

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Jana Blažková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Gen HOXA9 a transformace krvetvorných buněk při leukémii
Bakalářská práce

2020

Jana Blažková

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana Blažková**
Osobní číslo: **C16170**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Gen HOXA9 a transformace krvetvorných buněk při leukémii**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Charakterizovat leukémii a její jednotlivé typy.
2. Popsat fyziologický průběh hematopoézy.
3. Seznámit s homeoboxovými geny.
4. Vysvětlit gen HOXA9, jeho fyziologické funkce, regulaci expresi genu HOXA9.
5. Popsat vliv genu HOXA9 na prognózu leukémie.
6. Probíhající klinické studie.
7. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30.6. 2020

Jana Blažková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za ochotu, přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Pojem homeobox vznikl spojením „homeo“ – stejný, pocházející z výrazu homeóza a „box“ – oblast. Homeoboxové geny hrají řídicí roli při tvorbě a diferenciaci tkání především za embryonálního vývoje. Poruchy regulace homeoboxových genů úzce souvisí vývojovými abnormalitami a širokou řadou chorob u dospělých. Výskyt rakoviny je často spojen s porušením regulace homeoboxového genu. Maligní onemocnění krevních buněk je jednou z častých malignit jak v dětském věku, tak i u dospělých, proto se výzkum leukémie stal zásadní pro mnoho vědců. Doposud není prokázáno, jaké stádium maligní transformace je homeoboxovými geny ovlivněno. Předmětem lékařského výzkumu je i zkoumání významu homeoboxových genů v patogenezi, zda mají klíčový nebo jen vedlejší efekt. HOXA9 je řazen mezi nejvíce prozkoumaný homeoboxový gen v leukemogenezi. Je potvrzen vzájemný vztah HOXA9 s prognózami pacientů u některých leukémií. HOXA9 by mohl být považován za cíl budoucích leukemických terapií, protože byl popsán v mnoha studiích vliv HOXA9 na leukemickou transformaci buněk. Tato bakalářská práce je zaměřena na leukémie, a především na gen HOXA9, u něhož je patrná souvislost s leukemickou transformací krevních buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Gen HOXA9, homeoboxové geny, leukémie, hematopoéza, leukemická transformace krevních buněk

TITLE

HOXA9 gene and hematopoietic stem cell transformation in leukemia

ANNOTATION

The term homeobox originated from the combination "homeo" - the same, derived from the term homeosis and "box" - area. Homeobox genes play a controlling role in tissue formation and differentiation, especially during embryonic development. Disorders of homeobox gene regulation are closely related to developmental abnormalities and a wide range of diseases in adults. The occurrence of cancer is often associated with dysregulation of the homeobox gene. Blood cell malignancy is one of the common malignancies in both children and adults, so leukemia research has become essential for many scientists. It is not yet proven what stage of malignant transformation is affected by homeobox genes. The subject of medical research is also the study of the importance of homeobox genes in the pathogenesis, whether they have a key or only a side effect. HOXA9 is ranked among the most studied homeobox genes in leukemogenesis. The relationship of HOXA9 with the prognosis of patients with some leukemias is confirmed. HOXA9 could be considered a target for future leukemic therapies, as the effect of HOXA9 on leukemic cell transformation has been described in many studies. This bachelor thesis is focused on leukemia, and especially on the HOXA9 gene, which is clearly associated with leukemic transformation of blood cells.

KEYWORDS

HOXA9 gene, homeobox genes, leukemia, hematopoiesis, leukemic transformation of blood cell

OBSAH

ÚVOD.....	17
1 HEMATOPOÉZA	19
2 LEUKÉMIE	22
2.1 Historie.....	22
2.2 Onkologická hematologie.....	24
2.3 Rozdělení leukémií.....	24
2.1.1 Akutní myeloidní leukemie	25
2.1.2 Akutní lymfocytární leukemie	25
2.1.3 Chronická myeloidní leukemie.....	26
2.1.3.1 Filadelfský chromosom.....	27
2.1.4 Chronická lymfocytární leukemie	28
2.4 Diagnostika leukémie.....	29
2.5 Klinický obraz leukémie.....	31
2.6 Léčba leukémie.....	32
2.7 Transplantace kostní dřeně.....	33
3 HOMEBOXOVÉ GENY.....	36
3.1 Role HOX genů spojených s hematopoézou	36
3.2 Konkrétní příklady HOX genů v hematopoéze	38
3.3 HOX geny v leukemogenezi	39
4 HOXA9	41
4.1 HOXA9 v hematopoéze	41
4.2 Regulace HOXA9.....	42
4.3 HOXA9 v leukemogenezi	43
4.3.1 Evolučně konzervované transkripční faktory HOXA9 A MEIS1	44
4.3.2 Fúzní onkogen NUP98-HOXA9.....	45
4.3.3 HOXA9 spojený s leukémií se smíšenou linií	46

4.4	Proteiny a geny regulované pomocí HOXA9	47
4.5	Budoucí cíle léčby spojené s HOXA9	49
5	ZÁVĚR	50
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
7	ZDROJE OBRÁZKŮ A PŘÍLOH	59

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Dichotomický klasický model hematopoézy	21
Obrázek 2: Rudolf Ludwig Karl Virchow	23
Obrázek 3: Mléčné sérum pacienta s leukémií získané extrakcí	24
Obrázek 4: Filadelfský chromozóm	27
Obrázek 5: Genetické faktory CLL	29
Obrázek 6: Schéma, které znázorňuje výklenek kostní dřeně, kde dochází k vývoji HSC na primární linii	35
Obrázek 7: Karyotyp t (7;11) (p15; p15) pacienta s AML	46

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Hierarchie hematopoézy	61
Příloha 2: Atlas znázorňující morfologii leukemických buněk	62

SEZNAM ZKRATEK

ABL1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
ALL	akutní lymfocytární leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ATM	Serine/threonine kinase
AYA	Adolescent and young adult
BAD	BCL2-associated agonisto of cell death
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region
BM	kostní dřeň
CDX4	Caudal type homeobox 4
CLL	chronická myeloidní leukémie
CLP	běžný lmfoidní progenitor
CML	chronická myeloidní leukémie
CMP	běžný myeloidní progenitor
c-MYC	c-myb mxeloblastosis viral oncogene factor 4E
CNS	centrální nervový systém
CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptid
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
FCR	režim kombinující léčiva bludarabin, cyklofosfamid, rituximab
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
GMP	Progenitory granulocytů a makrofágů
HEX	Hematopoietically expressed homeobox
HLA	Human leukocyte antigen
HOX geny	Homeoboxové geny
HSC	Hematopoietic stem cell
HSPC	krvetvorné kmenové buňky a progenitorové buňky
IGF-1R	receptor pro růstový faktor
LIC	Leukemia-initiating cell
LMPP	Multipotentní lymfoidní progenitor
LSC	leukemická kmenová buňka
MEIS1	Myeloid ecotropic viral integration site 1

MEN1	Multiple endocrine neoplasia type 1
MEP	Progenitory megakaryocytů a erytrocytů
miRNA	MicroRNA
MLL	Mixed lineage leukemia
MN1	Meningoma 1
MPD	myeloproliferativní poruchy
MPP	multipotentní hematopoetický progenitor
MSC	mezenchymální kmenová buňka
MSX	Muscle segment homeobox gene
MRD	Detection of minimal residual disease
NK buňky	Natural killers
NUP98	Nucleoporin 98 and 96 precursor
ODC	Ornithindekarboxyláza
PAX	Pair-rule gene
PBX1	Pre-B-cell leukemia factor 1
Ph	filadelfský chromozóm
PIM1	pim-1 oncogene
PKC	Protein kinase C
SMAD4	Family member 4
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tc	Cytotoxic T lymfocyt
Th	Helper T lymfocyt
TK	tyrosinkináza
TKI	inhibitor tyrosinkinázy
TPO	trombopoetin
WBC	White blood cell leukocyt

TERMINOLOGIE

Aberace – strukturní změna chromozomů, chromozomová mutace

Alogenní transplantace – přenos tkáně nebo orgánu mezi dvěma lidmi nebo mezi dvěma kmeny zvířat

Autologní transplantace – tkáň pocházející od téhož jedince

CD – jednotné označení antigenů molekul na povrchu buněk, které jsou charakteristické pro jejich jednotlivé skupiny a druhy. CD antigeny jsou důležité pro funkce jednotlivých buněk.

Diferenciace – vývojové rozlišení

Down regulace – regulace směrem dolů, snížení odpovědi na stimulaci v důsledku poklesu až chybění složek zodpovědných za přenos této stimulace k výkonným složkám

Extramedulární – vyskytující se nebo probíhající mimo kostní dřeň

Fosforylace – jedná se o metabolickou reakci, při které se na danou sloučeninu naváže jedna nebo více molekul fosfátu

Interakce – vzájemné působení dvou a více činitelů

Klast – HOX geny vytvářející na chromozomu shluk (cluster), jsou uspořádány zleva doprava

Klonální – vznikající z jednoho předchůdce nepohlavním dělením

Kompartiment – jedná se o část celku, která má specifické vlastnosti a je oddělen od ostatních částí

Latence – doba mezi podnětem a zjevným projevem

Lokus – je místo (pozice) určitého genu na chromozomu

Megakaryocyt – buňka kostní dřeně, z níž se tvoří krevní destičky

Nukleocytoplazmatický transport – jedná se o přesně regulovaný proces, který řídí výměnu a buněčnou distribuci proteinů a RNA mezi jádrem a cytoplazmou

Patogeneze – vznik a vývoj chorobných změn v těle

Proliferace – bujení, novotvoření, růst, zvyšování počtu buněk v tkáni či orgánu

Promotor – je sekvence DNA, na kterou se váže RNA polymeráza či jiné součásti transkripčního aparátu

Remise – vymizení příznaků a projevů onemocnění, nikoliv nemoci samé

Replikace – zmnožení, zdvojení

Supresor – má za úkol potlačovat, tlumit účinek

Transdukce – proces, ve kterém bakteriofág vnáší vlastní genetický materiál do napadených bakterií a vyvolá tak u nich nové vlastnosti

Transferáza – jedná se o třídu enzymů, které katalyzují chemické reakce, při nich dochází k přenosu funkčních skupin z jedné molekuly zvané donor na druhou molekulu zvanou akceptor

Transformace – přeměna, přetvoření

Transkripce – je přepis genetické informace z DNA na molekulu RNA

Translokace – jedná se o strukturní přestavbu, která vzniká přemístěním části chromozómu mezi nehomologními chromozómy

Up regulace – regulace směrem ke zvýšení odpovědi na určitý stimulus (Fallini et al., 2020; Velký lékařský slovník On-line)

ÚVOD

Leukémie je charakterizována nadměrnou tvorbou abnormálně pozměněných krvinek, jejímž následkem je poté nedostatek normálních krvinek. Jde o zhoubný nádor leukocytů, které jsou jednou ze složek imunitního systému u člověka. Nedostatek leukocytů vede k častějším infekcím. Akutní lymfocytární leukémie (ALL), je nejběžněji vyskytujícím typem u dětí. Akutní myeloidní leukémie (AML) je nejčastějším typem akutní leukémie u dospělých. Různým typům leukémie podlehe zhruba v ČR zhruba 700 lidí ročně, nejčastěji ve věku 75 až 79 let. Pacientů onemocní přibližně ročně 1300, výskyt se tedy od konce 90. let výrazně nezměnil. Ze statistik vyplývá, že více nemocných přežije. Léčba spočívá v chemoterapii a u pacientů, kteří jsou zákroku schopní, následně je u nich provedena transplantace kostní dřeně.

R. Virchow byl první, který zavedl pojem leukémie již v roce 1847 a Bennet v roce 1851 nazval onemocnění „leukocytémií“. Od té doby bylo ve výzkumu leukémie s pomocí dalších vědců a doktorů učiněno mnoho významných objevů, které zásadně ovlivnily přístup k tomuto onemocnění. Genová podstata leukémie hraje velmi důležitou roli, co se týká jak příčin nebo mechanismů vedoucích k tomuto onemocnění. U mnohých leukémií se v nádorových leukocytech najdou změny genetické výbavy těchto buněk, které se v nich objevily v průběhu pacientova života, pouze výjimečně mají dědičný základ. Pod těmito abnormalitami v genomu kmenových buněk a progenitorů hematopoézy vedoucím ke vzniku leukémie, si můžeme představit nejen bodové mutace a chromozómalní aberace, ale i numerické změny v počtu chromozómů.

Za prvořadý zájem u vědců je studovat geny, u kterých by mutace, případně deregulace jejich exprese vedla ke vzniku onemocnění. Vysoce evolučně konzervovaná genová rodina homeoboxových (HOX) genů patří mezi takové geny. Homeobox je specifická sekvence DNA dlouhá asi 180 nukleových bází, která se nachází na kraji některých genů. Geny, které homeobox obsahují, jsou označovány jako homeoboxové geny. Homeobox, který obsahuje 60 aminokyselin je schopen po své translaci se navázat jako tzv. homeodoména na DNA a fungovat jako transkripční faktory. Podstatnou úlohu mají HOX geny ve vývoji krevních buněk neboli hematopoéze. Důležité je i načasování exprese HOX genů, geny na 3' konci jsou exprimovány před geny na 5' konci.

Zaměření bakalářské práce je zacíleno na vliv HOX genů v hematopoéze a na jejich význam ve vývoji leukémií. Z rodiny HOX genů se práce zabývá především genem HOXA9, který je zařazen do I. třídy HOX genů. Gen HOXA9 patří mezi jeden z nejvíce prozkoumaných

genů skupiny HOX. HOXA9 je obzvláště zajímavý z hematopoetického hlediska, protože jeho dysfunkce se podílí na rozvoji akutních leukémií a jeho exprese se výrazně liší mezi liniemi erytrocytů v různých stádiích vývoje. U pacientů s CML byla zaznamenána zvýšená exprese HOXA9. U akutních leukémií byla exprese HOXA9 spolu s dalšími HOX geny spojena s lékařskou prognózou rozvoje onemocnění. U pacientů s dobrou cytogenetickou prognózou byla pozorována nižší hladina exprese HOX genů. U pacientů s AML byl gen HOXA9 klasifikován jako marker nepříznivé prognózy. Jeho skutečná funkce v hematopoéze a vývoji leukémie není do dnešní doby úplně vysvětlena. HOXA9 gen je pro výzkum stále velmi důležitý.

1 HEMATOPOÉZA

Hematopoéza znamená tvorbu krevních buněčných složek. Probíhá již během embryonálního vývoje společně se vznikem a rozvojem oběhové soustavy a v dospělosti zodpovídá za obnovu krevních elementů. Vědcům a lékařům může studium hematopoézy pomoci porozumět procesům, které způsobují poruchy krve a rozvoj rakoviny. Hematopoéza je za embryonálního vývoje soustředěna do oblasti žloutkového vaku, poté přechází do jater a sleziny, a nakonec se krvetvorba přesouvá do kostní dřeně. Kostní dřeň je hlavním hematopoetickým orgánem, je tady přítomna zásoba hematopoetických kmenových buněk (Penka et al., 2011; Jagannathan-Gogdan et al., 2013).

Hematopoéza je vhodným modelem pro zkoumání vztahů mezi buňkami orgánového systému. Při hematopoéze se uplatňují interakce mezi vyvíjejícími buňkami a stromálními buňkami odvozenými od mesenchymů. Proto byly vyvinuty kultivační systémy, které začleňují adhezující nelymfoidní buňky k podpoře tvorby myeloidních nebo lymfoidních buněk. Při studiu krvetvorby byly identifikovány hematopoetické kmenové buňky (HSC), které byly izolovány z kostní dřeně. Z HSC mohou být obnovovány všechny krevní linie dospělého člověka. CD34 je běžný marker pro identifikaci HSC (Ceredig et al., 2009).

HSC mají schopnost regenerace během celého života organismu a jsou schopny generovat všechny typy krvinek prostřednictvím progenitorů, které jsou hierarchicky uspořádané. Díky tomu se udržuje homeostáza zralého krevního systému. V procesech, které kontrolují regeneraci, je nutná přísná regulace, specifikace a diferenciací linie. Charakteristika mechanismů, kterými se řídí další vývoj HSC, je proto ústřední problematikou ve výzkumu kmenových buněk.

Převládající model posledních tří desetiletí je klasický model hematopoézy. Jedná se o dichotomický model (viz Obr.1), v němž se z multipotentních HSC vytvářejí všechny zralé typy krvinek. HSC mají schopnost regenerace, kterou jejich potomci v následujícím diferenciacním stádiu ztrácejí. Vznikají tak multipotentní hematopoetické progenitory (MPP). MPP poté produkují běžné myeloidní progenitory (CMP) a běžné lymfoidní progenitory (CLP).

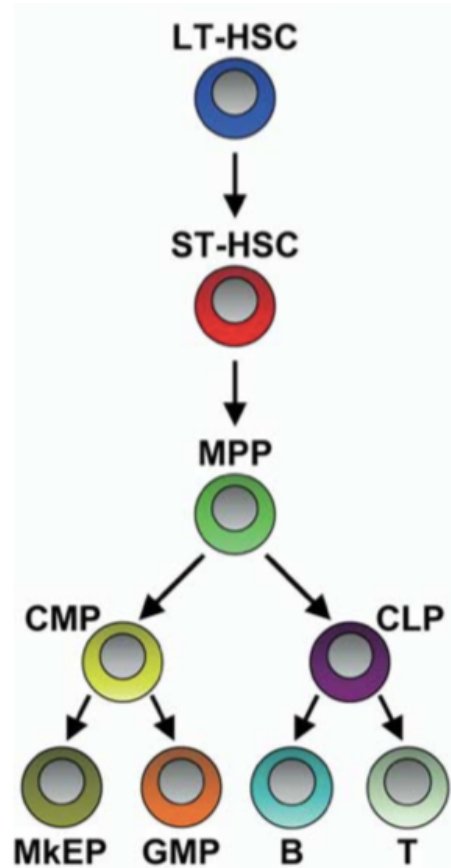
CMP generuje progenitory granulocytů a makrofágů (GMP) a megakaryocytů a erytrocytů (MEP). Z megakaryocytů se tvoří trombocyty, což jsou bezjaderné krevní elementy, které se podílejí zejména na zástavě krvácení a srážení krve. Erytrocyty jsou zásadní pro přenos krevních plynů. Granulocyty a makrofágy jsou důležitými složkami nespecifické imunity.

CLP vytváří progenitory NK buněk a lymfocyty typu B a T. T a B lymfocyty jsou součástí specifické imunitní odpovědi. Vývoj lymfocytů probíhá v kostní dřeni a brzlíku, jedná se o nezralé buňky a po setkání s antigenem se mění na zralé (imunokompetentní) buňky. T lymfocyty tvoří jednotlivé subtypy lymfocytů: pomocné lymfocyty (T_h) a cytotoxické lymfocyty (T_c) + regulační T_{reg} (Görgens et al., 2013).

Klasický dichotomický model předpokládal, že buňky, které jsou ve stádiu CMP a CLP se budou dále diferenciovat na myeloidní a lymfoidní linii buněk (viz Příloha 1).

Byly však identifikovány lidské progenitory, které zahrnují plný nebo částečný lymfoidní potenciál s omezenými myeloidními schopnostmi. Podle současné hypotézy mají oba prekurzory duální potenciál (myeloidní, tak i lymfoidní). Mimo klasický dichotomický model byla vytvořena řada dalších modelů. Poznatky o hematopoéze jsou založeny na údajích z testů *in vivo* a *in vitro*. Ty navrhují pestré buněčné osudy, které jsou specifické pro jednotlivé progenitorové buňky. Multipotentní lymfoidní progenitory (LMPP) byly objeveny u myši při zkoumání lymfoidní vývojové kapacity. Mohou vést ke tvorbě granulocytů a makrofágů, ale netvoří megakaryocyty nebo erytrocyty.

Většina modelů hematopoézy je založená na větvení, ve kterém se postupně snižuje diferenciační potenciál progenitorů. S novými poznatky přestává být tento přístup k popisu hematopoézy dostatečný a jsou vytvářeny nové modely, které lépe představují souvislé vztahy mezi HSC, progenitory a výslednými diferencovanými buňkami (Ceredig et al., 2009).



Obrázek 1: Dichotomický klasický model hematopoézy (Převzato z: Adolfsson et al., 2005)

LT-HSC dlouhodobá HSC, **ST-HSC** krátkodobá HSC, **MPP** multipotentní progenitor, **CMP** společný myeloidní progenitor, **CLP** společný lymfoidní progenitor, **MkEP** megakaryocyt/erytroidní progenitor, **GMP** granulocyt/makrofágový progenitor, **B** B-lymfocyt, **T** T-lymfocyt

2 LEUKÉMIE

Pojmenování leukémie pochází z řeckých slov „*leukos*“ a „*heima*“, ty jsou vztažena na nadbytek leukocytů v těle. Koncem 19. století byla leukémie rozdělena na základní čtyři podtypy: AML, ALL, CML a CLL. V současnosti diagnóza leukémie zahrnuje veškerou řadu hematopoetických novotvarů, ty mohou být komplexní nebo zcela jedinečné (Blackburn et al., 2019).

2.1 Historie

O objev leukémie se zasloužili Alfred Velpeau, Alfred Donné, John Bennett a Rudolf Virchow. Všichni čtyři jsou uvedeni jako „ten“ objevitel leukémie. Aby byl vytvořen časově posloupný přehled o počátcích leukémie, budou uvedeni všichni čtyři lékaři, kteří přispěli k objevu leukémie.

Peter Cullen byl lékař a první, kdo popsal případ pacienta trpícího dle našich současných znalostí pravděpodobně chronickou leukémií. Tento pacient přišel s horečkou a intenzivní bolestí břicha a jeho krevní sérum bylo na pohled podobné mléku. Cullen nemoc popisoval jako „*splenitis acutus*“ (akutní hyperplazie sleziny). Pacienta léčil pouštěním žilou a odebrané vzorky krve, kterých bylo dohromady 5, také popsal. U prvních tří vzorků mělo sérum nadále barvu přirovnatelnou k mléku nejspíše způsobenou hromaděním leukocytů. Poslední dva vzorky vypadaly přirozeně. Jeho kolega, Dr. Hooper, po prozkoumání vzorku krve od Cullenova pacienta postřehl, že se sérum sestávalo téměř úplně z koagulovatelné lymfy. Cullen věřil, že u pacienta došlo k rychlé absorpci tuku a následné tvorbě přírodní emulze. Neměl však žádné vysvětlení pro mléčné sérum a jeho význam ve vztahu k akutní hyperplazii sleziny. Cullen zvolil léčbu kalomelem (chlorid rtuťnatý) a zdálo se, že se pacient zotavil.

Alfred Armand Louis Marie Velpeau (1775-1867) byl lékař, který charakterizoval příznaky spojené s leukémií ve vztahu se zvýšením počtu leukocytů (mléčné sérum). Z jeho poznatků se čerpá do dnešní doby a vedou k včasné diagnóze leukémie. Velpeau stojí za prvním přesným popisem pacienta s leukémií při pitvě. V roce 1827 publikoval případ u 63letého pacienta jménem Vernis. Pacient měl příznaky, které byly: intenzivní otok břicha, horečky, slabost a močové kameny. Nemoc vypukla v jeho 54 letech. Další 3 roky následovala stabilní fáze onemocnění. Následně se u pacienta projeví opakované horečky v důsledku zánětu. Po čtyřech letech si Vernis stěžoval na potíže s močením a byla mu podávána diuretika. Rok nato

byly u něj pozorovány dva nádory umístěné na levé straně břicha. Krátce poté byl Vernis přijat do nemocnice a další ráno zemřel. Velpeau provedl pitvu a jeho pozornost upoutala zvětšená játra a slezina. Zkoumal a zaznamenal také změnu složení krve. Sérum bylo husté jako kaše a celkově působilo, jako krev naplněná hnisem. Velpeau podezříval spojení tohoto onemocnění s oběhovým systémem.

Alfred Francois Donné (1801-1878) byl lékař, který identifikoval krevní destičky. Byl také prvním lékařem, který je zodpovědný za přesné mikroskopické vyšetření, popis a obraz pozměněného složení krve, které se vyskytuje u pacientů s leukémií. V roce 1845 zveřejnil Donné Atlas (viz Příloha 2), ve kterém jsou mikroskopické ilustrace znázorňující morfologii leukemických buněk.

John Hughes Bennett (1812-1857) byl lékařem, který jako první zavedl pojem leukocytémie, což je akumulace leukocytů.

Lékař Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902; viz Obr.2) pozoroval u pacientů převrácený poměr mezi bílými a červenými krvinkami a nemoc v roce 1847 označil pojmem „leukämie“. Virchow začal rozlišovat splenickou a lymfatickou leukémií.



Obrázek 2: Rudolf Ludwig Karl Virchow (Převzato z: Kampen, 2012)

K včasnému pochopení leukémie se přišlo postupným procesem, nelze jmenovat „objevitele leukémie“, nýbrž se o objev se zasloužilo více lékařů a jejich pacientů. Všichni lékaři se shodli a popsali změnu krve jako: mléčnou hnisavou směs, hnisavé globule hmoty a

lymfy, nebo také hnisající tělíska. (viz Obr. 3) poukazuje na „mléčné“ sérum, které je získané extrakcí od pacienta s leukémií (Kampen, 2012).



Obrázek 3: Mléčné sérum pacienta s leukémií získané extrakcí (Převzato z: Kampen, 2012)

2.2 Onkologická hematologie

Jako hematologické malignity jsou označovány klonální choroby, které vznikají z hematopoetických buněk. Ty mohou být zcela nezralé, nebo mohou být v určitém pokročilejším stadiu vývoje vymizet. Klonálním vývojem rozumíme, že všechny buňky nádorů vznikají z jediné buňky, která se nádorově zvrhla. Tuto skutečnost lze prokázat některými zcela totožnými znaky příslušných buněk. V dceřiných buňkách se tedy vzniklá anomálie opakuje, takto vzniká populace nádorových elementů. Vzniklá populace utlačuje krvetvorbu.

2.3 Rozdělení leukémií

Hematologická nádorová onemocnění můžeme rozdělit na nemoci myeloidní a lymfoidní. Myeloidní multipotentní/oligopotentní buňka vzniká z pluripotentní/multipotentní kmenové buňky a dává v průběhu hematopoézy vznik buňkám myeloidní řady. Z těchto buněk za normálních podmínek vzniknou erytrocyty, trombocyty, monocyty a neutrofilní, eozinofilní či bazofilní segmenty. V totipotentní/multipotentní kmenové buňce (tato buňka se může vyvíjet směrem k oběma liniím) mohou nastat změny, které naruší vývoj pouze jedné linie. Lymfoidní nádory vznikající z pluripotentní/multipotentní kmenové buňky, dávají během hematopoézy vznik T-lymfocytům, B-lymfocytům a NK buňkám. U nádorů hematopoetických tkání

rozlišujeme stavy akutní a chronické. Akutní neléčená leukémie způsobí smrt nemocného v řádech týdnů či měsíců. Chronická neléčená leukémie umožňuje přežití v řádech měsíců či let. Toto rozdělení na akutní a chronickou leukémii poukazuje na schopnost buněk vyzávat obdobně jako při běžném vývoji hematopoetických buněk. Morfologicky nevyvinuté elementy (blasty) jsou nalézány u akutních leukémií. Naopak je tomu u chronických leukémií, kde různými diagnostickými technikami byly buňky označeny jako vyzrálé. Díky tomuto pohledu je možné rozdělit hematologické nádory na čtyři základní skupiny. Akutní myeloidní leukemie (AML), akutní lymfocytární leukemie (ALL), chronická lymfoidní leukemie (CLL), chronická myeloidní leukemie (CML) (Penka et al., 2011; <https://cancercenter.com>).

2.1.1 Akutní myeloidní leukemie

Poruchou hematopoetických progenitorů buněk, která je charakteristická vyšším počtem nezralých myeloidních buněk v kostní dřeni je AML. AML se vyskytuje nejčastěji u dospělých pacientů. Důvod vzniku AML je stále do značné míry neznámý. Akutní myeloidní leukemie zahrnuje různorodou skupinu maligních nemocí krvetvorby, která má společnou charakteristickou proliferaci a hromadění nevyvinutých hematopoetických buněk myeloidní linie v kostní dřeni a poté vyplavování těchto nezralých buněk do periferní krve.

AML se řadí mezi nejčastěji se vyskytující typ akutní leukemie. Jako AML se označuje stav, kdy kostní dřev začne produkovat blasty (buňky, které ještě nejsou zcela vyzrálé). Tyto blasty se běžně vyvíjejí v bílé krvinky, ale u AML se tyto buňky nevyvíjejí.

U AML myeloidní kmenové buňky většinou vytvářejí abnormální myeloblasty nebo leukocyty, ale někdy se mohou stát neobvyklými erytrocyty nebo trombocyty. Jak se množí tyto abnormální buňky, začínají vytlačovat normální erytrocyty, leukocyty a trombocyty, jejichž přítomnost v lidském těle je zcela klíčová. Rakovinné buňky se také mohou šířit do dalších částí těla (Blackburn et al., 2019; <https://cancercenter.com>).

2.1.2 Akutní lymfocytární leukemie

ALL je malignita spojená s nezralými lymfocyty. Mezi zralé WBC jsou řazeny lymfocyty, které jsou potřebnou součástí imunitního systému. Nezralým typem WBC jsou lymfoblasty, ty rostou a dozrávají na lymfocyty, které jsou nalézány v lymfatickém systému i v krvi. Abnormální nebo zhoubné lymfoblasty jsou nazývány leukemickými buňkami. Tím, že

se tyto buňky dělí a replikují, tak vytlačují zdravé buňky nacházející se v kostní dřeni. Postupem ALL lymfoblasty unikají z kostní dřene a shromažďují se v různých oblastech, které zahrnují slezinu, brzlík, lymfatické uzliny, játra, varlata u mužů, mozek a míchu. Zhoubné lymfoblasty neprojdou procesem zrání, aby se z nich mohly stát lymfocyty, ani neplní funkci lymfocytů, proto nemají takovou schopnost bojovat s infekcemi. Bohužel tyto zhoubné buňky brání produkci a vývoji zdravých buněk a také rostou a žijí déle než normální zdravé buňky.

Existence tří hlavních druhů lymfocytů, při diagnóze stanovuje podtyp ALL, kterým je lymfocyt ovlivněn.

Příčina ALL není úplně jasná, musí být nejprve stanovena. Změny DNA, které jsou zjištěné u ALL, předpokládají, že nejsou spojeny s děděním genetické výbavy po rodičích (Blackburn et al., 2019).

ALL je nejčastěji diagnostikována u dětí. S ALL se je možné setkat v jakémkoliv věku, ale nejčastěji se vyskytuje u lidí mladších 15 let nebo starších 45 let. U dětí mladších 15 let (nejčastěji ve věku od dvou do čtyř let) tvoří ALL největší procento leukemických diagnóz (<https://cancercenter.com>).

2.1.3 Chronická myeloidní leukemie

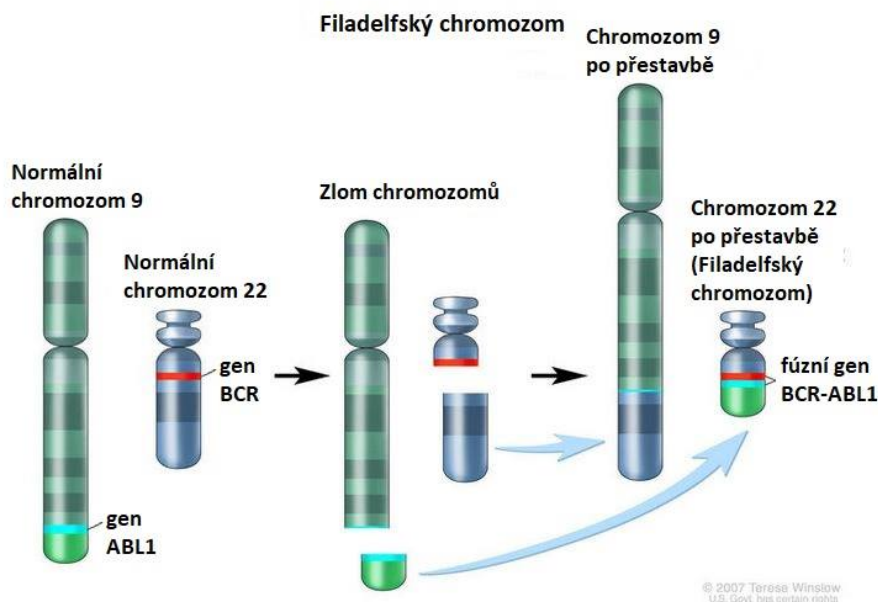
CML se vyskytuje u 1-2 osob z 100 000 dospělých, jedná se o myeloproliferativní novotvar. Jen malé procento onemocnění tímto druhem leukemie se vyskytuje přibližně u 15 % nově diagnostikovaných případů leukémie u dospělých. Ústřední vliv na patogenezi CML má fúze genu ABL1, ten je umístěn na chromozómu 9 s genem BCR, ten leží na chromozómu 22. Fúze těchto genů má za následek expresi onkoproteinu BCR-ABL1, což je podstatně aktivní tyrosinkináza, ta podporuje růst a replikaci. Díky tomu je ovlivnitelná leukemogeneze, je vytvořen buněčný cyklus, který není závislý na cytokinech s aberantními apoptotickými signály v reakci kdy je potřeba stáhnout cytokin (Jabbour et al., 2018).

Počátek u CML je v krvetvorných buňkách kostní dřene a ty se v průběhu času šíří do krve. Genetická změna přemění myeloidní buňky na nezralé rakovinné buňky. Nakonec se nemoc může rozšířit do dalších částí těla.

Tento druh leukémie se šíří a roste pomalu, proto je klasifikován jako chronický. CML však může tvořit podtypy, které časem přejdou z pomalu rostoucí leukémie na rychle rostoucí akutní formu. Ta se pak může rozšířit na kterýkoliv orgán v lidském těle. Tento typ je obtížné léčit (Adam et al., 2008; <https://cancercenter.com>; UPMC Hillman Cancer Center-Pittsburg PA).

2.1.3.1 Filadelfský chromosom

Z různých druhů rakovin má leukémie nejvyšší úmrtnost. Filadelfský chromozóm (Ph) (viz Obr.4) byl poprvé nalezen v roce 1960 u pacienta s CML, jedná se o zkrácený chromozóm 22 vznikající reciproční translokací $t(9; 22) (q34; q11)$. Ph je charakteristickým znakem pro CML. Gen Proto-oncogene tyrosine-protein kinase (ABL1), umístěný na chromozómu 9 se přesouvá do tzv. breakpoint cluster region (BCR), který je umístěn na chromozómu 22 a vzniká tak fúzní gen BCR-ABL1 na Ph. Existují 3 hybridní fúzní geny BCR-ABL1, ty mají trvale zvětšenou aktivitu tyrosinkinázy (TK). Díky aberacím aktivované kinázy mohou narušit dráhy po proudu, což má za následek zvýšenou proliferaci, zastavení diferenciacce a imunitu proti buněčné smrti. Díky inhibitorům tyrosinkinázy (TKI) můžeme najít nejúspěšnější cílenou terapii pro Ph-pozitivní leukémii. TKI působí na BCR-ABL1 protein. Odolnost při léčbě a vývoj onemocnění nadále představují překážky ve zlepšení prognózy u pacientů s Ph-pozitivní leukémií. Klíčem k vyřešení těchto problémů může být studium kmenových buněk leukémie a mutací domény BCR-ABL kinázy (Kang et al., 2016).



Obrázek 4: Filadelfský chromozóm (Upraveno podle: www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.1.4 Chronická lymfocytární leukemie

CLL byla v posledních dvou desetiletích jednou z nejvíce prozkoumávanou leukémií v oblasti klinického výzkumu. K vývoji nových diagnostických pokroků vedlo porozumění patogenезi tohoto onemocnění. Nová léčiva, která jsou schválena pro léčbu CLL, mají rapidně zlepšit klinické výsledky pro pacienty.

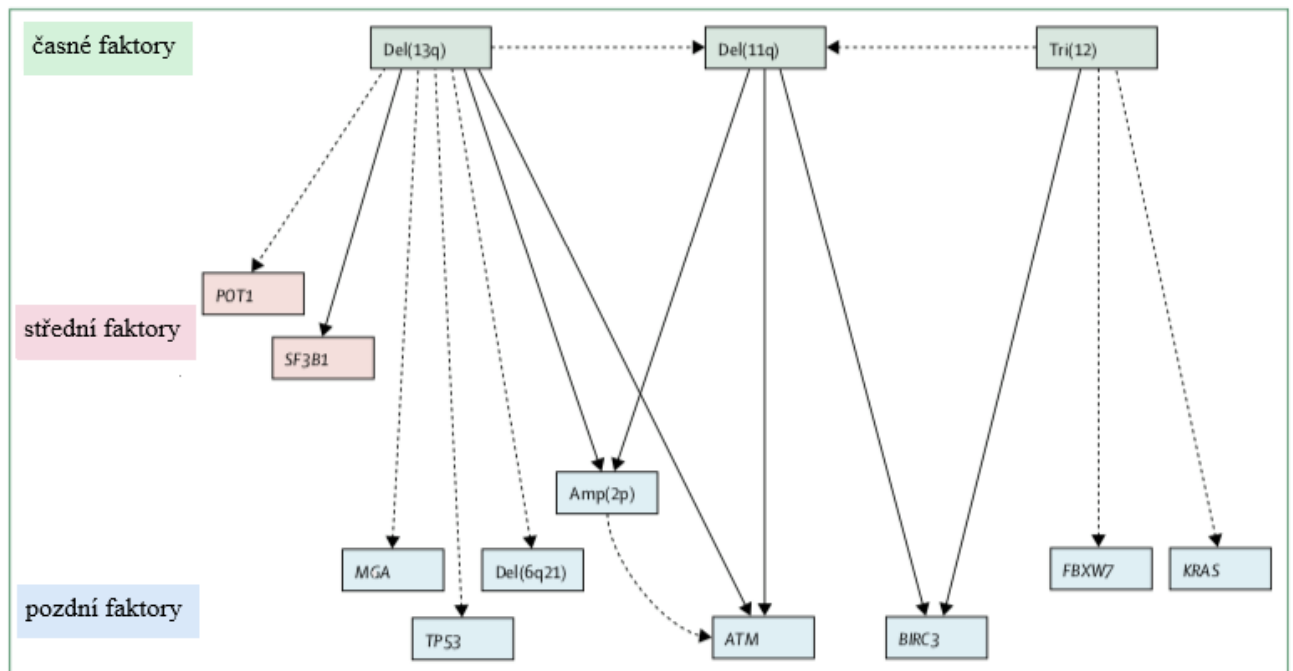
Pro CLL je charakteristická klonální proliferace a akumulace zralých CD-5 pozitivních B-lymfocytů, které se nacházejí v krvi, v kostní dřeni, v lymfatických uzlinách a ve slezině. Multipotentní a samoobnovující hematopoetické kmenové buňky se řadí mezi primární, které vyvolávají vznik leukémie. CLL se řadí mezi leukémie, které mají jednu z největších dědičných predispozic hematologických malignit. Anamnézu onemocnění v rodině má asi 10 % jedinců, u kterých se rozvinula CLL.

Leukemická transformace u většiny pacientů trpících CLL je iniciována ztrátou nebo získáním chromozomálního materiálu (viz Obr.5). K tomu vedla souhrnná genomická analýza CLL, jedná se o model sekvenční genetické evoluce. Pokud během onemocnění vznikly další mutace nebo změny chromozómů, je leukémie agresivnější a odolnější vůči léčbě. Počáteční chromozomální aberace zaznamenávají chybění dlouhého raménka chromozómu 13 asi v 55 % případech a v 10-20 % případů bylo zaznamenáno získání chromozómu 12. Chybění dlouhého raménka chromozómu 11 je přibližně u 10 % případů a chybění krátkého raménka chromozómu 17 asi u 5-8 % případů, ale tyto aberace jsou obvykle v pozdějších stádiích onemocnění. Za ztrátou miRNA stojí chybění dlouhého raménka u chromozómu 13, která zahajuje leukemogenezi. Ztrátu genu ATM (serine/threonine kinase) způsobuje chybění dlouhého raménka chromozómu 11. Gen ATM má za úkol kódovat kinázovou odpověď na poškození DNA. Odstranění tumorového supresorového genu TP53 má za následek chybění krátkého raménka chromozómu 17.

Jedná se o typicky pomalu rostoucí rakovinu. CLL zastupuje asi třetinu leukemických diagnóz. Výskyt je častý u starších dospělých. CLL má svůj původ v B-lymfocytech kostní dřeni a zasahuje do krve. Abnormální buňky proliferují a vytlačují normální buňky. Šíří se přednostně do lymfatických uzlin, do jater a do sleziny.

Jedna forma CLL postupuje pomalu a příznaky se můžou objevit i roky po začátku. To znamená, že nemoc jako CLL může trvat několik let, než je klasifikována jako závažná. Další forma CLL roste velice rychle. Pokud roste hodně abnormálních lymfocytů, které vytlačují

normální krvinky, vyvíjí se CLL. To tělu zabraňuje v boji s infekcemi (Adam et al., 2008; <https://cancercenter.com>; Hallek et al., 2018; UPMC Hillman Cancer Center-Pittsburg PA).



Obrázek 5: Genetické faktory CLL (Upraveno podle: Hallek et al., 2018)

2.4 Diagnostika leukémie

U podezření na AML se nejprve analyzuje periferní krev pacientů na anémii, trombocytopenii a leukopenii. Poté je dalším krokem diagnózy tohoto typu leukémie biopsie a testování kostní dřeně. Na vzorcích periferní krve lze provést tyto testy: průtokovou cytometrii, imunofenotypizaci a morfologická a genetická analýza. Výsledky testů biopsie a vzorek tekutiny získaný aspirací kostní dřeně poukazují na hypercelulární dřeň, která má nízký obsah hematopoetických buněk a zvýšené zastoupení nezralých buněk v podobě blastů. Pro zařazení leukemických buněk, je využívána průtoková cytometrie, která buňky obarví, pomocí řady barviv a chemických látek. Aby byly odlišeny zdravé buňky a leukemické buňky je používána imunofenotypizace, která využívá vzory povrchových proteinů na leukemických buňkách. K potvrzení AML stačí, pokud biopsie nebo periferní krev potvrdí nález nejméně 20 % myeloblastů. O určení, v jaké fázi AML je, se postará cytometrie, cytogenetika a molekulární studie. U pacienta, který má podezření na AML, je mimo jiné také nutné provést test jaterních funkcí, analýzu sérové laktátdehydrogenázy a kyseliny močové.

U ALL je diagnóza provedena pomocí testování tekutiny získané aspirací kostní dřeně a biopsie, také za použití vzorků periferní krve, ty poslouží k průtokové cytometrii a imunofenotypizaci, morfologické a genetické analýze, což je již vysvětleno u AML. Hypercelulární dřen s nízkým množstvím zdravých hematopoetických buněk a zvýšené zastoupení lymfoblastů potvrdí výsledky tekutiny odebrané aspirací kostní dřeně a biopsie. K určení, jestli je ALL odvozena od B-lymfocytů nebo T-lymfocytů, je nápomocna průtoková cytometrie a imunofenotypizace. Na principu rozlišení B-lymfocytů se může ALL B-lymfocytární dělit na další různé podtypy. Prekurzorové B-lymfocytární ALL nejpravidelněji exprimují proteiny na buněčném povrchu a to CD10, CD19 a CD34, zároveň také nukleární terminální deoxynukleotidovou transferázu. Zralá B-lymfocytární ALL, známá jako leukémie Burkittových buněk, převažuje u mužů. T-lymfocytární ALL exprimují proteiny na buněčném povrchu CD2, CD3, CD7, CD34 a deoxynukleotid transferázu. ALL mohou také vznikat v důsledku abnormálního počtu chromozómů (Blackburn et al., 2019).

CLL je nejčastěji identifikována, jestliže na úplném krevním obrazu dojde k náhodnému objevu zvýšeného počtu lymfocytů, přičemž byl krevní obraz získán z důvodů, které původně nesouvisely s nálezem leukémie. Imunofenotypizací je potvrzena diagnóza CLL, pokud je zvýšený počet B-lymfocytů vyšší než 5000 B-lymfocytů na μl periferní krve. CLL buňky vystavují společně na svém povrchu CD5 a také povrchové antigeny B-lymfocytů CD19, CD20 a CD23. K odlišení CLL od ostatních lymfomů by mohla sloužit exprese CD200. Každá buněčná linie leukemických buněk je vybavena lehkými imunoglobulinovými řetězci κ nebo λ . K odlišení buněčné linie leukemických buněk od reaktivních příčin lymfocytózy nebo lymfadenopatie poslouží imunofenotypizace (Hallek et al., 2018).

Při dlouhodobém nepodloženém zvýšeném počtu leukocytů nebo případně trombocytů se provádí genetické testování přítomnosti tzv. Filadelfského chromozómu (Ph) cytogeneticky nebo metodou FISH. Pozitivní výsledek potvrzuje diagnózu CML a pomáhá ji odlišit od jiných myeloproliferačních nebo myelodysplastických syndromů. Negativní výsledek ale CML diagnózu nevylučuje (Jabbour et al., 2018). Přibližně 95 % nemocných s CML má pozitivní testy na Ph. Zbývajících přibližně 5 % nemocných s CML má jiné komplikované přestavby klíčových chromozomálních oblastí nebo má i normální karyotyp (Fitzgerald et al., 2009).

2.5 Klinický obraz leukémie

U AML je pozorován vysoký počet proliferačních nezralých leukemických buněk, ty napadají kostní dřen, kde se za normálních podmínek tvoří zdravé buňky. Příkladem, kdy je nedostatek prostoru pro růst a dozrávání buněk na normální erytrocyty, leukocyty a krevní destičky, rozumíme různé anémie, leukopénie a trombocytopenie. U anémií je často pozorována dušnost při normální činnosti, bolest na hrudi, závratě, únava a bledost. Leukopénie způsobí pravidelné infekce, horečky a také špatné hojení ran. Trombocytopenie jsou obvykle spojené s krvácením. Krvácení je těžko zastavitelné, velice jednoduše se tvoří modřiny, spouští se krvácení z nosu. Proniknutím leukémie do kostní dřene, mohou mít pacienti také bolesti kloubů. Příznaky AML, neléčeného onemocnění, jsou úzce spjaty se základním narušením hematopoézy. U AML je pozorována hyperleukocytóza, kdy krevní obraz vykazuje několikanásobně zvýšený počet leukocytů nad fyziologickou mez. Důsledná péče je vyžadována u pacientů s leukocytózou, aby došlo k omezení různých komplikací. Pacientům je podávána intravenózní tekutina, která je dost agresivní. Pomocí hydroxymočoviny je pomáháno snížit počet bílých krvinek. Laboratorní testy se u pacientů s leukocytózou provádí každých 6 až 8 hodin. U některých případů bylo prokázáno, že leukocytóza může později podněcovat vznik leukostázy. Leukostázou rozumíme poruchu mikrocirkulace v důsledku hromadění leukocytů, které jsou nadměrně zastoupeny v periferní krvi. Je spojena s častou úmrtností, pokud není léčena. Nejčastější místa, které leukostáza postihuje, jsou CNS (centrální nervový systém) a plíce.

Příznaky pro ALL mohou být anémie, trombocytopenie. Díky infekcím, které probíhají u člověka, je důvod vyhledat odbornou péči. B-lymfocyty způsobují u ALL onemocnění CNS. T-lymfocyty způsobují u ALL pozvolné kostní anatomické poškození, extramedulární onemocnění a pozorujeme vysoké hladiny vápníku (Blackburt et al., 2019).

U CLL mohou být různé klinické projevy. Pacienti jsou většinou zpočátku bez symptomů a CLL je tedy diagnostikována pouze díky náhodnému nálezu lymfocytózy, nález může být provázen s různými anémiemi nebo trombocytopenií. U zbytku pacientů budou pozorovány konstituční symptomy, které jsou definované jako přetrvávající horečky, noční pocení, úbytek na váze, který nemá žádnou spojitost se stravovacím režimem a také únava. Tedy CLL může být prokázána v důsledku klinických příznaků a symptomů (Strati et al., 2018).

CML mohou být rozděleny do tří stádií: CML-CP (Chronic myeloid leukemia in chronic phase), CML-AP (Chronic myeloid leukemia in accelerated phase) a CML-BP (Chronic

myeloid leukemia in blastic phase). U většiny nemocných je pozorována CML-CP. Příznaky, pokud jsou potvrzeny, pocházejí z anémií a zvětšení sleziny nad její obvyklou velikost. Mezi příznaky se řadí úbytek na váze, únava, malátnost, snadná sytost při jídle. Mohou být pozorovány i méně obvyklé projevy jako je krvácení (špatná funkce krevních destiček, nebo malý počet), trombóza, zvýšená hladina kyseliny močové, která způsobuje tzv. dnu v kloubech. CML-AP může být o dost zákeřnější a projevuje se pomocí zhoršujících se anémií, zvětšení sleziny a pronikáním do orgánů. CML-BP se většinou projevuje jako akutní leukémie, kde jsou zhoršené příznaky jako krvácení, horečka a infekce (Jabbour et al., 2018).

2.6 Léčba leukémie

U ALL je léčba u dětí zaměřena na CNS, pravidelněji se klade spoleh na léky, které mají potlačit imunitu (steroidy, asparagináza a vinkristin), než na přístup, který má potlačit funkce krvetvorné kostní dřeně (daunorubicin a etoposid). U dospělých se dává přednost alogenní transplantaci. V populaci AYA (Adolescent and Young Adult) je léčba soustředěna na základě známých faktorů (věk, výskyt bílých krvinek, zapojení CNS a cytogenetika). Další stupňování nebo snižování terapie je založena na kvantifikaci MRD (Detection of minimal residual disease) v určitých časových bodech (Juliussen et al., 2016). Za standardní léčbu ALL jsou považovány systémové chemoterapeutické režimy s obsahem více činidel a léků, ty prostupují hematoencefalitickou bariérou. Příkladem jsou velké dávky cytarabinu a methotrexátu, společně s chemoterapií uvnitř mozkových plen pro konkrétní ochranu CNS (Blackburn et al., 2019).

AML je léčena intenzivní kombinací cytarabinu a antracyckinu. Antracykliny jsou antibiotika s cytostatickým účinkem, která jsou produkována kmeny bakterií *Streptomyces*. Cílem léčby je vyvolat u pacienta remisi, což je bezpříznakový stav bez detekovatelných projevů nemoci. Často praktikovaný je starší systém 3 dny léčba daunorubicinem a 7 dní cytarabinem, dále jsou používány i jeho modifikace spočívající v úpravách dávkování, záměně podobných léčiv nebo i přidání dalších léčiv. Konkrétní léčebné režimy jsou stále předmětem studií. Rozsáhlý seznam existujících léčebných protokolů lze nalézt na Globálním portálu AML (<http://www.amlglobalportal.com>). U pacientů mladších 60 let většina zavedených léčebných postupů dosahuje úplné remise v přibližně 80 % případů. U pacientů ve věku v rozmezí 60–70 let je to 60 %. Nemoc se často do několika let vrátí obzvláště u starších pacientů s rizikovými genetickými rysy. Alogenní transplantace kostní dřeně se provádí u přibližně 40 % mladých

dospělých pacientů. S věkem její účinnost klesá, proto se u starších pacientů používá jen velmi zřídka (Juliussen et al., 2016; Valcovici et al. 2016). Podle věku, rizikové kategorie a základního funkčního stavu pacienta se uvádí běžné postupy léčby AML (Blackburn et al., 2019).

CLL je u pacientů často zjištěná již v rané bezpříznakové fázi onemocnění. U takových pacientů se léčba nezačíná, jejich stav je však pečlivě sledován. Bylo zjištěno, že zahájení léčby již v raném stádiu nevedlo ke zlepšení prognózy ani zdravotního stavu, naopak běžně mělo negativní účinky. Léčba se zahajuje, až když se onemocnění posune do další fáze, nebo se vyskytnou příznaky. Mezi příznaky se řadí například anémie nebo trombocytopenie, výrazné nebo zhoršující se zvětšení sleziny nebo zvětšení uzlin. Také autoimunitní anémie nebo trombocytopenie nereagující na kortikosteroidy. Sledují se také nespecifické příznaky jako neúmyslný úbytek hmotnosti, únava, horečky. Podnětem pro zahájení může být rychlá progresivní lymfocytóza, kdy se počet lymfocytů zdvojnásobí za méně než 6 měsíců. V potaz je ale brán i absolutní počet lymfocytů.

Standardní léčba CLL se zakládá na chlorambucilu, což je cytostatikum. Pacientům bez ohledu na věk se dále často podává rituximab, což je monoklonální protilátka anti-CD20. U starších pacientů s více onemocněními vede kombinace chlorambucilu a anti-CD20 protilátek k prodloužení přežití. U mladších pacientů zlepšuje kvalitu a trvání odpovědi kombinace analogů purinů fludarabinu a cyklofosfamidu. Léčebný režim FCR založený na kombinaci fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabu prodloužil celkové přežití u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Chemoimunoterapie se tak stala standardní léčbou CLL (Hallek et al., 2018).

2.7 Transplantace kostní dřeně

Leukémie jsou charakteristické velmi agresivním průběhem onemocnění a špatnými reakcemi na terapie, které jsou dostupné. Následkem narušené normální hematopoézy se vyskytují u pacientů s leukémiemi cytopenie. Mikroprostředí kostní dřeně je také nazýváno, jako výklenek kostní dřeně (viz Obr. 6). Ve výklencích kostní dřeně jsou HSC, díky nim je udržovaná hematopoéza. HSC jsou regulovány pomocí komplexního souboru buněčných populací, které zahrnují arteriolární a sinusové endoteliální buňky, mezenchymální kmenové buňky (MSC), perivaskulární stromální buňky, osteoblasty, neurony sympatiku, nemyelinizované Schwannovy buňky, adipocyty megakaryocytů a regulační T-lymfocyty.

Leukemické buňky zasahují a ničí mikroprostředí kostní dřeně. Díky tomu je potenciálně posunuta rovnováha mikroprostředí ve prospěch urychlené expanze leukemických buněk nebo až k leukemogenezi a rozvoji necitlivosti k léčbě chemickými látkami obvykle cytostatiky.

Byla provedena řada xenotransplantačních studií (přenos orgánů mezi různými živočišnými druhy), kterými bylo prokázáno, že buňky AML jsou organizovány hierarchicky a pocházejí ze vzácných transformovaných LSC, ty jsou schopné regenerace a dále se dělí na vysoce proliferativní potomstvo. Tedy výsledná leukemická buněčná hmota vznikla klonální evolucí, kde jsou dominantní klony buněk a ty současně existují s menšími subklony buněk. To značí, že znovu vypuknutí AML může být řízeno buď dominantním klonem, nebo menšími subklony, a to po vzniku nových mutací během chemoterapie (Duarte et al., 2018).

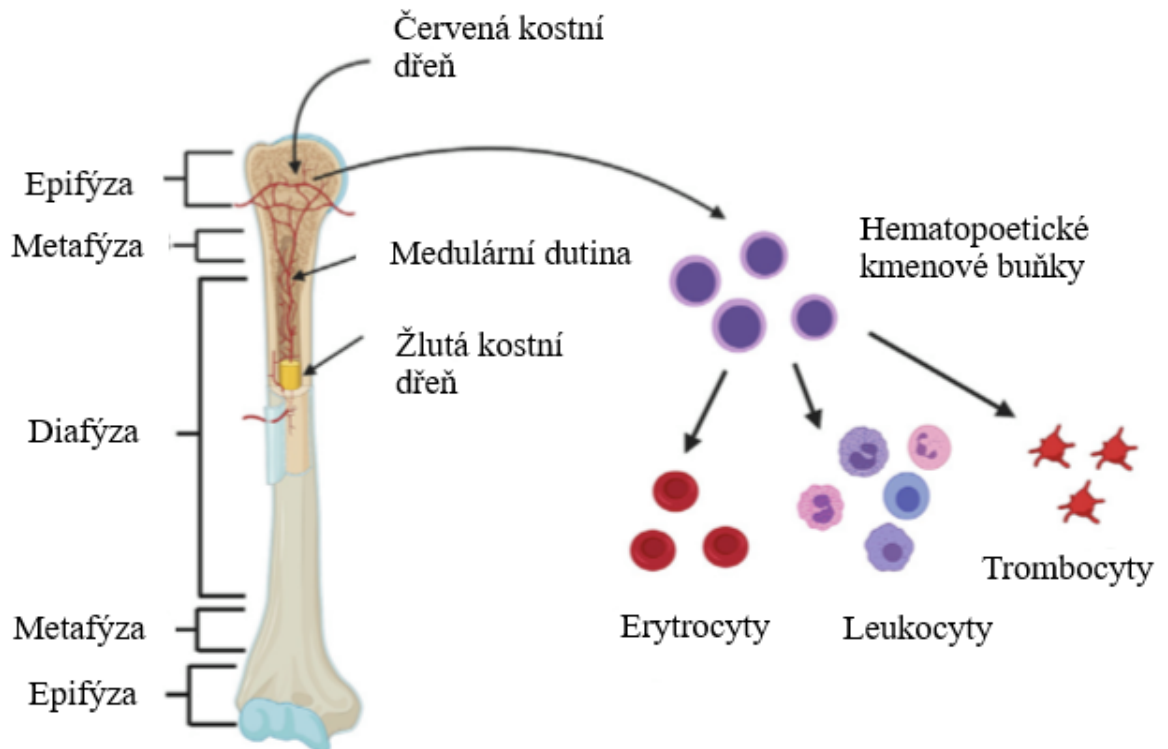
U AML je pro pacienty a lékaře časný či pozdní návrat nemoci velkou komplikací. Zvětšená pozornost při návratu leukémie je soustředěna na mikroprostředí kostní dřeně. Interakce mezi LSC a mikroprostředím kostní dřeně by mohly vést ke změnám léčby leukémií, a to z běžných cytotoxických chemoterapií na cílené terapie, které obsahují adhezivní faktory, chemokiny a jejich receptory (Wang et al., 2018).

Pokud nejsou nalezeni dárce s hlavním histokompatibilním komplexem (HLA), je autologní transplantace kostní dřeně považována za alternativu ke konzervativní léčbě recidivujících malignit. Pacienti s opětovnou manifestací onemocnění jsou vhodní pro autologní (transplantace z téhož jedince) transplantaci kostní dřeně. U pacienta je během úplné remise tekutina získaná aspirací z kostní dřeně zmrazena a skladována při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Může být použita při znovu sestavení hematopoézy po vysoké dávce chemoterapie a radioterapie u pacienta. Studie ukazují, že buňky kostní dřeně s připraveným antileukemickým antisérem stimulují repopulaci kostní dřeně příjemce a také mají vliv na znovuoobnovení hematopoézy (Netzel et al., 1984).

Při alogenních transplantacích kostní dřeně je široce používáno celkové ozařování těla (TBI). TBI se využívá, aby bylo zabráněno odmítnutí dárcovské kostní dřeně. Pokud je při transplantaci kostní dřeně využitý i režim TBI je dosaženo daleko lepších výsledků při léčbě hematologických malignit. U TBI se vyskytuje akutní i pozdní toxicita. Akutní toxicita se vyznačuje nevolnostmi, zvracením, průjmem, dočasnou ztrátou chuti a vyrážkou. Pozdní toxicita se vyznačuje intersticiální pneumonitidou, neplodností, hormonálními poruchami, osteoporózou, zpomalením růstu a sekundárními malignitami (Paix et al., 2018).

Zhoubné blasty tvořící nádor AML jsou chápány jako různé klinicky, morfologicky, geneticky a epigeneticky heterogenní nádory, které jsou dohromady seskupené dle klasifikace AML.

U ALL byla také dopodrobna studována její závislost na mikroprostředí kostní dřeně. U dětských pacientů se výsledky onemocnění v posledních šesti letech výrazně zlepšily. U dospělých pacientů je ale stále vykazována špatná prognóza. Dřívější či pozdní návrat nemoci je připisován minimální zbytkové nemoci skupiny LIC (Leukemia-initiating cell) buněk v klidovém stádiu (buňky se nedělí), které zůstávají nezasaženy chemoterapiemi působícími na dělící se buňky (Shafat et al., 2017).



Obrázek 6: Schéma, které znázorňuje výklenek kostní dřeně, kde dochází k vývoji HSC na primární linii (Upraveno podle: Chander et al., 2020).

3 HOMEBOXOVÉ GENY

Geny homeobox tvoří velkou skupinu podobných genů, které řídí tvorbu mnoha tělesných struktur během raného embryonálního vývoje. Genová skupina homeobox zahrnuje u člověka odhadem 235 funkčních genů a 65 pseudogenů, což jsou strukturně podobné geny, ovšem neposkytují pokyn pro výrobu proteinů. Geny homeoboxu obsahuje každý lidský chromozóm, často se také vyskytují ve shlucích. Zatím bylo popsáno mnoho tříd a podskupin genů homeoboxu, ačkoli tato seskupení jsou používána nekonzistentně.

Geny homeoboxu obsahují konkrétní sekvenci DNA, ta dává pokyny pro výrobu řetězce 61 stavebních aminokyselin, které jsou známé jako homeodoména. Homeodoména je ta část proteinu, která se váže na specifické regulační oblasti cílových genů. Proteiny, které ji obalují, proto většinou působí jako transkripční faktory.

Geny, které spadají do skupiny homeoboxů se během vývoje podílejí na celé řadě rozhodujících činností. Mezi takové činnosti se řadí nasměrování tvorby končetin a orgánů podél přední a zadní stěny embrya. Také mezi tyto činnosti spadá regulace procesu, kterým buňky vyžívají, aby vykonávaly specifické funkce. Některé homeoboxové geny mohou působit jako supresory nádorů, což znamená, že pomáhají zabránit růstu buněk a jejich příliš rychlému, nebo nekontrolovatelnému dělení.

Homeoboxové geny mají nespočet důležitých funkcí, proto i mutace v těchto genech jsou zodpovědné za celou řadu vývojových poruch. Mutace ve skupině homeoboxových genů většinou způsobují malformace končetin. Změny v HOX genech PAX (pair-rule geny) často vedou k poruchám očí. Změny v genech homeoboxu MSX (muscle segment homeobox gene) způsobují abnormální vývoj hlavy, obličeje a zubů. Zvýšená nebo snížená aktivita homeoboxových genů byla navíc spojena s několika formami rakoviny manifestovanými v pozdějším věku (Genetics Home Reference-NIH; Mallo et al., 2010).

3.1 Role HOX genů spojených s hematopoézou

U savců existuje 39 HOX genů a ty jsou uspořádány do čtyř genomických klastrů (A-D), které jsou umístěny na čtyřech různých chromozómech 7, 17, 12 a 2 v tomto pořadí. Na základě podobnosti sekvencí se homeobox skládá ze 13 paralogních skupin, přičemž žádný shluk neobsahuje celou sadu.

V hematopoetických buňkách je exprimováno více členů A, B a C klastrů genů HOX. Několik z těchto genů HOX vykazuje charakteristické vzorce exprese. Geny umístěné na 3' straně klastrů, které jsou exprimovány na svých nejvyšších hladinách v nejprimitivnější subpopulaci lidských buněk CD34 kostní dřeně. Geny lokalizované na 5' konci mají širší rozsah exprese s jejím potlačením v pozdějších stádiích hematopoetické diferenciaci.

HOX geny třídy I (klastrovaná rodina homeoboxových genů), jsou evolučně vysoce konzervovanou sadou genů, které kódují hlavní skupinu transkripčních faktorů kontrolujících embryonální vývoj a jsou zapojeny do pokračujícího procesu diferenciaci hematopoetických buněk.

Analýza genové exprese vzorků myši i lidské kostní dřeně objevila, že většina HOX genů, které jsou v klastrech A, B a C jsou exprimovány v hematopoetických buňkách a z větší části jsou přednostně exprimovány v subpopulacích obohacených HSC a v nezralých progenitorových kompartmentech a down regulovaných během diferenciaci a zrání. Tyto poznatky vedly k hypotéze, že HOX geny mají nezastupitelnou funkci v časných krvetvorných buňkách, včetně HSC a také, že porušená regulace exprese HOX může ovlivnit leukemickou transformaci.

Role HOX genů v hematopoéze byla zkoumána pomocí umělé nadměrné exprese z retrovirových vektorů nebo naopak na snížené či vymizené expresi, která zahrnovala geneticky modifikované myši modely. I tak je stále jejich role do jisté míry nejasná.

Zkoumání bohaté exprese HOX genů v HSC z jater plodu a u progenitorů v lidské pupečnickové krvi prokázalo silné účinky genu HOX na diferenciaci a proliferaci. Jeden z velice pozoruhodných účinků genu HOX, je například silný vliv genů HOX na regeneraci HSC.

Mezi regulátory HOX genů patří produkt genu MLL, kofaktory PBXI (Pre-B-cell leukemia factor 1) a MEIS1. Gen MLL (mixed lineage leukemia) patří do skupiny genů Trithorax, které kódují modifikátory chromatinu a které jsou důležité pro správné udržení exprese HOX genů během vývoje. MLL hraje zásadní roli v definitivní hematopoéze tím, že navozuje proliferaci a diferenciaci HSC prostřednictvím exprese HOX genů. Pokud embrya nejsou schopná tvořit MLL, snižuje se schopnost tvorby hematopoetických kolonií. Pokud se sníží tvorba hematopoetických kolonií, může být zachráněna nadměrnou expresí HOXA9, HOXA10, HOXB3 nebo HOXB4 (Argiropolous et al., 2007; Milne et al., 2002; Sauvageau et al., 1994).

3.2 Konkrétní příklady HOX genů v hematopoéze

Členové rodiny HOX genů hrají v hematopoéze překrývající se a různorodé role a jsou výzvou k objasnění jejich specifických a kombinovaných funkcí.

Exprese genů, které spadají pod klastr HOXA (A10, A1, A13), je myeloidně omezena. Nadměrná exprese HOXA10 narušuje myeloidní a B-lymfoidní diferenciaci a způsobuje zvýšenou proliferaci progenitorů hematopoézy. Tento efekt byl prokázán zvýšením exprese v myších buňkách kostní dřeně pomocí retrovirové transdukce.

HOXB4 spadá mezi HOX geny, které jsou exprimovány v primitivních myších a lidských hematopoetických buňkách. Je prokázáno, že vynucená nadměrná exprese nebo přímé dodání proteinu HOXB4 stimuluje výrazné expanze HSC *in vivo* a *ex vivo* bez podpory leukémie. Tyto poznatky naznačují, že HOXB4 způsobuje selektivní expanzi primitivních hematopoetických buněk bez změny jejich diferenciaci. U myší, které postrádaly geny HOXB3 a HOXB4, byly vykazovány kvalitativně podobné, ale kvantitativně výraznější rozdíly v hematopoéze. HOXB3 a HOXB4 jsou žádané, ale nejsou nutné pro normální funkci HSC. Jejich ztráta může být kompenzovaná regenerující funkcí jiných genů HOX. Nejnovější studie odhalila, že klastr HOXB (HOXB1-HOXB9) se také podílí na normální hematopoéze. Většina genů HOXB klastru je převážně exprimována v erytroidních buňkách.

Geny lokusů HOXC jsou exprimovány v lymfoidních buňkách u myši a u lidí. HOXC4 je v lymfoidních buňkách převážně exprimován. Chybí analýza exprese genů HOX v lymfoidních buňkách, zejména s ohledem na diferenciaci a zapojení B-lymfocytů nebo T-lymfocytů.

Při klinických studiích byla také zkoumána exprese genů HOXC4, HOXC5 a HOXC6 během diferenciaci lymfoidních buněk. Ukázalo se, že podskupiny funkčních buněk CD34 odvozené z odlišné kostní dřeně se liší svou expresí genů HOX. Analýza poukazuje na expresi HOXC4, HOXC5 a HOXC6 během zrání jak B-lymfocytů, tak i T-lymfocytů. Všechny linie B-lymfocytů odrážející stádia zrání od pre B-lymfocytu do plazmatických buněk exprimují HOXC4, HOXC5 a HOXC6. Rovněž pro všechny linie T-lymfocytů představující fáze zrání od běžného stádia T-lymfocytů po zralé T buňky exprimují HOXC4, HOXC5 a HOXC6. Signály pro HOXC4, HOXC5 a HOXC6 byly vždy silnější ve zralých buněčných liniích, než v těch nezralých (Bijl et al., 1996; Thorsteinsdottir et al., 1997).

3.3 HOX geny v leukemogenezi

Geny homeoboxu vytváří nadřazenou skupinu genů, ty kontrolují diferenciaci buněk a morfogenezi během embryonálního vývoje. Tyto geny obsahují signální DNA sekvence. Signální DNA sekvence kóduje 61 aminokyselinovou doménu, která je známa jako homeodoména. Homeobox zprostředkovává vazebné interakce proteinu s bázemi DNA v konformaci helix-turn-helix. Působení proteinů obsahující homeodoménu jako transkripčních regulátorů je zprostředkováno důležitou součástí homeodomény motivem helix-turn.helix.

Geny homeoboxu poukazují na klasický příklad blízkého vztahu mezi embryogenezí a novotvorbu tkáně. Rostoucí počet genů homeoboxu je aberantně vytlačován v různých solidních nádorech (nádory vytvářející ložiska viditelná okem nebo při vyšetření je lze nahmatat). Aberantní exprese genů HOX se může také často vyskytovat u hematologických malignit. U sarkomů dochází také k deregulaci HOX genů díky translokacím.

HOX geny mohou fungovat také jako onkogeny. Schopnost genů HOX se transformovat byla prokázána u velmi malého počtu jiných typů buněk. Jako příklad můžeme uvést gen HOXA1. Tento gen je exprimován ve tkáních týkajících se nádoru, ale nikoliv v normálních mléčných tkáních. Exprese HOXA1 v epitelových buňkách prsu indukuje zhoubnou transformaci a podporuje přežití buněk rakoviny prsu pomocí zvýšené regulace exprese Bcl-2 (B-cell lymphoma). Určitá možnost, že většina HOX genů, které jsou aberantně aktivovány v nádorech, může působit jako onkogeny, je do jisté míry kontroverzní. Protože onkogenní potenciál u HOX genů nebyl prokázán v normálních buňkách, ze kterých tumory pocházejí.

HOX geny, které jsou normálně exprimovány embryonálními tkáněmi, mohou být aberantně aktivovány v nádorech. Také bylo zjištěno, že pár nadměrně exprimovaných genů HOX inhibuje diferenciaci a podporuje růst buněk.

HOX geny, které jsou ztraceny nebo je snížena odpověď na stimulaci v důsledku poklesu až chybění složek, které jsou zodpovědné za přenos této stimulace k výkonným složkám v rakovinách, nepůsobí jako klasické supresory nádorů. Ale sporné je, zda HOX geny, které jsou nadměrně exprimovány v nádorech, fungují jako onkogeny v pozitivním smyslu. Down-regulace nebo up-regulace, v závislosti na individuálním genu homeoboxu, zásadním způsobem mění fenotyp a chování buněk a také, že celkové funkční důsledky aberantního vyjádření jsou podobné. Mezi tyto regulace spadá návrat buněk do méně diferenciovaného embryonálního stavu, podpora přežití a zvýšení proliferace a tyto změny mohou podporovat progresi nádoru, anebo také zvyšovat predispozici k transformaci týkající se nádoru.

Nadměrnou expresí několika genů HOX vyvolává leukemogenezi. Jedním z příkladů může být HOXA10, ten je široce zastoupen v AML. V buňkách kostní dřeně u myši nadměrná exprese HOXA10 blokuje vývoj B-lymfocytů a podporuje expanzi progenitorů, které mají schopnost formovat megakaryocytární kolonie.

V patogenezi akutních leukémií je prokázána jednoznačná role HOX genů. Tato ústřední role je podporována, že u pacientů s AML bylo často pozorováno zvýšení exprese genů HOX a MEIS1.

Díky experimentům bylo zjištěno, že vynucená nadměrná exprese vybraných HOX genů (HOXA9, HOXA10, HOXB3, HOXB6, HOXB8), poskytuje růstovou výhodu *in vivo* a *in vitro*, a to vede k leukémii a dlouhou latencí, a to s pomocí systémů, které používají přenos retrovirových genů do myších buněk kostní dřeně s následnou transplantací. Dlouhá doba latence nástupu onemocnění poukazuje, že pro postup ke zjevné leukémii jsou potřebné další genetické poruchy.

Geny HOX jsou zapojeny do translokací, které jsou specifické pro leukémii. NUP98 je fúzním partnerem u HOX genů. Fúzní gen NUP98-HOX byl izolován u pacientů s AML a CML. NUP98-HOX obsahuje N-terminální část, která prezentuje NUP98 a C-terminální část pro HOX, který zahrnuje homeodoménu. Transformační potenciál fúzí NUP98-HOX může odrážet jejich zvýšenou stabilitu proteinu nebo jejich schopnost změnit nukleocytoplasmatický transport mRNA a proteinu, nebo proteinu. Geny HOX mají schopnost vyvolat leukémii jako fúzní partneři NUP98.

Fúzní geny MLL zahrnují přesmyky, ty jsou vytvořené díky chromozómním translokacím fúzujících N-terminální sekvence MLL na 1 z více než 40 funkčně rozmanitých skupin fúzních partnerů na C-terminální, tvoří 5 % všech případů AML a 22 % pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (Argiropoulos et al., 2007; Samuel et al., 2005; Treisman et al., 1992).

4 HOXA9

Do nadřazené skupiny homeoboxů spadají geny HOX, které jsou vysoce konzervovanou podskupinou. Geny HOX hrají zásadní roli během embryogeneze a onkogeneze.

HOXA9 patří do klastru HOXA je dobře prozkoumaný a zaujímá velice významné postavení jak u normální hematopoézy, tak u leukemogeneze. U myši, kde byl pozorován nedostatek HOXA9, byl sledován zhoršený hematopoetický vývoj. U lidí je gen HOXA9 vysoce exprimován. Také je gen HOXA9 nezbytný pro nádorový proces v některých typech leukémií, zejména u leukémie se smíšenou linií (MLL). Pacienti s akutní myeloidní leukémií (AML), u kterých je aberantní nadměrná exprese genu HOXA9, je spojena se špatným přežitím pacientů. Nadměrná exprese HOXA9 v primitivních kostních buňkách zvyšuje expanzi HSC (He et al., 2012).

4.1 HOXA9 v hematopoéze

Většina genů HOX je po dokončení vývoje transkripčně potlačena, ale určité geny spadající do klastrů A, B a C jsou důležitými regulátory i dospělé hematopoézy (Collins et al., 2016).

Nejvýrazněji exprimovaný gen homeoboxu (HOX) je HOXA9, je exprimován v kompartmentu hematopoetických kmenových buněk (HSC) kostní dřeni (BM) a je odlišován pomocí down regulací. Pokud je vynucená retrovirová nadměrná exprese genu HOXA9 v BM, pak je zvětšena expanze hematopoetických kmenových buněk *in vitro* (Quéré et al., 2011).

HOXA9 reguluje tvorbu vzorců a identitu tkání v průběhu embryogeneze a také je exprimován v průběhu dospělé hematopoézy. Role proteinu HOXA9 je zřejmá jak při normální hematopoéze, tak také při leukemické přeměně. Pokud HOXA9 chybí u myši, tak jsou zřejmé poruchy v myeloidních, erytroidních a lymfoidních kompartmentech. Při nadměrné expresi HOXA9 je blokováno rozlišení myeloidních progenitorů, které jsou podřízené růstovému faktoru, nakonec dojde k maligní přeměně po období latence (Vijapurkar et al., 2004).

Pokud je vynucená exprese HOXA9, pak je zvýšena proliferace primitivních krevních buněk, která také rozšiřuje HSC a může vést k myeloidní leukémii. Ale pokud je ztráta genu HOXA9, pak je inhibována proliferace a je zhoršena i funkce HSC. HOXA9 účinkuje pomocí jistých drah, ale jsou do značné míry neznámé. HOXA9 je transkripční faktor, nicméně bylo rozpoznáno několik přímých cílových genů (Hu et al., 2007).

4.2 Regulace HOXA9

Regulace genu HOXA9 může být na rozdílných úrovních. Pokud určujeme míru exprese genu HOXA9, jedná se o regulaci, která probíhá na transkripční úrovni. Další úroveň je sekundární regulace, ta je na proteinové úrovni, což znamená, že mění funkci transkripčních faktorů. Konkrétně sekundární regulace modifikuje DNA vazebnou schopnost.

Pro expresi genu HOXA9 a normální hematopoézu je nezbytný transkripční faktor CDX4 (caudal type homeobox 4) a také je nezbytný transkripční menin, který je koregulátorem. Menin byl dříve označován jako nádorový supresor kódovaný pomocí MEN1 (multiple endocrine neoplasia type 1), ten je v lidském dědičném nádorovém syndromu mutován. Menin vzájemně působí s řadou transkripčních faktorů a proteinů MLL. Významnou roli při určování míry úrovně exprese genu HOXA9 hraje zejména metylace histonu H3 a menin je tady zodpovědný za aktivní i potlačovanou změnou histonu v lokusu HOXA9. Díky odhalení funkčního spojení mezi CDX4, meninovými a histonovými změnami, které se podílejí na udržení transkripce 5'HOX genů, jsou poskytnuty nové pohledy na porozumění regulace exprese genu HOXA9 (Yan et al., 2006).

Mezi další regulátor genu HOXA9 může být zařazen SMAD4 (Family Member 4). Na studiích leukemické kmenové buňky (LSC) modelované pomocí SMAD4 myši akutní myeloidní leukémie, která je vyvolaná pomocí genu HOXA9 nebo fúzním onkogenem NUP98-HOXA9. Komplexy HOXA9-SMAD4 se hromadí v cytoplazmě normálních krvetvorných kmenových buněk a progenitorových buněk transdukovaných těmito onkogeny. I přesto nedochází k cytoplazmatické stabilizaci HOXA9 v SMAD4 a díky tomu je sledována vyšší hladina HOXA9. Pokud není přítomen SMAD4 urychlí se vývoj leukémie *in vivo* a to díky zvětšené přeměně krvetvorných kmenových buněk a progenitorových buněk (HSPC). Aby byla chráněna přeměna normálních HSPC, které jsou indukované HOXA9, proto správným a potřebným mechanismem je cytoplazmatická vazba HOXA9 pomocí SMAD4. SMAD4 je silný supresor nádoru, který se podílí na kontrole růstu. Díky přerušení vzájemného působení mezi HOXA9 a SMAD4, aby byly aktivovány dráhy transformujícího růstového faktoru β (TGF - β) a apoptózy, což směřovalo ke ztrátě LSC. Díky tomuto zjištění byla odhalena hlavní role SMAD4 v negativní regulaci iniciace a udržování leukémie, která je indukovaná pomocí HOXA9/NUP98-HOXA9 a je poskytován účinný důkaz, že protichůdnost ustálení SMAD4 pomocí onkoproteinů může být novým terapeutickým přístupem v leukémii (Quéré et al., 2011).

Gen HOXA9 je fosforylován proteinovou kinázou C (PKC) a také kaseinovou kinázou II. Díky PKC, která zprostředkovává fosforylaci, a tak se sníží vazebná přitažlivost HOXA9 s DNA a také se sníží schopnost vnitřního HOXA9, který tvoří spolupracující DNA vazebné komplexy s PBX. Vývojové rozlišení myeloidů, které je vyvoláváno pomocí esteru forbol je z části vyvolána právě fosforylací HOXA9 zprostředkovanou PKC, která ale snižuje vazbu DNA homeoproteinu na DNA (Vijapurkar et al., 2004).

Dalším faktorem, který ovlivňuje funkci HOXA9 na posttranslační úrovni je trombopoetin (TPO). TPO reguluje tvorbu krevních destiček, což je jeho primární funkcí. TPO neovlivňuje celkové buněčné hladiny HOXA9. TPO indukuje nukleární transport HOXA9 v nezralých krvetvorných buňkách. Hormon TPO má vliv na jadernou lokalizaci transkripčního faktoru v primitivní buněčné linii. TPO má vliv i na jaderný import HOXA9 díky zlepšení tvorby komplexu HOXA9-MEIS1. MEIS1 má ústřední postavení v TPO-indukované HOXA9 jaderné lokalizaci a je odhalován jeho molekulární mechanismus. MEIS1 může blokovat jaderné exportní signální dráhy, pak za následek je, že jaderné lokalizační signály mohou směřovat protein přímo do jádra (Kirito et al., 2004).

4.3 HOXA9 v leukemogenezi

HOXA9 spadá mezi nejčastěji deregulovaný gen HOX v leukémii. Základní exprese genu HOXA9 by mohla být obvyklým mechanismem, který spojuje různé iniciační děje u akutní myeloidní leukémie (AML) a také je sloučen s nepříznivou klinickou prognózou. Díky vývoji AML v myších transplantačních chimérách BM byl přímo prokazován leukemogenní potenciál HOXA9. Myší transplantační chiméry BM dostaly štěp primitivních HSC, který byl vytvořen retrovirovým genovým přenosem k nadměrné expresi HOXA9. Nucená exprese genu HOXA9 v hematopoetických prekurzorech způsobuje podstatnou transformaci primitivních hematopoetických buněk a leukémie (Quéré et al., 2011).

Gen HOXA9 je nepostradatelný pro udržení leukemické transformace, ale molekulární mechanismy, kterými přispívá k leukemogenezi, jsou dodnes nejisté. K porušení regulace HOXA9 mohou vést různé genetické změny, včetně translokací MLL, fúzí NUP98, mutací NPM1c (cytoplasmic Nucleophosmin 1). Akutní leukémie jsou nejčastěji studovanými nemocemi s poruchou regulace HOXA9. V AML má HOXA9 2 až 8krát vyšší expresi (Collins et al., 2016).

4.3.1 Evolučně konzervované transkripční faktory HOXA9 A MEIS1

Geny transkripčních faktorů jsou nejčastějším cílem genetických změn v lidských leukémiích, mající základní funkce při běžném vývoji krevních buněk. HOXA9 a MEIS1 spadající pod homeoboxové geny, jsou transkripční faktory, které obsahují homeodoménu. HOXA9 a MEIS1 kontrolují spontánní obnovu progenitorů, které jsou v hematopoéze, tak i v leukemogenezi. Oba geny se považují za kritické regulátory hematopoézy, jsou exprimovány v brzkých hematopoetických progenitorech a následně jsou regulovány směrem dolů na CD34-fázi časně diferenciaci progenitorů.

HOXA9 a MEIS1 v leukemogenezi účinkují jako dominantní onkoproteiny, které navzájem spolupracují a způsobují AML. Pokud je nadměrná exprese genu HOXA9, způsobuje tato exprese blokaci diferenciaci neleukemogenních progenitorů spjatých s leukemogenními myeloidními buňkami. Aby byla možná produkce progenitorů, které vyvolávají AML, je nutná spolupráce s MEIS1. Ko-exprese MEIS1 a HOXA9 v buněčných liniích má za následek zvýšení účinnosti transformace HOXA9. Vysoké exprese obou genů jsou spojeny s nepříznivou prognózou (Adamaki et al., 2015).

Kódující proteiny HOXA9, MEIS1 a PBX1 obsahují homeodoménu, která se zapojuje do leukemické transformace jak u lidí, tak u myší. Tyto proteiny spolu fyzicky interagují. HOXA9 mají schopnost se kooperativně vázat na DNA *in vitro* s PBX, také s MEIS1. Jak se tedy může zdát, tak HOXA9 má schopnost vázat DNA jako heterodimery s MEIS1 nebo PBX.

MEIS1 se také může jevit jako hlavní intracelulární vazebný partner s PBX1. Akutní myeloidní leukémie vzniká u příjemců buněk kostní dřeně, které nadměrně exprimují HOXA9 a MEIS1. Samy HOXA9, MEIS1 a PBX1 se při nadbytečné expresi v buňkách kostní dřeně akutně netransformují, ale pokud je nadbytečná exprese HOXA9 a MEIS1 nastupuje rychlá indukce leukemických transformací. PBX1 je silně onkogenní za přítomnosti HOXB3 a HOXB4 (Kroon et al., 1998).

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) jedná se o tyrosinkinázový receptor, tento receptor je přechodně exprimován během zrání hematopoetických kmenových buněk, ale jeho exprese je trvale zvýšena v AML. MEIS1 je pravidelně nalézán up-regulován spolu s HOX geny v lidských leukémiích, za což můžou vysoké hladiny FLT3 mRNA. MEIS1 a HOXA9 spolu spolupracují při navozování leukémií (Morgado et al., 2007).

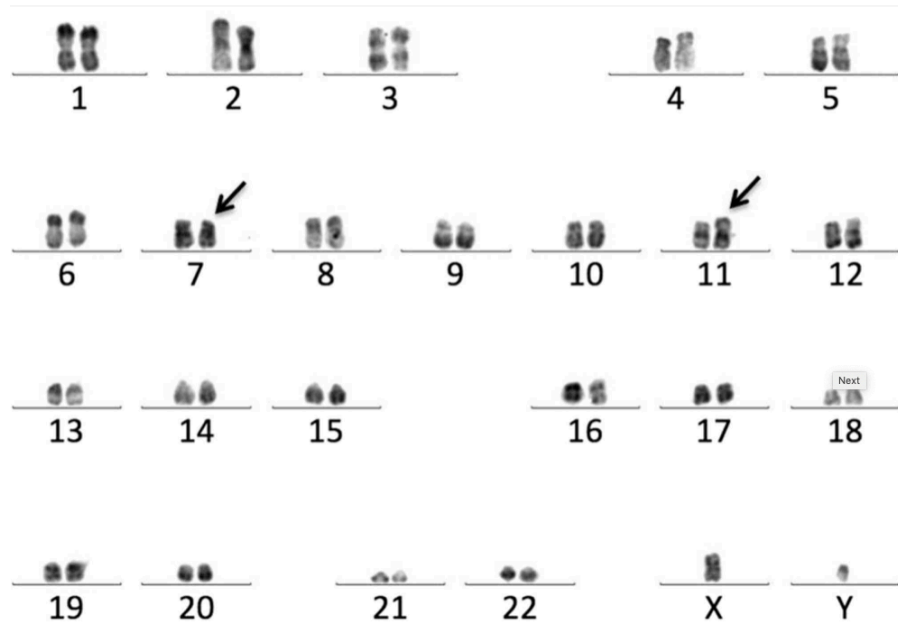
4.3.2 Fúzní onkogen NUP98-HOXA9

Díky translokacím HOXA9 s genem kódujícím NUP98, je gen HOXA9 přímo zapojen do leukémie u lidí. NUP98 je nukleoporinový protein. Aby mohla nastat exprese fúzního proteinu NUP98, byla vynucena exprese HOXA9 cílových genů a imortalizovaných hematopoetických myeloidních progenitorů. U myši podobná nadměrná exprese fúzních proteinů NUP98-HOXA9 imortalizuje hematopoetické progenitorové buňky, a to vede k myeloproliferativním poruchám (MPD). Vývoj letální AML ve frakci zvířat, bylo prokázáno v experimentech s transplantací BM (Quéré et al., 2011).

Na chromozómu 11p15 leží nukleoporinový gen NUP98, ten je zapojen do relativně vzácných translokací, které se opakují u akutních a chronických leukémií. Gen HOXA9 patří mezi nejčastější cíle translokací 11p15. N-koncová část NUP98, která je fúzovaná s C-koncovou svého partnera zahrnující homeodoménu vázající DNA. Prokázalo se, že NUP98 dává působivou transkripční aktivitu svému partnerovi v NUP98-HOXA9. NUP98-HOXA9 mohou tvořit kooperativní komplex, který váže DNA s PBX1 a že tato interakce je nutná pro transformaci fibroblastů, tedy leukemogeneze prostřednictvím NUP98-HOXA9 může vyžadovat určitou roli pro PBX1, což může znamenat potenciální roli pro MEIS1. Kooperativní vazba DNA mezi proteiny NUP98-HOXA9 a PBX1 nepředstavuje biochemický základ pro transformaci buněk primární kostní dřeně (Kroon et al., 2001).

Je předpokládáno, že fúzovaný protein NUP98-HOXA9 napomáhá leukemogenezi zastavením HOXA9, což je způsobeno díky terminální rozlišení. NUP98-HOXA9 může napomáhat k blastické přeměně tím, že blokuje normální dráhy myeloidního rozdělení (Yamamoto et al., 2000).

U AML se vyskytuje vzácná, ale opakující se genetická abnormalita. Jedná se o chromozomální translokaci t (7;11) (p15; p15) (viz Obr.7), kdy tato translokace vede k fúzi N-terminální části NUP98 s homeodoménou několika genů HOXA, nejčastěji s genem HOXA9 (NUP98-HOXA9). Pacienti, kteří mají AML spojenou s translokací t (7;11), mohou mít unikátní biologické a klinické vlastnosti a špatnou prognózu (Yang et al., 2017).



Obrázek 7: Karyotyp t(7;11)(p15;p15) pacienta s AML. Šipky znázorňují translokace v chromozómech 7 a 11. (Převzato z: Yang et al., 2017)

4.3.3 HOXA9 spojený s leukémií se smíšenou linií

HOXA9 je nadměrně exprimován a je ho potřeba v některých podtypech leukémií u lidí. Zejména tedy u leukémie se smíšenou linií leukémií (MLL). HOXA9 zahrnuje dva exony, které obsahují homeodoménu. U myši byl nalezen transkript HOXA9T, který je podstatně exprimován v různých embryonálních tkání myši. HOXA9T nebyl nalezen v normálních lidských buňkách, proto jeho funkce zůstává neobjasněná.

Díky RT-PCR testu byl stanoven výskyt izoform HOXA9 v buněčných liniích lidské leukémie a mononukleárních buňkách kostní dřeně. Byly rozeznány transkripty lidských genů HOXA9, které jsou označeny HOXA9 a HOXA9T, ty kódují protein obsahující a protein neobsahující homeodoménu. Oba transkripty byly hojně exprimovány v lidských leukemických buněčných liniích přeuspořádaných MLL, a to v porovnání s normálními mononukleárními buňkami kostní dřeně nebo jinými druhy leukemických buněk. HOXA9T ať už samotný nebo ve spolupráci s MEIS1 není schopen přeměňovat normální progenitorové buňky kostní dřeně. Pokud je nuceně zvýšená exprese HOXA9T, pak je významně zvýšena schopnost HOXA9 přeměňovat progenitorové buňky kostní dřeně u myši (He et al., 2012).

HOXA9 je nepostradatelný u nádorových procesů v MLL leukémiích. MLL je přijímána do cílových genů s HOX lokusy a jsou součástí komplexů, které zvyšují transkripci.

MLL má vliv i na hematopoézu a jedná se o jeden z nejčastěji přeskupovaný gen v akutních leukémiích.

Vyšší hladiny exprese HOXA9 mohou být velmi často pozorovány v leukemických buňkách, které nesou přeuspořádaný MLL gen. Protože cílovým genem pro MLL chimérické proteiny je HOXA9. Díky zvýšené expresi vyšlo také najevo, že je klíčová pro proliferativní výhodu a přežití tak v leukemických buňkách a tím souvisí se špatnou prognózou u pacientů s AML (Largeot et al., 2013).

Translokace, které obsahují gen MLL v leukémii, mají unikátní biologické vlastnosti a obvykle mají špatnou prognózu (Faber et al., 2009).

Cca 10 % případů akutních leukémií zahrnuje chromozómalní translokace v lokusu 11q23, který zahrnuje MLL. Tyto Akutní leukémie jsou spjaty s agresivním klinickým průběhem. Pro dostačující udržení leukemické transformace jsou důležité fúzní proteiny MLL, které konstitutivně regulují expresi HOXA9 (Collins et al., 2016).

4.4 Proteiny a geny regulované pomocí HOXA9

Protein HOXA9 je transkripčním faktorem homeodomény a je vysoce konzervativní. HOXA9 může řídit transkripci několika genů, které se pak vážou na promotor, ale může také regulovat přímo některé proteinové produkty.

Při vysoké expresi HOXA9 v myších myeloidních buňkách je narušena exprese gp91-Phox. Gen CYBB (cytochrome b-245, beta polypeptid), který je zodpovědný za kódování proteinu gp91-Phox. A jeho přepis je omezen pouze na diferenciované myeloidní buňky. HOXA10 v nediferenciovaných myeloidních buňkách potlačuje transkripční faktor. Potlačení transkripce CYBB je pomocí cis prvku v proximálním promotoru. HOXA9 spouští transkripci CYBB v diferenciovaných myeloidních buňkách, pomocí stejného cis prvku. U transkripce CYBB, která je zprostředkována díky HOXA9 je potřeba PBX1, ale je potlačována působením MEIS1. HOXA9 je zapojen do translokací, které jsou spojené s leukémií, příkladem můžou být některé myeloidní leukémie, které zahrnují HOXA9 a protein NUP98. Bylo zjištěno, že exprese fúzního proteinu NUP98-HOXA9, blokuje transkripci CYBB v diferenciacích myeloidních buňkách. V porovnání s HOXA9 má fúzní protein NUP98-HOXA9 k cis elementu CYBB větší vazebnou afinitu, ale vazba není ovlivněna fosforylací. CYBB je identifikován jako obvyklý cílový gen, který je potlačen díky HOXA10, ale aktivován pomocí HOXA9. Pokud je zvýšená

exprese MEIS1 nebo NUP98-HOXA9, poté je potlačena transkripce genu specifická pro myeloid, což také může vést k diferenciačnímu bloku v leukemogenezi (Bei et al., 2005).

U pacientů s AML bylo zkoumáno, že společné působení MN1 (meningioma 1) a HOXA9 je omezena na pacienty s nejhorší prognózou. A také tato koexprese byla spojena s velice aktivní signalizací STAT (signal transducer and activator of transcription), která je u nejagresivnějších skupin AML. Tyto studie prokazují, že STAT signalizace je rozhodující pro regeneraci kmenových buněk leukémie u leukémií exprimujících MN1 a HOXA9. MN1 jedná se o samostatný účinný onkogen, který produkuje myeloidní malignitu i samotný. MN1 napomáhá proliferaci a spontánní obnově transdukovaných buněk (Heuser et al., 2009).

Dalším příkladem, kdy HOXA9 pozitivně reguluje, může být onkogenní kináza PIM1 (pim-1 oncogene). Protein HOXA9 se váže na promotor PIM1 a tím indukuje mRNA a protein PIM1 v buňkách krvetvorby. Díky expresi proteinu PIM1 pomocí HOXA9 je zvýšena fosforylace a potlačená aktivace proapoptotického proteinu BAD (BCL2 – associated agonist of cell death). Buňky HOXA9, které mají zvýšenou apoptózu a sníženou proliferaci, což jsou anomálie. Tyto vady jsou napraveny opětovným zavedením PIM1. Je potvrzeno, že PIM1 je přímým transkripčním cílem HOXA9 a také zprostředkovatelem jeho antiapoptotických a proliferačních účinků v časných buňkách. A díky tomu, že HOXA9 je u akutních myeloidních leukémií obvykle up-regulován, mohl by být PIM1 terapeutickým cílem při onemocnění lidí (Hu et al., 2007).

Onkoprotein MLL-ENL způsobuje nadměrnou expresi HOXA9/MEIS1, ta dále vede ke zvýšení exprese genu c-Myb (c-myb myeloblastosis viral oncogene homolog). Touto cestou může být spuštěna leukemická přeměna. Produkt genu c-Myb není schopen sám o sobě spustit přeměnu buněk kultury na leukemické, což bylo i prokázáno. Potlačením exprese c-Myb je ale možné přeměně zabránit. Transformace zprostředkovaná HOXA9/MEIS1 je tedy na c-Myb závislá (Hess et al., 2006). Pomocí c-Myb je řízená exprese IGF-1R (receptor pro růstový faktor). Pomocí IGF-1R, se snižuje závislost leukemických buněk na cytokinech (Whelan et al., 2008).

Funkce eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4E (eIF4E) je pozitivně regulována pomocí produktu genu HOXA9. Tento vliv HOXA9 nesouvisí s jeho rolí v regulaci transkripce. Produkt genu HOXA9 se váže přímo na eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) a soutěží o vazebná místa s dalšími proteiny, které obsahují homeodoménu. Například s PRH/Hex (hematopoietically expressed homeobox), který působí jako negativní regulátor. V jádře tak HOXA9 podporuje na eIF4E závislý export mRNA cyklinu D1 a mRNA pro ornithindekarboxylázu (ODC). V cytoplazmě eIF4E s HOXA9 zvyšují translační účinnost

ODC mRNA. Bylo prokázáno, že u určité skupiny leukémií vytlačuje HOXA9 PRH z vazby s eIF4E, čímž může být narušena regulace eIF4E a spuštěna leukemická přeměna (Topisirovic et al., 2005).

U dospělých AML je jednou z nejčastějších genetických abnormalit mutace v chaperonovém proteinu Nucleophosmin 1 (NPM1). NPM1 se nachází primárně v jádru, ale díky mutacím, které jsou v AML vedou k tomu, že NPM1 se nachází v cytoplazmě. NPM1c up reguluje expresi HOXA9, HOXA10 a MEIS1, ale přesný mechanismus není zatím známý. Provedené studie na myších prokazují, že NPM1c může spolupracovat s FLT3 *in vivo*, kdy vznikají leukémie s dlouhou latencí (Collins et al., 2016).

4.5 Budoucí cíle léčby spojené s HOXA9

Vliv genu HOXA9 na leukemickou transformaci buněk popisuje mnoho studií. Z toho lze tedy vyvodit, že gen HOXA9 může být potenciálním cílem léčby leukémií. Ukázalo se, že při úbytku HOXA9 v 17 lidských AML/ALL buněčných liniích (7 MLL-přeuspořádané, 10 MLL-zárodečné linie) navozuje zástavu proliferace a buněčnou smrt specificky v MLL-přeuspořádaných buňkách. Při potlačení genu HOXA9 u primárních AML byla prokázána indukce buněčné smrti ve větším rozsahu ve vzorcích přeskupených MLL. Je tedy známá důležitá role HOXA9 v lidských leukémiích MLL a je naznačeno, že zacílení HOXA9 nebo navazující programy mohou být novou terapeutickou možností (Faber et al., 2009). Podstatná role SMAD4, která spočívá v negativní regulaci zahájení a udržování leukémie indukované HOXA9/NUP98-HOXA9, byla také odhalena. Protichůdné působení stabilizace SMAD4 těmito onkoproteiny by mohla být novým terapeutickým přístupem při léčbě leukémií (Quére et al., 2011).

5 ZÁVĚR

Krvetvorba neboli hematopoéza je proces tvorby krve v organismu. Je úzce spjata s leukémiemi. Základními mechanismy, které krvetvorba zajišťuje, jsou proliferace a diferenciacie pluripotentních buněk v buňky unipotentní. Unipotentní buňky jsou pak připraveny vykonávat své specifické funkce. Krvetvorba je nápomocná k pochopení dějů, které jsou spojené s různými druhy onemocnění včetně leukémie, na kterou se má bakalářská práce zaměřuje.

Uplynulo mnoho let od první diagnostikované leukémie z kostní dřeně pacienta, zavedení radioterapie do léčby leukémií a také i od prvního podání chemoterapie. Dodnes je řada otázek, na které nejsou známé odpovědi, týkajících se jak vzniku leukémie, tak její diagnózy a možných inovací v terapii. Leukémie jsou řazeny mezi onemocnění s vysokou mortalitou.

Homeoboxové geny obsahují vysoce evolučně konzervované oblasti. To znamená, že obdobné geny s podobnou strukturou i funkcí se vyskytují jak u primitivních, tak i u těch nejvyvinutějších organismů. V každém komplexu HOX genu je přímý lineární vztah mezi pozicí genu a jeho dočasnou prostorovou expresí, což dokazuje velmi důležitou úlohu v časně embryogenezi.

Gen HOXA9 je klíčovým regulátorem vývoje HSC v normální hematopoéze. Jeho exprese se fyziologicky snižuje s vývojem krevních buněk. U MLL asociovaných myeloidních leukémií byla pozorována zvýšená exprese HOXA9. Předpokládá se, že pro indukci tvorby tohoto typu leukémií, je gen HOXA9 nezbytný v počátečních fázích onemocnění. Role genu HOXA9 v leukemogenezi není stále zcela objasněna. I když je gen HOXA9 nejlépe prozkoumaným homeoboxovým genem, je velkou komplikací stále nedostatečně prostudovaná řada regulačních drah, jejichž je součástí. Lze očekávat, že řada genů spojených s interakcemi s genem HOXA9 teprve čeká na svůj objev. V budoucnu bude důležitý gen HOXA9 zejména v souvislosti s léčbou leukémií do budoucna. Regulací genu HOXA9 by mohla být potenciálně zvrácena nádorová přeměna hematopoetických buněk, proto je do studia tohoto genu vkládána velká naděje.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMAKI, M., G. I. LAMBROU, A. ATHANASIADOU, S. VLAHOPOULOS, A. G. PAPAVALASSILIOU a M. MOSCHOVI. HOXA9 and MEIS1 gene overexpression in the diagnosis of childhood acute leukemias: Significant correlation with relapse and overall survival. *Leukemia Research* [online]. 2015, **39**(8), 874-882 [cit. 2020-06-17]. ISSN 01452126. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014521261500123X>

ADAM, Z., M. KREJČÍ a J. VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN isbn978-80-247-2502-4.

ARGIROPOULOS, B. a R. K. HUMPHRIES. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* [online]. 2007, **26**(47), 6766-6776 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/1210760>

BEI, L., Y. LU a E. A. EKLUND. HOXA9 Activates Transcription of the Gene Encoding gp91 Phox during Myeloid Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(13), 12359-12370 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M408138200>

BIJL, J., J. W. VAN OOSTVEEN, M. KREIKE, et al. Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* [online]. 1996, **87**(5), 1737-1745 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/87/5/1737/174583/Expression-of-HOXC4-HOXC5-and-HOXC6-in-human>

BLACKBURN, L. M., S. BENDER a S. BROWN. Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Seminars in Oncology Nursing* [online]. 2019, **35**(6) [cit. 2020-06-17]. ISSN 07492081. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749208119301329>

CEREDIG, R., A. G. ROLINK a G. BROWN. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2009, **9**(4), 293-300 [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri2525>

COLLINS, C. T. a J. L. HESS. Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets. *Oncogene* [online]. 2016, **35**(9), 1090-1098 [cit. 2020-06-26]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/onc2015174>

DUARTE, D., E. D. HAWKINS a C. LO CELSO. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood* [online]. 2018, **131**(14), 1507-1511 [cit. 2020-06-22]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/131/14/1507/36671/The-interplay-of-leukemia-cells-and-the-bone>

FALLINI, C., B. KHALIL, C. L. SMITH a W. ROSSOLL. Traffic jam at the nuclear pore: All roads lead to nucleocytoplasmic transport defects in ALS/FTD. *Neurobiology of Disease* [online]. 2020, 140(104835) [cit. 2020-07-11]. ISSN 09699961. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996120301108>

FABER, J., A. V. KRIVTSOV, M. C. STUBBS, et al. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* [online]. 2009, **113**(11), 2375-2385 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/113/11/2375/109995/HOXA9-is-required-for-survival-in-human>

FITZGERALD, P. H. a Ch. M. MORRIS. Ph-Negative Chronic Myeloid Leukemia: The Nature of the Breakpoint Junctions and Mechanism of ABL Transposition. *Leukemia & Lymphoma* [online]. 2009, **6**(4-5), 277-287 [cit. 2020-06-17]. ISSN 1042-8194. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428199209053559>

GÖRGENS, A., S. RADTKE, M. MÖLLMANN, M. CROSS, J. DÜRIG, P. A. HORN a B. GIEBEL. Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. *Cell Reports* [online]. 2013, **3**(5), 1539-1552 [cit. 2020-06-17]. ISSN 22111247. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124713002076>

HALLEK, M., T. D. SHANAFELT a B. EICHHORST. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* [online]. 2018, **391**(10129), 1524-1537 [cit. 2020-06-17]. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618304227>

HE, M., P. CHEN, S. ARNOVITZ, et al. Two isoforms of HOXA9 function differently but work synergistically in human MLL-rearranged leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 2012, **49**(2), 102-106 [cit. 2020-06-17]. ISSN 10799796. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979612000927>

HESS, J. L., C. B. BITTNER, D. T. ZEISIG, Ch. BACH, U. FUCHS, A. BORKHARDT, J. FRAMPTON a R. K. SLANY. C-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* [online]. 2006, **108**(1), 297-304 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/108/1/297/133571/cMyb-is-an-essential-downstream-target-for>

HEUSER, M., L. M. SLY, B. ARGIROPOULOS, et al. Modeling the functional heterogeneity of leukemia stem cells: role of STAT5 in leukemia stem cell self-renewal. *Blood* [online]. 2009, **114**(19), 3983-3993 [cit. 2020-07-05]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/114/19/3983/26754/Modeling-the-functional-heterogeneity-of-leukemia>

Homeoboxes - Genetics Home Reference - NIH. Genetics Home Reference - NIH [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genefamily/homeoboxes>

HU, Y., E. PASSEGUÉ, S. FONG, C. LARGMAN a H. J. LAWRENCE. Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood* [online]. 2007, **109**(11), 4732-4738 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/109/11/4732/23149/Evidence-that-the-Pim1-kinase-gene-is-a-direct>

JABBOUR, E. a H. KANTARJIAN. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology* [online]. 2018, **93**(3), 442-459 [cit. 2020-06-17]. ISSN 03618609. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.25011>

JAGANNATHAN-BOGDAN, M. a L. I. ZON. Hematopoiesis. *Development* [online]. 2013, **140**(12), 2463-2467 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.083147>

JULIUSSON, G. a R. HOUGH. Leukemia. STARK, D.P. a G. VASSAL, ed. *Tumors in Adolescents and Young Adults* [online]. S. Karger, 2016, 2016-9-5, s. 87-100 [cit. 2020-06-18]. Progress in Tumor Research. ISBN 978-3-318-05911-3. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/447076>

KAMPEN, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* [online]. 2012, **36**(1), 6-13 [cit. 2020-06-19]. ISSN 01452126. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212611004711>

KANG, Z., Y. LIU, L. XU, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer* [online]. 2016, **35**(1) [cit. 2020-06-17]. ISSN 1944-446X. Dostupné z: <https://cancercommun.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40880-016-0108-0>

KIRITO, K., N. FOX a K. KAUSHANSKY. Thrombopoietin Induces HOXA9 Nuclear Transport in Immature Hematopoietic Cells: Potential Mechanism by Which the Hormone Favorably Affects Hematopoietic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, **24**(15), 6751-6762 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <https://MCB.asm.org/content/24/15/6751>

KROON, E., J. KROSL, U. THORSTEINSDOTTIR, S. BABAN, A.M. BUCHBERG a G. SAUVAGEAU. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *The EMBO Journal* [online]. 1998, **17**(13), 3714-3725 [cit. 2020-06-17]. ISSN 14602075. Dostupné z: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/17.13.3714>

KROON, E., U. THORSTEINSDOTTIR, N. MAYOTTE, T. NAKAMURA a G. SAUVAGEAU. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *The EMBO Journal* [online]. 2001, **20**(3), 350-361 [cit. 2020-

06-17]. ISSN 14602075. Dostupné z:
<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/20.3.350>

LARGEOT, Anne, Jérôme PAGGETTI, Julien BROSEUS, et al. Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2013, **1833**(12), 3054-3063 [cit. 2020-06-17]. ISSN 01674889. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488913003121>

Leukemia Types, Symptoms, and Treatments | UPMC Hillman Cancer Center. Cancer Treatment Center | UPMC Hillman Cancer Center - Pittsburgh PA [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://hillman.upmc.com/cancer-care/blood/types/leukemia>

MALLO, Moises, Deneen M. WELLIK a Jacqueline DESCHAMPS. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Developmental Biology* [online]. 2010, **344**(1), 7-15 [cit. 2020-06-17]. ISSN 00121606. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160610002691>

MILNE, Thomas A, Scott D BRIGGS, Hugh W BROCK, Mary Ellen MARTIN, Denise GIBBS, C.David ALLIS a Jay L HESS. MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Molecular Cell* [online]. 2002, **10**(5), 1107-1117 [cit. 2020-06-17]. ISSN 10972765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276502007414>

MORGADO, Ester, Stéphanie ALBOUHAIR a Catherine LAVAU. Flt3 is dispensable to the Hoxa9/Meis1 leukemogenic cooperation. *Blood* [online]. 2007, **109**(9), 4020-4022 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0006-4971. Dostupné z:
<https://ashpublications.org/blood/article/109/9/4020/23638/Flt3-is-dispensable-to-the-Hoxa9Meis1-leukemogenic>

NETZEL, B., R. I. HAAS a S. THIERFELDER. Autologous Bone Marrow Transplantation in Leukemia. THIEL, Eckhard a Stephan THIERFELDER, ed. *Leukemia* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984, 1984, s. 290-300 [cit. 2020-06-22]. Recent Results in Cancer Research. ISBN 978-3-642-82251-3. Dostupné z:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-82249-0_13

PAIX, A., D. ANTONI, W. WAISSI, M. LEDOUX, K. BILGER, L. FORNECKER a G. NOEL. Total body irradiation in allogeneic bone marrow transplantation conditioning regimens: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2018, **123**, 138-148 [cit. 2020-06-22]. ISSN 10408428. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842817303268>

PENKA, M. a E. SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011, 15 ISBN 978-80-247-3459-0.

QUÉRÉ, R., G. KARLSSON, F. HERTWIG, et al. Smad4 binds Hoxa9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by Hoxa9 and leukemia transformation. *Blood* [online]. 2011, **117**(22), 5918-5930 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/117/22/5918/22147/Smad4-binds-Hoxa9-in-the-cytoplasm-and-protects>

SAMUEL, S. a H. NAORA. Homeobox gene expression in cancer: Insights from developmental regulation and deregulation. *European Journal of Cancer* [online]. 2005, **41**(16), 2428-2437 [cit. 2020-06-17]. ISSN 09598049. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804905007136>

SAUVAGEAU, G., P. M. LANSDORP, C. J. EAVES, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1994, **91**(25), 12223-12227 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.25.12223>

SHAFAT, M. S., B. GNANESWARAN, K. M. BOWLES a S. A. RUSHWORTH. The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. *Blood Reviews* [online]. 2017, **31**(5), 277-286 [cit. 2020-06-22]. ISSN 0268960X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X1630073X>

STRATI, P., N. JAIN a S. O'BRIEN. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 2018, **93**(5), 651-664 [cit. 2020-06-18]. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002561961830154X>

THORSTEINSDOTTIR, U., G. SAUVAGEAU, M. R. HOUGH, W. DRAGOWSKA, P. M. LANSDORP, H. J. LAWRENCE, C. LARGMAN a R. K. HUMPHRIES. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1997, **17**(1), 495-505 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.17.1.495>

TOPISIROVIC, I., A. KENTISIS, J. M. PEREZ, M. L. GUZMAN, C. T. JORDAN a K. L. B. BORDEN. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Activity Is Modulated by HOXA9 at Multiple Levels. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2005, **25**(3), 1100-1112 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <https://mcb.asm.org/content/25/3/1100>

TREISMAN, J., E. HARRIS, D. WILSON a C. DESPLAN. The homeodomain: A new face for the helix-turn-helix? *BioEssays* [online]. 1992, **14**(3), 145-150 [cit. 2020-07-10]. ISSN 0265-9247. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.950140302>

Types of Leukemia: Common, Rare and More Varieties | CTCA. Cancer Treatment Centers of America | Care Like No Other | CTCA [online]. 2020 IPB [cit. 2020-06-24]. Dostupné z: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/leukemia/types>

VALCOVICI, M., F. ANDRICA, C. SERBAN a S. DRAGAN. Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives. *Archives of Medical Science* [online]. 2016, **2**(2), 428-435 [cit. 2020-06-18]. ISSN 1734-1922. Dostupné z: <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/aoms.2016.59270>

VIJAPURKAR, U., N. FISCHBACH, W. SHEN, Ch. BRANDTS, D. STOKOE, H. J. LAWRENCE a C. LARGMAN. Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of the Leukemia-Associated HOXA9 Protein Impairs Its DNA Binding Ability and Induces Myeloid Differentiation. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, **24**(9), 3827-3837 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <https://Mcb.asm.org/content/24/9/3827>

Výrazy od a | Velký lékařský slovník On-Line. Výrazy od a | Velký lékařský slovník On-Line [online]. Copyright © Maxdorf 1998 [cit. 03.07.2020]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz>

WANG, A. a H. ZHONG. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology* [online]. 2018, **23**(10), 729-739 [cit. 2020-06-22]. ISSN 1607-8454. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10245332.2018.1486064>

WHELAN, J. T., D. L. LUDWIG a F. E. BERTRAND. HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* [online]. 2008, **22**(6), 1161-1169 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0887-6924. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/leu200857>

YAMAMOTO, K., Y. NAKAMURA, Y. NAKAMURA, K. SAITO a S. FURUSAWA. Expression of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in the blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia with t(7;11)(p15;p15). *British Journal of Haematology* [online]. 2000, **109**(2), 423-426 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0007-1048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.2000.02003.x>

YAN, J., Y. CHEN, A. DESMOND, A. SILVA, Y. YANG, H. WANG, X. HUA a Ch. ARENDT. Cdx4 and Menin Co-Regulate Hoxa9 Expression in Hematopoietic Cells. *PLoS ONE* [online]. 2006, **1**(1) [cit. 2020-06-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000047>

YANG, J., X. LYU, X. ZHU, X. MENG, W. ZUO, H. AI a M. DENG. Chromosome t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia coexisting with multilineage dyspoiesis and mutations in NRAS and WT1: A case report and literature review. *Oncology Letters* [online]. 2017, **13**(5), 3066-3070 [cit. 2020-06-26]. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.5823>

7 ZDROJE OBRÁZKŮ A PŘÍLOH

ADOLFSSON, J., R. MÅNSSON, N. BUZA-VIDAS, et al. Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. *Cell* [online]. 2005, **121**(2), 295-306 [cit. 2020-06-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405001583>

[Figure, Philadelphia chromosome. A piece of chromosome 9 and a piece chromosome 22 break off and trade places.] - PDQ Cancer Information Summaries - NCBI Bookshelf. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65740/figure/CDR0000258006__158/?fbclid=IwAR3msUf69VTHQBy3OIq6qKmKFFqAOQPQxZZYd70JTfE1CczCrEyUyaMW7q4

HALLEK, M., T. D. SHANAFELT a B. EICHHORST. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* [online]. 2018, **391**(10129), 1524-1537 [cit. 2020-06-17]. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618304227>

CHANDER, V. a G. GANGENAHALLI. Emerging strategies for enhancing the homing of hematopoietic stem cells to the bone marrow after transplantation. *Experimental Cell Research* [online]. 2020, **390**(1) [cit. 2020-06-24]. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482720301622>

KAMPEN, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* [online]. 2012, **36**(1), 6-13 [cit. 2020-06-19]. ISSN 01452126. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212611004711>

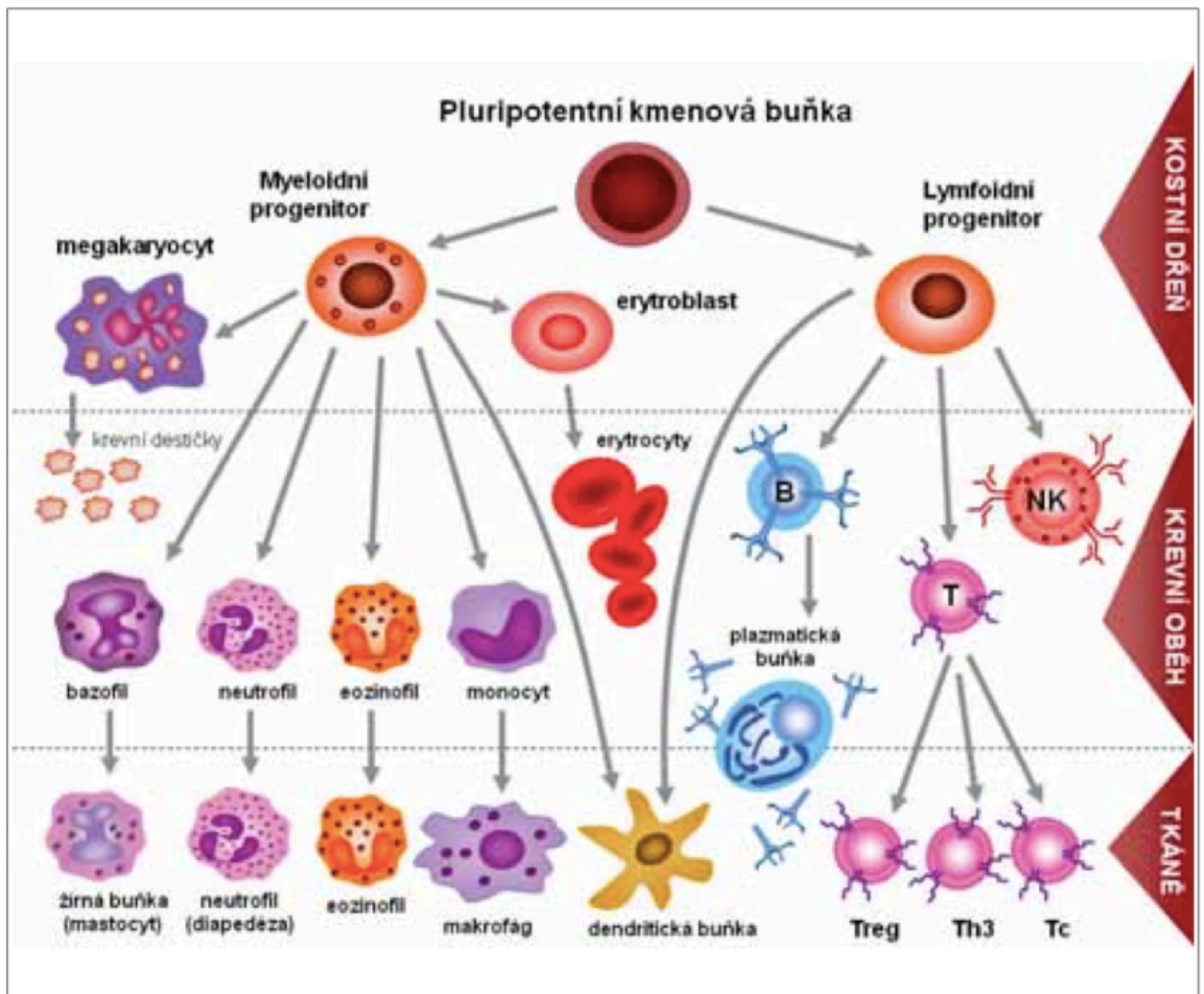
LAPČÍKOVÁ, A., V. DIVOKÝ, M. HORVÁTKOVÁ a I. FELLNEROVÁ. Laboratorní hematologie: [od fyziologie k medicíně : integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN isbn978-80-244-2876-5.

YANG, J., X. LYU, X. ZHU, X. MENG, W. ZUO, H. AI a M. DENG. Chromosome t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia coexisting with multilineage dyspoiesis and mutations in NRAS and WT1: A case report and literature review. *Oncology*

Letters [online]. 2017, **13**(5), 3066-3070 [cit. 2020-06-26]. ISSN 1792-1074. Dostupné z:
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.5823>

PŘÍLOHY

Příloha 1: Hierarchie hematopoézy (Upraveno podle: Lapčiková et.al., 2011)



Příloha 2: Atlas znázorňující morfologii leukemických buněk, zveřejněný roku 1845 (Převzato z: Kampen, 2012). **A** prezentace bílých krvinek v krvi extrahované leukemického pacienta; **B** a **C** slizniční globule (hnisavé globule); **D** slizniční globule (kuličky) po ošetření kyselinou octovou pro vizualizaci jader; **E** globule hnisu; **F** globule hnisu po ošetření kyselinou octovou

