exprese po uvolnění diferenciačního bloku ATRA byl pozorován také u genu *HOXA10*. Exprese genů *HOXA9*, *HOXA11*, *HOXB2* a *HOXB4* se po inkubaci s ATRA nezměnila (viz Obr. 19).

Efekt ATRA byl invertován pomocí společné inkubace s GSK-J4 specifickým inhibitorem JMJD3 a UTX. Nižší koncentrace GSK-J4 inhibitoru (1 $\mu$ M) způsobila snížení exprese *HOX* genů a vyšší koncentrace (10 $\mu$ M) vedla k výraznějším statisticky významným snížením u konkrétních *HOX* genů (*HOXA1*,  $p=0,0305$ ; *HOXA3*,  $p=0,0152$ , *HOXA4*,  $p=0,1118$ ; *HOXA5*,  $p=0,0092$ ; *HOXA6*,  $p=0,0315$ ; *HOXA7*,  $p=0,0017$ ; *HOXA10*,  $p=0,0003$ , *HOXB4*, nesignifikantní *HOXB6*,  $p=0,0029$ ) (viz Obr. 19).



Obr. 18: Stanovení procenta mrtvých buněk pomocí průtokové cytometrie (barvení kombinací propidium iodidu a annexinu V) u ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie po 8h, 24h a 48h inkubaci s GSK-J4 (1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M a 10 $\mu$ M)

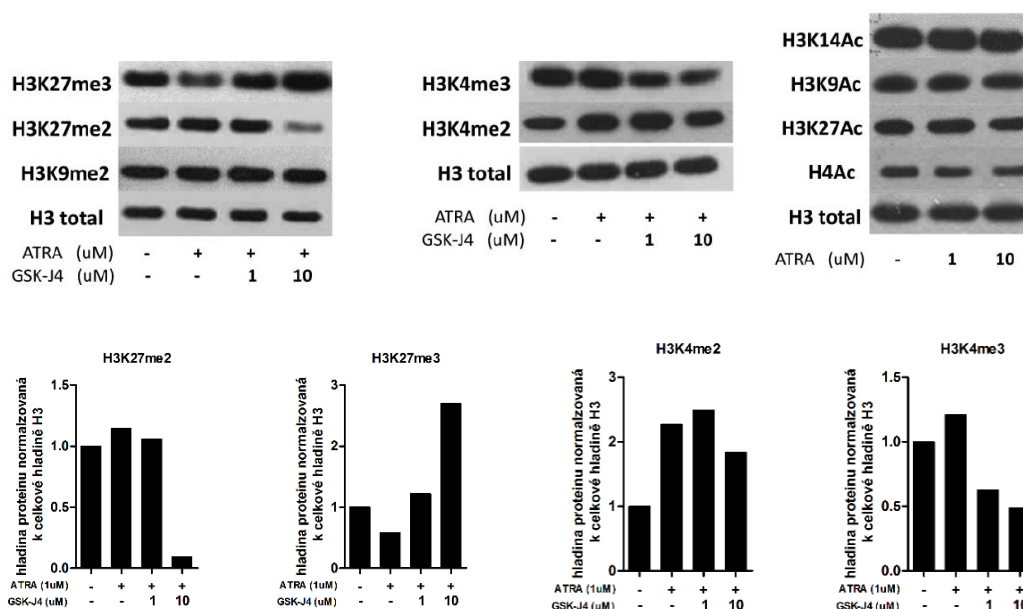


Obr. 19: Expresa *HOXA*, *HOXB* genů u ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie na mRNA úrovni po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M), graf byl vytvořen aritmetickým průměrem 3 biologických replikátů (každý ze 3 technických replikátů), statistická signifikance (\* $\leq$  0,05, \*\* $\leq$  0,001, \*\*\* $\leq$  0,0001)

## 5.9 Celkové změny histonového kódu u PML-RAR $\alpha$ + buněk

Uvolnění PML-RAR $\alpha$  diferenciálního bloku pomocí ATRA je doprovázeno řadou epigenetických změn. Abychom zjistili, které epigenetické modifikace histonů se podílejí na změně exprese genů během ATRA-řízené diferenciace, inkubovali jsme NB4 buněčnou linii s ATRA a také v kombinaci s GSK-J4 inhibítor. Specifický inhibitor GSK-J4 jsme použili za účelem ověření role lyzin 27 histon demethyláz JMJD3 a UTX v transkripční regulaci *HOX* genů při procesu diferenciace. K detekci celkové hladiny modifikovaných histonů na proteinové úrovni byla využita metoda western blot. Hladina represní histonové značky (H3K27me3) byla snížena po degradaci PML-RAR $\alpha$  fúzního proteinu pomocí ATRA. Naopak hladina tohoto modifikovaného histonu byla zvýšena po přidání GSK-J4 inhibítoru. Kombinovaná inkubace s ATRA a GSK-J4 způsobila snížení hladiny dimetylovaného lyzinu

27 na histonu H3 (H3K27me2), což ukazuje na dynamickou rovnováhu mezi H3K27me3 a H3K27me2. Inhibice lyzin 27 specifických demethyláz zprostředkující zvýšení H3K27me3 pravděpodobně způsobuje snížení H3K27me2 jako výchozího substrátu pro trimethylaci. Oproti represní histonové značce byl u aktivačních histonových značek pozorován odlišný vliv ATRA a inhibitoru GSK-J4. U di- a trimethylovaného lyzinu 4 na histonu H3 (H3K4me2, H3K4me3) vedlo přidání ATRA ke zvýšení hladiny obou proteinů, zatímco kombinace ATRA a GSK-J4 způsobila jejich snížení. Hladina ostatních detekovaných modifikovaných histonů, mezi které patří dimethylovaný lyzin 9 na histonu H3 (H3K9me2), acetylovaný lyzin 9 na histonu H3 (H3K9Ac), acetylovaný lyzin 14 na histonu H3 (H3K14Ac), acetylovaný lyzin 27 na histonu H3 (H3K27Ac) a acetylovaný histon H4 (H4Ac), se po inkubaci s ATRA nezměnila (viz Obr. 20).



Obr. 20: Expres histonových modifikací u ATRA-senzitivní buněčné linie NB4 a po 8h inkubaci s ATRA (1µM, 10µM v případě acetylovaných histonů) nebo v kombinaci GSK-J4 (1µM, 10µM), histony byly izolovány metodou kyselých extrakcí, jako kontrolní protein histonové frakce byl použit celkový histon H3.

### 5.10 Změny histonového kódu na promotorech *HOX* genů u PML-RARα+ buněk

Abychom zjistili, zda jsou změny histonového kódu prezentovány přímo na promotorech jednotlivých *HOX* genů a zda by mohly být odpovědné za změnu transkripce těchto genů, provedli jsme metodu chromatinové imunoprecipitace (ChIP), která umožňuje pomocí specifických protilátek proti modifikovaným histonům vycípat DNA fragmenty, na

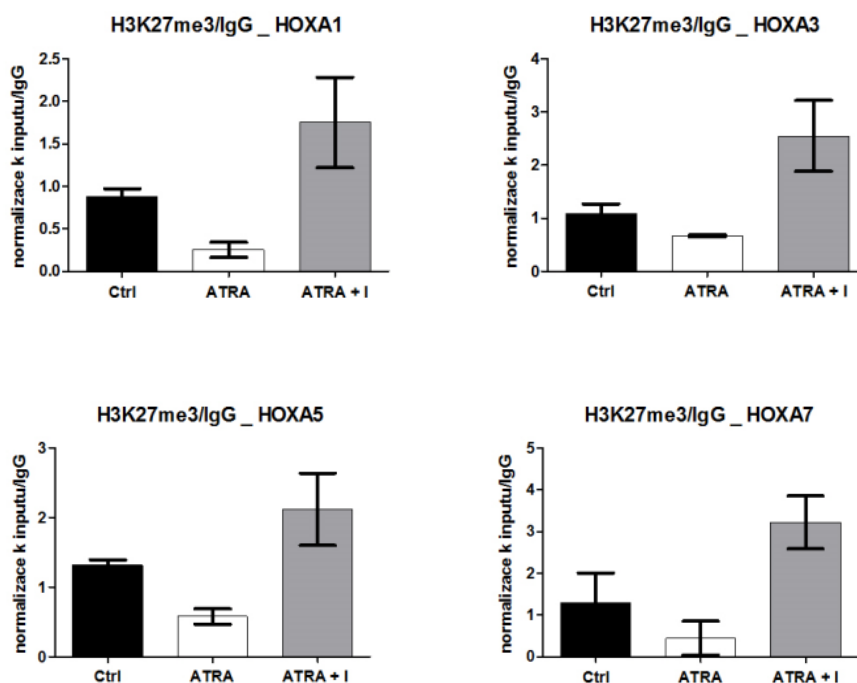
kterých je navázán protein našeho zájmu, a ty poté analyzovat pomocí qPCR. Na promotorech vybraných *HOX* genů (*HOXA1*, *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA7*) jsme se zaměřili na represní histonovou značku (H3K27me3), jejíž množství je regulováno lyzin 27 specifickými demethylázami JMJD3 a UTX. Metoda ChIP byla provedena po osmihodinové inkubaci NB4 buněčné linie s ATRA samotnou, nebo v kombinaci s GSK-J4 inhibitorem jako ve výše uvedených experimentech. ATRA samotná signifikantně snížila hladinu H3K27me3 na promotorech vybraných *HOX* genů (*HOXA1*,  $p=0,007$ ; *HOXA3*,  $p=0,006$ ; *HOXA5*,  $p=0,033$  a *HOXA7*,  $p=0,007$ ) (viz Obr. 21). Naopak GSK-J4 působil proti efektu ATRA a signifikantně zvýšil hladinu represní histonové značky (*HOXA1*,  $p=0,046$ ; *HOXA3*,  $p=0,036$ ; *HOXA5*,  $p=0,007$  a *HOXA7*,  $p=0,007$ ) (viz Obr. 21). Tato data odpovídají výše uvedeným výsledkům analýzy represní histonové značky získaným pomocí metody western blot.

K získání informací o přítomnosti represní histonové značky na promotorech většího množství *HOX* genů jsme metodu chromatinové imunoprecipitace rozšířili o následné sekvenování nové generace (NGS = next-generation–sequencing) a provedli tak metodu zvanou ChIP-seq. Nejprve jsme identifikovali DNA fragmenty, na které se navázala protilátka proti H3K27me3, tzv. píky, a dále jsme k finální analýze (tzv. peak calling analysis pomocí nástroje MACS2) použili pouze ty píky (DNA fragmenty), které byly přítomny v obou experimentálních replikátech NB4 buněčné linie po inkubaci s ATRA a GSK-J4 inhibitorem. Jako promotorové oblasti jsme definovali nukleotidové sekvence, které byly vzdáleny od počátku transkripce (TSS = transcription start site) méně než 2 000 bází (2 kbp). V rámci promotorových oblastí celého genomu kleslo celkové množství detekovaných píků po inkubaci s ATRA, a to ve srovnání s kontrolním vzorkem, zatímco inkubace ATRA spolu s GSK-J4 způsobila opětovné zvýšení počtu píků (Ctrl ~ 92 738, ATRA ~ 42 650, ATRA+I (GSK-J4) ~ 117 751). Stejný trend byl pozorován také u změny počtu genů, v jejichž promotorových oblastech byly nalezeny H3K27me3 specifické píky (Ctrl ~ 4057, ATRA ~ 1677, ATRA+I (GSK-J4) ~ 4926) (viz Obr. 22). Tyto výsledky odpovídají výsledkům z celkové hladiny represní histonové značky na proteinové úrovni a zároveň také výsledkům získaným metodou ChIP.

Dále jsme porovnali seznam získaných genů s píky H3K27me3 v jejich promotorových oblastech za rozdílných podmínek po inkubaci s ATRA a GSK-J4 inhibitorem a výsledky promítli do Vennova diagramu (viz Obr. 22). Průnik genů ( $n = 1295$ ), v jejichž promotorových oblastech byly detekovány H3K27me3 píky u kontrolního vzorku (Ctrl) a zároveň u vzorku po inkubaci s kombinací ATRA a GSK-J4 (ATRA+I), zahrnoval také geny *HOXA3*, *HOXA10*, *HOXB3*, *HOXC9* a *HOXC11* (viz Obr. 22). U těchto genů lze dle změny

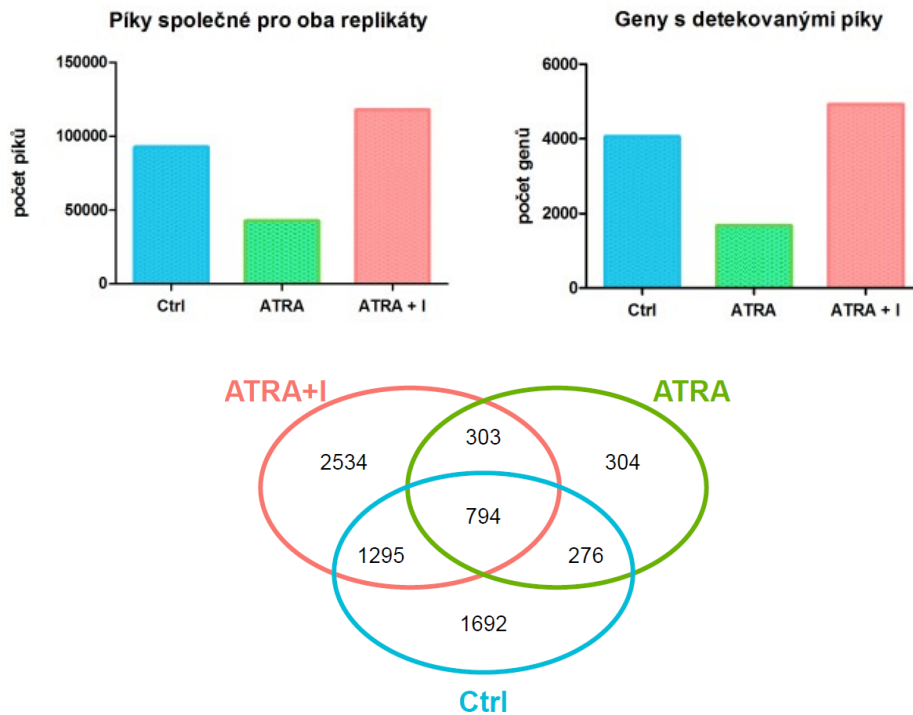
přítomnosti represní histonové značky předpokládat transkripční regulaci řízenou lyzin 27 specifickou demethylázou JMJD3 přes demethylaci represní histonové značky H3K27me3. Vizualizace analýzy H3K27me3 píků pro promotorové oblasti genů *HOXA10*, *HOXB3* a *HOXC9* jsou znázorněny na obrázku č 23.

Pro promotorové oblasti *HOX* genů, ve kterých nebylo kvůli suboptimální kvalitě vzorku detekováno dostatek H3K27me3 specifických píků potřebných pro finální analýzu píku, byla využita analýza počtu normalizovaných readů k identifikaci oblastí se zvýšenou přítomností H3K27me3 (read counts). Pomocí této analýzy bylo detekováno snížení hladiny H3K27me3 po inkubaci s ATRA a opětovné zvýšení způsobené ko-kultivací s GSK-J4 u řady dalších *HOX* genů (*HOXA1*, *A4*, *A7*, *A10*, *B2*, *B3*, *B5*, *C4*, *C10*, *C13*, *D1*, *D4*, *D9*) (viz Obr. 24). Pomocí této metody jsme detekovali také řadu *HOX* genů (*HOXA9*, *A11*, *B6*, *B9*, *C6*, *C12*, *D3* a *D13*), které nevykazovaly podobný trend změny H3K27me3, a proto lze předpokládat, že právě uvedené geny nejsou přítomností H3K27me3 regulovány (viz Obr. 25). Zároveň tato analýza potvrdila odlišnost v rámci regulace exprese dvou *HOX* genů (*HOXA9* a *HOXA11*), u kterých se hladina exprese po inkubaci s ATRA a GSK-J4 inhibítorem nezměnila (viz Obr. 26). Změna exprese těchto nekorelujících *HOX* genů ukazuje, že některé *HOX* geny nepodléhají regulaci demethylázou JMJD3.

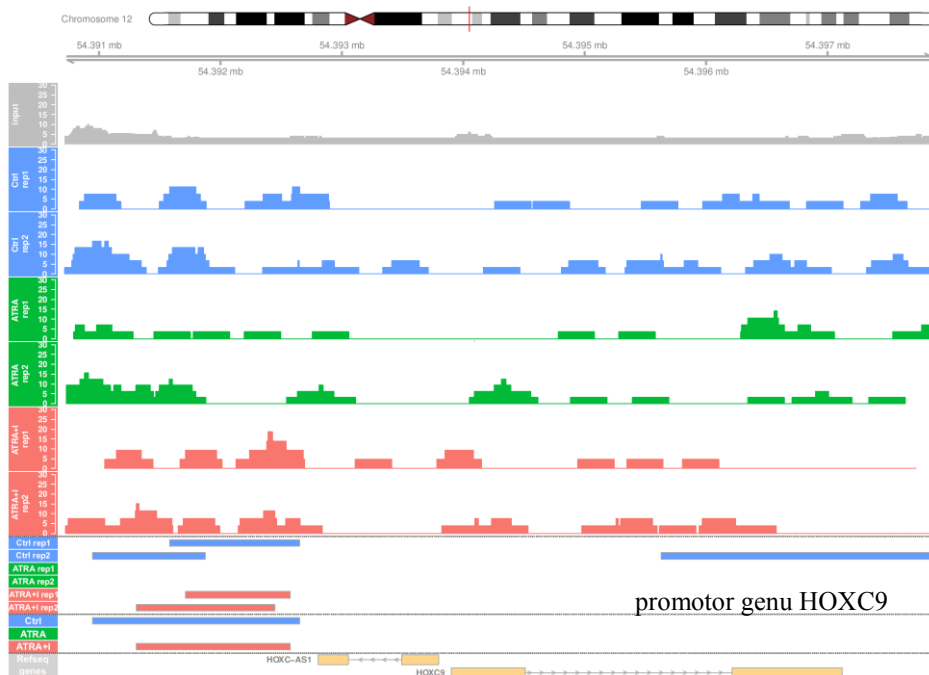


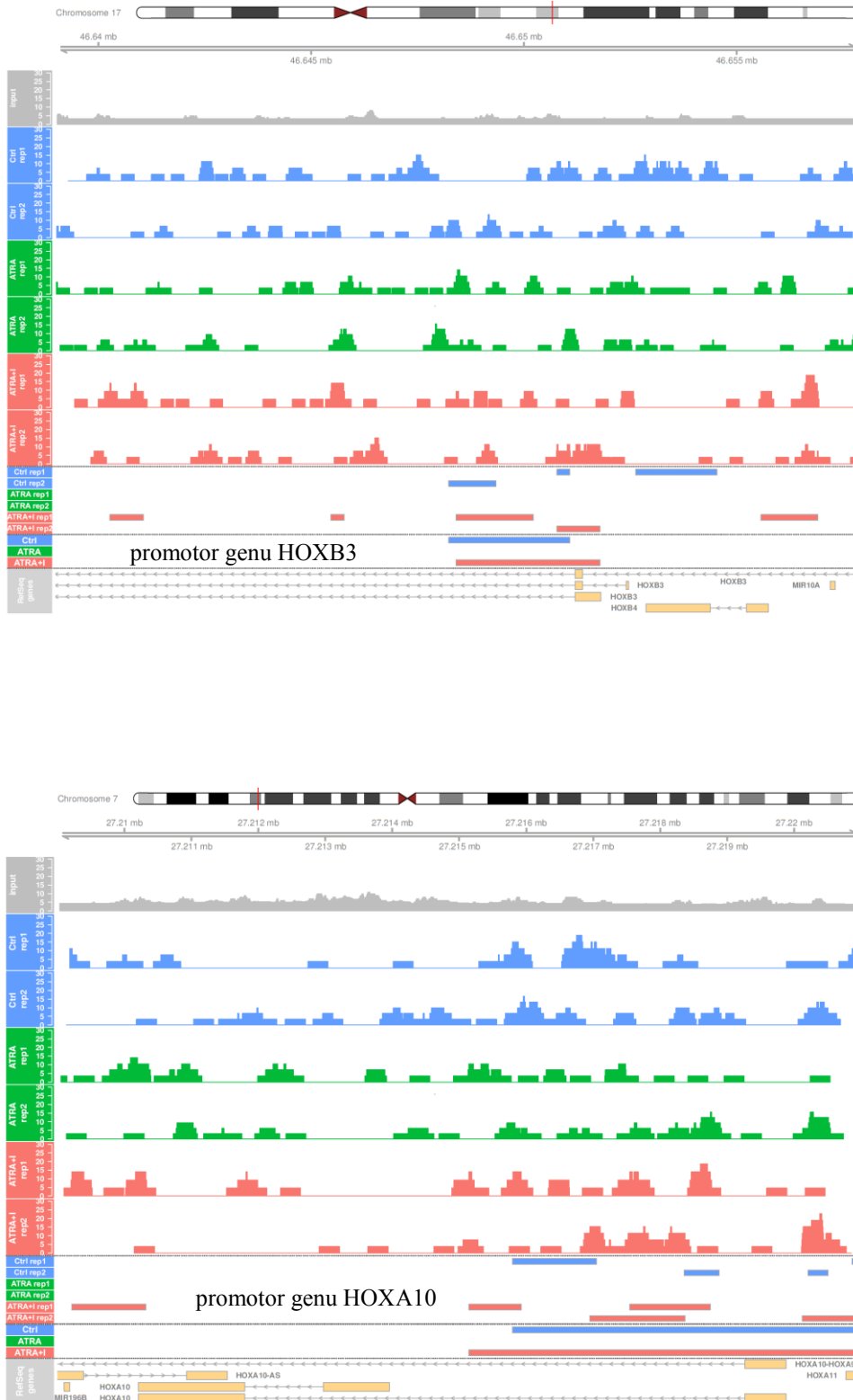
Obr. 21: Hladina přítomnosti H3K27me3 na promotorech *HOXA1*, *A3*, *A5*, *A7* ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ +NB4 buněčné linie po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (10 $\mu$ M), relativní nabožení H3K27me3 je normalizováno k celkovému množství chromatinu a vztaženo k hladině imunoprecipitovaného IgG (negativní kontrola)



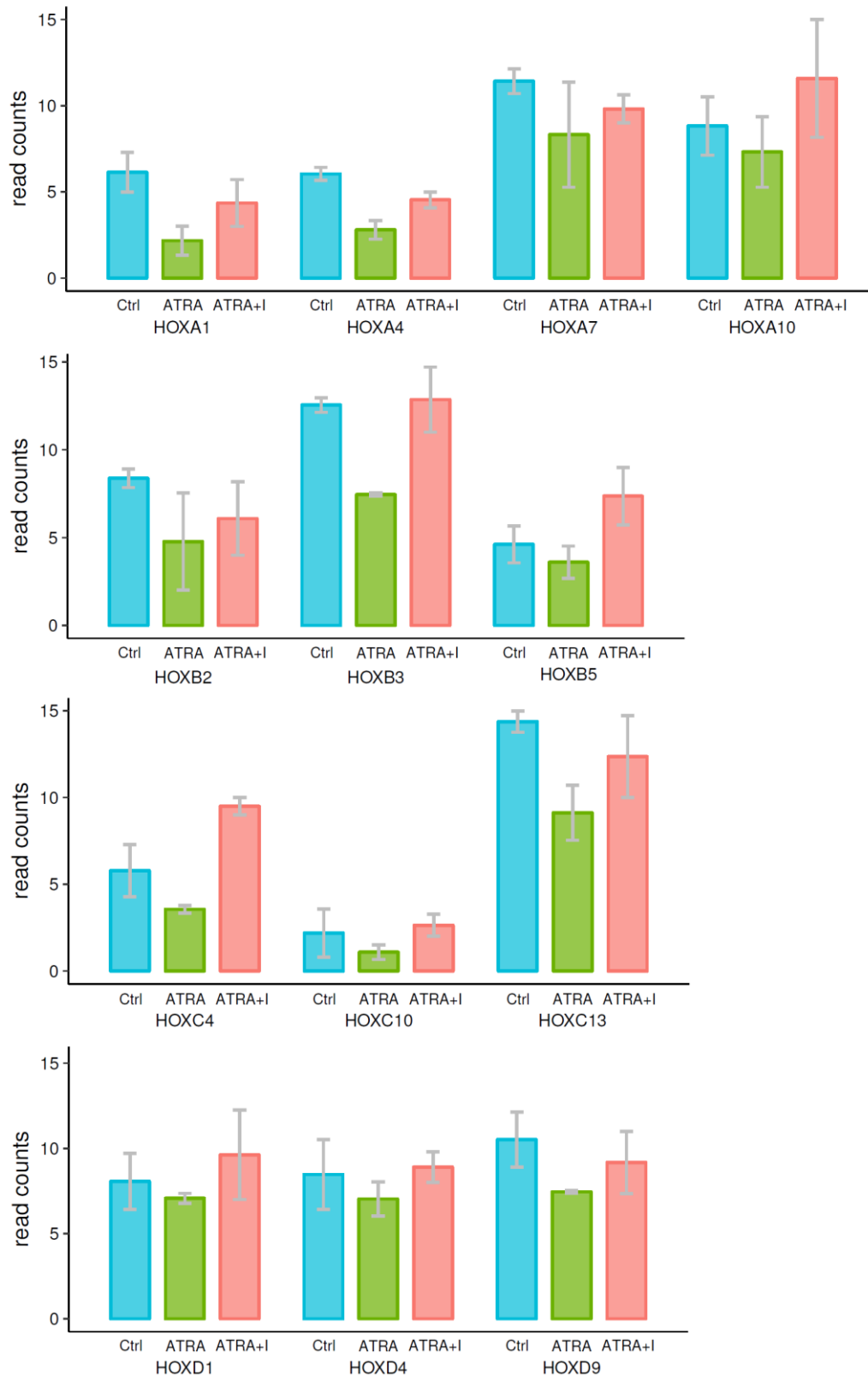


Obr. 22: Hladina přítomnosti H3K27me3 na promotorech genu v celém genomu ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ +NB4 buněčné linie po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (10 $\mu$ M), základní data byla porovnána s referenční sekvencí genomu hg19 a následně zpracována metodou peak calling analýzy. Přítomnost H3K27me3 je zde prezentována tzv. společnými píky (nacházející se u obou replikátů ve vzdálenosti menší než 2kbp), Vennův diagramy znázorňují průnik genů s píky detekovanými u rozdílných podmínek.

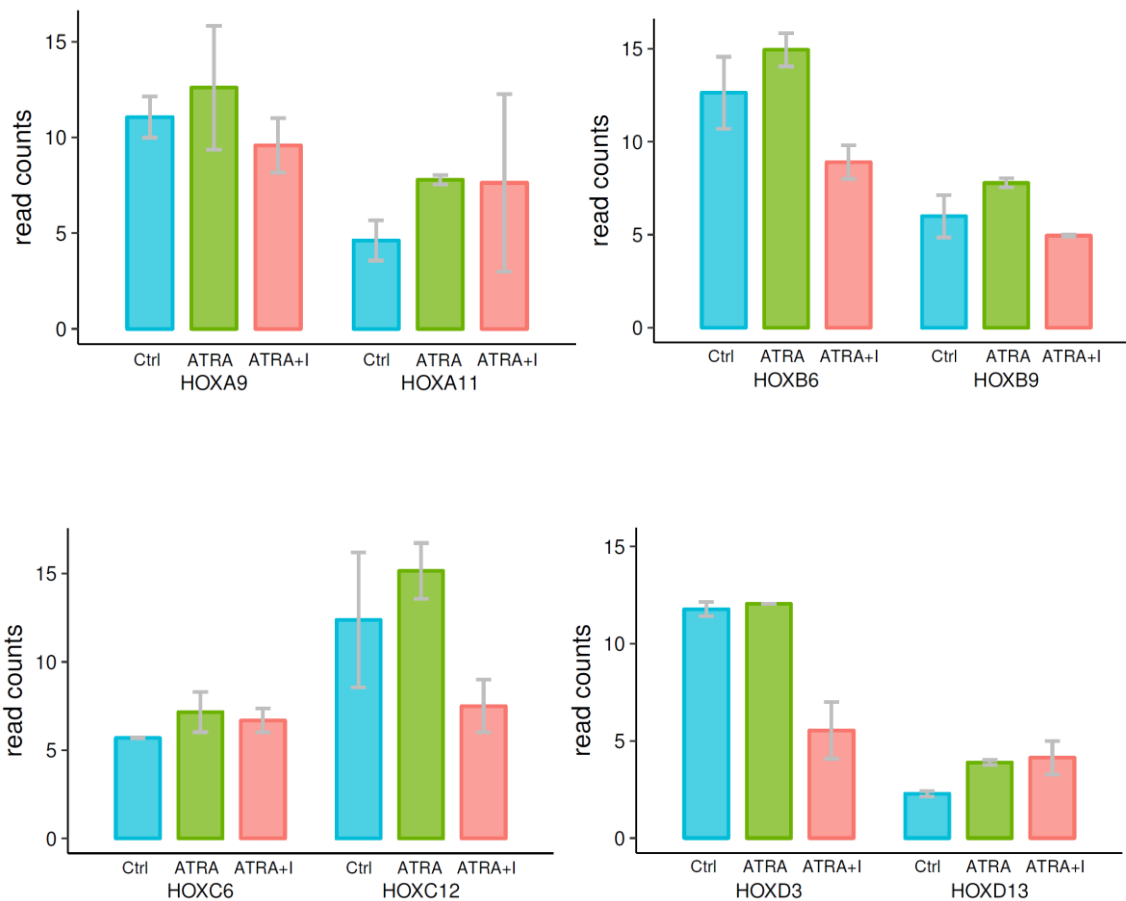




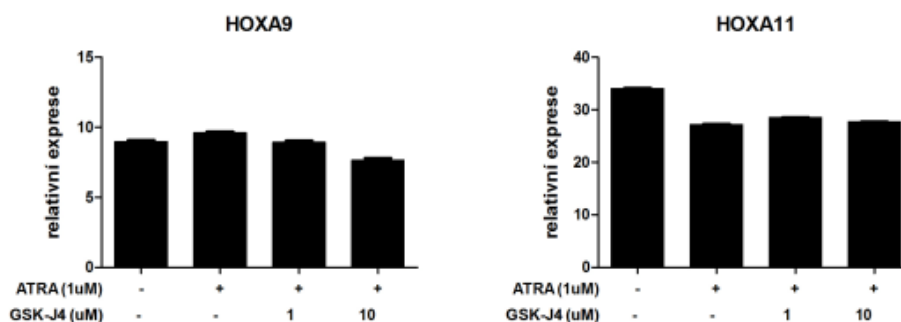
Obr. 23: Hladina přítomnosti H3K27me3 na promotorech *HOXA10*, *HOXB3*, *HOXC9* ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (10 $\mu$ M), obrázky znázorňují ChIP-seq data replikátů a společné píky (nacházející se u obou replikátů ve vzdálenosti menší než 2kbp) nalezené metodou peak calling analysis



Obr. 24: Hladina přítomnosti H3K27me3 na promotorech *HOX* genů regulovaných přítomností H3K27me3 ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (10 $\mu$ M), surová data byla porovnána s referenční sekvencí genomu hg19 a následně zpracována metodou počtu readů ( $\pm$  500 bp od TSS). Počítané ready (read counts) byly prodlouženy na délku sekvenovaného fragmentu (300 bp) a normalizovány k velikosti sekvenovací knihovny.



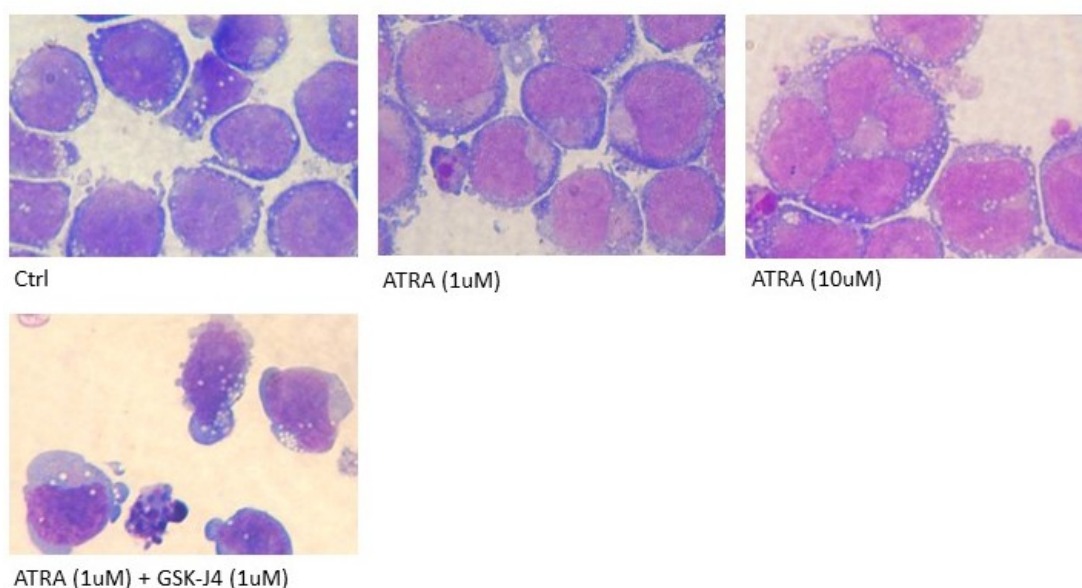
Obr. 25: Hladina přítomnosti H3K27me3 na promotorech *HOX* genů pravděpodobně neregulovaných přítomností H3K27me3 ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (10 $\mu$ M), surová data byla porovnána s referenční sekvencí genomu hg19 a následně zpracována metodou počtu readů (+/- 500 bp od TSS). Počítané ready (read counts) byly prodlouženy na délku sekvenovaného fragmentu (300 bp) a normalizovány k velikosti sekvenovací knihovny.



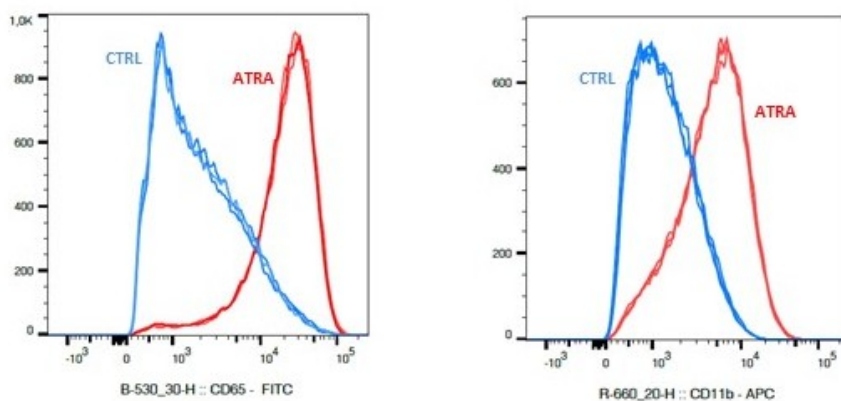
Obr. 26 : Expresa *HOXA9* a *HOXA11* ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie na mRNA úrovni po 8h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M), graf byl vytvořen aritmetickým průměrem 3 biologických replikátů (každý ze 3 technických replikátů)

### 5.11 Efekt inhibice JMJD3 na ATRA-řízenou diferenciaci u PML-RAR $\alpha$ + buněk

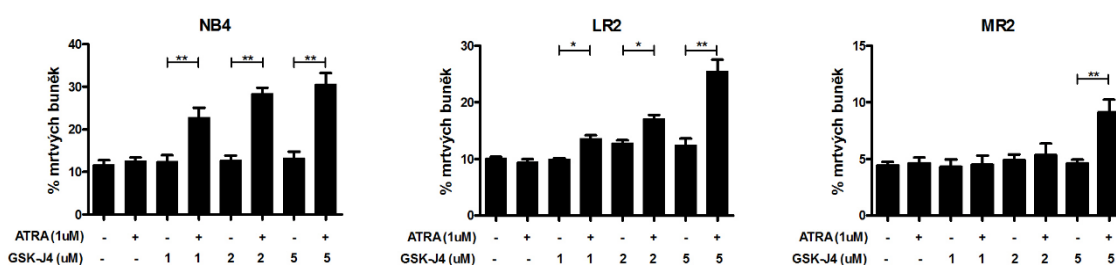
Již dříve bylo publikováno, že aberantně zvýšená exprese demethylázy UTX způsobuje zvýšenou diferenciaci PML-RAR $\alpha$ + buněk při inkubaci s ATRA (Rocha-Viegas et al., 2014). Pro studium vlivu aktivity demethylázy JMJD3 jsme se rozhodli použít inhibiční činidlo GSK-J4, a sledovat jeho vliv na ATRA-řízenou diferenciaci PML-RAR $\alpha$  pozitivních buněk. Nejprve jsme morfologicky ověřili, že námi používaná dávka ATRA způsobuje diferenciaci NB4 buněčné linie ze stádia promyelocytu do stádia abnormálního typu neutrofilního granulocytu (Jasek et al., 2008). Tento způsob diferenciace je typický pro PML-RAR $\alpha$ + blasty pacientů léčených pomocí ATRA (viz obr. 27). Diferenciace NB4 buněčné linie byla potvrzena také pomocí průtokové cytometrie na proteinové úrovni zvýšením diferenciačních markerů (CD65 a CD11b) (viz Obr. 28). Buňky po společné kultivaci ATRA s GSK-J4 inhibitorem nevykazovaly na morfologické úrovni žádné změny diferenciace (změny nukleární segmentace) ve srovnání s buňkami inkubovanými pouze s ATRA (viz Obr. 27). Na těchto buňkách byly patrné morfologické známky apoptózy jako jsou povrchové změny plazmatické membrány a tvorba váčků. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli změřit pomocí průtokové cytometrie potenciální změny v množství znaků typických pro apoptózu a nekrózu (Annexin V a propoidum iodid). ATRA v kombinaci s GSK-J4 inhibitorem způsobila signifikantní zvýšení procenta mrtvých buněk ve srovnání s buňkami kultivovanými pouze s ATRA, nebo GSK-J4 inhibitorem. Tento synergický apoptotický efekt při vyšší dávce GSK-J4 inhibitoru byl detekován také u obou ATRA-rezistentních klonů NB4-LR2 a NB4-MR2 (viz Obr. 29).



Obr. 27: Mikroskopické stanovení morfologie PML-RAR $\alpha$ + ATRA-senzitivní buněčné linie NB4 barvením May-Grünwald, Giemsa-Romanowski po 48h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) a GSK-J4 (1 $\mu$ M)



Obr. 28: Stanovení typických diferenciačních znaků CD65 a CD11b (barvením fluorescenčními protilátkami) u ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie po 48h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M)



Obr 29.: Stanovení procenta mrtvých buněk pomocí průtokové cytometrie (barvení kombinací propidium iodidu a annexinu V) u ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$ + NB4 buněčné linie po 48h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M) a GSK-J4 (1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M a 10 $\mu$ M)

## 5.12 Role methylace DNA v transkripční regulaci *HOX* genů u PML-RAR $\alpha$ + buněk

Vzhledem k tomu, že ATRA způsobila u NB4 buněčné linie snížení exprese *de novo* DNA methyltransferázy *DNMT3b* na mRNA úrovni, rozhodli jsme se ověřit roli DNA methylace v PML-RAR $\alpha$  řízené regulaci *HOX* genů. Pro tento účel jsme použili metodu bisulfitového sekvenování ve dvou promotorových oblastech vybraných *HOX* genů (*HOXA5* [-400-(-223)bp upstream od TSS, a -233bp upstream od TSS bp upstream- (+15) od TSS]; *HOXA7* [-186 -(+2) downstream od TSS, (-427) -(186) bp ] s vyšší koncentrací CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) ostrůvků. Po inkubaci s ATRA (8h, 24h ani 48h) nebyly detekovány žádné změny v methylaci CpG ostrůvků v těchto promotorových oblastech ve srovnání s kontrolními vzorky. Žádná změna methylace ve výše zmíněných promotorových oblastech nebyla pozorována ani u rezistentního klonu NB4-LR2 (viz Obr. 30).

### NB4 –HOXA5 promotor

1.část

24h



48h



72h



2. část

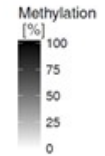
24h



48h



72h



### LR2 –HOXA5 promotor

1.část

24h



48h



72h



2.část

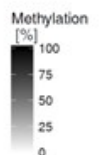
24h



48h



72h



### NB4 –HOXA7 promotor

1.část

24h



48h



72h



2.část

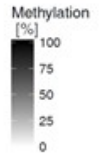
24h



48h



72h



### LR2 –HOXA7 promotor

1.část

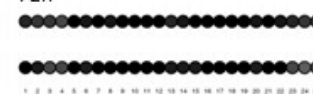
24h



48h



72h



2.část

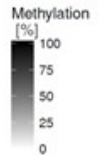
24h



48h



72h



Obr. 30 : Stanovení methylovaných cytosinů v promotorech *HOXA5* a *HOXA7* genů u ATRA-senzitivní PML-RAR $\alpha$  NB4 buněčné linie a ATRA-rezistentního klonu LR2 po 24h, 48h a 72h inkubaci s ATRA (1 $\mu$ M)

## 6 Diskuze

*HOX* geny primárně regulují řadu procesů během embryonálního vývoje, velmi důležitou roli však hrají také ve vývoji hematopoetických buněk po celý život jedince (Alharbi et al., 2013; Cantile et al., 2008; Du and Taylor, 2004; Thorsteinsdottir et al., 1997b). Pomocí experimentálních studií na myších modelech a hematopoetických buňkách, ve kterých byla studována aberantně snížená, nebo zvýšená exprese jednotlivých *HOX* genů, byl již dříve prokázán vliv těchto genů na regulaci hematopoézy (Beslu et al., 2004; Izon et al., 1998; Kappen, 2000; Lawrence et al., 1997; Sauvageau et al., 1994; Thorsteinsdottir et al., 1997a). Aberantní exprese *HOX* genů, která bývá často detekována u různých druhů leukémií, může hrát roli v procesu maligní transformace. Dosud však nebylo zcela objasněno, zda působí aberantní exprese *HOX* genů v procesu leukemogeneze jako hlavní spouštěč nebo spíše jako sekundární změna v genové expresi, která se na patologické zástavě diferenciaci hematopoetických buněk a jejich maligním zvratu podílí pouze nepřímo.

Tato práce je v první části zaměřena zejména na objasnění rozdílů v expresi *HOX* genů u AML ve srovnání s fyziologickými protějšky zdravé kostní dřeně, a tudíž by mohla přispět k objasnění vlivu aberantní exprese *HOX* genů na leukemogenní proces. Subpopulace vývojových stádií zdravé kostní dřeně byly sortovány tak, aby z morfologického hlediska odpovídaly jednotlivým subtypům AML dle FAB klasifikace. U zdravé kostní dřeně byla detekována nejvyšší exprese *HOX* genů u časných vývojových stádií myeloidní řady, zatímco během diferenciaci myeloidních prekurzorů se exprese *HOX* genů postupně snižovala. Tento fakt odpovídá již dříve publikovaným studiím, které prokázaly význam přesné koordinace *HOX* genů jakožto klíčových regulátorů hematopoézy. Během tohoto diferenciačního procesu se exprese *HOX* genů u hematopoetických buněk postupně snižuje (Alharbi et al., 2013; Argiropoulos and Humphries, 2007; Magli et al., 1991).

Ze získaných dat vyplývá, že zatímco změna exprese *HOX* genů během vývoje hematopoetických buněk vykazuje snižující se trend, exprese těchto genů u subtypů AML dle FAB klasifikace zdravým protějškům plně neodpovídá. Podobné výsledky byly pozorovány u dětských pacientů s ALL, u nichž byla také detekována rozdílná exprese *HOX* genů u leukemických buněk ve srovnání se zdravými sortovanými protějšky lymfoidní vývojové řady kostní dřeně (Starkova et al., 2010). Z těchto výsledků tedy vyplývá, že aberantní exprese *HOX* genů není způsobena pouze zastavením hematopoetických buněk v konkrétním stádiu diferenciaci. Lze tedy předpokládat, že se *HOX* geny přímo podílejí na procesu maligní transformace buněk při rozvoji leukémie.



Analýzou expresního profilu *HOX* genů u dětských pacientů s AML byla identifikována odlišná hladina exprese mezi jednotlivými subtypy dle FAB klasifikace a zároveň také dle přítomnosti typických molekulárních aberací (*PML-RAR $\alpha$* , *RUNX1-RUNXT1*, *CBFb-MYH11* a s přestavbami genu *MLL*). Již dříve byl například publikován specifický vliv těchto *MLL*-přestavbových fúzních genů na regulaci exprese *HOX* genů (Hess, 2004). Ze získaných dat byl v této práci nejzajímavější a nejodlišnější skupinou AML pacientů subtyp AML M3, který je charakterizován přítomností *PML-RAR $\alpha$*  fúzního genu. U *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních pacientů byla pozorována celkově nejnižší hladina exprese *HOX* genů ve srovnání s ostatními subtypy, které jsou definovány přítomností molekulárních aberací, případně normálním karyotypem. Tato skutečnost nebyla ovlivněna ani přítomností *FLT3/ITD* mutace, která bývá všeobecně u leukemických pacientů asociována se zvýšenou expresí *HOX* genů (Roche et al., 2004). Výsledky byly ověřeny také analýzou dat větší kohorty AML pacientů. U *FLT3/ITD* pozitivních pacientů s *PML-RAR $\alpha$*  fúzním genem byla detekována opět signifikantně nižší exprese, a to ve srovnání s *PML-RAR $\alpha$*  negativními pacienty s mutací *FLT3/ITD* (Hollink et al., 2011). Z našich výsledků a dříve publikovaných dat tedy vyplývá, že typické molekulární aberace u AML pravděpodobně významně ovlivňují expresní profil *HOX* genů.

Expresní profil *HOXA* genů částečně rozděluje pacienty s AML také dle prognózy. U pacientů se standardním rizikem (méně agresivním typem leukémie) byla detekována celkově nižší exprese *HOXA* genu, a to ve srovnání s pacienty s vysokým rizikem (Drabkin et al., 2002). Nicméně stratifikační kritéria protokolů pro léčbu AML jsou definovaná z velké části dle přítomnosti molekulárních aberací. Skupina standardního rizika zahrnuje všechny *PML-RAR $\alpha$*  pozitivní pacienty s nízkou expresí *HOX* genů. V naší kohortě dětských AML pacientů byla také nalezena asociace mezi standardním rizikem a nejnižší expresí *HOX* genů u *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních případů. Naopak *MLL* přestavbové AML, pro které je charakteristická vysoká exprese *HOX* genů, spadaly do skupiny agresivnějších leukémií s vysokým rizikem. Z našich výsledků lze konstatovat, že rozdíly v expresi *HOXA* genů jsou asociovány s rozdílnými molekulárními aberacemi, a tudíž nelze považovat hladinu exprese *HOXA* genů jako nezávislý prognostický faktor u AML pacientů.

Expese *HOX* genů během embryogeneze a hematopoézy je na úrovni chromatinu velmi přísně regulována. Na této regulaci se podílí řada modifikátorů chromatinu, jejichž abnormálně změněná funkce může částečně přispívat i k procesu maligní transformace. Bivalentní charakter *HOX* genů, charakteristický přítomností represních (H3K27me3) a aktivačních histonových značek (H3K4me2/3), v promotorových oblastech ukazuje na

důležitost transkripční regulace těchto genů na úrovni chromatinu. Přítomnost těchto bivalentních domén pak umožňuje rychlou a dynamickou regulaci buněčně specifické odpovědi (Bernstein et al., 2006). Na základě výše uvedených faktů jsme se v naší práci pokusili objasnit roli modifikátorů chromatinu v regulaci *HOX* genů u pacientů s AML a zdravých protějšků sortované kostní dřeně odpovídajícího vývojového stádia. Zaměřili jsme se na analýzu exprese DNA *de novo* methyltransferáz a také demethyláz a methyltransferáz histonů. Celkově byla u zdravých subpopulací kostní dřeně i leukemických protějšků detekována negativní korelace mezi expresí DNA *de novo* methyltransferáz a lyzin 27 specifických demethyláz (*JMJD3*, *UTX*), zatímco exprese *HOX* genů se během diferenciacie hematopoetických buněk pouze mírně snížila. O demethylázách *JMJD3* a *UTX* je známo, že ve zdravé hematopoeze hrají velmi důležitou roli (Liu et al., 2012; Ntziachristos et al., 2014). V případě leukemických vzorků byla nejvýraznější korelace mezi *HOX* geny a modifikátory chromatinu nalezena opět u subtypu AML M3 s *PML-RAR $\alpha$*  fúzním genem, který se pravděpodobně podílí na regulaci exprese *HOX* genů jako hlavní mediátor regulační kaskády. Zároveň bylo již dříve publikováno, že u *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních buněk jsou patrné změny na úrovni chromatinu, které mohou být způsobeny deregulací modifikátorů chromatinu nebo změnou cílení jejich enzymatické aktivity (Grignani et al., 1998). Pokud je fúzní protein *PML-RAR $\alpha$*  degradován, dochází k masivní modifikaci chromatinových struktur, což potvrzuje význam *PML-RAR $\alpha$*  fúzního proteinu jako součásti epigenetické regulační kaskády cílových genů (Martens et al., 2010). Lze tedy předpokládat, že u AML pacientů, a to zejména u *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních, je abnormální exprese *HOX* genů výrazně ovlivněna modifikátory chromatinu.

V návaznosti na výše zmíněné výsledky a dříve publikovaná data jsme se dále zaměřili konkrétně na *PML-RAR $\alpha$*  pozitivní případy AML pacientů a pokusili jsme se objasnit mechanismus regulace *HOX* genů fúzním genem *PML-RAR $\alpha$*  jako primárním mediátorem celé epigenetické regulační kaskády. U *PML-RAR $\alpha$*  pozitivních AML pacientů byla detekována celkově nejnižší exprese *HOXA* a *HOXB* genů, která byla asociována s nízkou expresí lyzin 27 specifických demethyláz (*JMJD3*, *UTX*) a vysokou expresí *de novo* DNA methyltransferáz (*DNMT3a*, *DNMT3b*). Funkční nebo fyzické spojení těchto modifikátorů chromatinu a *HOX* genů bylo již dříve publikováno v řadě studií. Konkrétně *UTX* ovlivňuje hladinu exprese *HOX* genů a zároveň byla prokázána její přímá vazba na promotor genu *HOXB1* (Agger et al., 2007; Rocha-Viegas et al., 2014). V případě tohoto subtypu AML spojuje celou regulační kaskádu prokázaná přímá vazba *PML-RAR $\alpha$*  fúzního proteinu na gen pro demethylázu histonů *JMJD3* (Martens et al., 2010). Zároveň byla *de novo* DNA

methyltransferáza DNMT3a popsána jako nepostradatelná pro iniciaci a rozvoj PML-RAR $\alpha$  pozitivní leukémie (Cole et al., 2016).

V naší práci jsme pokusili prozkoumat role těchto modifikátorů chromatinu v PML-RAR $\alpha$  řízené regulaci *HOX* genů pomocí modelových buněčných linií exprimujících PML-RAR $\alpha$  fúzní protein. Uvolněním diferenciačního bloku a zároveň degradací fúzního proteinu PML-RAR $\alpha$  pomocí ATRA bylo dosaženo zvýšení hladiny JMJD3 demethylázy a vybraných *HOXA* a *HOXB* genů. Zvýšení exprese *HOX* genů bylo následně sníženo na původní hladinu, a to působením JMJD3/UTX specifického inhibitoru. Zvýšení exprese JMJD3 (UTX beze změny) a *HOX* genů způsobené ATRA bylo provázeno snížením celkové hladiny represní histonové značky (H3K27me3), zatímco snížení exprese *HOX* genů způsobené inhibicí demethyláz bylo provázeno adekvátním zvýšením hladiny H3K27me3. Změny v hladinách represní histonové značky byly prokázány jak na celkové proteinové úrovni, tak také na promotorech vybraných *HOX* genů pomocí CHIP. Nadstavbová metoda CHIP-seq, díky které je možné sledovat všechny promotory v rámci genomu, rozšířila spektrum *HOX* genů regulovaných lyzin 27 specifickou demethylací u PML-RAR $\alpha$  pozitivních buněk. Přítomnost represní histonové značky v promotoru genu *HOXB6* během aktivace a inhibice demethylázy JMJD3 neodpovídala změně exprese tohoto genu, na rozdíl od exprese *HOX* genů regulovaných demethylací lyzinu 27. Tyto výsledky odpovídají již dříve publikovaným datům, ve kterých byl gen *HOXB6* popsán jako jeden ze skupiny genů regulovaných jiným mechanismem (Giampaolo et al., 2002).

V další části projektu jsme využili ATRA-rezistentní klony PML-RAR $\alpha$  pozitivní buněčné linie s mutovanou vazebnou doménou pro retinovou kyselinu na RAR $\alpha$ . Díky těmto ATRA-rezistentním klonům se nám podařilo prokázat, že ATRA působí na expresi *HOX* genů specificky přímo přes PML-RAR $\alpha$  fúzní protein. V případě rezistentních linií s mutovanou vazebnou doménou pro retinovou kyselinu nebyla detekována změna exprese *HOX* genů ani *JMJD3*. Lze tedy konstatovat, že exprese *HOX* genů je regulována specificky, tj. působením PML-RAR $\alpha$  fúzního proteinu. Uvedenou regulaci *HOX* genů, která není závislá pouze na procesu diferenciace, se nám podařilo ověřit pomocí všeobecného diferenciačního činidla PMA, které způsobilo naopak snížení exprese *HOX* genů, zatímco exprese *JMJD3* byla zvýšena. Obě tyto změny exprese genů odpovídají fyziologické diferenciaci, která se liší od abnormální diferenciace způsobené degradací fúzního proteinu pomocí ATRA (Alharbi et al., 2013; Martens et al., 2010; Thompson et al., 2003).

Ačkoli je známo, že DNA methylace ovlivňuje expresi *HOX* genů (Tsumagari et al., 2013), nepodařilo se nám tuto skutečnost u našeho PML-RAR $\alpha$  buněčného modelu prokázat.

Degradace fúzního proteinu způsobila snížení exprese pouze methyltransferázy *DNMT3b*, u které však nebyla detekována žádná fyzická interakce s PML-RAR $\alpha$  fúzním proteinem jako je tomu v případě methyltransferázy *DNMT3a* (Cole et al., 2016). Změna exprese *DNMT3b* methyltransferázy nebyla provázena žádnou změnou methylace CpG ostrůvků v promotorech *HOX* genů.

Z vyšetření morfologických změn u PML-RAR $\alpha$  pozitivních leukemických buněk po podání ATRA samotné a v kombinaci s GSK-J4 vyplývá, že demethyláza JMJD3 nemá vliv na ATRA-řízenou diferenciaci. Ačkoli nebyla detekována žádná změna v diferenciaci před nebo po inhibici JMJD3 specifickým inhibitorem GSK-J4, kombinace ATRA a GSK-J4 inhibitoru měla na PML-RAR $\alpha$  pozitivní buňky cytotoxický efekt. Kombinované působení těchto dvou činidel způsobilo signifikantní zvýšení procenta mrtvých buněk také u obou ATRA-rezistentních klonů PML-RAR $\alpha$  buněčné linie. Lze tedy konstatovat, že cytotoxický efekt kombinace ATRA a GSK-J4 inhibitoru, který není limitován pouze na PML-RAR $\alpha$  pozitivní buňky, nesouvisí s regulací *HOX* genů a jeho objasnění bude vyžadovat další zkoumání. Samotný inhibitor GSK-J4 je známý cytotoxickým působením na buňky lymfoblastické leukémie, která je odvozena z T-vývojové řady (T-ALL) bez vlivu na ostatní subtypy leukémií (Ntziachristos et al., 2014).

Přežívání leukemických pacientů, kteří jsou nositeli fúzního genu *PML-RAR $\alpha$*  se v posledních letech výrazně zlepšilo se zavedením cílené terapie. Nadále však existují pacienti, u kterých dochází ke vzniku rezistence na terapii a celkově špatné odpovědi na danou léčbu. K vylepšení léčebného protokolu přispívá studium molekulární podstaty maligního zvratu, který je řízen fúzním genem PML-RAR $\alpha$  a následném testování nových léčebných kombinací. V této práci jsme studovali expresní profil *HOX* genů, který je specifický pro uvedené pacienty a jejich roli v leukemogenezi. V neposlední řadě jsme poukázali na kombinaci léčiv, která by mohla potenciálně pomoci při léčbě APL pacientů rezistentních k léčbě na bázi ATRA.

## 7 Závěr

V této práci se nám podařilo objasnit, že rozdíly v expresi *HOX* genů u jednotlivých subtypů AML neodpovídají expresi *HOX* genů u odpovídajících vývojových stádií granulocytární a monocytární řady zdravé kostní dřeně. Ze zjištěných dat vyplývá, že se *HOX* geny podílejí na procesu maligní transformace hematopoetických buněk a nekopírují pouze vývojové stádium, ve kterém došlo k patologické zástavě diferenciaci v rámci procesu leukemogeneze. Exprese *HOX* genů u jednotlivých subtypů AML je významně ovlivněna přítomností, nebo absencí molekulárních aberací typických pro daný subtyp dle FAB klasifikace.

Pomocí exprese *HOX* genů na mRNA úrovni byla kohorta dětských AML pacientů rozdělena nesupervidovaným hierarchickým klastrováním do 5 klastrů, charakterizovaných přítomností konkrétních molekulárních aberací. Z hlediska exprese *HOX* genů byla pro nás nejzajímavější kohorta AML pacientů s *PML-RAR $\alpha$*  fúzním genem. Tato skupina pacientů vykazovala celkově nejnižší expresi *HOX* genů a také lyzin 27 specifických demethyláz a zároveň zvýšenou expresi DNA *de novo* methyltransferáz.

V další části práce jsme se proto zaměřili pouze na *PML-RAR $\alpha$*  pozitivní buňky, u nichž jsme prokázali, že transkripce daných *HOX* genů je regulována přes dráhu *PML-RAR $\alpha$ /JMJD3*. Degradace fúzního proteinu *PML-RAR $\alpha$*  (inkubací s ATRA) způsobuje zvýšení exprese *HOX* genů a demethyláz histonů. Naopak použití specifického inhibitoru histon demethyláz vedlo k opětovnému snížení exprese *HOX* genů. Podařilo se nám tedy charakterizovat roli *JMJD3* demethylázy podílející se na regulaci exprese *HOX* genů prostřednictvím demethylace H3K27me3 represní histonové značky.

Následně jsme stanovili z klinického hlediska velmi zajímavý účinek inhibice *JMJD3*, který se projevuje synergickým apoptotickým efektem kombinace ATRA a GSK-J4 specifického inhibitoru. Tento synergický apoptotický efekt jsme pozorovali nejen u ATRA-senzitivních buněk, ale také u ATRA rezistentních buněk s mutací v *RAR $\alpha$*  vazebné doméně.

## 8 Přehled publikací a přednášek

### Publikace:

**Rejlova, K.**, Musilova, A., Kramarzova, K.S., Zaliova, M., Fiser, K., Alberich-Jorda, M., Trka, J., and Starkova, J. (2018). Low HOX gene expression in PML-RARalpha-positive leukemia results from suppressed histone demethylation. *Epigenetics* 13, 73-84. IF 4,92

Skvarova Kramarzova, K., Fiser, K., Mejstrikova, E., **Rejlova, K.**, Zaliova, M., Fornerod, M., Drabkin, H.A., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Sary, J., Trka, J., *et al.* (2014). Homeobox gene expression in acute myeloid leukemia is linked to typical underlying molecular aberrations. *J Hematol Oncol* 7, 94. IF 4,94

### Publikace přímo nesouvisející s tématem dizertační práce:

Flores-Montero, J., Kalina, T., Corral-Mateos, A., Sanoja-Flores, L., Perez-Andres, M., Martin-Ayuso, M., Sedek, L., **Rejlova, K.**, Mayado, A., Fernandez, P., *et al.* (2019). Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *J Immunol Methods*. IF 2,19

### Přednášky:

Rejlová K., Slámová M., Dobiášová A., Škvárová Kramarzová K., Alberich Jorda M., Fišer K., Trka J., Starková J. Role demethyláz histonů v transkripční regulaci HOX genů u PMLRARA+ pacientů s akutní myeloidní leukémií Vědecká konference 2.LF UK, Praha, ČR (2018)

Rejlová K., Dobiášová A., Škvárová Kramarzová K., Alberich Jorda M., Fišer K., Trka J., Starková J. Low HOX gene expression in PML-RARA-positive leukemia results from suppressed histone demethylation. International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralove (New Frontiers in the Research of Ph.D.), ČR (2018)

Rejlová K., Dobiášová A., Škvárová Kramarzová K., Alberich Jorda M., Fišer K., Trka J., Starková J. Role demethyláz histonů v transkripční regulaci HOX genů u PMLRARA+ pacientů s akutní myeloidní leukémií Vědecká konference 2.LF UK, Praha, ČR (2016)

Rejlová K., Dobiášová A., Škvárová Kramarzová K., Alberich Jorda M., Fišer K., Trka J., Starková J. The role of histone demethylases in the transcription regulation of HOX genes in PML-RARA+ AML patients. GRC Cancer Genetics & Epigenetics, přednáška, Lucca (Barga), Italy (2016)

## 9 Seznam zkratek

ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AML1	RUNTX1 - runt-related transcription factor 1
APL	akutní promyelocytární leukémie
ATO	arsenic trioxide (oxid arsenitý)
ATRA	all-trans retinoic acid
B-ALL	ALL odvozena z B-vývojové řady
BMI-1	specific moloney murine leukemia virus integration region 1
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérum albumin)
CALM	Calmodulin
CBF $\beta$	core-binding factor $\beta$
CD	cluster of differentiation
CEBP $\alpha$	CCAAT-enhancer binding protein alpha
CML	chronická myeloidní leukémie
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
DMSO	dimethylsulfoxid
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DNMT3a/b	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A/B
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ENL (MLLT1)	Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia; Translocated To, 1
ETO (RUNX1T1)	runt-related transcription factor; translocated to 1(cyclin related)
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive komplex 2 subunit
FAB	French-American-British pracovní skupina
FACS	Fluorescesce Activated Cell Sorter
FBS	fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
FLT3	fms (Feline McDonough Sarcoma) - related tyrosine kinase 3
GSK-J4	Ethyl 3-(((6-(4,5-dihydro-1H-benzo[d]azepin-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate
H3K27Ac	acetylovaný lyzin 27 na histonu H3
H3K27me3	trimethylace lysinu 27 na histonu 3
H3K4me2/3	di/trimethylace lysinu 4 na histonu 3
H3K9Ac	acetylovaný lyzin 9 na histonu H3
H3K9me2	dimetylovaný lyzin 9 na histonu H3
H4Ac	acetylovaný histon H4
HOX geny	homeoboxové geny
HSC	hematopoietic stem cell (hematopoetická kmenová buňka)
H SCT	HSC transplantation (transplantace HSC)

ChIP	chromatinová imunoprecipitace
IFN $\gamma$	interferon gamma
ITD	internal tandem duplication (vnitřní tandemová duplikace)
JMJD3 (KDM6B)	lysine (K)-specific demethylase 6B
KIT	kit oncogene
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A
MDS	myelodysplastický syndrom
MEIS1	myeloid ecotropic viral integration site 1
MLL	mixed lineage leukemia
MLLT2 (AF4)	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 2
MLLT3 (AF9)	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3
MRN	minimální reziduální nemoc
MYH11	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle
NCoR	nuclear receptor corepressor
NGS	next generation sequencing
NK	natural killers
NPM1	Nucleophosmin 1
NUP98	Nucleoporin 98 kDa
p53 (TP53)	tumor protein p53
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
PcG geny	Polycomb group genes
PI	propidium iodid
PMA	phorbol myristate acetate
PML	promyelocytic leukemia
PRC1	Polycomb repressive complex 1
PTPN11	sodium dodecyl sulfate (dodecylsulfát sodný)
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RA	retinoic acid (kyselina retinová)
RAR $\alpha$	retinoic acid receptor alpha
RAS	RASA1 p21 protein activator
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RXR	retinoid X receptor
RXRE	retinoid X receptor elements
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
T-ALL	ALL odvozena z T-vývojové řady
TNF	tumor necrosis factor
TrxG	trithorax group geny
TSS	transcription start site (místo počátku transkripce)
UTX (KDM6A)	lysine (K)-specific demethylase 6A
WHO	World health organization (Světová zdravotnická organizace)



## 10 Reference

Agger, K., Cloos, P.A., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731-734.

Alharbi, R.A., Pettengell, R., Pandha, H.S., and Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27, 1000-1008.

Andreeff, M., Ruvolo, V., Gadgil, S., Zeng, C., Coombes, K., Chen, W., Kornblau, S., Baron, A.E., and Drabkin, H.A. (2008). HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 22, 2041-2047.

Appelbaum, F.R., Gundacker, H., Head, D.R., Slovak, M.L., Willman, C.L., Godwin, J.E., Anderson, J.E., and Petersdorf, S.H. (2006). Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 107, 3481-3485.

Argiropoulos, B., and Humphries, R.K. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 26, 6766-6776.

Ayton, P.M., and Cleary, M.L. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* 17, 2298-2307.

Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.

Beslu, N., Kros, J., Laurin, M., Mayotte, N., Humphries, K.R., and Sauvageau, G. (2004). Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* 104, 2307-2314.

Bijl, J., van Oostveen, J.W., Kreike, M., Rieger, E., van der Raaij-Helmer, L.M., Walboomers, J.M., Corte, G., Boncinelli, E., van den Brule, A.J., and Meijer, C.J. (1996). Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* 87, 1737-1745.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.

Burnett, A.K., Hills, R.K., Milligan, D.W., Goldstone, A.H., Prentice, A.G., McMullin, M.F., Duncombe, A., Gibson, B., and Wheatley, K. (2010). Attempts to optimize induction and consolidation treatment in acute myeloid leukemia: results of the MRC AML12 trial. *J Clin Oncol* 28, 586-595.

Calvo, K.R., Sykes, D.B., Pasillas, M.P., and Kamps, M.P. (2002). Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21, 4247-4256.

Cantile, M., Scognamiglio, G., Anniciello, A., Farina, M., Gentilcore, G., Santonastaso, C., Fulciniti, F., Cillo, C., Franco, R., Ascierto, P.A., *et al.* (2012). Increased HOX C13 expression in metastatic melanoma progression. *J Transl Med* 10, 91.

Cantile, M., Schiavo, G., Terracciano, L., and Cillo, C. (2008). Homeobox genes in normal and abnormal vasculogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18, 651-658.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.

Cole, C.B., Verdoni, A.M., Ketkar, S., Leight, E.R., Russler-Germain, D.A., Lamprecht, T.L., Demeter, R.T., Magrini, V., and Ley, T.J. (2016). PML-RARA requires DNA methyltransferase 3A to initiate acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 126, 85-98.

Cowell, I.G., Sondka, Z., Smith, K., Lee, K.C., Manville, C.M., Sidorczuk-Lesthurge, M., Rance, H.A., Padget, K., Jackson, G.H., Adachi, N., *et al.* (2012). Model for MLL translocations in therapy-related leukemia involving topoisomerase IIbeta-mediated DNA strand breaks and gene proximity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8989-8994.

Creutzig, U., Zimmermann, M., Ritter, J., Reinhardt, D., Hermann, J., Henze, G., Jurgens, H., Kabisch, H., Reiter, A., Riehm, H., *et al.* (2005). Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 19, 2030-2042.

Das, N.D., Jung, K.H., Choi, M.R., Yoon, H.S., Kim, S.H., and Chai, Y.G. (2012). Gene networking and inflammatory pathway analysis in a JMJD3 knockdown human monocytic cell line. *Cell Biochem Funct* 30, 224-232.

Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M.T., Miclea, J.M., Chastang, C., Castaigne, S., and Fenaux, P. (1995). All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85, 2643-2653.

Ding, W., Li, Y.P., Nobile, L.M., Grills, G., Carrera, I., Paietta, E., Tallman, M.S., Wiernik, P.H., and Gallagher, R.E. (1998). Leukemic cellular retinoic acid resistance and missense mutations in the PML-RARalpha fusion gene after relapse of acute promyelocytic leukemia from treatment with all-trans retinoic acid and intensive chemotherapy. *Blood* 92, 1172-1183.

Drabkin, H.A., Parsy, C., Ferguson, K., Guilhot, F., Lacotte, L., Roy, L., Zeng, C., Baron, A., Hunger, S.P., Varella-Garcia, M., *et al.* (2002). Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 16, 186-195.

Du, H., and Taylor, H.S. (2004). Molecular regulation of mullerian development by Hox genes. *Ann N Y Acad Sci* 1034, 152-165.

Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., *et al.* (2012). Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet* 8, e1002774.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., *et al.* (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352, 254-266.

Ferrucci, P.F., Grignani, F., Pearson, M., Fagioli, M., Nicoletti, I., and Pelicci, P.G. (1997). Cell death induction by the acute promyelocytic leukemia-specific PML/RARalpha fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10901-10906.

Fischbach, N.A., Rozenfeld, S., Shen, W., Fong, S., Chrobak, D., Ginzinger, D., Kogan, S.C., Radhakrishnan, A., Le Beau, M.M., Largman, C., *et al.* (2005). HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 105, 1456-1466.

Ghannam, G., Takeda, A., Camarata, T., Moore, M.A., Viale, A., and Yaseen, N.R. (2004). The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* 279, 866-875.

Giampaolo, A., Felli, N., Diverio, D., Morsilli, O., Samoggia, P., Breccia, M., Lo Coco, F., Peschle, C., and Testa, U. (2002). Expression pattern of HOXB6 homeobox gene in myelomonocytic differentiation and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16, 1293-1301.

Giampaolo, A., Sterpetti, P., Bulgarini, D., Samoggia, P., Pelosi, E., Valtieri, M., and Peschle, C. (1994). Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 84, 3637-3647.

Gibson, B.E., Webb, D.K., Howman, A.J., De Graaf, S.S., Harrison, C.J., and Wheatley, K. (2011). Results of a randomized trial in children with Acute Myeloid Leukaemia: medical research council AML12 trial. *Br J Haematol* 155, 366-376.

Greaves, M.F. (1997). Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 349, 344-349.

Gregory, J., Kim, H., Alonzo, T., Gerbing, R., Woods, W., Weinstein, H., Shepherd, L., Schiffer, C., Appelbaum, F., Willman, C., *et al.* (2009). Treatment of children with acute promyelocytic leukemia: results of the first North American Intergroup trial INT0129. *Pediatr Blood Cancer* 53, 1005-1010.

Grier, D.G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G.J., Halliday, H.L., and Lappin, T.R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 205, 154-171.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F.F., Zamir, I., *et al.* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* *391*, 815-818.

Grignani, F., Ferrucci, P.F., Testa, U., Talamo, G., Fagioli, M., Alcalay, M., Mencarelli, A., Peschle, C., Nicoletti, I., and *et al.* (1993). The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* *74*, 423-431.

Hasle, H. (2014). A critical review of which children with acute myeloid leukaemia need stem cell procedures. *Br J Haematol* *166*, 23-33.

Hess, J.L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* *10*, 500-507.

Hiebert, S.W., Lutterbach, B., and Amann, J. (2001). Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the t(8;21), t(16;21), t(12;21), and inv(16) fusion proteins. *Curr Opin Hematol* *8*, 197-200.

Hollink, I.H., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Arentsen-Peters, S.T., Zimmermann, M., Peeters, J.K., Valk, P.J., Balgobind, B.V., Sonneveld, E., Kaspers, G.J., de Bont, E.S., *et al.* (2011). Characterization of CEBPA mutations and promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* *96*, 384-392.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* *377*, 397-404.

Horton, S.J., Grier, D.G., McGonigle, G.J., Thompson, A., Morrow, M., De Silva, I., Moulding, D.A., Kioussis, D., Lappin, T.R., Brady, H.J., *et al.* (2005). Continuous MLL-ENL expression is necessary to establish a "Hox Code" and maintain immortalization of hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res* *65*, 9245-9252.

Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y., and Li, E. (2007). Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* *39*, 391-396.

Chung, K.Y., Morrone, G., Schuringa, J.J., Plasilova, M., Shieh, J.H., Zhang, Y., Zhou, P., and Moore, M.A. (2006). Enforced expression of NUP98-HOXA9 in human CD34(+) cells enhances stem cell proliferation. *Cancer Res* *66*, 11781-11791.

Imaizumi, M., Suzuki, H., Yoshinari, M., Sato, A., Saito, T., Sugawara, A., Tsuchiya, S., Hatae, Y., Fujimoto, T., Kakizuka, A., *et al.* (1998). Mutations in the E-domain of RAR portion of the PML/RAR chimeric gene may confer clinical resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Blood* *92*, 374-382.

Inaba, H., Coustan-Smith, E., Cao, X., Pounds, S.B., Shurtleff, S.A., Wang, K.Y., Raimondi, S.C., Onciu, M., Jacobsen, J., Ribeiro, R.C., *et al.* (2012). Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* *30*, 3625-3632.

- Izon, D.J., Rozenfeld, S., Fong, S.T., Komuves, L., Largman, C., and Lawrence, H.J. (1998). Loss of function of the homeobox gene *Hoxa-9* perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* *92*, 383-393.
- Jasek, E., Mirecka, J., and Litwin, J.A. (2008). Effect of differentiating agents (all-trans retinoic acid and phorbol 12-myristate 13-acetate) on drug sensitivity of HL60 and NB4 cells in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* *46*, 323-330.
- Jin, L., Hanigan, C.L., Wu, Y., Wang, W., Park, B.H., Woster, P.M., and Casero, R.A. (2013). Loss of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) suppresses growth and alters gene expression of human colon cancer cells in a p53- and DNMT1(DNA methyltransferase 1)-independent manner. *Biochem J* *449*, 459-468.
- Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, A., Lehmann, S., Mollgard, L., Stockelberg, D., Tidefelt, U., Wahlin, A., and Hoglund, M. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* *113*, 4179-4187.
- Kappen, C. (2000). Disruption of the homeobox gene *Hoxb-6* in mice results in increased numbers of early erythrocyte progenitors. *Am J Hematol* *65*, 111-118.
- Kaspers, G.J., and Zwaan, C.M. (2007). Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* *92*, 1519-1532.
- Kelly, L.M., and Gilliland, D.G. (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *3*, 179-198.
- Kishimoto, M., Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H., and Kato, S. (2006). Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocr J* *53*, 157-172.
- Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T., and Sauvageau, G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J* *20*, 350-361.
- Kruidenier, L., Chung, C.W., Cheng, Z., Liddle, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., *et al.* (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* *488*, 404-408.
- Kundu, M., and Liu, P.P. (2001). Function of the *inv(16)* fusion gene *CBFB-MYH11*. *Curr Opin Hematol* *8*, 201-205.
- Kussick, S.J., and Wood, B.L. (2003a). Four-color flow cytometry identifies virtually all cytogenetically abnormal bone marrow samples in the workup of non-CML myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* *120*, 854-865.
- Kussick, S.J., and Wood, B.L. (2003b). Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Arch Pathol Lab Med* *127*, 1140-1147.
- Lange, B.J., Yang, R.K., Gan, J., Hank, J.A., Sievers, E.L., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., and Sondel, P.M. (2011). Soluble interleukin-2 receptor alpha activation in a Children's Oncology

Group randomized trial of interleukin-2 therapy for pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 57, 398-405.

Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsirigos, A., Ong, C.T., Low, H.M., Kin Sung, K.W., Rigoutsos, I., Loring, J., *et al.* (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 20, 320-331.

Lawrence, H.J., Helgason, C.D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D.J., Humphries, R.K., and Largman, C. (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89, 1922-1930.

Linggi, B., Muller-Tidow, C., van de Locht, L., Hu, M., Nip, J., Serve, H., Berdel, W.E., van der Reijden, B., Quelle, D.E., Rowley, J.D., *et al.* (2002). The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 8, 743-750.

Liu, J., Mercher, T., Scholl, C., Brumme, K., Gilliland, D.G., and Zhu, N. (2012). A functional role for the histone demethylase UTX in normal and malignant hematopoietic cells. *Exp Hematol* 40, 487-498 e483.

Lund, A.H., and van Lohuizen, M. (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 16, 239-246.

Magli, M.C., Barba, P., Celetti, A., De Vita, G., Cillo, C., and Boncinelli, E. (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6348-6352.

Magli, M.C., Largman, C., and Lawrence, H.J. (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J Cell Physiol* 173, 168-177.

Mallo, M., Wellik, D.M., and Deschamps, J. (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev Biol* 344, 7-15.

Martens, J.H., Brinkman, A.B., Simmer, F., Francoijs, K.J., Nebbioso, A., Ferrara, F., Altucci, L., and Stunnenberg, H.G. (2010). PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Cell* 17, 173-185.

Mayer J, S.J. (2002). *Leukemie*, Vol 357 s ( Praha: Grada Publishing, spol. s r. o.).

Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D., and Hess, J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.

Montavon, T., and Soshnikova, N. (2014). Hox gene regulation and timing in embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 34, 76-84.

Nervi, C., Ferrara, F.F., Fanelli, M., Rippon, M.R., Tomassini, B., Ferrucci, P.F., Ruthardt, M., Gelmetti, V., Gambacorti-Passerini, C., Diverio, D., *et al.* (1998). Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* 92, 2244-2251.

- Nguyen Kovochich, A., Arensman, M., Lay, A.R., Rao, N.P., Donahue, T., Li, X., French, S.W., and Dawson, D.W. (2013). HOXB7 promotes invasion and predicts survival in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* *119*, 529-539.
- Ntziachristos, P., Tsirigos, A., Welstead, G.G., Trimarchi, T., Bakogianni, S., Xu, L., Loizou, E., Holmfeldt, L., Strikoudis, A., King, B., *et al.* (2014). Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* *514*, 513-517.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247-257.
- Ono, R., Nosaka, T., and Hayashi, Y. (2005). Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis. *Int J Hematol* *81*, 288-293.
- Peterson, L.F., and Zhang, D.E. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene* *23*, 4255-4262.
- Pineault, N., Abramovich, C., Ohta, H., and Humphries, R.K. (2004). Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol* *24*, 1907-1917.
- Pineault, N., Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Rosten, P., Hogge, D.E., Aplan, P.D., and Humphries, R.K. (2003). Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood* *101*, 4529-4538.
- Pollard, J.A., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Ho, P.A., Zeng, R., Ravindranath, Y., Dahl, G., Lacayo, N.J., Becton, D., Chang, M., *et al.* (2010). 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* *115*, 2372-2379.
- Puumala, S.E., Ross, J.A., Aplenc, R., and Spector, L.G. (2013). Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* *60*, 728-733.
- Raaphorst, F.M., Otte, A.P., and Meijer, C.J. (2001). Polycomb-group genes as regulators of mammalian lymphopoiesis. *Trends Immunol* *22*, 682-690.
- Raelson, J.V., Nervi, C., Rosenauer, A., Benedetti, L., Monczak, Y., Pearson, M., Pelicci, P.G., and Miller, W.H., Jr. (1996). The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* *88*, 2826-2832.
- Ravandi, F., Kantarjian, H., Faderl, S., Garcia-Manero, G., O'Brien, S., Koller, C., Pierce, S., Brandt, M., Kennedy, D., Cortes, J., *et al.* (2010). Outcome of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res* *34*, 752-756.
- Robertson, K.D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* *20*, 3139-3155.

Rocha-Viegas, L., Villa, R., Gutierrez, A., Iriondo, O., Shiekhattar, R., and Di Croce, L. (2014). Role of UTX in retinoic acid receptor-mediated gene regulation in leukemia. *Mol Cell Biol* *34*, 3765-3775.

Roche, J., Zeng, C., Baron, A., Gadgil, S., Gemmill, R.M., Tigaud, I., Thomas, X., and Drabkin, H.A. (2004). Hox expression in AML identifies a distinct subset of patients with intermediate cytogenetics. *Leukemia* *18*, 1059-1063.

Ross, J.A. (2000). Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia? *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 4411-4413.

Sandahl, J.D., Kjeldsen, E., Abrahamsson, J., Ha, S.Y., Heldrup, J., Jahnukainen, K., Jonsson, O.G., Lausen, B., Palle, J., Zeller, B., *et al.* (2015). The applicability of the WHO classification in paediatric AML. A NOPHO-AML study. *Br J Haematol* *169*, 859-867.

Sano, H., Shimada, A., Taki, T., Murata, C., Park, M.J., Sotomatsu, M., Tabuchi, K., Tawa, A., Kobayashi, R., Horibe, K., *et al.* (2012). 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* *95*, 509-515.

Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 12223-12227.

Shurtleff, S.A., Meyers, S., Hiebert, S.W., Raimondi, S.C., Head, D.R., Willman, C.L., Wolman, S., Slovak, M.L., Carroll, A.J., Behm, F., *et al.* (1995). Heterogeneity in CBF beta/MYH11 fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia. *Blood* *85*, 3695-3703.

Schnittger, S., Kohl, T.M., Haferlach, T., Kern, W., Hiddemann, W., Spiekermann, K., and Schoch, C. (2006). KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* *107*, 1791-1799.

Sievers, E.L., Lange, B.J., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Bernstein, I.D., Smith, F.O., Arceci, R.J., Woods, W.G., and Loken, M.R. (2003). 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* *101*, 3398-3406.

Slape, C., and Aplan, P.D. (2004). The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk Lymphoma* *45*, 1341-1350.

Sorrell, A.D., Alonzo, T.A., Hilden, J.M., Gerbing, R.B., Loew, T.W., Hathaway, L., Barnard, D., Taub, J.W., Ravindranath, Y., Smith, F.O., *et al.* (2012). Favorable survival maintained in children who have myeloid leukemia associated with Down syndrome using reduced-dose chemotherapy on Children's Oncology Group trial A2971: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer* *118*, 4806-4814.



Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* *106*, 274-286.

Speleman, F., Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Verhasselt, B., Poppe, B., Van Roy, N., Vandesompele, J., Graux, C., Uyttebroeck, A., *et al.* (2005). A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* *19*, 358-366.

Starkova, J., Zamostna, B., Mejstrikova, E., Krejci, R., Drabkin, H.A., and Trka, J. (2010). HOX gene expression in phenotypic and genotypic subgroups and low HOXA gene expression as an adverse prognostic factor in pediatric ALL. *Pediatr Blood Cancer* *55*, 1072-1082.

Tan, Y.T., Sun, Y., Zhu, S.H., Ye, L., Zhao, C.J., Zhao, W.L., Chen, Z., Chen, S.J., and Liu, H. (2016). Deregulation of HOX genes by DNMT3A and MLL mutations converges on BMI1. *Leukemia* *30*, 1609-1612.

Testi, A.M., Biondi, A., Lo Coco, F., Moleti, M.L., Giona, F., Vignetti, M., Menna, G., Locatelli, F., Pession, A., Barisone, E., *et al.* (2005). GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood* *106*, 447-453.

Thompson, A., Quinn, M.F., Grimwade, D., O'Neill, C.M., Ahmed, M.R., Grimes, S., McMullin, M.F., Cotter, F., and Lappin, T.R. (2003). Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood* *101*, 1558-1565.

Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K., and Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* *99*, 121-129.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Hough, M.R., Dragowska, W., Lansdorp, P.M., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1997a). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* *17*, 495-505.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (1997b). Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematol Oncol Clin North Am* *11*, 1221-1237.

T

oren, A., Ackerstein, A., Slavin, S., and Nagler, A. (1995). Role of interleukin-2 in human hematological malignancies. *Med Oncol* *12*, 177-186.

Tsumagari, K., Baribault, C., Terragni, J., Chandra, S., Renshaw, C., Sun, Z., Song, L., Crawford, G.E., Pradhan, S., Lacey, M., *et al.* (2013). DNA methylation and differentiation: HOX genes in muscle cells. *Epigenetics Chromatin* *6*, 25.

van Lohuizen, M., Frasch, M., Wientjens, E., and Berns, A. (1991). Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2. *Nature* 353, 353-355.

van Lochem, E.G., van der Velden, V.H., Wind, H.K., te Marvelde, J.G., Westerdaal, N.A., and van Dongen, J.J. (2004). Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 60, 1-13.

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

Vitaliano-Prunier, A., Halftermeyer, J., Ablain, J., de Reynies, A., Peres, L., Le Bras, M., Metzger, D., and de The, H. (2014). Clearance of PML/RARA-bound promoters suffice to initiate APL differentiation. *Blood* 124, 3772-3780.

Weick, J.K., Kopecky, K.J., Appelbaum, F.R., Head, D.R., Kingsbury, L.L., Balcerzak, S.P., Bickers, J.N., Hynes, H.E., Welborn, J.L., Simon, S.R., *et al.* (1996). A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 88, 2841-2851.

Xia, Z.B., Anderson, M., Diaz, M.O., and Zeleznik-Le, N.J. (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8342-8347.

Yamamoto, K., Nakamura, Y., Saito, K., and Furusawa, S. (2000). Expression of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in the blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia with t(7;11)(p15;p15). *Br J Haematol* 109, 423-426.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., *et al.* (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434-2439.

Yang, J., and Fang, X. (2012). [Expression of DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b in eutopic endometrium]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37, 94-99.

Yoshida, H., Kitamura, K., Tanaka, K., Omura, S., Miyazaki, T., Hachiya, T., Ohno, R., and Naoe, T. (1996). Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 2945-2948.

Zandvliet, D.W., Hanby, A.M., Austin, C.A., Marsh, K.L., Clark, I.B., Wright, N.A., and Poulson, R. (1996). Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by in situ hybridisation. *Biochim Biophys Acta* 1307, 239-247.

Zeisig, B.B., Milne, T., Garcia-Cuellar, M.P., Schreiner, S., Martin, M.E., Fuchs, U., Borkhardt, A., Chanda, S.K., Walker, J., Soden, R., *et al.* (2004). Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* 24, 617-628.

Zhang, Q., Jin, X.S., Yang, Z.Y., Wei, M., Liu, B.Y., and Gu, Q.L. (2013). Upregulated Hoxc6 expression is associated with poor survival in gastric cancer patients. *Neoplasma* 60, 439-445.

Zimmermann, F., and Rich, I.N. (1997). Mammalian homeobox B6 expression can be correlated with erythropoietin production sites and erythropoiesis during development, but not with hematopoietic or nonhematopoietic stem cell populations. *Blood* 89, 2723-2735.

## **11 Přílohy**