

ÚLOHA GENŮ KÓDUJÍCÍCH RODINU TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ RUNX PŘI VZNIKU NÁDORŮ

THE ROLE OF GENES CODING THE FAMILY OF TRANSCRIPTION FACTORS RUNX IN CANCER

FUCHS O.

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Rodina genů pro transkripční faktory RUNX (*RUNX1*, *RUNX2* and *RUNX3*), které obsahují konzervativní oblast Runt pomocí které se váží k DNA, hraje důležité úlohy během vývoje savců a při vzniku maligních nádorů. Proteiny RUNX sdílejí partnera, který se neváže k DNA, „core-binding factor beta“ (CBFβ), který však posílí vazbu komplexu na DNA a jeho stabilitu. *RUNX1* je snad nejvíce často vystaven přestavbám při různých translokacích, které byly zjištěny u akutní myeloidní leukémie (AML), akutní lymfoblastické leukémie B-buněk (ALL) a u ALL T-buněk. Bodové mutace *RUNX1* byly nalezeny u AML, myelodysplastického syndromu a dědičného onemocnění destiček s predispozicí k AML. *RUNX2* je nezbytný pro osteogenezi a účastní se vzniku metastáz do kostí. Hypermethylace *RUNX3* byla nalezena u několika epiteliálních karcinomů a ztráta *RUNX3* předurčuje myši s vyřazeným genem pro *RUNX3* k hyperplazii žaludeční sliznice a je příkladem funkce tohoto genu jako nádorového supresoru. Hlavním úkolem, který je před námi, je určení klíčových cílových genů působení RUNX u karcinomů. Mnohé z těchto cílových genů budou pravděpodobně tkáňově specifické. Detailnější poznání drah působení transkripčních faktorů RUNX je nezbytné pro další aplikace v diagnostice a terapii karcinomů.

Klíčová slova: RUNX, oblast Runt, „core-binding factor“, leukémie, karcinom.

Summary

The family of transcription factor genes RUNX (*RUNX1*, *RUNX2* and *RUNX3*) that contain a conserved Runt DNA-binding domain plays important roles during mammalian developmental events and in neoplasia. The RUNX proteins share a non-DNA binding partner, core-binding factor beta (CBFβ), that confers high-affinity DNA binding and stability on the complex. *RUNX1* is perhaps the most frequently targeted and rearranged in a variety of different translocations, detected in acute myeloid leukemia (AML), B-lineage acute lymphoblastic leukemia (ALL) and T-cell ALL. Point mutations of *RUNX1* are found in AML, myelodysplastic syndrome, and familial platelet disorder with propensity to AML. *RUNX2*, essential for osteogenesis, is involved in bone metastasis. Hypermethylation of *RUNX3* has been found in several human epithelial cancers and loss of *RUNX3* predisposes knockout mice to gastric hyperplasia, indicating a tumor suppressor - like role for this gene. The main task before us is the identification of the key RUNX target genes in cancer. Many of these target genes will be likely tissue specific. A more complete knowledge of the pathways downstream of RUNX-CBFβ factors is necessary for further beneficial application to cancer diagnostics and therapeutics.

Key words: RUNX, Runt domain, core-binding factor, leukemia, cancer.

Úvod

U savců existují tři typy genů RUNX (*RUNX1*, *RUNX2* a *RUNX3*), označované také *CBFα* („core binding factor alpha“). Jedná se o transkripční faktory CBF, které hrají důležitou úlohu v normálním vývoji i při vzniku nádorů. Mohou fungovat jako nádorové supresory i jako onkogeny. Produkty exprese těchto genů se váží k DNA a obsahují homologní oblast k oblasti Runt u modelového organismu, malé mouchy octomilky (*Drosophila melanogaster*). Na DNA se váží ve formě heterodimerních komplexů se společným partnerem, proteinem CBFβ („core binding factor beta“). Uvedenou vazbu na DNA zprostředkuje podjednotka CBFα, zatím co podjednotka CBFβ se přímo neváže k DNA. Geny RUNX kódují tedy α-podjednotky (viz tab.1) (1) heterodimerních transkripčních faktorů, známých pod názvy CBF nebo PEBP2 / „polyomavirus enhancer-binding pro-

Tabulka č. 1.: Synonyma pro savčí geny RUNX a umístění genů RUNX na lidských chromozomech

RUNX1	CBFA2	AML1	PEBP2αB	21q22
RUNX2	CBFA1	AML3	PEBP2αA	6p21
RUNX3	CBFA3	AML2	PEBP2αC	1p36

tein 2“/. Enhancer (zesilovač transkripce) polyomaviru byl před více než 20 lety použit jako sonda ke studiu diferenciace myších embryonálních buněk (2). Tyto buňky v nediferencované formě jsou totiž resistentní k infekci viry včetně polyomaviru. PEBP2 je syntetizován teprve po indukci diferenciace embryonálních buněk. První savčí protein s oblastí runt byl klonován v souvislosti s přestavbou chromozomů t (8;21), která je spojena s akutní myeloidní leukémií (AML) (3). Tento gen byl původně označen *AML1* („acute myelogenous leukemia 1“) a dnes nese pojmenová-

Tabulka č. 2.: Základní funkce transkripčních faktorů RUNX, důsledky vyřazení genů pro proteiny RUNX a úloha proteinů RUNX při vzniku nádorů

protein	základní funkce	důsledky u myšího fenotypu (-/-)	úloha při vzniku nádorů
Runx1	v definitivní hematopozeze	letální pro embryo, nefunguje hematopozeza ve fetálních játrech	ztráta nebo mutace jedné alely vede k akutní myeloidní leukemii
Runx2	v diferenciaci osteoblastů a v osifikaci	letální po narození v důsledku poruchy respirace	zvýšená exprese vede ke vzniku lymfomů T buněk
Runx3	ve vývoji gastrointestinálního traktu, v thymopozeze a v neurogenezi	letální brzy po narození hyperplazie epitelu trávicího ústrojí	častá inaktivace u karcinomů trávicího ústrojí

ní *RUNX1* (1). Druhá podjednotka heterodimerních transkripčních faktorů CBF (CBFβ) i když se sama neváže na DNA, zvyšuje vazbu podjednotky α na DNA (4,5) a chrání podjednotku *RUNX1* před proteolytickou degradací (6). Fenotyp myši s vyřazeným genem *RUNX1* je skoro shodný s fenotypem myši s vyřazeným genem *CBFβ* (7,8). Úlohu nádorových supresorů dokládají nalezené inaktivující mutace genů *RUNX*, delece a hypermetylace těchto genů u řady zhoubných nádorů. Naopak u jiných zhoubných nádorů se setkáváme s jejich onkogenním potenciálem po retrovirové inserci genů *RUNX*.

Funkci jednotlivých transkripčních faktorů RUNX a jejich úlohu při vzniku nádorů ukazuje **tab.2** a bude podrobněji probrána níže.

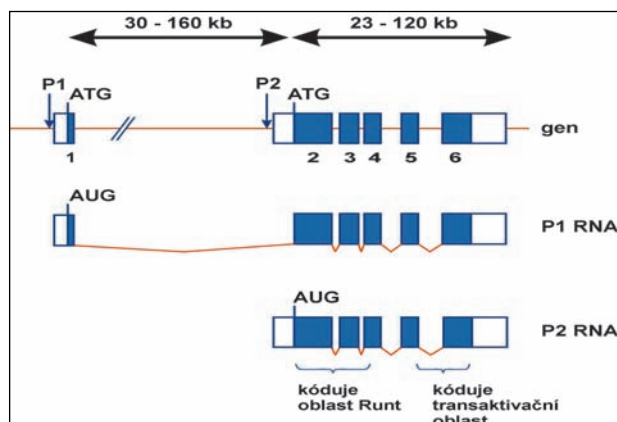
Úloha genu *RUNX1* při vzniku nádorů

Struktura genu *RUNX1* a odpovídajících produktů jeho transkripce, dvou forem transkriptů *RUNX1* RNA ze dvou promotorů P1 a P2 je znázorněna **na obr.1**. Specifické translokace chromozomů, které zahrnují gen *RUNX1* (*AML1/CBFA2/PEBP2αB*) se vyskytují u hematologických malignit. Výsledkem přestaveb chromozomů je vznik fuzních proteinů spojených s leukémií. Partner fúze genu *RUNX1* byl zatím identifikován na molekulární úrovni u následujících přestaveb chromozomů: t(8;21) (*RUNX1-ETO/MTG8*), t(16;21) (*RUNX1-MTG16*), t(3;21) (*RUNX1-EAP*), t(3;21) (*RUNX1-EVII*), (*RUNX1-MDS1*) a (*RUNX1-MDS1-EVII*), t(1;21) (*Runx1-PRDM16*), t(4;21) (*FGA7-RUNX1*), t(7;21) (*RUNX1-USP42*), t(12;21) (*TEL/ETV6-RUNX1*) a t(X;21) (*RUNX1-FOG2/ZFPM2*) a (*RUNX1-PRDX4*) (9-20). Struktura fuzních proteinů vzniklých přepisem některých hybridních genů z těchto přestaveb chromozomů je ukázána vedle struktury proteinů RUNX **na obr.2**. Cytogenetickou analýzou, fluorescenční hybridizací in situ (FISH) bylo nalezeno více než 20 přestaveb chromozomů, kde je zahrnut gen *RUNX1*. Zatímco transkripční faktor *RUNX1* váže acetyltransferázy (P300/CPB / "cAMP responsive element binding protein") a stimuluje transkripci svých cílových genů (**viz tab.3**), které hrají důležitou úlohu v diferenciaci hematopoetických buněk, fuzní proteiny naopak váží histondeacetylázy, blokují vývoj myeloidních buněk a způsobí transformaci těchto buněk vedoucí k leukémii. Acetylace lysinových zbytků histonů vede totiž k rozvolnění struktury chromatinu a usnadňuje tím přístup transkripčních faktorů k DNA (21). Koaktivátory transkripce, kam patří i P300/CPB, mají proto často acetyltransferázovou aktivitu. Naopak většina korepresorů transkripce jsou enzymy s aktivitou histondeacetyláz (HDAC) nebo proteiny interagující s HDAC. Deacetylace lyzinových zbytků histonů vede ke kondenzaci chromatinu a tím ke zeslabení transkripce v důsledku omezeného přístupu transkripčních faktorů k DNA (21). Popsané děje dokumentuje **obr. 3**

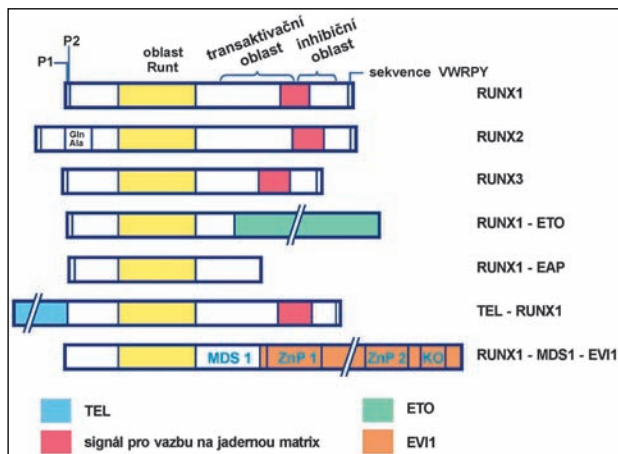
ukazující transkripci cílových genů řízenou transkripčním faktorem *RUNX1* nebo fuzními proteiny *RUNX1-ETO* a *RUNX1-EVII*. Stejně jako tyto dva fuzní proteiny působí i fuzní protein TEL-*RUNX1*.

Tabulka č. 3.: Cílové geny pro transkripční faktor *RUNX-1*

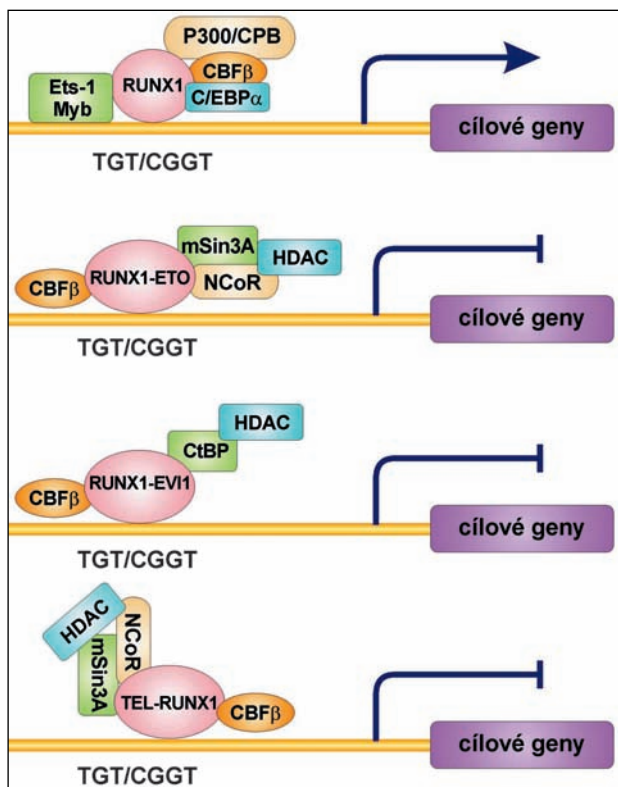
růstové faktory
faktor stimulující tvorbu kolonií pro granulocyty a makrofágy (GM-CSF)
interleukin 3 (IL3)
receptory
receptoty T-lymfoidních buněk
receptor pro faktor stimulující tvorbu kolonií u makrofágů (M-CSFR)
receptor pro faktor stimulující tvorbu kolonií u granulocytů (G-CSFR)
Flt3 („fms-related tyrosine kinase 3“)
molekuly zahrnuté v signálních drahách
p21CIP1/WAF1
Bcl-2 („B-cell CLL/lymphoma 2“)
BLK („B-lymphocyte specific tyrosine kinase“)
transkripční faktory
STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“)
PU.1
c-myc
c-fos
proteázy a další účinné molekuly
MMCP6 („mouse mast cell protease 6“)
ELA2 („neutrophil elastase/protease“)
myeloperoxidáza (MPO)
granzym B (GZMB)



Obr. 1.: Struktura lidského genu *RUNX1* a odpovídajících transkriptů P1 *RUNX1* mRNA a P2 *RUNX1* mRNA. Exony jsou číslovány podle práce autorů Levanon et al. (66). Transkripce P1 mRNA je řízena z promotoru P1 a transkripce P2 mRNA je řízena z promotoru P2.



Obr. 2.: Struktura proteinů RUNX1, RUNX2 a RUNX3 a několika fuzních proteinů, které obsahují RUNX1. P1 a P2 jsou dvě promotorové oblasti, kterým odpovídají různě dlouhé transkripty RUNX1 mRNA (viz obr.1) a tedy i proteiny RUNX1 (viz text). C-koncový motiv VWRPY (Val-Trp-Arg-Pro-Tyr) se podobá motivu WRPW popsanému u helix-smýčka-helix proteinů a hraje úlohu v interakcích protein-protein. Oblast RUNX2 bohatá na glycinové a alaninové zbytky je označena Gln,Ala.

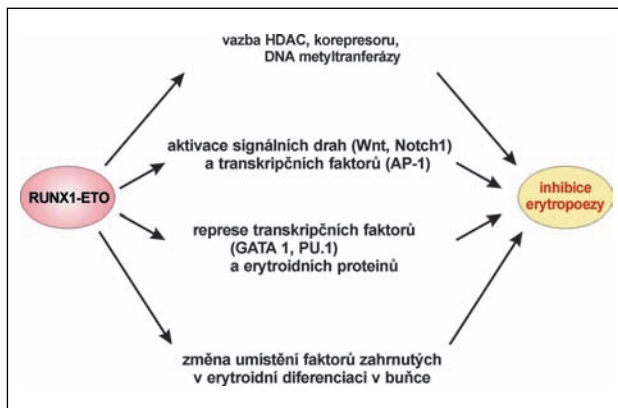


Obr. 3.: Funkce RUNX1 v komplexu s CBFβ jako aktivátoru transkripce svých cílových proteinů po interakci s dalšími specifickými transkripčními faktory, např. Ets-1/Myb a C/EBPα a s acetyltransferázou P300/CBP. Fuzní proteiny RUNX1-ETO, RUNX1-EVI1 a TEL-RUNX1 naopak fungují jako represory transkripce cílových genů RUNX1, protože váží korepresory transkripce NcoR, mSin3A nebo CtBP a s nimi potom histon-deacetylázu. Podrobnější popis je uveden v textu.

Fuzní protein RUNX1-ETO/MTG8

Tento chimerní protein (752 aminokyselinových zbytků) vzniká fúzí N-koncové části proteinu RUNX1 obsahující oblast Runt (177 aminokyselinových zbytků) a proteinu ETO postrádajícího prvních 30 aminokyselinových zbytků jako produkt exprese fuzního genu po t(8;21)(q22;q22) přestavbě chromosomů (obr.2) (22-24). Uvedenou přestavbu chromosomů nacházíme přibližně u 10% pacientů s AML, zvláště u typu FAB (franc.-amer.-brit. klasifikace) M2 s prokazatelnou neutrofilní diferenciací (kolem 25% případů) (25). Klasický model koreprese transkripce cílových genů (např. *GM-CSF*, *IL-3*, *c-fos*) transkripčního faktoru RUNX1 pomocí fuzního proteinu RUNX1-ETO byl již uveden (viz obr.2). V soulase s ním ETO váže histon-deacetylázy třídy 1 (HDAC 1-3) jak přímo tak přes korepresory NCoR („nuclear co-repressor“), SMRT („silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor“) a mSin3A (analog represoru transkripce u kvasinek Sin3) (25-27). Inhibitory HDAC (např. butyrát, fenylbutyrát, kyselina valproová, hydroxamové kyseliny / např. SAHA a trichostatin A/, epoxyketony /např. trapoxintrichostatin/ a další) mají schopnost zrušit v některých modelových systémech *in vitro* negativní vliv fuzního proteinu RUNX1-ETO na acylaci histonů, transkripci, buněčný cyklus a diferenciaci (28,29). Vliv inhibitorů histon-deacetyláz je zesílen současným účinkem inhibitoru metyltransferázy (5-aza-2'-deoxycytidin), což naznačuje zahrnutí vlivu fuzního proteinu RUNX1-ETO na metylaci DNA (30,31). RUNX1-ETO potlačuje aktivitu kritických transkripčních faktorů v myeloidní diferenciaci, např. PU.1, C/EBPα a PLZF (32). Popsaný mechanismus inhibice diferenciace fuzním proteinem RUNX1-ETO platí pro myeloidní diferenciaci, kde RUNX1 je jedním z klíčových transkripčních faktorů. Neplatí však pro erytroidní diferenciaci, kde erytroidní geny nemají specifická vazebná místa pro RUNX1. Přesto fuzní protein RUNX1-ETO inhibuje i erytroidní diferenciaci (25). Je tedy zřejmé, že účinek fuzního proteinu je komplexnější a zahrnuje další mechanismy, které jsou schematicky znázorněny pro inhibici erytroidní diferenciace na obr.4. Mechanismus zde zahrnuje i vliv na signální dráhy Wnt, Notch a Janus N-koncové protein kinázy (JNK) a změnu lokalizace transkripčního faktoru v buňce (25). V signální dráze JNK leží transkripční faktor AP-1. Fuzní protein RUNX1-ETO stimuluje uvedené signální dráhy a tím inhibuje normální erytroidní diferenciaci (25). RUNX1-ETO vedle inhibice exprese GATA1 na úrovni mRNA i proteinu může způsobit i cílenou degradaci erytroidního transkripčního faktoru GATA1 v proteazomech a je možné, že použití inhibitoru proteazomů (zatím již klinicky používaného bortezomibu /Velcade/) potlačí některé z vlivů RUNX1-ETO na leukemogenezi (25).

Přes tyto pokroky ve výzkumu mechanismu působení RUNX1-ETO na leukemogenezi, stále není jasný jeho vliv na vznik AML u pacientů s přestavbou chromosomů t(8;21). Myší modely po retrovirové transfekci RUNX1-ETO nebo naopak transgenní myši RUNX1-/- s vneseným genem pro fuzní protein RUNX1-ETO ukázaly, že samotný RUNX1-ETO nezpůsobí leukémii *in vivo* (33). Zatím existují dvě možná vysvětlení pro leukemogenní vliv RUNX1-ETO *in vivo*. První možností je nezbytnost zkráceného fuzního proteinu RUNX1-ETO o C-koncovou oblast, která právě interaguje s korepresory transkripce, proteiny NcoR a SMRT. Takto zkrácený fuzní protein vyvolal AML u myši (34)



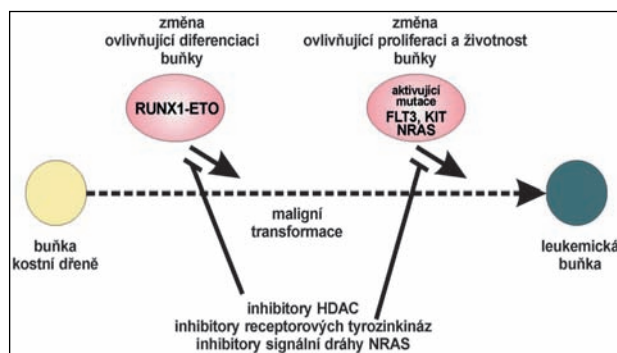
Obr. 4.: Mechanizmy účastníci se inhibice erytropoiezy fuzním proteinem RUNX1-ETO

a vyskytuje se i u pacientů s AML (33). Další možností je potřeba další genetické změny k vyvolání leukémie, kterou je zřejmě aktivující mutace receptorových tyrosinkináz (FLT3 a KIT), které hrají úlohu v signálních drahách fosfatidylinositol 3' kinázy (PI3K) a mitogeny aktivovaných protein kináz (MAPK) a aktivující mutace NRAS v signální dráze MAPK. Tento model leukemogeneze (**obr.5**) je podepřen experimentálními výsledky indukce AML u myši kombinací fuzního proteinu RUNX1-ETO a mutace FLT3 (FLT3-LM / "FLT3 length mutation") (35). Samotný fuzní protein RUNX1-ETO ani samotná aktivující mutace FLT3 nezpůsobí vznik AML. Mutaci FLT3 však může nahradit i aktivující mutace KIT nebo NRAS, které podobně jako aktivující mutace FLT3 se vyskytují u AML obsahující fuzní proteiny odvozené z přestavb chromozomů zahrnujících gen *RUNX1* (33,36). Uvedené aktivující mutace vedou k aktivaci signálních drah umožňujících nekontrolovatelnou proliferaci buněk a mají též antiapoptotický účinek na bun-
ky. Vedle AML může dojít i k indukci akutní lymfoblastické leukémie (ALL), protože část pacientů s fuzním proteinem RUNX1-ETO vykazuje i expresi lymfoidního antigenu CD4. Popsaný model (**obr.5**) má samozřejmě význam i pro terapii a byly vyvinuty inhibitory FLT3 a dalších receptorových tyrosinkináz, které jsou již i klinicky zkoušeny (37-40). Signální dráhu NRAS lze inhibovat pomocí inhibitorů farnesylace samotného proteinu NRAS nebo inhibicí MAPK (41,42). Farnesylace je posttranslační modifikace, kde RAS je aktivován enzymem farnesyltransferázou, která přidává isoprenylovou skupinu k proteinu RAS (41).

Fuzní proteiny RUNX1-EV11, RUNX1-MDS1, RUNX1-MDS1-EV11 a RUNX1- EAP

Uvedené fuzní proteiny vznikají přestavbou chromozomů t(3;21)(q26;q22) a nachází se u pacientů s blastickou krizí chronické myeloidní leukémie a často jsou i důsledkem léčby u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a AML. N-koncová část RUNX1 obsahující oblast Runt vytvoří hybridní protein s proteinem EV11 („ecotropic viral integration site 1“), obsahujícím oblasti zinkových prstů (**obr.2**). Existují nejméně 4 mechanismy, kterými fuzní proteiny, obsahující RUNX1 a EV11, způsobí maligní transformaci hematopoetických kmenových buněk. Prvním z nich je popsán mechanismus změny transkripce cílových genů transkripčního faktoru RUNX1, který se fuzí mění z akti-

vátoru transkripce na represor transkripce (**obr.3**) (43). Druhým mechanismem je inhibice signální dráhy transformačního růstového faktoru- β (TGF- β) fuzním proteinem. V tomto případě fuzní protein váže svou částí EV11 přenašeč signálu TGF- β , protein Smad3 a tím brání jeho účinkování jako transkripční faktor pro expresi cílových genů působení TGF- β (44). Třetím mechanismem, který se podílí na vyvolání maligní transformace hematopoetických kmenových buněk je inhibice aktivity c-Jun N-koncové kinázy (JNK) patřící do skupiny MAPK. Tato inhibice JNK zabraňuje stresem indukované apoptóze buněk. Čtvrtým mechanismem je potom zvýšení aktivity transkripčního faktoru AP-1 aktivací promotoru genu pro c-Fos pomocí fuzního proteinu RUNX1-EV11. Všechny 4 mechanismy se podílí na maligní transformaci hematopoetických kmenových buněk (43). Expresí fuzního genu *RUNX1-MDS1-EV11* v buňkách kostní dřeně myši po retrovirové transdukcii způsobila leukemii 5 až 13 měsíců po transplantaci myši těmito buňkami (45). Gen *EAP* kóduje ribozomální protein L22. Čtecí rámec tohoto genu se však změní při vzniku hybridního genu *RUNX1EAP* a translace odpovídající mRNA končí po přidání 17 aminokyselinových zbytků, které nejsou kódovány genem *EAP*, k oblasti Runt proteinu RUNX1 (16). Malý gen *MDS1* kóduje protein o 170 aminokyselinových zbytcích. Fuzní protein RUNX1-MDS1 obsahuje stejnou část proteinu RUNX1 jako fuzní protein RUNX1-EAP (16). Oba tyto fuzní proteiny inhibují např. aktivaci promotoru genu *CSF1R* („macrophage colony stimulating factor receptor 1“), který je normálně cílovým genem transkripčního faktoru RUNX1 (16). Uvedené fuzní proteiny způsobí transformaci fibroblastů *in vitro* a růst nádoru po injekci transfekovaných buněk do athymických nahých myši (16).



Obr. 5.: Model leukemogeneze vyžadující dvě genetické změny (dva údery). Samotný fuzní protein RUNX1-ETO nevyvolá maligní transformaci, ale ta nastane např. ve spojitosti s další mutací, kterou může být aktivující mutace tyrosinkináz Flt3 nebo Kit nebo mutace NRAS. Maligní transformaci lze zabránit účinkem inhibitorů histondeacetyláz, inhibitorů receptorových tyrosinkináz a inhibitory signální dráhy NRAS.

Fuzní protein RUNX1-MTG16

Tento fuzní protein je výsledkem poměrně vzácné přestavby chromozomů t(16;21)(q24;q22), která se vyskytuje u myeloidních leukémií jako následek jejich léčby (46). Chimerní protein obsahuje N-koncovou část RUNX1 včetně oblasti Runt (177 aminokyselinových zbytků) fuzovanou k C-konci proteinu MTG16 (527 aminokyselinových zbytků). MTG16 je jaderný protein patřící do rodiny ETO/MTG8

a obdobně také interaguje s HDAC a působí jako korepresor transkripce (47). Fuzní protein RUNX1-MTG16 působí tedy jako korepresor transkripce cílových genů řízených transkripčním faktorem RUNX1. MTG16 je také kandidátem nádorového supresoru u karcinomů prsu (48) a ztráta jeho funkce způsobená přestavbou chromozomů může také přispívat k transformaci hematopoetických buněk.

Fuzní protein TEL/ETV6-RUNX1

Tento fuzní protein, vzniklý přestavbou chromozomů t(12;21)(p13;q22), se vyskytuje asi u čtvrtiny pediatrických pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) (12,4952). Fuzní protein opět působí jako korepresor transkripce cílových genů transkripčního faktoru RUNX1 (obr.2) (53). Fuzní protein také inhibuje normální funkci transkripčního faktoru TEL, který je potřebný k ustavení hematopoézy v kostní dřeni a to též přispívá ke vzniku leukémie (54).

Fuzní protein RUNX1-FOG2

Gen *RUNX1* je za oblastí Runt fuzován ke genu *FOG2* přestavbou chromozomů t(X;21)(p22.3;q22.1) (17). Odpovídající hybridní protein RUNX1-FOG2 potlačuje aktivitu transkripčních CBF a GATA1 opět mechanismem koreprese transkripce cílových genů těchto transkripčních faktorů a podílí se tak na patogenezi myelodysplazie. Fuzní protein totiž váže korepresor CtBP („C-terminal binding protein“) a HDAC (17).

Fuzní protein RUNX1-USP42

Gen *RUNX1* je v intronu 7 fuzován k intronu 1 genu *USP42* („ubiquitin specific protease“) v chromozomální přestavbě t(7;21)(p22;q22) (20). Deregulace ubiquitinylace uvedenou chromozomální přestavbou zřejmě hraje úlohu v patogenezi AML.

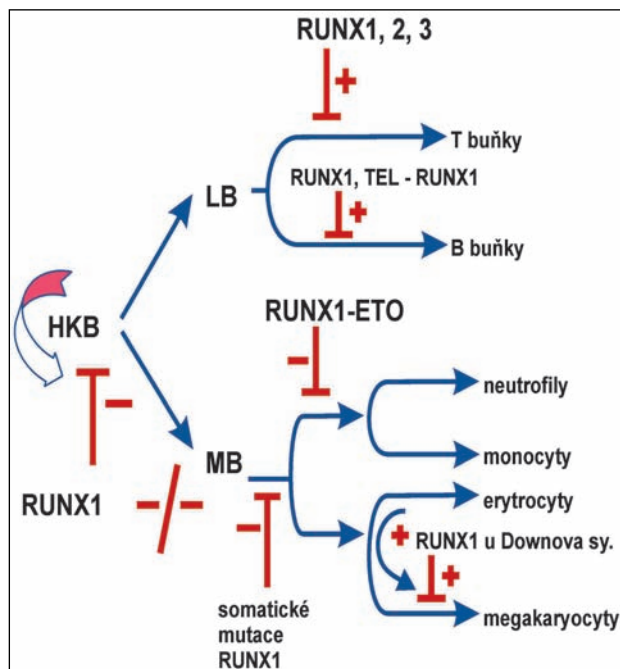
Fuzní protein CBFa-SMMHC/MYH11

Gen *MYH11* kóduje těžký řetězec myosinu SMMHC („smooth muscle myosin heavy chain“) a fuzní gen *CBFB-MYH11* vzniklý inverzí chromozomu 16 kóduje hybridní protein CBFa-SMMHC, který inaktivuje funkci transkripčního faktoru RUNX1 (55,56). Fuzní protein heterodimerizuje s Runx1 silněji než samotný CBFa a Runx1 je tím držen v cytoplazmě buněk a nemůže fungovat jako transkripční faktor v jádře buněk. Dalším mechanismem podílejícím se na leukemogenezi je opět funkce fuzního genu jako korepresoru v komplexu s korepresorem mSin3A a HDAC8 (57). U 70% pacientů s AML a s inverzí chromozomu 16 se vyskytují už zmíněné aktivující mutace KIT, FLT3 a NRAS a proto pro ně zřejmě platí model leukemogeneze ukázaný na obr. 5 a hypotéza dvou potřebných změn (úderů), kde uvedené aktivující mutace patří do první třídy tzv. proliferativních a inv(16) do mutací druhé třídy tzv. blokujících diferenciaci (58).

Vliv množství funkčního transkripčního faktoru RUNX1 na leukemogenezi

Pro normální vývoj hematopoetických buněk, proliferaci a diferenciaci je třeba přes 50% funkčního proteinu RUNX1 (59). Obr.6 přehledně ukazuje vliv deregulace exprese genů *RUNX*, fuzních proteinů obsahujících Runx1 a mutací v *RUNX1* na hematopoetické kmenové buňky (HKB) a na jednotlivé linie lymfoidních (LB) a myeloidních (MB) buněk

(60). Ztráta funkce RUNX1 je důležitá u myeloidních leukémií (AML), zatímco pro lymfoidní leukémie (ALL) a T-buněčné lymfomy je charakteristická dominantně onkogenní úloha genů *RUNX*. Účinek fuzního proteinu TEL-RUNX1 je podobný vlivu zvýšené exprese RUNX1 a zvýšená hladina RUNX1 byla často pozorována u ALL dětských pacientů, často jako důsledek zmnování části chromozomu 21, ale i v případech způsobených jiným mechanismem (60, 61). Pro tento závěr svědčí i snížený výskyt fuzního proteinu TEL-RUNX1 u dětí s Downovým syndromem i když ALL je u nich běžná a dochází u nich ke zvýšené expresi RUNX1. Tento model však nehraje s rozdílnou úlohou RUNX1 jako stimulatoru transkripce po vazbě koaktivátorů transkripce a fuzního proteinu TEL- RUNX1 jako korepresoru transkripce (obr.3). To však hypoteticky lze vysvětlit tím, že u ALL je důležitá jen funkce korepresoru transkripce a tu vedle fuzního proteinu TEL-RUNX1 hraje i zvýšená exprese některého dalšího genu *RUNX* iniciovaná zvýšenou expresí RUNX1. Zvýšená exprese genu *RUNX1* byla pozorována i u nehematologických malignit, např. karcinomů sliznice dělohy (62).



Obr. 6.: Model pro vliv deregulace exprese genů *RUNX* vzhledem k liniím a ke stádiu diferenciaci v hematopoéze. Šipky a značky pro blok ukazují stimulaci a inhibici diferenciaci, zatímco symboly + a - značí zda vliv je zprostředkován přebytkem nebo nedostatkem aktivity RUNX. Zvýšená exprese RUNX 1,2,3 je spojena s blokem diferenciaci u lymfoidních T-buněk (T-buněčné lymfomy u myši). Zmnování genu RUNX1 a zvýšená exprese RUNX1 byla pozorována u lidské ALL a u Downova syndromu. Účinek fuzního proteinu TEL-RUNX1 je funkčně podobný zvýšené expresi RUNX1. Zvýšená exprese RUNX1 u pacientů s Downovým syndromem vede k megakaryocytární leukémii (AML-M7). Ztráta funkce RUNX1 v kmenových buňkách vede k bloku diferenciaci a zabrání definitivní erythropoeze. Somatické mutace RUNX1 brání časnému vývoji myeloidních buněk zatímco fuzní protein RUNX1-ETO brání pozdějšímu vývoji myeloidních buněk.

Příkladem důležité úlohy RUNX1 pro megakaryopoézu u člověka je vzácný syndrom „dědičná porucha destiček s predispozicí k akutní myeloidní leukemii „ FPD/AML („familial platelet disorder“). Jedná se o autozomálně dominantně dědičnou chorobu spojenou s vrozenými mutacemi jedné alely genu *RUNX1* na chromozomu 21q22.3 (63,64). Jednotlivci z postižených rodin trpí od narození trombocytopenií a v přibližně 35% onemocní AML v průměru ve věku 33 let (64). Jelikož pouze část těchto osob s mutací v jedné alele genu *RUNX1* onemocní AML, je zřejmé že tato mutace nestačí k vyvolání leukemie. Obvykle lze však u případů, kde dojde k přechodu do AML nalézt v době diagnózy AML další abnormality v karyotypu (65). Totéž platí pro pacienty se sporadickým výskytem AML a s mutacemi v genu *RUNX1*.

Na obr.1 je znázorněn gen *RUNX1*, kde číslování exonů odpovídá práci autorů Levanon et al. (66). Existuje též starší číslování exonů genu *RUNX1* (67), kde iniciační kodon transkriptu z promotoru 2 je v exonu 3 což odpovídá exonu 2 na obr.1. Zatímco délka proteinu RUNX1 odpovídající transkriptu z P1 je 480 aminokyselinových zbytků, u proteinu RUNX1 odpovídajícího transkriptu z P2 je 453 aminokyselinových zbytků. Frekvence bodových mutací RUNX1 u nově zachycených případů AML je nízká a větší je pouze u nediferenciovaného fenotypu FAB-M0 (68,69). Zde se většinou jedná o mutace v obou alelách genu *RUNX1*. Bodové mutace RUNX1 byly také nalezeny u preleukemie, myelodysplastického syndromu (MDS) a to u japonských pacientů, kteří přežili výbuch atomové bomby v Hirošimě (70), u MDS a AML po terapii alkylačními látkami a inhibitory topoisomerázy II (71) a také u MDS přecházejícího do AML (forma s refrakterní anemií a přebytkem blastů a tatáž forma s blasty v transformaci) (72,73). Bodové mutace jsou často ve vazebné oblasti RUNX1 na DNA, tedy v oblasti Runt, ale také další bodové mutace mimo tuto oblast byly popsány (74,75).

Mutace RUNX1 jsou velmi vzácné u chronické myeloidní leukemie (CML) a nehrají úlohu v přechodu CML do blastické krize, protože mutace RUNX1 byla nalezena jen u jednoho z 84 případů CML v blastické krizi (76,77).

Úloha genu RUNX2 při vzniku nádorů

Zmnožení genu *RUNX2* na chromozomu 6p21 bylo popsáno u několika karcinomů, zvláště u osteosarkomu (78,79). Následky zvýšené exprese genu *RUNX2* u osteosarkomu nejsou zatím známy. Exprese RUNX2 probíhá u osteoprogenitorů i u zralých osteoblastů a hraje úlohu v proliferaci i diferenciaci buněk zahrnutých v tvorbě skeletu (80). RUNX2 má vliv i na expresi genů zahrnutých v angiogeneze, např. vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a genů pro matrixové metaloproteinázy 9 a 13, osteopontin a kolagenázy s úlohou při migraci endoteliálních buněk, degradaci extracelulární matrix a tvorbě metastáz (81). Karcinomy prsu, prostaty a plic se vyznačují expresí několika proteinů, které jinak nacházíme jen u buněk skeletu, např. kostní sialoprotein a další proteiny typické pro osteoblasty (81). Tyto produkty usnadňují interakci mezi nádorem a mikroprostředím kostí. Exprese RUNX2 byla prokázána u karcinomů prsu i prostaty (82,83). Karcinomy prsu často metastazují do kostí a *in vivo* bylo ukázáno, že inhibice aktivity RUNX2 zabrání metastazujícím buňkám karcinomu prsu v jejich osteolytické aktivitě (82). Inhibici aktivity RUNX2

lze dosáhnout zkrácením proteinu RUNX2 o C-koncovou část, která obsahuje oblast umožňující vazbu na jadernou matrix (viz obr.2). RUNX2 interaguje s receptorem pro estrogen a zvyšuje tím svou aktivitu transkripčního faktoru (84). Zatímco buňky normální prostaty vykazují expresi všech tří genů *RUNX* (*RUNX1*, *RUNX2* a *RUNX3*), buňky karcinomu prostaty vykazují jen expresi genů *RUNX1* a *RUNX2*. Produkty exprese obou genů, proteiny RUNX1 a RUNX2 společně s transkripčním faktorem rodiny ETS (PDEF, „prostate derived ETS factor“) a receptorem pro androgen regulují expresi genu pro prostatický specifický antigen (PSA). Zbývá zjistit další cílové geny v epiteliálních buňkách prsu a prostaty, které jsou regulovány transkripčními faktory RUNX a to zřejmě povede k vývoji nových terapií pro léčbu karcinomu prsu a prostaty (82,83).

Onkogenní potenciál RUNX2 byl dále prokázán v modelovém systému myších buněk T-lymfomů s expresí c-MYC, kde RUNX2 vykazoval antiapoptotický a proproliferační vliv (85).

Úloha genu RUNX3 při vzniku nádorů

Gen *RUNX3* leží na krátkém raménku chromozomu 1 (1p36.11-1p36.13), tedy v oblasti, která je často deletována u karcinomů žaludku (86). A v případech, kdy není tato oblast deletována často nacházíme sníženou expresi RUNX3, přibližně u 60% analyzovaných primárních karcinomů žaludku (87). Exprese RUNX3 je snížena až o 90% v pozdních stádiích metastazujících karcinomů žaludku. Z analýzy 119 vzorků karcinomu žaludku však byla nalezena pouze jedna mutace genu *RUNX3*, záměna C>T v poloze C373, která znamenala náhradu argininu 122 za cystein (R122C) uvnitř oblasti Runt (88). O něco větší procento bodových mutací genu *RUNX3* bylo nalezeno při analýze 34 případů karcinomu močového měchýře (89). Zde byly nalezeny mutace u dvou pacientů a to opět v oblasti Runt, což znemožňuje vazbu RUNX3 na DNA a jeho funkci transkripčního faktoru. Malý výskyt mutací genu *RUNX3* neposiluje teorii o úloze RUNX3 jako nádorového supresoru. Epiteliální tkáň žaludku u myši s vyřazenou funkcí genu *RUNX3* („*RUNX3*knockout“) vykazuje hyperplazii v důsledku zvýšené proliferace a snížené apoptózy způsobených sníženou citlivostí k transformačnímu růstovému faktoru beta (TGF-β) (88). RUNX3 inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu stejným mechanismem i u buněk adenokarcinomu jícnu (90). RUNX3 má antionkogenní aktivitu a gen pro RUNX3 je vedle časté delece u karcinomů žaludku také často hypermetetylován ve své P2 promotorové oblasti v CpG ostrůvcích. Epigeneticky je tím inhibována transkripce genu *RUNX3* a to nejen u karcinomů žaludku, ale i u karcinomů plic, pankreasu, jater, prostaty, žlučových cest, prsu, děložní sliznice, děložního čípku, močového měchýře, varlat a kolorektálních karcinomů (89, 91-95).

Závěr

RUNX1 hraje nezastupitelnou úlohu při kontrole růstu myeloidních buněk. Cílovými geny působení RUNX1 jsou totiž geny kódující klíčové proteiny zahrnuté v myelopoeze. RUNX1 je však také propojen se signálními dráhami dalších nádorových supresorů jako jsou TGF-β a p53. RUNX1 aktivuje gen *CDKN2A*, který kóduje protein p14^{ARF} („alternative reading frame“), nádorový supresor, nezbytný pro stabilizaci p53 v odpovědi na zvýšenou expresi onkogenů,

např. myc, ras (96). RUNX1-ETO naopak inhibuje expresi genu *CDKN2A*.

Průkaz fuzních proteinů na kterých se podílí RUNX1 nebo CBFβ má i důležitý význam v prognóze leukemických pacientů. Přestavby chromozomů jejichž výsledkem jsou fuzní proteiny RUNX1-ETO a CBFβ-SMMHC mají při odpovídající terapii příznivou prognózu u dospělých pacientů s AML. Přítomnost fuzního proteinu TEL-RUNX1 je podle výsledků části onkologických center příznivá pro prognózu u dětských pacientů s ALL a v souhlase s tím bylo nalezeno menší množství tohoto fuzního proteinu v okamžiku relapsu než v čase stanovení diagnózy. Jiná hematologická pracoviště však nezjistila rozdíl v prognóze u dětských pacientů s ALL a fuzním proteinem TEL-RUNX1 a také nenašli menší množství fuzního proteinu v čase relapsu než v čase diagnózy (97).

Ztráta genů pro RUNX2 a RUNX3 by mohla vést ke stejnému účinku v jiných typech buněk jako ztráta genu pro RUNX1 u myeloidních buněk. RUNX3 se podílí na zprostředkování účinku TGF-β v epiteliálních buňkách a ztráta

genu pro RUNX3 vede ke karcinomu sliznice žaludku. Zatím se však neobjevila práce ukazující, že ztráta genu pro RUNX2 vede k tvorbě karcinomu. Úloha nádorového supresoru byla tedy zatím potvrzena jen pro RUNX1 a RUNX3. Osteoblasty s vyřazeným genem *RUNX2* vykazují překvapivě zvýšenou rychlost růstu *in vitro* (80). RUNX2 nefunguje také v diferenciaci osteoblastů u osteosarkomů a to dokonce i v případech, že exprese proteinu RUNX2 byla prokázána (98). Pro cílenou terapii nádorů na jejichž vzniku se podílejí transkripční faktory RUNX je nezbytné dokonaleji prozkoumat cílové geny těchto faktorů u karcinomů a hematologických malignit. Technika mikročipů („microarrays“) a další dnes dostupné techniky pro zjištění exprese cílových genů regulovaných transkripčními faktory RUNX v buňkách nádoru pomůže v diagnostice a terapii těchto nádorů.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9045-3. Autor děkuje Ing. Janě Burjankové za překreslení obrázků.

Literatura:

- van Wijnen AJ, Stein GS, Gergen JP et al. Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene* 2004; 23: 4209-4210.
- Amati P. Polyoma regulatory region: a potential probe for mouse cell differentiation. *Cell* 1985; 43: 561-562.
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T. et al. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10431-10434.
- Wang S, Wang Q, Crute BE, et al. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3324-3339.
- Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M et al. Molecular cloning and characterization of PEBP2β, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2α. *Virology* 1993; 194: 314-331.
- Huang G, Shigesada K, Ko K et al. Dimerization with PEBP2 B protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J* 2001; 20: 723-733.
- Sasaki K, Yagi H, Bronson RT et al. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11723-11727.
- Wang Q, Stacy T, Miller JD et al. The CBFβ subunit is essential for CBFα2 (AML1) function in vivo. *Cell* 1996; 87: 697-708.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocation in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84: 321-330.
- Lo Coco F, Pisegua S, Divero D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemia. *Hematologica* 1997; 82: 364-370.
- Lorsbach RB, Downing JR. The role of the AML1 transcription factor in leukemogenesis. *Int J Hematol* 2001; 74: 258-265.
- Zuna J. Úloha genů TEL a AML1 v patogenezi hematologických malignit. *Čas lékař čes* 2001; 140: 131-137.
- Asou N. The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45: 129-150.
- Yamagata T, Maki K, Mitani K. Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol* 2005; 82: 1-8.
- Mikhail FM, Coignet L, Hatem N et al. A novel gene, FGA7, is fused to RUNX1/AML1 in a t(4;21)(q28;q22) in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 110-118.
- Nucifora G, Begy CR, Erickson P et al. The 3;21 translocation in myelodysplasia results in a fusion transcript between the AML1 gene and the gene for EAP, a highly conserved protein associated with the Epstein-Barr virus small RNA EBER1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7784-7788.
- Chan EM, Comer EM, Brown FC et al. AML1-FOG2 fusion protein in myelodysplasia. *Blood* 2005; 105: 4523-4526.
- Zhang Y, Emmanuel N, Kamboj G et al. PRDX4, a member of the peroxidoreductase family, is fused to AML1 (Runx1) in an acute myeloid leukemia patient with a t(X;21)(p22;q22). *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40: 365-370.
- Sakai I, Tamura T, Narumi H et al. Novel RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44: 265-270.
- Paulsson K, Békassy AN, Olafsson T et al. A novel and cytogenetically cryptic t(7;21)(p22;q22) in acute myeloid leukemia results in fusion of *RUNX1* with the ubiquitin-specific protease gene *USP42*. *Leukemia* 2005; 20: 224-229.
- Di Croce L. Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R77-R84.
- Erickson P, Gao J, Chang KS et al. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 1992; 80: 1825-1831.
- Nisson PE, Watkins PC, Sacchi N. Transcriptionally active chimeric gene derived from the fusion of the AML1 gene and a novel gene on chromosome 8 in t(8;21) leukemic cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63: 81-88.
- Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K et al. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* 1993; 12: 2715-2721.
- Choi Y, Elagib KE, Goldfarb AN. AML1-ETO-mediated erythroid inhibition: new paradigms for differentiation blockade by a leukemic fusion protein. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2005; 15: 207-216.
- Amann JM, Nip J, Strom DK et al. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6470-6483.
- Dannenberg J-H, David G, Zhong S et al. mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev* 2005; 19: 1581-1595.
- Wang J, Sauntharajah Y, Redner RL et al. Inhibitors of histone deacetylase

- cetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemic cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2766-2769.
29. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 38-51.
30. Gozzini A, Santini V. Butyrates and decitabine cooperate to induce histone acetylation and granulocytic maturation of t(8;21) acute myeloid leukemia blasts. *Ann Hematol* 2005; 84 Suppl 13: 54-60.
31. Liu S, Shen T, Huynh L et al. Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2005; 65: 1277-1284.
32. Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS et al. The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101: 270-277.
33. Kuchenbauer F, Feuring-Buske M, Buske C. AML1-ETO needs a partner. New insights into the pathogenesis of t(8;21) leukemia. *Cell Cycle* 2005; 4: e1-e3.
34. Yan M, Burel SA, Peterson LF et al. Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17186-17191.
35. Schessl C, Rawat VPS, Cusan M et al. The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 2005; 115: 2159-2168.
36. Schnittger S, Kohl TM, Haeflrich T et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 2006; 107: 1791-1799.
37. Klenner P. Protinádorová chemoterapie pro 21. století. *Klin Onkol* 2003; 16: 243-248.
38. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 1154-1163.
39. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 172-187.
40. Tickenbrock L, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Emerging FLT3 kinase inhibitors in the treatment of leukaemia. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006; 11: 153-65.
41. Appels NMGM, Beijnen JH, Schellens JHM. Development of farnesyltransferase inhibitors: a review. *Oncologist* 2005; 10: 565-578.
42. Milella M, Precupanu CM, Gregorj C et al. Beyond single pathway inhibition: Mek inhibitors as a platform for the development of pharmacological combinations with synergistic antileukemic effects. *Curr. Pharm Des* 2005; 11: 2779-2795.
43. Mitani K. Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. *Oncogene* 2004; 23: 4263-4269.
44. Kurokawa M, Mitani K, Imai Y et al. The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor- β -mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 1998; 92: 4003-4012.
45. Cuenca GM, Nucifora G, Ren R. Human AML1/MDS1/EVI1 fusion protein induces an acute myelogenous leukemia (AML) in mice: A model for human AML. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1760-1765.
46. Gamou T, Kitamura E, Hosoda F et al. The partner of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8 (ETO) family. *Blood* 1998; 91: 4028-4037.
47. Hoogeveen AT, Rossetti S, Stoyanova V et al. The transcriptional corepressor MTG16a contains a novel nucleolar targeting sequence deranged in t(16;21) positive myeloid malignancies. *Oncogene* 2002; 21: 6703-6712.
48. Kochetkova M, McKenzie OL, Bais AJ et al. CBFA2T3 (MTG16) is a putative breast tumor suppressor gene from the breast cancer loss of heterozygosity region at 16q24.3. *Cancer Res* 2002; 62: 4599-4604.
49. Golub TR, Baker GF, Bohlander SK et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4917-4921.
50. Romana SP, Poirel H, Le Coniat M et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 4263-4269.
51. Zuna J, Hrušák O, Kalinova M et al. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? *Leukemia* 1999; 13: 22-24.
52. Zuna J, Krejci O, Madzo J et al. TEL/AML1 and immunoreceptor gene rearrangements-which comes first? *Leuk Res* 2005; 29: 633-639.
53. Guidez F, Petrie K, Ford AM et al. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 2000; 96: 2557-2561.
54. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998; 12: 2392-2402.
55. Trnková Z, Peková S, Bedřiková R et al. Type JCBF β /MYH11 transcript in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Hematology* 2003; 8: 115-117.
56. Shigesada K, van de Sluis B, Liu PP. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBF β /PEBP2B-MHY11. *Oncogene* 2004; 23: 4297-4307.
57. Durst KL, Lutterbach B, Kummalue T et al. The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 607-619.
58. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia, and inv(16) (p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol* 2005; 128: 18-34.
59. Nimer SD. Blood and Runx1: got to have it, really need it. *Blood* 2004; 104: 3420-3421.
60. Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene* 2004; 23: 4308-4314.
61. Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 376-387.
62. Planaguma J, Díaz-Fuertes M, Gil-Moreno A et al. A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 8846-8853.
63. Song W-J, Sullivan MG, Legare RD et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukemia. *Nat Genet* 1999; 23: 166-175.
64. Minelli A, Maserati E, Rossi G et al. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: Genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40: 165-171.
65. Ganly P, Walker RC, Morris CM. Familial mutations of the transcription factor RUNX1 (AML1, CBFA2) predispose to acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1-10.
66. Levanon D, Glusman C, Bangsow T et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene* 2001; 262: 23-33.
67. Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucl Acids Res* 1995; 23: 2762-2769.
68. Langabeer SE, Gale RE, Rollinson SJ et al. Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 24-32.
69. Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* 2004; 23: 4284-4296.
70. Harada H, Harada Y, Tanaka H et al. Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101: 673-680.
71. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard JP. Mutations of AML1 are common in therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 2004; 104: 1474-1481.
72. Harada H, Harada Y, Niimi H et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 2004; 103: 2316-2324.
73. Steensma DP, Gibbons RJ, Mesa RA et al. Somatic mutations in RUNX1/CBFA2/AML1 are common in high-risk myelodysplastic syndrome, but not in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eu r J Haematol* 2005; 74: 47-53.
74. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K et al. Mutational analyses of the AML1 gene in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 617-621.
75. Carnicer MJ, Nomdedéu JF, Lasa A et al. AML-1 mutations outside the RUNT domain: description of two cases in myeloid malignancies. *Leukemia* 2002; 16: 2329-2332.
76. Steer EJ, Goldman JM, Cross NCP. Mutations of the transcription fac-

- tor AML1/CBFA2 are uncommon in blastic transformation of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2001 nebo 2000; : 476-477.
77. Corm S, Biggio V, Roche-Lestienne C et al. Coexistence of AML1/RUNX1 and BCR-ABL point mutations in an imatinib-resistant form of CML. *Leukemia* 2005; 19: 1991-1992.
 78. Forus A, Weghuis DO, Smeets D et al. Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplifications at 6p and 17p in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14: 15-21.
 79. Lau CC, Harris CP, Lu XY et al. Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 11-21.
 80. Pratap J, Galindo M, Zaidi SK et al. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion preosteoblasts. *Cancer Res* 2003; 63: 5357-5362.
 81. Barnes GL, Hebert KE, Kamai M et al. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res* 2004; 64: 4506-4513.
 82. Javed A, Barnes GL, Pratap J et al. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer inhibits osteolysis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1454-1459.
 83. Fowler M, Borazanci E, McGhee L et al. RUNX1 (AML-1) and RUNX2 (AML-3) cooperate with prostate-derived Ets factor to activate transcription from the PSA upstream regulatory region. *J Cell Biochem* 2006; 97: 1-17.
 84. McCarthy TL, Chang W-Z, Liu Y, Centrella M. Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts. *J Biol Chem* 2003; 278 : 43121-43129.
 85. Blyth K, Vaillant F, Hanlon L et al. Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways *in vivo*. *Cancer Res* 2006; 66: 2195-2201.
 86. Bae SC, Takahashi E, Zhang YW et al. Cloning, mapping and expression of PEBP2 alpha C, a third gene encoding the mammalian Runt domain. *Gene* 1995; 159: 245-248.
 87. Lund AH, van Lohuizen M. RUNX: a trilogy of cancer genes. *Cancer Cell* 2002; 1: 213-215.
 88. Li QL, Ito K, Sakakura C et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124.
 89. Kim W-J, Kim E-J, Jeong P et al. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 9347-9354.
 90. Torquati A, O'Rear L, Longobardi L et al. RUNX3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by reinstating transforming growth factor beta responsiveness in esophageal adenocarcinoma cells. *Surgery* 2004; 136: 310-316.
 91. Li Q-L, Kim H-R, Kim W-J et al. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 223-228.
 92. Ku J-L, Kang S-B, Shin Y-K et al. Promoter hypermethylation down-regulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 6736-6742.
 93. Xiao WH, Liu WW. Hemizygous deletion and hypermethylation of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 376-380.
 94. Kato N, Tamura G, Fukase M et al. Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of infants. *Am J Pathol* 2003; 163: 387-391.
 95. Goel A, Arnold CN, Tassone P et al. Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer* 2004; 112: 754-759.
 96. Hiebert SW, Reed-Inderbitzin EF, Amann J et al. The t(8; 21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30: 177-183.
 97. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukemia. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 502-513.
 98. Thomas DM, Johnson SA, Sims NA et al. Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27^{KIP1}, is disrupted in osteosarcoma. *J Cell Biol* 2004; 167: 925-934.

Došlo: 31. 3. 2006
Prijato: 15. 5. 2006