

# Porucha v regulácii chromatínu ako molekulárny mechanizmus MLL-ENL leukemogenézy

Takáčová S.<sup>1</sup>, Jarošová M.<sup>2</sup>, Divoký V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologie LF UP Olomouc

<sup>2</sup>Hemato-onkologická klinika FN Olomouc

## Súhrn

Chromozomálne aberácie postihujúce gén *Mixed-Lineage Leukemia* (*MLL*, známy tiež pod názvami *HRX* alebo *ALL-1*) na lokuse 11q23 sú asociované s agresívnym typom akútnej leukémie. Časté translokácie vedú ku vzniku heterogénnej skupiny *MLL* fúziých génov, ktoré získaním aktívneho transformačného potenciálu spôsobujú leukemickú konverziu *MLL* transkripčného faktoru. *MLL* proteín sa zúčastňuje epigenetického procesu udržovania expresie homeotických (*Hox*) génov v priebehu niekoľkých bunkových delení počas vývinu a diferenciácie buniek. Abnormálne zmeny v tomto procese vedú ku vzniku leukémie. Cieľom tohto súhrnného článku je poskytnúť ucelený prehľad o normálnej a malígnej funkcii *MLL* proteínov so zameraním predovšetkým na *MLL-ENL* v rámci súčasných poznatkov. Súhrnný článok zároveň zahŕňa vlastný prínos našej skupiny do danej problematiky *MLL* leukémií.

**Keľúčové slová:** akútna leukémia, *MLL*, translokácia, chromatín, epigenetika, transkripcia

## Summary

Takáčová S., Jarošová M., Divoký V.: Aberrant chromatin regulation as a molecular mechanism of *MLL-ENL* leukemogenesis

Chromosomal aberrations that affect the *Mixed-Lineage Leukemia* gene (*MLL*, known also as *HRX* or *ALL-1*) located at 11q23 are associated with an aggressive type of acute leukemia. Frequent translocations create a diverse set of *MLL* fusion genes with acquired active transforming potential resulting in leukemic conversion of *MLL* transcription factor. The normal *MLL* protein is involved in epigenetic maintenance of homeotic (*Hox*) gene expression through several rounds of cell division during development and differentiation. Alterations of this process by oncogenic *MLL* chimeric transcription factors lead to leukemia. This review is intended to provide a coherent view on normal and malignant function of *MLL* proteins - mainly focusing on *MLL-ENL* - in our current knowledge. Our own contribution to the field is also summarized in this review.

**Key words:** acute leukemia, *MLL*, translocation, chromatin, epigenetics, transcription

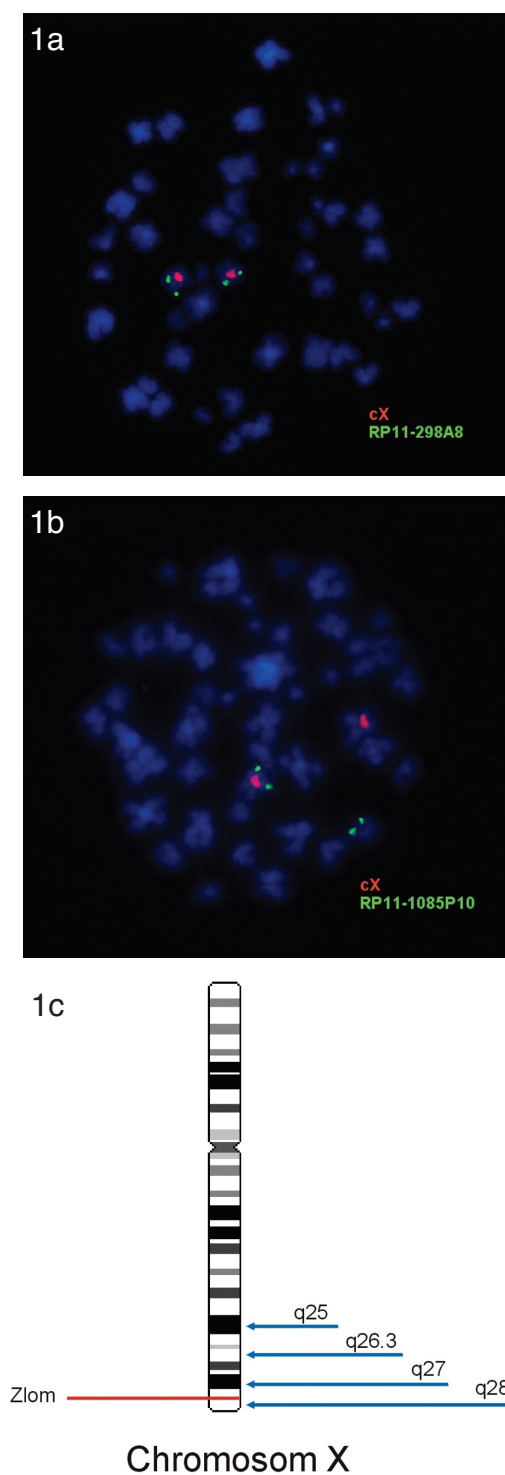
*Trans. Hemat. dnes, 13, 2007, No. 1, p. 16–22.*

## Heterogenita prestavieb *MLL* génu

Gén *MLL* sa nachádza v oblasti 11q23 a zúčastňuje sa viacerých typov chromozomálnych aberácií, ktoré spôsobujú konverziu *MLL* protoonkogénu na aktívny onkogén. Mutácie génu *MLL* zahŕňajú okrem častých translokácií, aj inverzie, duplikácie, delécie; vo vzácných prípadoch sa vyskytujú i génové amplifikácie. Najčastejšími mutáciami sú recipročné translokácie (1–3), ktoré sú asociované s agresívnou akútnou leukémiou (AL) v detskom aj v dospelom veku. V ich dôsledku vznikajú chimerické onkoproteíny, u ktorých N-terminálny koniec *MLL* proteínu je fúzovaný s C-terminálnym koncom partnerského proteínu. Zlom v géne *MLL* najčastejšie nastáva v oblasti zahŕňajúcej exóny 8-14, nazývanej *breakpoint cluster region* (BCR). Lokalizáciu zlomov DNA do tejto oblasti ako i ich frekvenciu vo veľkej miere ovplyvňuje jej chromatinová štruktúra, ďalej repetitívne sekvencie a rozpoznávacie miesta pre topoizomerázu II, ktoré sa v BCR nachádzajú (4, 5, 6). Nie je preto prekvapením, že prestavby *MLL* patria medzi najčastejšie abnormality u sekundárnych leukémií po terapii inhibítormi topoizomerázy II.

*MLL* translokácie sa vyznačujú pozoruhodnou heterogenitou partnerských génov. Bolo popísaných viac než

päťdesiat partnerských génových lokusov, ale ich značná časť je neznámeho pôvodu. Atlas genetiky a cytogenetiky v onkológii a hematológii v súčasnosti uvádza tridsaťštyri identifikovaných fúziých *MLL* partnerov (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html>). Niekoľko nových translokácií bolo identifikovaných a charakterizovaných na HOK v Olomouci (nepublikované výsledky (obr. 1). Napriek veľkej diverzite *MLL* fúzií platí určitá „zákonitosť“ vo frekvencii ich výskytu. Podľa subcelulárnej lokalizácie normálnych proteínových produktov partnerských génov *MLL* je možné ich rozdeliť na nukleárne a cytoplazmatické. *MLL* je translokovaný v 5 % prípadov detských akútnych lymfoblastických leukémií (ALL) (43) a u 80 % kojeneckých ALL, z ktorých najmenej 50 % tvoria dve translokácie zahŕňajúce nukleárnych partnerov: t(4;11), ktorej výsledkom je fúziý onkogén *MLL-AF4*, a t(11;19), ktorá dáva vznik fúziému onkogénu *MLL-ENL* (7, 8). Kým *MLL-AF4* špecifikuje výlučne pre-B bunkový fenotyp ALL, *MLL-ENL* sa vyskytuje aj u akútnych myeloblastických leukémií (AML), u akútnych bifenotypických leukémií (ABL) a v ojedinelých prípadoch u T-bunkovej ALL (1, 7, 9). Okrem toho tvoria *MLL* translokácie 10 % všetkých mutácií u AML. Sú to najmä fúzie s nukleárnymi



**Obr. 1.** Schematické znázornenie mapovania a určovania lokalizácie zlomu na chromozóme X u detskej pacientky s ALL asociovanou s prestavbou 11q23. Pomocou FISH sa potvrdila translokácia génu *MLL* s partnerským X chromozómom (nie je ukázané). **A.** Výsledok FISH s BAC sondou RP11-298A8, ktorá mapuje do oblasti Xq27 a je značená zeleným fluorochrómom, a zároveň s centromerickou sondou CEPX (Abbott-Vysis), ktorá je značená červeným fluorochrómom. Lokalizácia BAC sondy na X chromozóme potvrdzuje, že zlom nenastal v pruhu q27. **B.** Mapovanie oblasti Xq28 pomocou BAC sondy RP11-1085P10 značenej zeleným fluorochrómom a centromerickú sondou CEPX (Abbott-Vysis) značenej červeným fluorochrómom. Lokalizácia signálu BAC sondy na inom chromozóme (chromozóm 11) potvrdzuje zlom X chromozómu v pruhu q28. **C.** Mapa X chromozómu znázorňuje zlom v pruhu q28. Fúzia *MLL* génu s Xq28 nebola doteraz popísaná.

mi partnermi: t(9;11), kódujúca fúzny produkt *MLL*-AF9, a t(6;11), kódujúca *MLL*-AF6 (10). Ďalšie *MLL* fúzne onkogény s nukleárnymi partnermi ako i všetky fúzie s cytoplazmatickými partnermi sa vyskytujú v malých skupinách pacientov a v ojedinelých prípadoch. Skutočnosť, že *MLL* je častejšie fúzovaný s nukleárnymi proteínmi, poukazuje na to, že tieto chimerické onkoproteíny sa vyznačujú vysokým transformačným potenciálom v porovnaní s cytoplazmatickými partnermi, a menej vyžadujú kooperáciu ďalších onkogénov v leukemickej transformácii krvotvorných buniek. Nezávisle na fenotype leukémie, výskyt *MLL* mutácií u pacientov vždy zhoršuje prežitie a je spojený s veľmi zlou prognózou.

### Normálna funkcia *MLL*

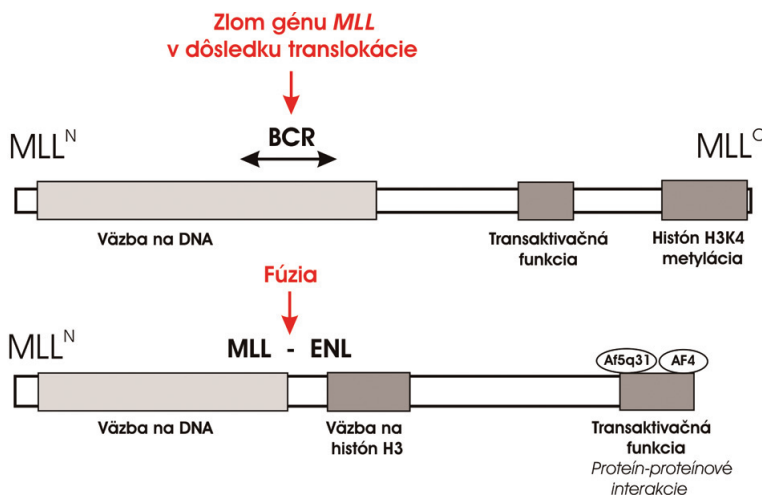
*MLL* proteín je transkripčný faktor, ktorý sa zapája do udržiavania „transkripčnej pamäte“ počas embryogenézy, dozrievania a vývinu mnohých typov buniek. *MLL* je proteín s vysokou molekulovou hmotnosťou (skladá sa z 3968 aminokyselinových jednotiek), ktorý sa v bunke proteolyticky štiepi na C-koncový (*MLL*<sup>C</sup>) a N-koncový (*MLL*<sup>N</sup>) fragment. Po translokácii do jadra sa fragmenty spoja do jedného proteínového komplexu (44, 45, 46). Zjednodušená štruktúra proteínu *MLL* a funkčné domény jednotlivých fragmentov sú znázornené na obrázku 2.

Transkripčná pamäť umožňuje bunke zapamätať si, akým je bunkovým typom, a zabezpečuje zachovanie a prenos daného genetického programu zakódovaného v podobe histónových modifikácií chromatinu do ďalšej generácie počas niekoľkých bunkových delení. To znamená, že daný histónový kód určuje, ktoré gény sa majú zapínať v danom vývinovom štádiu, ako dlho majú byť udržiavané v aktívnom stave a kedy ich treba vypnúť.

Heterozygótny stav straty funkcie *MLL* u myši vedie ku skeletálnym transformáciám a posteriornému posunu profilu expzie *Hox* génov. Expzia *Hox* génov sa normálne aktivuje u myších embryí s úplnou deficienciou *MLL*, ale nie je udržiavaná počas celého vývinu, čo má letálny efekt v skorom štádiu embryogenézy. Tieto výsledky poukázali nato, že kľúčovými cieľovými génmi *MLL* sú *Hox* gény kódujúce transkripčné faktory s dôležitou úlohou v regulácii embryonálneho vývinu, bunkového delenia, líniovej špecifikácie a diferenciacie buniek (20, 32, 33).

### Leukemická konverzia transkripčného faktora *MLL*

Translokáciou na partnerský lokus transkripčný faktor *MLL* stráca C-terminálnu časť, ktorá je zodpovedná za transaktiváciu cieľových génov a poskytuje schopnosť modifikovať chromatin. Doterajšie práce dokazujú, že skrátená N-terminálna časť *MLL* nemá leukemogénne vlastnosti, avšak pomocou fúzneho partnera nadobúda transformačný potenciál *in vitro* (11–16) a spôsobuje leukémiu u myši (17–19). Skoršie hypotézy naznačovali, že *MLL* leukemogenéza by mohla byť výsledkom dvoch mechanizmov - získavania nových funkcií *MLL* onkogénu, ktorý dominantne negatívnym spôsobom potláča účinok normálnej alely, a zároveň straty funkcie jednej alely *MLL*. Súčasný pohľad na



**Obr. 2.** Schematické znázornenie štruktúry MLL proteínu a jeho konverzie na onkogénny transkripčný faktor MLL-ENL. Po fúzii s ENL N-terminálna časť MLL proteínu je zachovaná a podieľa sa na väzbe DNA. MLL ale stráca transaktivačnú a H3K4 metylačnú aktivitu na C-konci. MLL-ENL chimerický onkoproteín získa histón H3-väzobnú funkciu na N-terminálnom konci ENL a transaktivačný potenciál sprostredkovaný s C-terminálnou doménou ENL. Táto doména sa zúčastňuje proteín-proteínových interakcií s ďalšími MLL partnermi AF5q31 a AF4 v rámci elongačného komplexu. Súčasné vedecké poznatky dokazujú, že táto doména je potrebná a dostačujúca k leukemickej transformácii krvotvorných progenitorov (29). Na obrázku je znázornený aj BCR a bod fúzie MLL s ENL.

vznik a vývin MLL leukémií skôr podporuje mechanizmus nadobúdania nových onkogénnych funkcií, čo je v súlade s už dávno známym faktom, že heterozygótna deficiencia *MLL* nevedie k vývinu leukémie u myší (20). Jarošová a kol. popísali prípad „skrytej“ fúzie *MLL-AF10* u pacienta s AML, ktorá vznikla duplikáciou 5' časti *MLL* a jej následnou inzerciou do oblasti 10p12. Ďalším zaujímavým zistením bolo, že nedošlo k recipročnej translokácii, a preto obidve alely *MLL* zostali zachované. Tento predtým nikdy nepopísaný mechanizmus vzniku *MLL* fúzií poskytuje ďalší dôkaz o tom, že strata jednej alely *MLL* neprispieva k leukemogénze (21). Molekulárna podstata leukemickej konverzie MLL proteínu spočíva v nadobúdaní nových funkcií prostredníctvom fúzných partnerov. Jedným z mechanizmov je priama fúzia MLL s transaktivačnou doménou nukleárných partnerských proteínov. Konverzia proteínu MLL na onkogénny transkripčný faktor je schematicky znázornená na príklade vzniku MLL-ENL fúzneho onkoproteínu na obrázku 2.

**Viac partnerov-jedna funkcia?**

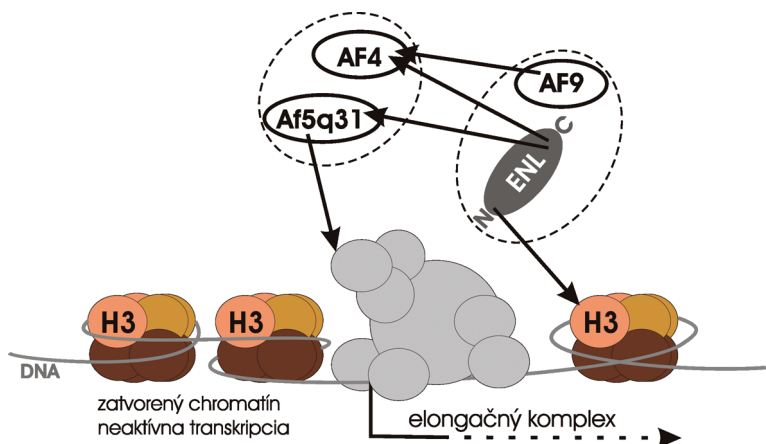
Charakteristickým rysom MLL leukémií je ich rozmanitý fenotyp. Na rozdiel od iných leukemických onkogénov, ktoré sú zväčša asociované s jedinou špecifickou hematopoetickou líniou, jednotlivé *MLL* onkogény vykazujú tendenciu určovať leukemický fenotyp. Napriek vysokej heterogenite MLL fúzných onkoproteínov, nevykazujú MLL leukémie výrazne odlišný pro-

fil expresie génov v súvislosti s jednotlivými partnermi, ale *MLL* translokácie sa skôr zoskupujú na základe fenotypu leukemickej línie (22, 23). So všetkými prestavbami *MLL* génu je dominantne asociovaná vysoká hladina expresie *Hox* génov, čo poukazuje na to, že deregulácia *Hox* génov môže byť spoločným mechanizmom leukemickej transformácie *MLL* onkogénmi (23). Na základe týchto faktov si treba položiť otázku, ako môžu natoľko odlišné, nepríbuzné proteíny dávať vznik onkogénnym MLL chiméram, ktoré transformujú hematopoetickú bunku podobným mechanizmom – nadmernou expresiou *Hox* génov. Novšie štúdie sa domnievajú, že najčastejšie nukleárne partnerské proteíny MLL fúzií sú súčasťou siete proteínových interakcií, ktorá ich pravdepodobne spája do jedného hypotetického multiproteínového komplexu nazývaného „MLL-web“. V ňom sú jednak pospájané interakciami medzi sebou, a jednak fyzicky a funkčne interagujú s transkripčným aparátom a transkripčnou elongáciou. V strede

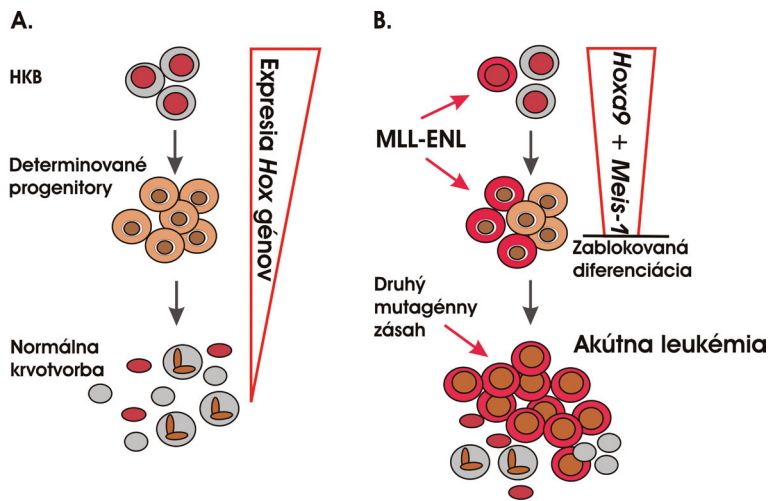
„MLL-web“ komplexu ležia MLL fúzni partneri dvoch proteínových rodín: ENL rodina a AF4 rodina. Proteíny ENL rodiny, ENL a AF9 obsahujú evolučne konzervovanú histón H3-väzobnú doménu na N-konci, transaktivačnú doménu na C-konci a spájajú „MLL-web“ komplex s chromatinovým templátom. Zároveň interagujú s proteínmi druhej rodiny, AF4 a AF5q31. AF5q31 priamo interaguje s komponentami transkripčného aparátu počas elongácie, čo naznačuje hypotézu, že proteínový komplex MLL fúzných partnerov podporuje priebeh transkripčnej elongácie (obr. 3) (24–26).

**Aspekty MLL-ENL leukemogénzy**

Leukemická konverzia MLL transkripčného faktoru



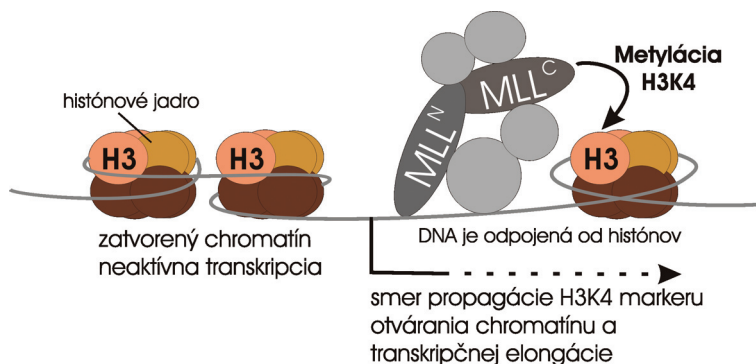
**Obr. 3.** „MLL-web“. Najčastejšie nukleárne partneri MLL tvoria hypotetický proteínový komplex, v ktorom sú pospájané medzi sebou pomocou vzájomných interakcií. ENL zabezpečuje kontakt medzi komplexom a chromatinom. AF5q31 interaguje s elongačným komplexom (modifikované podľa 25).



**Obr. 4.** Akútna leukémia vzniká v priebehu mnohokrokového evolučného procesu postupnou akumuláciou genetických a epigenetických zmien v genóme. **A.** Normálna krvotvorba. HKB je jedinou bunkou, ktorá je schopná sebaobnovovania a zároveň diferenciácie do všetkých bunkových typov krve. **B.** MLL-ENL je prvou mutáciou, ktorá môže zasiahnuť buď HKB a zosilniť jej potenciál sebaobnovovania alebo determinované progenitory, v ktorých aktivuje tento program. Zároveň vedie k zablokovaniu bunkovej diferenciácie v preleukemickom štádiu, a získavaním ďalších mutácií dochádza k úplnej leukemickej transformácii a vzniku AL (modifikované podľa 27).

je prvou udalosťou mnohokrokového procesu – „evolúcie“ akútnej leukemogenézy. Účinok MLL-ENL onkoproteínu v leukemogenéze spočíva vo zvýšení kapacity sebaobnovovania krvotvornej kmeňovej bunky (HKB) (abnormálna expanzia HKB) alebo znovu navodením týchto vlastností v determinovaných progenitoroch. Zároveň má MLL-ENL schopnosť zablokovať diferenciáciu krvotvorných buniek. Kombinácia týchto dvoch aspektov je potrebná k vytvoreniu preleukemického štádia, v ktorom sú bunky prístupné akumulácii ďalších mutácií, čo vedie k úplnej leukemickej transformácii a vzniku AL (27, 28). Obrázok 4 znázorňuje hierarchiu onkogénnych zásahov potrebných pre vývin AL.

Bunkové modely s indukovateľným onkogénom *MLL-ENL* ukázali, že leukemická transformácia indukovaná aktívnym MLL-ENL je reverzibilná. Na udržanie imortalizácie vyžadujú primárne krvotvorné bunky kontinuálnu



**Obr. 5.** Súčasný model úlohy MLL v transkripčnej regulácii. MLL proteín sa viaže na promótor *Hox* génov a pomocou C-koncovkej domény metyluje histón H3 na lyzíne štyri. Otvorená chromaťínová štruktúra sa propaguje v smere transkripcie génu posúvaním MLL spolu s elongačným komplexom po génovom lokusu.

aktivitu MLL-ENL. Po „vypnutí“ onkogénu strácajú myeloblasty proliferatívny potenciál a začínajú terminálne diferencovať do neutrofilov a makrofágov (29, 30). Myeloidné bunky imortalizované onkogénom *MLL-ENL* vykazujú závislosť na rastových faktoroch a zároveň citlivosť na apoptózu. Pôsobením G-CSF došlo k zvratu imortalizácie a indukcii terminálnej diferenciácie myeloidných buniek. To znamená, že MLL-ENL transformuje krvotvorné progenitory zvýšením alebo navodením sebaobnovovania a reverzibilného diferenciácie bloku. Na vytvorenie ireverzibilného diferenciácie bloku vyžaduje *MLL-ENL* kooperáciu *c-myc* proto-onkogénu (31).

Transformácia aktívnym MLL-ENL onkoproteínom koreluje so zvýšením expresie *Hox* génov, ktoré sú pod kontrolou transkripčného faktora MLL. Po deaktivácii MLL-ENL dochádza k poklesu ich expresie, čo naznačuje, že MLL-ENL priamo udržuje expresiu týchto génov (30). Tieto pozorovania boli ďalej potvrdené „microarray“ analýzou, ktorá odhalila zvýšenú expresiu génov *Hoxa9*, *Hoxa7* a génov *Meis-1*, *Pbx3* (ich produkty podporujú transaktivačnú funkciu Hox proteínov), ktorá korelovala so zastavením diferenciácie vplyvom aktívneho onkoproteínu MLL-ENL. Ďalej sa ukázalo, že *Hoxa9* v kooperácii s *Meis-1* majú schopnosť nahradiť transformačnú aktivitu MLL-ENL onkogénu, čo poskytuje priamy dôkaz, že koexpresia týchto dvoch molekúl je kľúčovým molekulárnym mechanizmom MLL-ENL leukemogenézy (29).

Abnormálna elongácia ako kľúčový mechanizmus leukémie

#### Abnormálna elongácia ako kľúčový mechanizmus leukémie

MLL je počas krvotvorby exprimovaný na konštantnej úrovni, expresia *Hox* génov sa mení: na vysokej hladine sú exprimované v skorých štádiách krvotvorby, t.j. v HKB a multipotentných progenitoroch, a ich expresia klesá počas diferenciácie na zrelé krvné bunky (obr. 4).

Ako MLL udržuje expresiu *Hox* génov v krvotvorných bunkách? MLL z funkčného hľadiska je histón-metyltransferáza, ktorá sa podieľa na „zapísaní“ histónového kódu na sekvenciách *Hox* génov špecifickou metyláciou aminokyseliny lyzínu v pozícii štyri na molekule histónu H3 (H3K4) (34, 35). MLL ako transkripčný faktor má schopnosť naviazať sa na DNA v preaktivovaných promótorových oblastiach (regulačné sekvencie) *Hox* génov a posúvaním sa po celom génovom lokuse vkladá metylačný marker na histón H3 (36–38). V dôsledku označenia chromaťínu markerom H3K4 dochádza k odpojeniu DNA molekuly od histónových proteínov, a tým sa DNA stáva prístupnou pre väzbu bazálneho transkripčného aparátu, ktorý je

fyzicky asociovaný s MLL proteínom. MLL udržuje chromatin v aktívnom stave, a tým umožňuje elongáciu transkripcie (kontinuálnu expresiu) *Hox* génov počas vývinu krvotvorných buniek aj po niekoľkých bunkových deleniach, kým nedôjde k odpojeniu MLL zo sekvencií *Hox* génov (obr. 5) (37–39). Potlačením ich expresie krvotvorné progenitory začnú diferencovať na zrelé krvné bunky.

V prípade MLL-ENL onkoproteínu sa ukázalo, že sa viaže na promotory *Hox* génov v komplexe s normálnym MLL proteínom. V prítomnosti aktívneho MLL-ENL onkoproteínu sa zvyšujú aktivačné markery na chromatin *Hox* génov, ktoré spôsobujú abnormálne zmeny v histónovom kóde. Podľa súčasného modelu krvotvorné progenitory konštitutívne udržiavajú aktívny stav chromatinu na sekvenciách *Hox* génov v dôsledku chybného čítania histónového kódu a spúšťajú abnormálny transkripčný program – konštitutívnu elongáciu *Hox* génov (40). Následná nadprodukcia kľúčových molekúl Hoxa9, Meis-1 dáva signál k zablokovaniu terminálnej diferenciácie krvotvorných progenitorov, ktorá sa stáva kritickým krokom v akútnej leukemogéze (obr. 4).

### Reverzibilita leukémie

#### – bunkové a myšie modely budúcej generácie

Na základe súčasného pohľadu, onkogénny transkripčný faktor MLL-ENL konvertuje prechodne aktivované promotory kľúčových *Hox* génov na konštitutívne aktivované pomocou abnormálnych zmien v epigenetickom kóde, pôvodne vytvorenom normálnym MLL proteínom. To je prvou onkogénnou udalosťou, ktorá sa v bunke odohráva, a spôsobuje zastavenie diferenciácie. Rýchlo proliferujúce preleukemické bunky s vysokou pravdepodobnosťou akumulujú ďalšie genetické a epigenetické zmeny, ktoré vo funkčnej kooperácii vedú k vývinu AL. Avšak molekulárna podstata MLL-ENL leukemogézy zostáva naďalej v mnohých aspektoch nejasná. Zdá sa, že MLL-ENL nemá schopnosť riadiť a udržiavať všetky aspekty leukemickej transformácie. Doteraz nie je známe, koľko ďalších, po sebe nasledujúcich zásahov je potrebných pre úplnú leukemickú transformáciu a aký je ich biologický vzťah k iniciačnej mutácii MLL-ENL.

Zaujímavou otázkou je, či dochádza k aktivácii obranných bunkových mechanizmov po stimulácii onkogénom MLL-ENL. Táto myšlienka sama o sebe nie je nová. Dávno je známe, že bunka spúšťa dráhy vedúce k zastaveniu bunkového cyklu alebo apoptóze ako odpoveď na onkogénny stres. Avšak v súčasných štúdiách sa ukázalo, že tieto dva základné tumor-supresorové mechanizmy sú aktivované v skorých pre-neoplastických štádiách rakoviny ako tzv. „bariéra“ proti malígnej konverzii (41). Kľúčovým regulátorom týchto mechanizmov je tumor-supresorový proteín p53, ktorý má za úlohu zabrániť genetickej instabilite. Zatiaľ nie je známe, či dochádza k aktivácii rovnakých mechanizmov aj v preleukemických bunkách. Súčasná štúdie odhalili ďalšiu funkciu MLL fúznych proteínov, okrem iných aj MLL-ENL. Tieto onkogény inhibujú transkripčnú aktivitu p53, a tým potláčajú ochrannú odpoveď bunky na poškodenie DNA indukované ionizujúcim

žiarením (42). Na modele EK buniek, ktoré sú prirodzene immortalizovanými bunkami s rýchlou proliferatívnou aktivitou sa ukázalo, že aktívny onkogén MLL-ENL zvyšuje prežitie buniek po ionizujúcom žiarení (vlastné predbežné výsledky). Na základe týchto faktov je možné sa domnievať, že MLL-ENL môže mať antiapoptický účinok, ktorý spočíva v inhibícii p53, alebo potláčaním bariérových mechanizmov v preleukemickom štádiu urýchľuje progresiu leukemickej transformácie bunky. Myšičí model s indukovateľným onkogénom MLL-ENL (nepublikovaný vlastný experiment) umožňuje v budúcnosti študovať túto hypotézu *in vivo* a objasniť dôležité otázky MLL-ENL leukemogézy. Využitie tohto modelu spočíva hlavne v štúdiu molekulárneho mechanizmu potenciálnej reverzibility leukemickej transformácie *in vivo* a objasnení kľúčovej otázky, či inaktivácia jedinej (iniciačnej) mutácie je dostačujúca k návratu evolúcie leukémie aj v neskorých štádiách ochorenia, v ktorých dochádza ku kooperácii viac mutácií.

Veľkou výzvou do budúcnosti je odhalenie a pochopenie podrobného mechanizmu transkripčnej deregulácie nielen s onkogénom MLL-ENL, ale aj s ďalšími onkogénnymi variantami MLL, čo je predpokladom potencionálneho vývinu špecifických inhibítorov na cieľnú terapiu MLL leukémií. Štúdium úlohy a funkcie génu MLL v normálnej aj malígnej hematopoéze prispieva k objasneniu základných biologických mechanizmov bunky: regulácie transkripcie, diferenciácie a bunkového rastu.

#### Zoznam použitých skratiek

ABL = Akútna bifenotypická leukémia  
 AF4 = Associated factor 4  
 AF5q31 = Associated factor 5  
 AF6 = Associated factor 6  
 AF9 = Associated factor 9  
 AML = Akútna myeloidná leukémia  
 AL = Akútna leukémia  
 ALL = Akútna lymfoblastická leukémia  
 BCR = Breakpoint cluster region  
 c-myc = Myelocytomatosis oncogene  
 C-terminus = Karboxyterminálny koniec proteínu  
 DNA = Deoxyribonucleic acid  
 dsDNA = dvojvláknová (double strand) DNA  
 EK bunky = Embryonálne kmeňové bunky  
 ENL = Eleven-nineteen leukemia  
 FISH = Fluorescent in situ hybridization  
 G-CSF = Granulocytic colony stimulating factor  
 HKB = Hematopoetická kmeňová bunka  
 HOK = Hemato-onkologická klinika  
 Hox = Homeobox  
 H3K4 = Histón H3 metylovaný na lyzíne 4  
 LF UP = Lekárska fakulta Univerzity Palackého  
 Meis-1 = Mouse ecotropic integration site 1  
 MLL = Mixed lineage leukemia  
 N-terminus = Aminoterminálny koniec proteínu  
 Pbx3 = Pre-B-cell leukemia transcription factor 3

#### Vysvetlivky vybraných termínov

*Chromatin* – stavebná hmota chromozómov v jadre eukaryotickej bunky a skladá sa z dsDNA a proteínov. Proteíny chromatinu sa delia na históny a proteíny nehistónovej povahy. dsDNA sa otáča okolo histónového jadra a špiralizáciou sa vbalí do vyšších organizačných štruktúr chromatinu. Bunka dokáže regulovať expresiu génov rozbalením a opätovným vbalením príslušného úseku DNA do chromatinu.

*Chromatinový marker* – znak v podobe chemickej skupiny (napr. mety-

lová), ktorá sa pripája na molekuly histónov kovalentnou chemickou väzbou a spôsobuje zmenu stavu a funkcie chromatinu.

*Epigenetika (epigenetická dedičnosť)* – prenos znakov a zmien, ktoré ovplyvňujú expresiu a funkciu génov do ďalšej generácie (buniek, organizmu) cez bunkový cyklus mimo genetickej informácie zakódovanej v podobe sekvencie DNA.

*Transkripcia* – začiatkový proces vyjadrenia genetického kódu, počas ktorého sa genetická informácia prepíše z DNA do RNA a vedie k jej prekladu do funkčných proteínových molekúl.

*Elongácia* – postupné predĺžovanie RNA reťazca počas transkripcie.

## Literatúra

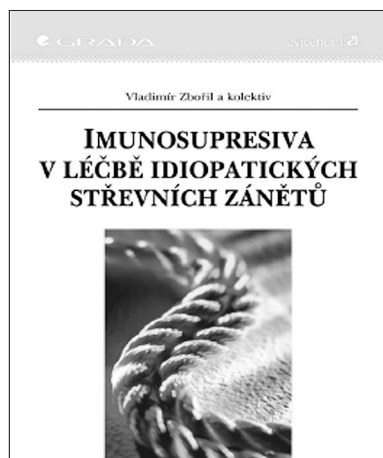
1. **Gu Y, Nakamura T, Alder H, et al.** The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax* to the AF-4 gene. *Cell* 1992; 71: 701-708.
2. **Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA.** A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukemias. *Nat Genet* 1992; 2: 113-118.
3. **Tkachuk DC, Kohler S, Cleary M.** Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71: 691-700.
4. **Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canani O, Saito H, Croce CM, Canani E.** Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res* 1994; 54: 2326-2330.
5. **Strout M, Marcucci G, Bloomfield CD., Caligiuri MA.** The partial tandem duplication of ALL-1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2390-2395 (1998).
6. **Strissel P, Strick R, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ.** An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood* 1998; 92: 3793-3803.
7. **Ayton PM, Cleary ML.** Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 2001; 20: 5695-5707.
8. **Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA.** The molecular basis of leukemia. *Hematology (Am Soc Hematom Educ Program)* 2004; 80-97.
9. **Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberger DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ, Look AT.** Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003; 102: 262-268.
10. **Hess J.** MLL: a histon methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends in Mol Med* 2004; 10: 500-507.
11. **Lavau C, Szilvassy SJ, Slany R, Cleary ML.** Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J* 1997; 16: 4226-4237.
12. **Slany RK, Lavau C, Cleary ML.** The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 122-129.
13. **So CW, Cleary ML.** MLL-AFX requires the transcriptional effector domains of AFX to transform myeloid progenitors and transdominantly interfere with forkhead protein function. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6542-6552.
14. **Lavau C, Luo RT, Du C, Thirman MJ.** Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10984-10989.
15. **Lavau C, Du C, Thirman M, Zeleznik-Le N.** Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *EMBO J* 2000; 19: 4655-4664.
16. **DiMartino JF, Ayton PM, Chen EH, Naftzger CC, Young BD, Cleary ML.** The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10. *Blood* 2002; 99: 3780-3785.
17. **Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, et al.** An MLL-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: A method to create fusion oncogenes. *Cell* 1996; 85: 853-861.
18. **Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, et al.** The MLL-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukemogenesis. *EMBO J* 1999; 18: 3564-3574.
19. **Forster A, Pannell R, Drynan LF, et al.** Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with MLL to replicate primary events of human cancer. *Cancer Cell* 2003; 3: 449-458.
20. **Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ.** Altered Hox expression and segmental identity in MLL-mutant mice. *Nature* 1995; 378: 505-508.
21. **Jarosova M, Takacova S, Holzerova M, et al.** Cryptic MLL-AF10 fusion caused by insertion of duplicated 5' part of MLL into 10p12 in acute leukemia: a case report. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 162: 179-182.
22. **Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, Schnittger S, Hiddemann W, Kern W, Haferlach T.** New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia* 2005; 19: 953-964.
23. **Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberger DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ, Look AT.** Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 2003; 102: 262-268.
24. **Erfurth F, Hemenway CS, de Erkenez AC, Domer PH.** MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* 2004; 18: 92-102.
25. **Zeisig DT, Bittner CB, Garcia-Cuellar MP, Hess JL, Slany RK.** The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 2005; 24: 5525-5532.
26. **Slany RK.** When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematol Oncol* 2005; 23: 1-9.
27. **Jamieson CH, Weissman IL and Passegue E.** Chronic versus acute myelogenous leukemia: A question of self-renewal. *Cancer Cell* 2004; 6: 531-533.
28. **Cozzio A, Passegue E, Anton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL.** Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 2003; 17: 3029-3035.
29. **Zeisig BB, Milne TA, Garcia-Cuellar MP, et al.** Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 617-628.
30. **Horton SJ, Grier DG, McGonigle GJ, Thompson A, Morrow M, De Silva I, Moulding DA, Kioussis D, Lappin TRJ, Brady HJM, Williams O.** Continuous MLL-ENL expression is necessary to establish a "Hox code" and maintain immortalization of hematopoietic progenitor cells. *Cancer Res* 2005; 65: 9245-9252.
31. **Schreiner S, Birke M, Garcia-Cuellar MP, Zilles O, Greil J, Slany RK.** MLL-ENL Causes a Reversible and myc-dependent Block of Myelomonocytic Cell Differentiation. *Cancer Res* 2001; 61: 6480-6486.
32. **Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NMT, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ.** Mammalian Trithorax and Polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14372-14377.
33. **Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ.** MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10632-10636.
34. **Milne TA, Briggs SD, Brock HW, et al.** MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 2002; 10: 1107-1117.
35. **Nakamura T, Mori T, Tada S, et al.** ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 2002; 10: 1119-1128.
36. **Dou Y, Milne AT, Tackett AJ, et al.** Physical Association and Coordinate Function of the H3 K4 Methyltransferase MLL1 and the H4 K16 Acetyltransferase MOF. *Cell* 2005; 121: 873-885.

37. **Milne TA, Dou Y, Martin ME, Brock HW, Roeder RG, Hess JL.** MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 14765–14770.
38. **Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, et al.** Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8603–8608.
39. **Slany RK.** Chromatin control of gene expression: Mixed-lineage leukemia methyltransferase SETs the stage for transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 14481–14482.
40. **Milne TA, Martin ME, Brock HW, Slany RK, Hess JL.** Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hoxa9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res* 2005; 65: 11367–11374.
41. **Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al.** DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434: 864–870.
42. **Wiederschain D, Kawai H, Shilatifard A, Yuan ZM.** Multiple mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *J Biol Chem* 2005; 280: 24315–24321.
43. **Pui Ch, Relling MV, Downing JR.** Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 1535–1548.
44. **Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ.** Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* 2003; 115: 293–303.
45. **Yokohama A, Kitabayashi I, Ayton PM, Cleary ML, Ohki M.** Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 2002; 100: 3710–3718.
46. **Hsieh JJ, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ.** Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 186–194.

Ďakujeme Mgr. Zuzane Koledovej (Ústav biologie LF UP Olomouc) za asistenci pri konečnej úprave rukopisu. Grantová podpora: IGA NR7849; MSM 6198959205 a MSM 6198959216.

Mgr. Sylvia Takáčová  
Ústav biologie LF UP  
Hněvotínská 3  
775 15 Olomouc

Došlo do redakce: 23. 6. 2006  
Přijato: 3. 11. 2006



## IMUNOSUPRESIVA V LÉČBĚ IDIOPATICKÝCH STŘEVNÍCH ZÁNĚTŮ

Vladimír Zbořil a kolektiv

Imunosupresivní terapie vstoupila do léčby idiopatických střevních zánětů již před čtvrtstoletím, její využití v gastroenterologické praxi je však stále spojeno s velkým respektem a někdy i nadbytečnými obavami. Imunosupresiva jsou vnímána jako skupina více či méně přesahující konvenční farmakoterapii a jejich využití je posouváno do větších gastroenterologických center.

Vzhledem k relativně nízké incidenci ulcerózní kolitidy a Crohnovy nemoci je tento přístup jistě správný, ovšem v praxi vede k tomu, že s imunosupresivní terapií se spíše vyčkává a mnohdy je indikována

pozdě. Léčebné výsledky pak samozřejmě nejsou optimální a tím diskreditují samu podstatu léčby. Tento přístup je umocněn relativně malými zkušenostmi gastroenterologů s používáním imunosupresivní terapie a obavami z jejich nežádoucích účinků.

Z těchto důvodů se autoři publikace pokusili shrnout současné poznatky o terapii imunosupresivou v léčbě idiopatických střevních zánětů v rovině teorie, literárních referencí a vlastních zkušeností tak, aby přispěli k prosazení reálného pohledu na současné možnosti jejich léčebného využití.

Součástí monografie je také výhled do budoucnosti léčby idiopatických střevních zánětů imunosupresivou.

Vydalo nakladatelství Grada Publishing a.s. v roce 2006, formát A5, brožovaná vazba, 128 stran, cena 149 Kč, 229 Sk, ISBN 978-80-247-1563-6, kat. číslo 1197.

**Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz**