

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A WT1 gén kópiaszám-eltéréseinek és expressziós zavarainak szerepe daganatos kórképekben

Dr. Buglyó Gergely

Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015.

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. A WT1 gén és protein.....	9
2.2. A fehérje izoformái.....	10
2.3. A WT1 szerepe az embryonális fejlődésben	14
2.3.1. A gonádok fejlődése	14
2.3.2. A vese fejlődése.....	15
2.3.3. A kardiovaszkuláris rendszer fejlődése	16
2.3.4. A WT1 kétirányú hatása a sejtek differenciálódására	16
2.4. A WT1 funkciói a felnőtt szervezetben.....	18
2.5. A WT1 jelentősége daganatos betegségekben	18
2.5.1. Egy gén két arca: onkogén és tumorszupresszor	18
2.5.2 A Wilms-tumor.....	19
2.5.3. WAGR szindróma	20
2.5.4. Denys-Drash szindróma	21
2.5.5. Frasier szindróma	22
2.5.6. A „Denys-Drash/Frasier spektrum”	23
2.5.7. Rosszindulatú hematológiai betegségek.....	23
2.5.8. Egyéb, szolid tumorok.....	25
2.5.9. A WT1, mint a daganatellenes immunterápia vonzó célpontja.....	27
3. CÉLKITŰZÉS	29
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	30
4.1. A vizsgált betegek	30
4.2. Laboratóriumi módszerek.....	31
4.2.1. DNS izolálás, PCR reakció a WT1 exonjainak vizsgálatára	31
4.2.2. Kópiaszám-vizsgálatok qRT-PCR segítségével	33
4.2.3. Immunfestés WT1 elleni antitesttel	35
4.2.4. RNS izolálás, a WT1-expresszió meghatározása qRT-PCR-rel.....	35
4.3. Statisztikai módszerek	36
5. EREDMÉNYEK.....	39

5.1. WT1 defektus kimutatása komplex daganatos kórkép háttérében	39
5.1.1. Az exonok amplifikálása, szekvenálása	39
5.1.2. Kópiaszám-analízis.....	40
5.1.3. Immunhisztokémia	41
5.2. WT1-expresszió malignus hematológiai betegségeiben.....	42
5.2.1. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma	42
5.2.2. Köpenysejtes lymphoma.....	42
5.2.3. Perifériás T-sejtes lymphoma	44
5.2.4. Felnőttkori akut lymphoblastos leukemia.....	45
5.2.5. MALT és Burkitt lymphoma	46
6. MEGBESZÉLÉS	47
6.1. WT1 mikrodelíció okozta komplex, többfajta neoplasiával járó klinikai kép.....	47
6.2. WT1-expresszió lymphoid eredetű malignitásokban	51
6.3. Fontosabb eredményeink.....	57
7. ÖSSZEFOGLALÁS	58
8. IRODALOMJEGYZÉK	60
8.1. Hivatkozások	60
8.2. Hivatalos igazolás az értekezés alapjául szolgáló saját közleményekről	74
9. TÁRGYSZAVAK	75
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABL1: Abelson egér leukemia onkogén 1

ALCL: anaplastic large-cell lymphoma (anaplasztikus nagysejtes lymphoma)

ALL: akut lymphoblastos leukemia

ALK: anaplasztikus lymphoma kináz

AML: akut myeloid leukemia

ARR: antiszensz regulátor régió

AWT1: alternatív Wilms tumor 1

B-ALL: B-sejtes akut lymphoblastos leukemia

BASP1: brain acid soluble protein 1 (savban oldható agyi fehérje 1)

BDNF: brain-derived neurotrophic factor (agyi eredetű neurotróf faktor)

BEAM: carmustin, etopozid, citozin arabinozid, melfalán

BMT: betegségmentes túlélés

CBP: CREB binding protein (CREB-kötő fehérje)

CD: cluster of differentiation (differenciálódási antigén)

CGH: komparatív genomiális hibridizáció

CHOP: ciklofoszfamid, hidroxidaunorubicin, Oncovin, prednisolon

Cre: causes recombination (rekombinációt eredményez)

CREB: cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (ciklikus adenozin-monofoszfát reszponzív elemet kötő fehérje)

Ct: cycle threshold (ciklus küszöb)

CT: computer tomográfia

CTCF: CCCTC-kötő faktor

CTE: konstitutív transzportelem

DDS: Denys-Drash szindróma

DHAP: dexamethason, citozin arabinozid, cisplatin

DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma (diffúz nagy B-sejtes lymphoma)

DMS: diffúz mesangialis sclerosis

EGFR: epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptora)

EGR-1: early growth response protein 1 (korai növekedési válasz fehérje 1)

EIF3M: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 3, M alegység

EPDC: epicardium-derived cell (epicardium-eredetű sejt)

FFPE: formalin-fixed, paraffin-embedded (formalin-fixált, paraffinba ágyazott)

FS: Frasier szindróma

FSGS: focalis segmentalis glomerulosclerosis

GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GFR: glomeruláris filtrációs ráta

hnRNS: heterogén nukleáris ribonukleinsav

hyper-CVAD: ciklofoszfamid, vincristin, doxorubicin, dexamethason, citozin arabinozid, metotrexát

IGF-2: insulin-like growth factor 2 (inzulinszerű növekedési faktor 2)

IRF8: interferon regulátor faktor 8

LOH: loss of heterozygosity (a heterozigótaság elvesztése)

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue (mucosa-asszociált lymphoid szövet)

MCL: mantle cell lymphoma (köpenysejtes lymphoma)

MDS: myelodysplasiás szindróma

MIS: Müllerian inhibiting substance (mülleri gátló anyag)

MLPA: multiplex ligáció alapú próbaamplifikáció

MMTV: mouse mammary tumor virus (egér emlőtumor vírus)

NHL: non-Hodgkin lymphoma

NLS: nukleáris lokalizációs szignál

Par4: prostate apoptosis response 4 (prosztata apoptózis válasz 4)

PAX6: páros box-gén 6

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PDGF α : platelet-derived growth factor alpha (vérlemezke-eredetű növekedési faktor alfa)

PRRG4: proline rich gamma-carboxyglutamic acid polypeptide 4 (prolinban gazdag gamma-karboxiglutaminsav polipeptid 4)

PTCL: peripheral T-cell lymphoma (perifériás T-sejtes lymphoma)

qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (quantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció)

Ras: rat sarcoma protein (patkány sarcoma fehérje)

RBM4: RNA-binding motif protein 4 (RNS-kötő motívum fehérje 4)

R-CHOP: rituximab, ciklofoszfamid, hidroxidaunorubicin, Oncovin, prednisolon

RCN1: retikulokalbín 1

R-DHAP: rituximab, dexamethason, citozin arabinozid, cisplatin

Sf1: szteroidogén faktor 1

SLC1A2: solute carrier family 1 member 2 (oldott anyagokat transzportáló 1. fehérjecsald 2. tagja)

Sox9: SRY box 9 (SRY doboz 9)

SRY: sex determining region of Y (nemet meghatározó régió az Y kromoszómán)

STIM1: stromális interakciós molekula 1

T-ALL: T-sejtes akut lymphoblastos leukemia

TGFβ: transforming growth factor beta (transzformáló növekedési faktor béta)

TT: teljes túlélés

U2AF65: U2 auxiliary factor 65 (U2 kiegészítő faktor 65)

VEGF: vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)

WAGR: Wilms tumor, aniridia, urogenitális rendellenesség vagy gonadoblastoma, mentális retardáció

WAGRO: WAGR szindróma, obezitás

WNT4: wingless type MMTV integration site family, member 4 (szárnyatlan típusú MMTV integrációs hely család 4. tagja)

WT1: Wilms tumor 1

WT1-AS: Wilms tumor 1 antiszensz

1. BEVEZETÉS

A WT1 gént eredetileg a Wilms-tumorért felelős lokuszként írták le: Rose és mtsai (1990) feltérképezték a 11p13 kromoszomális régiót, amely a Wilms-tumorról járó WAGR szindrómában deletálódik, és ezen belül azonosítottak egy transzkripciós egységet, amely Zn-ujj fehérjét kódol. Call és mtsai (1990) részletesebben jellemezték a gént, leírták az általa kódolt polipeptid morfológiai sajátosságait, valamint az mRNS megjelenését a vesében és a csontvelőben.

Noha eleinte csak tumorszupresszorként tulajdonítottak szerepet a WT1 fehérjének, mára világos, hogy funkciója ennél jóval összetettebb. A Wilms-tumor mellett számos szolid és hematológiai malignitás pathogenesisében igazoltnak látszik a WT1 szerepe, ám, hogy valójában miben áll ez a szerep, az a mai napig nem pontosan tisztázott. Úgy tűnik, a WT1 fehérje csak az urogenitális rendszerben működik tumorszupresszorként, míg egyéb eredetű daganatok esetében inkább onkogénként funkcionál. E különös kettős szerepkör lehetséges magyarázata, hogy a géntermék a vesében elősegíti a sejtek érését, és kilépésüket a sejtciklusból, így a mesenchyma-epithelium tranzíció egyik fontos eleme, mely többek közt a nephronok létrejöttéhez is szükséges. A többi szövetben ugyanakkor a fentivel ellentétes módon működve, éretlen állapotban tartja a sejteket, vagy hozzájárul az epithelium-mesenchyma tranzícióhoz (Hohenstein és Hastie, 2006; Miller-Hodges és Hohenstein, 2012).

Az elméleti orvostudományban dolgozó kutatók mellett ma már gyakorló klinikusok, azaz hematológusok, nephrológusok és más szakterületek képviselői is foglalkoznak a WT1 génnel. Ez annak köszönhető, hogy az utóbbi évtizedekben, még inkább az elmúlt néhány évben összegyűlt eredmények alapján úgy tűnik, a WT1 klinikai alkalmazási lehetőségei jóval szélesebb körűek, mint azt korábban gondolták. Expresszióját az akut leukémiák mindkét fő típusában (AML-ben és ALL-ben) a reziduális betegség egyik fontos markerereként tartják számon; AML-ben különösen hasznos, a patológiai és citogenetikai altípustól független (univerzális) prognosztikai faktornak tekintik a remisszióba került betegek esetében (Cilloni és mtsai, 2008).

Azt is megfigyelték, hogy azon betegek keringésében, akik WT1-et expresszáló tumort hordoznak, megjelennek a WT1-specifikus citotoxikus T-lymphocyták és a WT1 elleni antitestek, igazolva a WT1 fehérje immunogenitását. Egy közlemény szerint, amelynek szerzői 75 tumorantigént hasonlítottak össze, a WT1 tűnik a legjobb terápiás célpontnak,

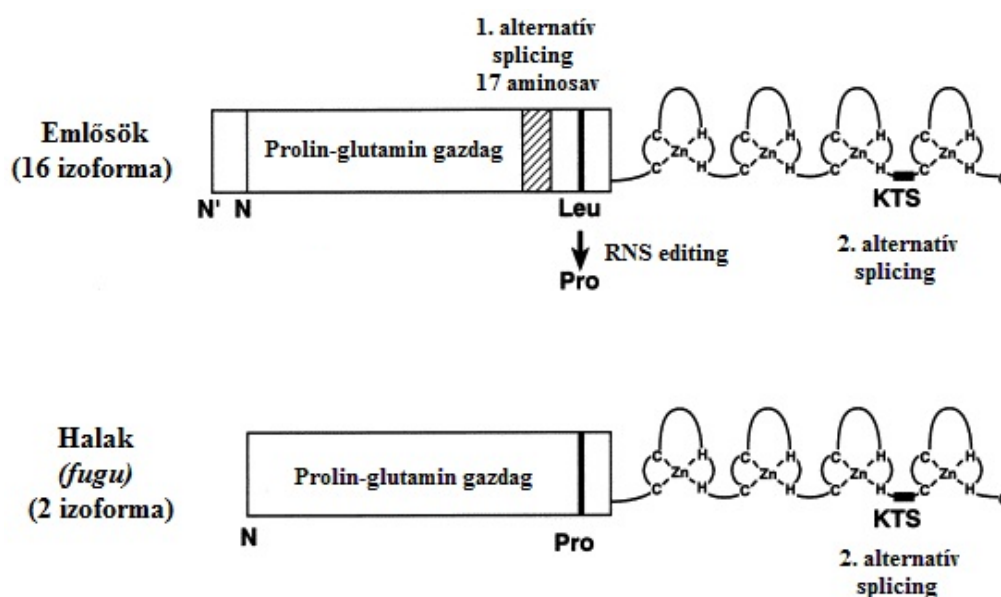
megelőzve pl. az EGFR-t, a p53-at és a Ras-t (*Cheever és mtsai, 2009*). Több klinikai tanulmány is rámutatott, hogy a WT1 peptiddel történő immunizáció biztonságos és hatékony lehet, többek között AML-ben, emlő- és tüdőrákban, glioblastomában: egyes szerzők szerint a közeljövőben a WT1-immunoterápia mindennapos klinikai gyakorlattá válhat (*Sugiyama, 2010; Lindstedt és mtsai, 2014*).

Összegzésképpen tehát megállapíthatjuk, hogy a WT1 gén és fehérje jelentős klinikai érdeklődésre tart számot, ugyanakkor a genetikusok és molekuláris biológusok számára komoly kihívást jelent: működése számos betegségben (pl. a leukemiákban) még alapjaiban sem tekinthető tisztázottnak. Saját munkánkkal, amelyben tanszékünk munkatársai mellett a Debreceni Egyetem több klinikájának orvosai is részt vettek, megpróbáltunk hozzájárulni a terület szakirodalmához: ha csak egy kis lépéssel is, de közelebb kerülni e különös gén titkának megfejtéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A WT1 gén és protein

A mintegy 50 kb kiterjedésű, 10 exonból álló WT1 gén terméke egy rendhagyó transzkripciós faktor, amely a kromoszomális és celluláris környezettől függően egyaránt képes aktiválni vagy gátolni bizonyos gének transzkripcióját, és a poszttranszkripciós szabályozásban is szerepet játszik. A fehérje C-terminálisan négy klasszikus, C2H2 („Krüppel”) típusú Zn-ujj doménre, N-terminálisan pedig egy prolinban és glutaminban gazdag szakaszra osztható, melyet az első 6 exon kódol (1. ábra). E szakasz tartalmaz egy dimerizációs domént, valamint egy transzkripciós aktivációért és represszióért felelős domént (Morrison és mtsai, 2008).



1. ábra. A WT1 fehérje szerkezete, a főbb izoproteinek emlősben és halban (Schedl és Hastie, 1998).

A fehérje minden gerinces élőlényben megtalálható, és emlősökben nagyfokú konzerváltságot mutat (Schedl és Hastie, 1998). A WT1 fehérje TATA nélküli, GC-gazdag promoterekhez kötődik, target szekvenciája 5' GCGTGGGAGT 3'. Általánosabban is megadható a konszenzus target szekvencia: 5' GNGNGGGNG 3' – ez pedig átfed az EGR-1 transzkripciós faktor konszenzus szekvenciájával (Rauscher és mtsai, 1990; Nakagama és

mtsai, 1995). Pritchard-Jones és mtsai (1990) nem sokkal a gén első leírása után közölték, hogy a WT1 mRNS kimutatható az embryonális vese mesenchymájából és glomerularis epitheliumából, a magzati gonádtlepből, valamint a mesothelből. A WT1 ez idáig azonosított konkrét targetjei között többnyire olyan géneket találunk, melyek a vese, a szív és a gonádok embryonális fejlődésében játszanak szerepet – pl. Sproutyl (Gross és mtsai, 2003), Snail (Martínez-Estrada és mtsai, 2010), nesztin (Wagner és mtsai, 2006), nephrin (Wagner és mtsai, 2004), CXXC5 (Kim és mtsai, 2010), Sf1 (Wilhelm és Englert, 2002). Több olyan gént is szabályoz, amelyek az ízlelőbimbók fejlődését irányítják (Gao és mtsai, 2014).

A WT1 gén saját promotere is TATA nélküli, ám, míg a fehérje expressziója pontosan szabályozott a különböző szövetekben, addig a promoter mindenütt túlműködik. A WT1 fehérje kifejeződését tehát elsősorban nem a promoter-szintű szabályozás, hanem más regulátor elemek határozzák meg, pl. egy silencer a gén 3. intronjában, ill. egy enhancer (Fraizer és mtsai, 1994; Hewitt és mtsai, 1995; Hu és mtsai, 2008).

A génexpresszió szabályozásában fontos szerepe lehet az 1. intronban található ARR metilációjának is. Az ARR olyan promoterként működik, mely a WT1 promoterével ellentétes irányú transzkripciót iniciál – transzkriptuma, a WT1-AS egy szakaszon komplementer a WT1 mRNS proximális szakaszával, de tartalmazza a WT1 génhez képest *upstream* elemek transzkriptumát is (Malik és mtsai, 2000). A WT1-AS több szövetben párhuzamosan expresszálódik a WT1-gyel, és az átfedő régió miatt heteroduplexet alkot a WT1 mRNS-sel. Az ARR metilációs mintázatának megváltozása a Wilms-tumorkok jellemző jegye, míg a WT1-AS abnormis *splicing*-ja szerepet játszhat a WT1 ektópiás expressziójában bizonyos daganatoknál (Dallosso és mtsai, 2007). Újabban primer myelofibrosis hátterében is leírták a WT1-AS megváltozott expresszióját (Pennucci és mtsai, 2014).

2.2. A fehérje izoformái

A WT1 funkciójának komplexitása jelentős részben a rendkívül nagy számú fehérjevariánsnak köszönhető. Haber és mtsai (1991) írták le a 4 alapvető izoformát: 2 helyen lehetséges alternatív *splicing*, ennek megfelelően az érett mRNS-be bekerülhet, vagy abból kimaradhat az 5. exon által kódolt 17 aminosav, ill. a 9. exon által kódolt szakaszból egy KTS tripeptid (1. ábra). Egészséges egyedben többségben vannak az 5. exon által kódolt

szakaszt, ill. a KTS-szekvenciát tartalmazó izoformák, ám míg a KTS-pozitív és KTS-negatív formák aránya konstans módon 2:1 a különböző szövetekben, addig a 17 aminosavat tartalmazó és nem tartalmazó izoproteinek aránya igen változó lehet (Wagner és mtsai, 2003; Klamt és mtsai, 1998).

Schedl és Hastie (1998) már 16 izoformáról számol be a WT1-et érintő, addig leírt alternatív start kodonoknak, az RNS editingnek, valamint a már említett alternatív *splicing*nak megfelelően (1. ábra). Azóta tovább növekedett az elméletileg lehetséges WT1 izoproteinek száma, összesen legalább 36-ra (Hohenstein és Hastie, 2006). Mindez egy újabb alternatív start kodon (Scharnhorst és mtsai, 1999), egy, az 5. intron végénél kezdődő transzkriptum (Dechsukhum és mtsai, 2000), valamint egy alternatív promoterrel és 1. exonnal rendelkező, ún. AWT1 transzkriptum (Dallosso és mtsai, 2004) felfedezésének köszönhető.

Érdekes módon ezen variációk többsége csak emlősökben található meg: egy vizsgált halfajban (*Fugu rubripes*) az 1. ábrán bemutatott mechanizmusok közül csak a KTS-tripeptidet érintő alternatív *splicing* működik. Mindez azt sugallja, hogy az összes izoprotein közül a KTS-pozitív és KTS-negatív formák közötti különbségnek lehet a legjelentősebb élettani szerepe (Hohenstein és Hastie, 2006). Alátámasztani látszik e feltevést, hogy mind a KTS-pozitív, mind a KTS-negatív izoprotein hiányában súlyos (de különböző) vesedefektusok alakulnak ki egérben (Hammes és mtsai, 2001), míg az 5. exon deléciója (Natoli és mtsai, 2002), vagy az upstream, alternatív transzlációs kezdőpont (CTG) mutációja (Miles és mtsai, 2003) nem jár megfigyelhető fenotípusos eltéréssel.

A KTS-pozitív és KTS-negatív izoforma közötti funkcionális különbség egyik fő okára akkor derült fény, amikor megvizsgálták e fehérjék DNS-kötő sajátosságait (Laity és mtsai, 2000). A KTS szekvencia beékelődése a fehérje 3. és 4. Zn-ujj doménje közé flexibilissé teszi ezt a linker régiót, és gyengíti a 4. Zn-ujj interakcióját a DNS-sel. Ennek megfelelően a DNS-hez való közvetlen kötődésben elsősorban a KTS-negatív izoprotein játszik szerepet.

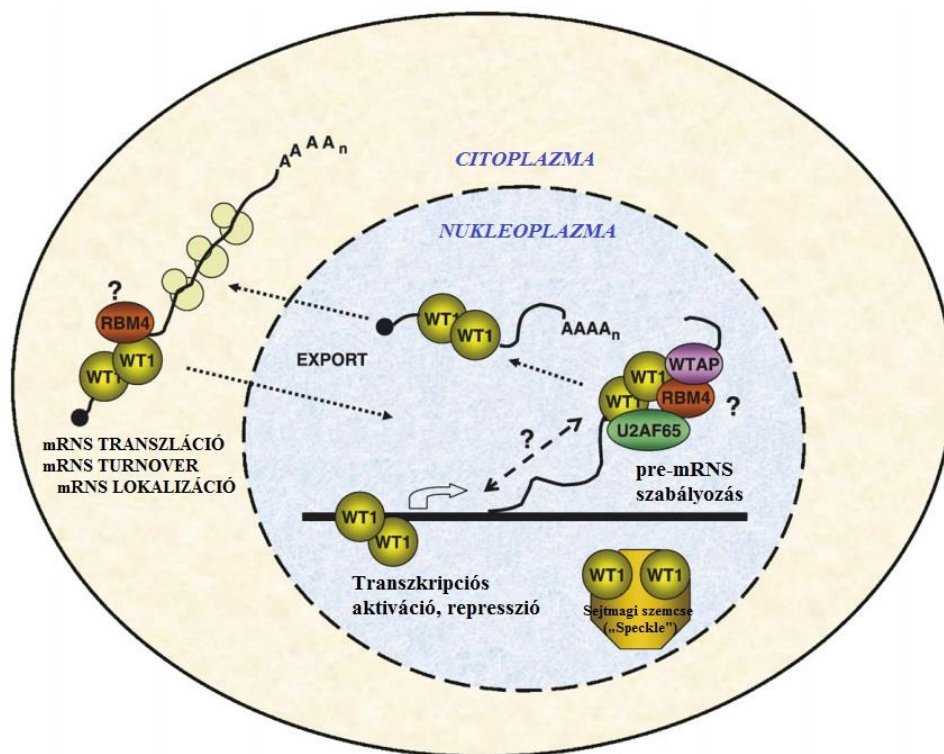
Mi lehet tehát a KTS-pozitív izoforma funkciója? Az irodalomból ismert, hogy a Zn-ujj domének a DNS mellett az RNS-hez is kötődhetnek (Ladomery és Delleire, 2002). Caricasole és mtsai (1996) kimutatták, hogy KTS-pozitív WT1 hatékonyabban kötődik IGF-2-eredetű RNS próbákhoz, mint akár a KTS-negatív izoforma, akár a WT1-gyel azonos családba tartozó EGR-1. Az RNS-hez való kötődésben a KTS tripeptid mellett döntő az 1. Zn-ujj szerepe (Ladomery és mtsai, 2003).

Fontos lehet a WT1 interakciója bizonyos *splicing* faktorokkal is. Elsőként Davies és mtsai (1998) számoltak be róla, hogy a WT1 Zn-ujj doménje segítségével kötődik az

U2AF65, egy szerin-arginin típusú *splicing* faktor SR doménjéhez. Noha ez a kötődés mindkét WT1 izoprotein esetében egyformán megvalósul, később a KTS-pozitív izoforma specifikus szerepét is bizonyították: az RBM4 *splicing* faktorhoz kötődve, annak funkcióját modulálta, így befolyásolva két minigén alternatív *splicing*-ját egy kotranszfekciós kísérletben (Markus és mtsai, 2006).

Mindezek mellett az is gyanítható, hogy a KTS-pozitív WT1 valamilyen szerepet játszik az RNS nukleáris exportjában és a translációban. Sokan beszámoltak róla, hogy a WT1 a sejtmag mellett a citoplazmából is kimutatható, ám azokban az években, amikor még egyszerű transzkripció faktoroként tekintettek a WT1-re, ezeket az eredményeket nem vették komolyan, és festési artefactumnak tartották (Hohenstein és Hastie, 2006). Ma már tudjuk, hogy az összes WT1 fehérje (sejttípustól függően) 10-50 százaléka valóban a citoplazmában található, annak köszönhetően, hogy a WT1 képes oda-vissza ingázni a sejtmag és a citoplazma között. Ráadásul a citoplazmatikus WT1 érdekes módon a működő riboszómákhoz asszociált (Niksic és mtsai, 2004). A WT1 sejtmagból való exportjának részletei még nem tisztázottak, de a nukleáris importról kiderült, hogy a 3. Zn-ujjban található NLS, valamint az importin α 1 és β segítségével valósul meg (Depping és mtsai, 2012).

Bor és mtsai (2006) közzölték az első konkrét adatokat arra vonatkozóan, hogy specifikusan a WT1 KTS-pozitív izoformája képes elősegíteni olyan, CTE-szakaszokat tartalmazó RNS-ek nukleáris exportját és translációját, amelyek még nem fejezték be a *splicing* folyamatát, és reziduális intronokat tartalmaznak. Mindent egybevetve bonyolult kép rajzolódik ki a WT1 sejtmagi és citoplazmatikus funkcióival kapcsolatban (2. ábra).



2. ábra. A WT1 lehetséges funkciói (Morrison és mtsai, 2008). A fehérje aktiválhatja, vagy gátolhatja a transzkripciót, kötődik a pre-mRNA-hez és egyes splicing faktorokhoz. Befolyásolhatja a transzkriptumok exportját a sejtmagból, turnover-ét és transzlációját.

Számos bizonyíték szól tehát amellet, hogy a WT1 nem pusztán transzkripció faktorként működik, hanem fehérje-RNS és fehérje-fehérje interakciók révén poszttranszkripció szinten is szabályozza targetjeit, e szabályozásban pedig a KTS-pozitív izoformáé a főszerep (Morrison és mtsai, 2008). Ha további közlemények jelennek meg a témában, érdekes lesz látni, hogy mennyire koordinált a WT1 transzkripció és poszttranszkripció funkciója – hogy vajon különböző, vagy ugyanazon célpontokon fejti ki hatását az egyes szinteken.

Kevesebbet tudunk a többi izoprotein szerepéről. Az emlős-specifikus 5. exon egy, a Par4 fehérjével való kötődésért felelős domént kódol (Richard és mtsai, 2001). E domén jelenléte önmagában nem kritikus a WT1-protein működése szempontjából, de hiánya megváltoztathatja a kifejlődő fenotípust, ha más mutációkkal együtt van jelen (Wagner és mtsai, 2003). A korábban említett AWT1 szerepet játszhat a Wilms-tumor kialakulásában, ha a 11p13 régiót érintő imprinting hibája miatt expresszálódik (Hancock és mtsai, 2007).

A többi izoformához mindezidáig nem sikerült specifikus funkciót társítani. Kérdéses, hogy egyáltalán léteznek-e ezek a funkciók, vagy az esetek jelentős részében e fehérjevariánsok pusztán evolúciós maradványokat képviselnek (Wagner és mtsai, 2003).

közvetlenül szabályozza az SRY promotert (Hossain és Saunders, 2001), ezt a mechanizmust senki sem tudta kimutatni *in vivo*. Más közlemények a KTS-pozitív izoforma szerepét hangsúlyozzák a folyamatban, ami felveti a poszttranszkripció szintű szabályozás lehetőségét (Bradford és mtsai, 2009).

Érdekes, hogy WT1 KTS-negatív formája az Sf1-hez kötődve szintén képes szabályozni a MIS expresszióját (Nachtigal és mtsai, 1998). Azonban, míg a Sox9 kötődésének döntő jelentősége van a transzkripció beindításában, addig a WT1-Sf1 komplex csak a képződő transzkriptum mennyiségét regulálja (Arango és mtsai, 1999).

2.3.2. A vese fejlődése

A gonádtelephez hasonlóan a maradandó vese (metanephros) is intermediér mesoderma-eredetű. A nephrogenesisben két fő képlet vesz részt: a metanephrogén mesenchyma, valamint az epitheliális ureterbimbó, amely a Wolff-cső kinövéséből alakul ki. Az ureterbimbó belenő a metanephrogén vesetelepbe, és kialakítja a vesemedencét, majd a nagy- és kiskelyheket, végül pedig apróbb ágakat alkotva a gyűjtőcsatorna-rendszert. A metanephrogén telep ureterbimbóval határos mesenchymája („cap mesenchyma”) ún. mesenchyma-epithelium tranzíción megy keresztül, kialakítva a vesicula renalisokat, amelyekből később a nephronok fejlődnek (Georgas és mtsai, 2009).

A WT1 számos ponton bekapcsolódik a folyamatba: szükséges a még indukálatlan mesenchyma túléléséhez, a mesenchyma-epithelium tranzícióhoz, valamint az azt követő nephronképződéshez, a podocyta létrejöttéhez és megfelelő működéséhez (Chau és Hastie, 2012). Régóta ismert, hogy a cap mesenchyma epitheliummá való differenciálódásának fő szabályozója a WNT4 (Stark és mtsai, 1994). Újabb eredmények szerint a WT1 funkciója a fejlődő vesében azzal magyarázható, hogy kiváltja az alaphelyzetben represszált WNT4 transzkripcióját. Olyan egerek létrehozásával, ahol a WT1 lokális knockout-ra került a vese mesenchymájában (Nestin-Cre egér: a Cre rekombináza a nestin promotor kontrollja alatt áll) sikerült megkerülni azt a problémát, hogy a hagyományos knockout veseagenesisével jár. Ilyen egerekben, noha az ureterbimbók kialakulnak, nincs nyoma mesenchyma-epithelium átmenetnek a cap mesenchymában, és a nephronok teljes hiánya tapasztalható. A WNT4 expressziója rendkívül alacsony (Essafi és mtsai, 2011).

Egy, a WT1 által szabályozott fejlődési folyamat hibája malignus daganathoz is vezethet, ahogy azt a Wilms-tumor példázza (lásd 2.5.2.).

2.3.3. A kardiovaszkuláris rendszer fejlődése

A szív fejlődése során a coronariák és az epicardium a proepicardiális szervecskéből alakulnak ki. Az epicardium befedi a fejlődő szívet, és bizonyos sejtjei (EPDC-k) epithelium-mesenchyma tranzíción mennek keresztül, majd infiltrálják a szívet. E mesenchymasejtek számos sejtfeleség létrehozására képesek: lehetnek belőlük fibroblastok, érfali simaizomsejtek, de a szívizomsejtek egy része is bizonyítottan EPDC-eredetű (*Zhou és mtsai, 2008; Chau és Hastie, 2012*).

Az EPDC-k expresszálják a WT1-et, ám ez az expresszió már nem mutatható ki a belőlük fejlődő, érett sejtekben (*Moore és mtsai, 1999*). Újabb eredmények arra engednek következtetni, hogy a WT1 elnyomja a differenciálódásért felelős WNT4 expresszióját az EPDC-kben, így a mesenchyma-állapot fenntartásáért felelős (*Chau és Hastie, 2012*). Az is kiderült, hogy a WNT4-en kívül az E-kadherin transzkripcióját is gátolja a WT1, mind közvetlenül, mind közvetve, a Snail transzkripciós faktor aktivációján keresztül (*Martínez-Estrada és mtsai, 2010*).

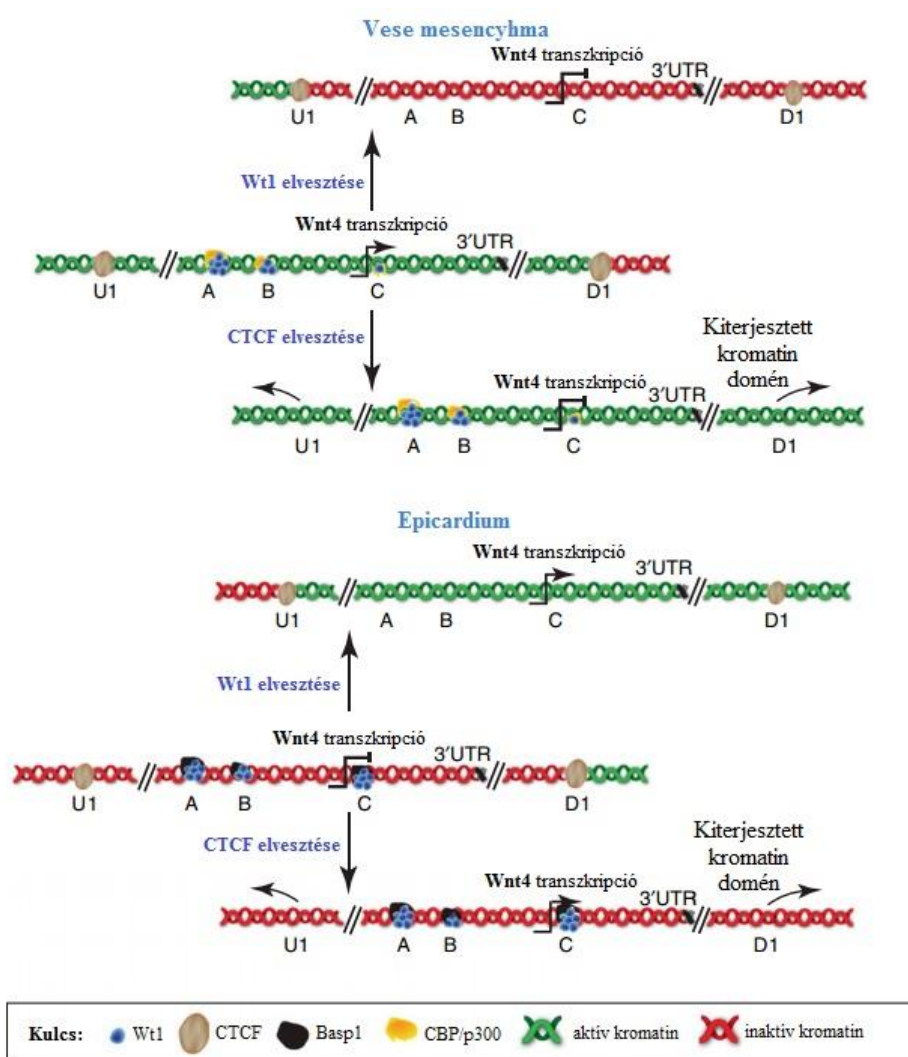
Az EPDC-k szabályozása mellett a WT1 általánosabb szerepét is feltételezik a szív vaszkularizációjában. Az irodalomból ismert, hogy egér coronariában mind az endothel, mind pedig az érfali simaizom expresszálja a WT1-et egy myocardiális infarktust követően, az infarktuszóna határán, és ez fontos lehet a neovaszkularizáció szempontjából (*Wagner és mtsai, 2002*). Noha kérdéses, hogy mindennek van-e jelentősége a fejlődő szívben is, vagy csak a másodlagos érképződésben, az mára bizonyítottnak tekinthető, hogy a WT1 az angiogenesis egyik fontos regulátora (lásd 2.4.). Érdekes módon azonban a gén angiogenesisben betöltött szerepét mostanáig nem sikerült általánosan kimutatni minden szövetben, csak a szívben és bizonyos daganatokban. Ez akár azt is jelentheti, hogy a génnek ez a funkciója is szövetspecifikus (*Miller-Hodges és Hohenstein, 2012*).

2.3.4. A WT1 kétirányú hatása a sejtek differenciálódására

Amint láttuk, a WT1 „bekapcsolja” a WNT4 promoterét a fejlődő vesében, így a mesenchyma-epithelium tranzícióért felelős, az epicardiumban ugyanakkor épp ellenkező módon működik: „kikapcsolja” a WNT4-et, és az epithelium-mesenchyma átmenet

kulcsszereplője. De vajon hogyan képes a WT1 ugyanazon promotert mindkét irányban regulálni a különböző szervekben?

E kérdésre Essafi és mtsai (2011) adták meg a választ. A WT1 egy koaktivátorral, a CBP-pel vagy a p300-zal alkot komplexet a vese mesenchymájában, az epicardiumban viszont egy korepresszorhoz, a BASP1-hez kötődik. Úgy tűnik, a WT1 hatása nem izoláltan érvényesül a WNT4 promoteren, hanem inkább a kromatin aktív és passzív konfigurációja közötti váltásokban („kromatin *flip-flop*”) nyilvánul meg. Erre utal, hogy ha nincs jelen a kromatinrégiót határoló CTCF, akkor a WT1 által kiváltott gátlás vagy aktiváció kiterjed a WNT4 melletti génekre is (4. ábra).



4. ábra. A WT1 ún. kromatin flip-flop révén különbözőképpen szabályozza a WNT4 expresszióját a vesében és az epicardiumban (Chau és Hastie, 2012).

2.4. A WT1 funkciói a felnőtt szervezetben

Felnőttben máig viszonylag kevés sejttípusról bizonyították, hogy expresszálja a WT1-et: a vese podocytaíró, a csontvelő CD34+ sejtjeiről, a Sertoli- vagy granulosa-sejtekről a gonádokban, valamint a mesotheliumról. Ám tamoxifennel indukálható WT1-*knockout* után többszervi elégtelenség jelentkezik felnőtt egerekben (*Chau és mtsai, 2011*). A fenotípusos elváltozások egy része várható a WT1 korábban leírt expressziós mintázatának ismeretében (súlyos glomerulosclerosis a podocytafunkció romlása következtében, a hemopoiesis zavara a csontvelői őssejtek defektusa miatt), ám a többi meglepetést okozott a szerzők számára is: a lép és az exokrin pancreas atrófiája, a csont- és zsírvolumen nagy mértékű csökkenése.

Ma a legtöbb szerző úgy véli, számos mesodermális eredetű szövetféleségben lehetnek WT1-pozitív mesenchyma-sejtek, ám a sejtek érése során az expresszió megszűnik (*Sugiyama, 2010; Chau és Hastie, 2012*). A WT1-nek tehát a vesefunkció és a vérképzés szabályozása mellett szerepe lehet a mesenchyma-sejtek túlélésében, a mesenchyma-epithelium egyensúly felnőttkori szabályozásában, valamint a szövetregenerációban is. Ez utóbbi folyamatban a WT1 mesenchymális funkciója mellett fontos lehet, hogy a fehérje a VEGF promoterét (*Hanson és mtsai, 2007*), valamint *splicing*-ját (*Amin és mtsai, 2011*) egyaránt szabályozva részt vesz az angiogenesis kontrolljában.

2.5. A WT1 jelentősége daganatos betegségekben

2.5.1. Egy gén két arca: onkogén és tumorszupresszor

A WT1 felfedezését követő években a gént leginkább a Wilms-tumor fontos tumorszupresszoraként tartotta nyilván az orvosi szakirodalom, később azonban onkogénszerepe került előtérbe a legkülönbözőbb daganatokkal kapcsolatban (*Hohenstein és Hastie, 2006*). Noha a WT1 korántsem az egyetlen ilyen Janus-arcú gén az onkogenetikában (*Johnson, 2000; Lobry és mtsai, 2011*), ami azt is mutatja, hogy az „onkogén” és „tumorszupresszor” címkeket talán csak a folyamatok valódi megértésének hiányában ragasztjuk rá egyes génekre (*Huff, 2011*), mégis érdekes lehet megpróbálkozni azzal, hogy jelenlegi tudásunk birtokában valamiféle magyarázatot adjunk e látszólagos ellentmondásra.

Az urogenitális rendszerben a WT1 klasszikus tumorszupresszorként viselkedik: ha mindkét kópia kiesik vagy működésképtelenné válik, Wilms-tumor alakul ki (lásd 2.5.2).

Más daganatokban azonban, ahol a WT1 onkogénszerepe gyanítható, jellemzően ektópiás génexpresszióról van szó, mutáció nélkül. Kivételt képeznek a leukemiák, hiszen egyrészt az egészséges hemopoiesisben részt vevő CD34+ őssejtek egy része normálisan is expresszálja a WT1-et, ahogy korábban láttuk, másrészt ezen malignitások hátterében nem csak a vad típusú WT1 expresszióját kövölték, de heterozigóta mutációk is előfordulnak a génben (lásd 2.5.7.). Egyes szerzők szerint e megfigyelés már önmagában megkérdőjelezi azt az általánosan elfogadott nézetet, hogy a WT1 leukemiákban kizárólag onkogénként viselkedhet (*Huff, 2011*).

Ahogy a 4. ábrán láttuk, a WT1 képes a sejtek differenciálódásáért felelős WNT4 transzkripciójának kétirányú szabályozására a különböző szövetekben. Ez lehet az egyik lehetséges magyarázat arra, hogyan funkcionálhat egyazon gén tumorszupresszorként a vesében, de onkogénként a szervezet egyéb területeiről származó daganatokban (*Miller-Hodges és Hohenstein, 2012*). Az is elképzelhető, hogy a WT1 a STIM1 szabályozása révén képes modulálni az intracelluláris Ca-szignalizációt, amelynek szerepe a tumorigenesisben még nem tisztázott, és különböző daganatfélésekben akár ellentétes előjellel is megnyilvánulhat (*Ritchie és mtsai, 2010*).

2.5.2 A Wilms-tumor

A Wilms-tumor (nephroblastoma) a leggyakoribb gyermekkori malignus húgyúti tumor: előfordulása 1:10000. Az incidencia csúcsa a 2. és 4. életév közé esik. Noha később is előfordul, a felnőttkori esetek ritkák: a daganatok 95 százalékát 10 éves kor előtt diagnosztizálják (*Huff, 2011*).

Klinikailag általában nagyméretű, a légzést követő, ballotálható deréktáji terime formájában jelentkezik. Legtöbbször a szülők is felismerik, mert elődomborítja a gyermek hasát. A sporadikus esetek többsége unilaterális. Szövettanilag klasszikusan három sejtípus alkotja a daganatot: epithelium, blastema, stroma („trifázisos” Wilms-tumor). E mellett gyakran találunk ektópiás szöveteket: csontot, porcot, izom- vagy zsírszövetet. Ez arra utal, hogy a Wilms-tumor fejlődési rendellenességként is felfogható (*Miller-Hodges és Hohenstein, 2012*).

Kezelése sebészi nephrectomia, melyet pre- és posztoperatív radioterápiával, valamint posztoperatív kemoterápiával egészítenek ki. Az ötéves túlélés 75 százalék feletti.

Noha az orvosi köztudatban a WT1 úgy él, mint a Wilms-tumorért felelős lokusz, valójában a WT1 csak az összes daganat 20 százalékáért felelős (Huff, 2011), és a sporadikus Wilms-tumorról diagnosztizált betegek mindössze 2 százaléka hordoz *germline* WT1 mutációt (Little és mtsai, 2004). A mutáns WT1 fehérje gyakran magas expressziót mutat a Wilms-tumorkban – ennek oka egyes szerzők szerint az 1. intronban lévő ARR hipometilációja lehet (lásd 2.1.).

Amennyiben a WT1 defektusa áll a Wilms-tumor hátterében, jellemzően olyan daganat keletkezik, amely intralobáris nephrogén maradványsejtekből indul ki, szövettana stromális túlsúlyt mutat (Al-Hussain és mtsai, 2014). Egyaránt megfigyelték a WT1 teljes és részleges delécióját, inszerciákat, missense és nonsense mutációkat. A pathogenesis fontos elemének tűnik azonban, hogy típusos esetben a gén mindkét kópiája inaktiválódik, vagyis homozigótaságról vagy összetett heterozigótaságról van szó a daganatsejtekben. Ez két módon történhet: vagy egyazon sejtben következik be két különböző szomatikus mutáció, vagy az egyik mutáns kópiát a szülőtől örökli a beteg. Ilyen esetekben nagy a LOH valószínűsége: így magyarázható a Wilms-tumor familiáris típusa, melyben autoszomális domináns öröklésről van szó, valamint a bilaterális tumorok magas előfordulását írták le (Huff, 2011). E mechanizmus jellemző példája a WAGR szindróma (lásd 2.5.3.).

Nem világos azonban, hogy a WT1 defektusa milyen molekuláris útvonalon okoz Wilms-tumort. A folyamatban kritikus lépésnek tűnik a β -katenin onkogén aktivációja (Maiti és mtsai, 2000), mely időben a WT1 kiesését követi (Fukuzawa és mtsai, 2007). A Wilms-tumoron belül jellemzően a mesenchymális elemek hordoznak WT1-mutációt, ami a mesenchyma-epithelium tranzíció hibájára utal a vese fejlődése során (lásd 2.3.2.).

2.5.3. WAGR szindróma

A WAGR szindróma Wilms tumor, aniridia, urogenitális rendellenesség vagy gonadoblastoma, valamint mentális retardáció együttesét jelenti. A szindróma nemritkán inkomplett formában jelentkezik: a diagnózis felállításának feltétele az aniridia, valamint legalább egy másik tünet megléte. Wilms-tumor az esetek 30 százalékában fordul elő (Rivera és Haber, 2005). A klasszikus tünetek mellett igen gyakran jelentkezik obezitás (Tiberio és mtsai, 2000), veseelégtelenséghez vezető podocyta-betegség (Breslow és mtsai, 2003), valamint a fejlődésben való visszamaradás és autizmus is (Yamamoto és mtsai, 2014).

A szindróma hátterében régóta ismert a 11p13 kromoszomális régió heterozigóta deléciója (*Riccardi és mtsai, 1978*), amely érinti a WT1 és PAX6 géneket. Az urogenitális rendellenességekért és daganatokért a WT1-et tartják felelősnek (ha Wilms-tumor is kialakul, akkor a daganatos szövetben a WT1 másik kópiája is hiányzik, vagy szomatikus mutációt mutat, ahogy korábban láttuk), míg az aniridiát a PAX6 deléciója okozza (*Hanson és mtsai, 1993*). Hyperphagia és obezitás akkor alakul ki, ha a heterozigóta deléció kiterjed a 11p14.1 régióra is, ahol a BDNF génje található, így e faktor haploinsufficienciáját okozza (*Han és mtsai, 2008*).

2.5.4. Denys-Drash szindróma

A Denys-Drash szindróma (DDS) igen ritka kórkép: 1994-ig mindössze 150 esetet publikáltak azóta, hogy Denys és mtsai (1967), valamint Drash és mtsai (1970) egymástól függetlenül leírták a tünetegyüttest (*Müller, 1994*). Központi tünete a korai veseelégtelenségbe torkolló diffúz mesangialis sclerosis (DMS), melyhez Wilms-tumor vagy pszeudohermafroditizmus társul. („Komplett” DDS esetén mindhárom tünet jelen van.) A WAGR szindrómánál jelentősebb, mintegy 90 százalék a Wilms-tumor kockázata DDS-ben (*Rivera és Haber, 2005*), és akárcsak az előbbi kórkép esetében, itt is lényegesen magasabb a bilaterális daganat előfordulása, mint sporadikus Wilms-tumoroknál: mintegy 20 százalékra becsülhető (*Müller, 1994*).

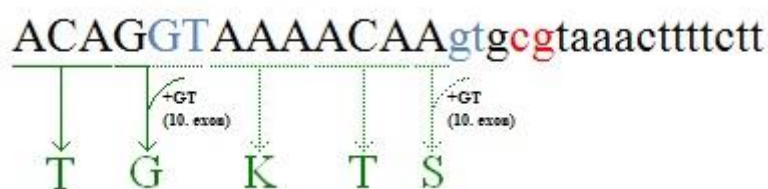
A szindrómát különböző pontmutációk okozhatják a WT1 génben: legtöbbször a 2., ill. 3. Zn-ujj domént kódoló 8. vagy 9. exon érintett. A mutációk heterozigóta formában is kiváltják a fenotípust – e domináns negatív hatás annak köszönhető, hogy a WT1 protein dimerként tölti be feladatát, ha pedig a dimer egyik tagja mutáns Zn-ujjjal rendelkezik, az gyengíti a fehérje interakcióját a targetjeivel (*Little és mtsai, 1993; Moffett és mtsai, 1995*).

A DDS-ben kialakuló DMS háttere a mai napig foglalkoztatja a nephrológusokat. Sokáig a mesangiumban észlelt szövettani változások szerepét hangsúlyozták, ám mára úgy tűnik, a podocyta-léziók a pathogenesis elsődleges tényezői. Leírták a lábnyúlványok eltűnését, valamint a podocyták hypertrophiáját, amely a WT1 alacsony, valamint egyidejűleg a PDGF α és a TGF β magas expressziójával függött össze – e növekedési faktorok pedig az epithelium-mesenchyma tranzíció jól ismert iniciátorai (*Burns és Thomas, 2010*). Az idáig összegyűlt kísérletes bizonyítékok arra utalnak, hogy a kórképben zavart szenved a podocyták érése, epitheliális differenciálódása (*Miller-Hodges és Hohenstein, 2012*).

2.5.5. Frasier szindróma

A Frasier szindróma (FS) jellemzői a férfi pszeudohermafroditizmus (XY kariotípus mellett női jellegű külső genitáliák), csíkgonád, vagy diszgenetikus herék, melyekből (többnyire benignus) gonadoblastoma indulhat ki. A DDS-hez hasonlóan e kórképnek is jellemzője a progresszív glomerulonephropathia, ám FS esetében a később jelentkező, lassabban progrediáló FSGS a tipikus tünet.

A betegséget az alternatív *splicing* zavara okozza. A WT1 génben a 9. exon vége előtt, valamint a 9. exon és a 9. intron határán egyaránt találunk egy-egy *splice* donor pontként használható GT szekvenciát (5. ábra). A sejtek (típustól függetlenül) gyakrabban használják a második *splice* donor pontot, ennek köszönhető a KTS-pozitív és KTS-negatív izoformák normálisan meglévő 2:1 aránya (lásd 2.2.). A második GT szakasz után következő intronbeli nukleotidok heterozigóta mutációja lehetetlenné teszi a második *splice* donor pont használatát a mutáns WT1 kópiáról átíródott hnRNS-ekben, így eltolja a WT1-izoproteinek arányát a KTS-negatív forma javára: qRT-PCR-rel végzett vizsgálatok alapján Frasier szindrómás betegekben az összes WT1 fehérje mintegy kétharmada KTS-negatív, vagyis a normális arány a visszájára fordul (Barboux és mtsai, 1997; Klamt és mtsai, 1998).



5. ábra. Részlet a WT1 gén szekvenciájából: a 9. exon és a 9. intron határa (az exon nagy, az intron kis nyomtatott betűkkel jelölve). Kékkel jelöltem a *splice* donor pontokat (GT és gt), pirossal a mutációs forrópontot (ezen a szakaszon $c \rightarrow t$ és $g \rightarrow a$ tranzíció is előfordul Frasier szindrómában), zölddel pedig a kódolt aminosavakat. Sima vonallal a KTS-negatív, szaggatottal a KTS-pozitív fehérje képződését ábrázoltam.

Egérmodellek segítségével is megerősítették azt a feltevést, hogy az FS hátterében a 9. intron *splice* donor szakaszának mutációi állnak. A heterozigóta egerekben a humán Frasier szindrómával analóg kórkép fejlődött ki, FSGS-sel. A homozigóták, amelyekben a KTS-pozitív fehérje teljesen hiányzott, nem pszeudohermafroditákká, hanem XY nőtényekké

fejlődtek az SRY rendkívül alacsony expressziójának köszönhetően, ám születés után nem sokkal elpusztultak a súlyos vesedefektusok miatt (*Hammes és mtsai, 2001*).

2.5.6. A „Denys-Drash/Frasier spektrum”

Amint láttuk, típusos esetben a WT1 strukturális mutációi DDS-hez, míg a *splice* izoformák arányának eltolódását okozó mutációk FS-hez vezetnek. Érdekes ugyanakkor, hogy egyes (Wilms tumori nélküli) Denys-Drash szindrómás esetek háttérében is leírták a 9. intron e jellegzetes mutációit (*Little és Wells, 1997*), míg esetenként a WT1 exonbeli mutációi is vezethetnek Frasier szindrómához (*Kohsaka és mtsai, 1999*). Egyes szerzők fenotípusos átfedésekről beszélnek e két szindrómában (*Miller-Hodges és Hohenstein, 2012*), míg mások szerint a DDS és az FS nem is tekinthetők külön entitásnak, hanem egyazon genetikai-klinikai spektrum részei (*Koziell és Grundy, 1999; McTaggart és mtsai, 2001*).

Bár Wilms-tumorra vagy gonadoblastomával való társulása nem ismert, ugyanebbe a spektrumba tartozhat a rendkívül ritka Meacham szindróma is (férfi pszeudohermafroditizmus, szívfejlődési rendellenesség és rekeszsérv együttese). E kórképben a WT1 Zn-ujj doménjeit érintő heterozigóta pontmutációkat írtak le, melyeket korábban DDS-sel és izolált Wilms-tumorra hoztak összefüggésbe (*Suri és mtsai, 2007*).

2.5.7. Rosszindulatú hematológiai betegségek

A vérképző rendszer rosszindulatú daganatai közül gyermekkorban az ALL a leggyakoribb: Magyarországon évente 60-65 új beteget regisztrálnak, amely az összes gyermekkori leukémiás eset 80-85 százalékát teszi ki. A felnőttkor legjellemzőbb leukémiája a CLL, incidenciája 70 éves kor körül a legmagasabb. Bár a gyermekkori hematológiai malignitások többségében folyamatosan javulnak a túlélési statisztikák, a legfrissebb adatok szerint ebben a csoportban a Hodgkin lymphoma után éppen a gyermekkori ALL prognózisa a legkedvezőbb, 4 éves túlélése 83 százalékos (*Kovács és mtsai, 2014*).

Noha bizonyos hemopoietikus progenitor sejtek az egészséges vérképző szövetben is expresszálják a WT1-et (lásd 2.4.), a gén magas expressziója a daganatos elváltozásokra jellemző (*Sugiyama, 2010*).

A hematológiai megbetegedések közül elsősorban akut leukemiákban, valamint MDS-ben vizsgálták a WT1-expresszió kórélettani és prognosztikai jelentőségét. Mindössze 2 évvel a gén első leírása után Miwa és mtsai (1992) már közölték, hogy mind AML-ben, mind ALL-ben kimutatható a WT1 expressziója a betegek többségében, ugyanakkor krónikus leukemiákban csak blasztos krízis alatt fejeződik ki a gén. Később a WT1-et expresszáló AML-es esetek kapcsán rosszabb prognózisról számolt be a szakirodalom (*Bergmann és mtsai, 1997*).

Jelenleg a WT1-expressziót a remisszió elérése utáni minimális reziduális betegség markereként használják a klinikumban, főként AML-es betegeknél (*Nowakowska-Kopera és mtsai, 2009; Candoni és mtsai, 2011; Lambert és mtsai, 2014*). ALL-ben valamivel ritkábban észlelhető a WT1 expressziója, és több bizonytalanság övezi a gén prognosztikai markerként való használhatóságát is: néhány nagy esetszámú tanulmány szerint a WT1-et expresszáló és nem expresszáló csoportok között nincs statisztikailag szignifikáns különbség a túlélésben (*Boublikova és mtsai, 2006; Busse és mtsai, 2009; Sadek és mtsai, 2011*). A WT1 fehérje ugyanakkor a tumorelles terápia ígéretes targetje az akut leukemiák minden típusában (lásd 2.5.9.), hiszen egyértelműnek látszik a szerepe a hematológiai daganatok pathogenesisében.

Nem ismert azonban, hogy pontosan miben áll ez a szerep. Egy modell szerint a WT1-et expresszáló daganatok azon csontvelői hemopoietikus őssejtekből indulnak ki, amelyek fiziológiásan is expresszálják a WT1-et. Az egészséges csontvelőben ezek a sejtek az érési folyamat részeként leszabályozzák a WT1 gén expresszióját, ám ha valamilyen okból e leszabályozás nem következik be, akkor a WT1 fehérje éretlen állapotban tartja, valamint további proliferációra készíti e sejteket, így beindítva a leukemogenezist (*Sugiyama, 2010*).

Sajnos igen kevés a kísérletes adat, amellyel egy ehhez hasonló modellt igazolni vagy cáfolni lehetne. A WT1 onkogén szerepét támasztja alá (legalábbis AML-ben), hogy gátolni képes a myeloid leukemogenesis egyik fontos tumorsuppresszora, az IRF8 expresszióját (*Vidovic és mtsai, 2010*).

Tovább bonyolítja a képet, hogy a vad típusú WT1 magas expressziója mellett ritkábban WT1 mutáció is előfordul. Egy 470 AML-es beteget tömörítő vizsgálat az összes eset 6,8 százalékában, míg a normál kariotípusú fiatal betegek között 8,3 százalékban mutatott ki WT1-mutációt. A WT1-mutáns betegek alcsoportját szignifikánsan rövidebb túlélés jellemezte, mint a mutációtól mentes alcsoportot (*Hou és mtsai, 2010*).

Az ALL és a WT1-mutációk összefüggéseiről ugyancsak jelentek meg közlemények. Tosello és mtsai (2009) gyermekkori és felnőtt T-ALL-ben az esetek 11-13 százalékában

heterozigóta *frameshift* mutációkat mutattak ki, melyek megcsonkítják a WT1 fehérje Zn-ujj doménjeit kialakító C-terminális régióját. E mutációk ugyanakkor a betegség prognózisát nem befolyásolták. Egy másik vizsgálat 238 T-ALL-ből 20 eset háttérében fedett fel a WT1 7. exonját érintő mutációkat, melyek rontották a betegségmentes túlélést a standard kockázatú, thymus-eredetű T-ALL-ek alcsoportjában (Heesch és mtsai, 2010). Az, hogy B-ALL-ben mindezidáig nem írtak le mutációkat, akár arra is utalhat, hogy a WT1 strukturális defektusa hozzájárul a myeloid és T-sejt prekursorok daganatos transzformációjához, ám a B-sejt előalakokéhoz nem (Tosello és mtsai, 2009).

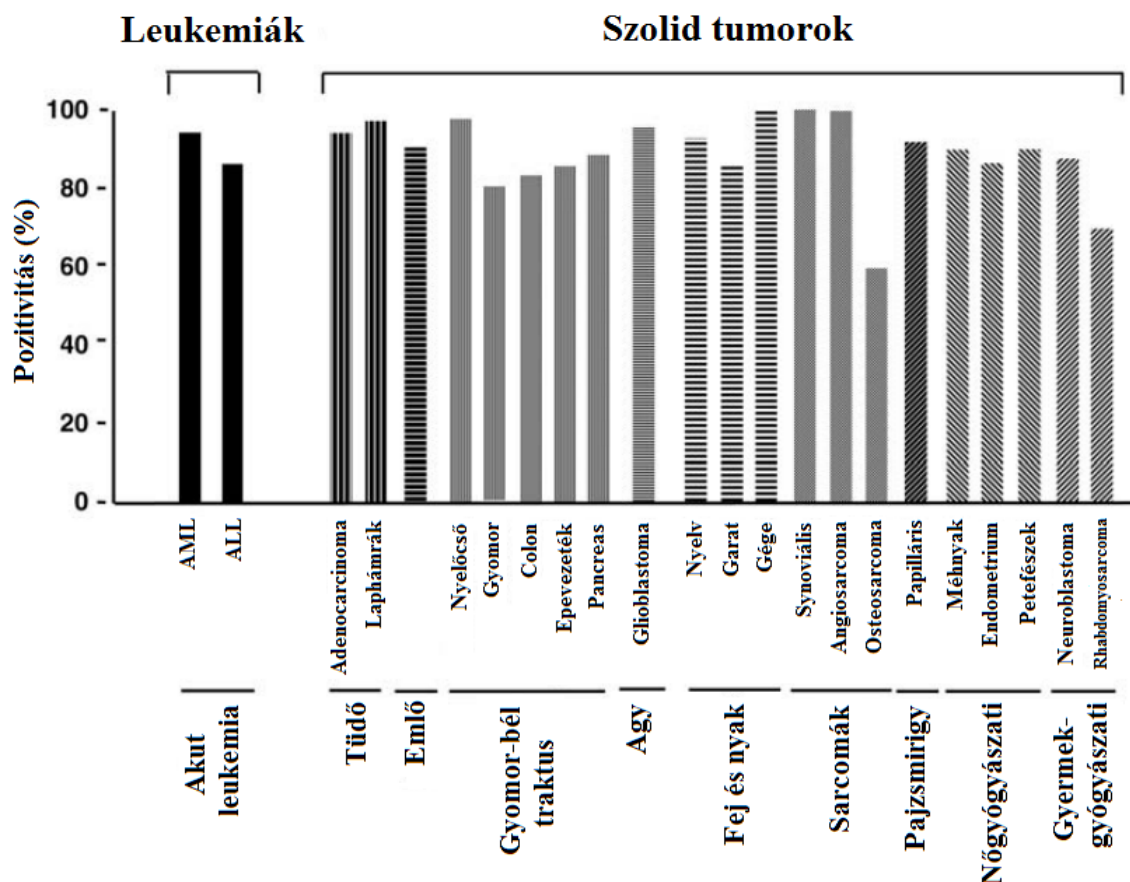
El kell különíteni a leukemiáktól a myelodysplasiás szindrómát (MDS), melyet pre-leukemia néven is ismernek. Az MDS tipikusan a felnőttkor, időskor betegsége, és a csontvelő myeloid állományának morfológiai dysplasiája jellemzi, mely ineffektív hemopoiesissel jár együtt, és az alacsony vvt-szám miatt anémiát, a neutropenia miatt infekciókra való fokozott hajlamot, a thrombocytopenia miatt pedig vérzékenységet okozhat. Az esetek egy részében AML fejlődhet ki belőle. A kórképben az akut leukemiákhoz hasonlóan magas WT1-expresszióról számol be a szakirodalom (Gurbuxani, 2007). A WT1 fehérje megjelenését a szindróma korai jelének tartják, és érdekes módon nincs szembeötlő különbség a betegség egyes altípusaiban mért WT1-expresszió mértéke között (Li és mtsai, 2007).

A lymphomák esetében igen kevés közlemény áll rendelkezésre a WT1 gén kifejeződéséről és szerepéről. Drakos és mtsai (2005) immunhisztokémiai módszerrel, valamint Western blottal mutatták ki a WT1 proteint különböző non-Hodgkin lymphomákból. Nagyarányú WT1-pozitivitást találtak Burkitt-lymphomában és ALK-pozitív ALCL-ben, ill. kimutatták a WT1 fehérjét az ALK-negatív ALCL-es, lymphoblastos lymphomás, valamint DLBCL-es esetek egy részében, ám a többi vizsgált NHL WT1-negatívnak mutatkozott. Vadasz és mtsai (2013) a Hodgkin-lymphomával foglalkoztak, és felvetik a WT1 lehetséges proangiogenikus szerepét a betegségben. Noha mindkét közlemény felhívja rá a figyelmet, hogy érdemes lenne behatóbban foglalkozni a WT1 és a lymphomák kapcsolatával, e terület máig háttérbe szorul a leukemia-kutatás mögött.

2.5.8. Egyéb, szolid tumorok

A korábban említett daganatos betegségek mellett a WT1 expresszióját számos szolid tumorban leírta már a szakirodalom (6. ábra). Közös bennük, hogy a gén mutációja nem

velejárója e kórképeknek: „mindössze” arról van szó, hogy a WT1 olyan sejtípusokban, szövetekben expresszálódik, ahol normális esetben nem kerül transzkripcióra (Miller-Hodges és Hohenstein, 2012).



6. ábra. A WT1-pozitivitás gyakorisága különböző daganatokban, immunfestéssel és/vagy qRT-PCR-rel meghatározva (Sugiyama, 2010).

A 6. ábrán bemutatott daganatok többségében a WT1-expresszió prognosztikai jelentősége is van (Sugiyama, 2010). Emlőrákban 10 éve ismert, hogy a WT1-et expresszáló esetek rosszabb túléléssel járnak (Miyoshi és mtsai, 2002). Egy újabb közlemény szerint főként a menopauza előtt diagnosztizált esetekben fontos a WT1-expresszió mérése (Camci és mtsai, 2011). Nem-kissejtes tüdőrákban a WT1-expresszió közvetlen vizsgálata mellett a WT1 ellen termelődő IgG antitest vérből való kimutatása is fontos lehet a daganat korai felismerésében, valamint prognózisának megítélésében (Oji és mtsai, 2009).

Bár a WT1 prognosztikai szerepét sikerült viszonylag megbízhatóan meghatározni a fenti daganatokban, az ma sem tekinthető tisztázottnak, hogy az ektópiás WT1-expresszió okozza-e a tumorigenésist, vagy a daganatok klonális evolúciójának egyik lépéseként jelenik

meg a WT1 protein a már korábban malignizálódott sejtekben. Az egyik felfogás szerint a gén kifejeződése a tumorok vaszkularizációjában játszhat döntő szerepet (Wagner és mtsai, 2008). Ahogy a 2.4. alfejezetben láttuk, számos kísérletes bizonyíték támasztja alá, hogy a WT1 a VEGF szabályozása révén (legalábbis bizonyos szövetekben) az angiogenesis fontos regulátora. Több daganat esetében, pl. endometrium-carcinomában is igazoltnak tűnik, hogy mindez a tumoros angiogenesisre is vonatkozik (Dohi és mtsai, 2010).

2.5.9. A WT1, mint a daganatellenes immunterápia vonzó célpontja

Cheever és mtsai (2009) egy nagyszabású tanulmányban 75 különböző antigént vetettek össze abból a célból, hogy meghatározzák a tumorellenes terápia legjobb targetjeit. Az antigéneket az alábbi szempontok szerint osztályozták: terápiás funkció, immunogenitás, onkogenitás, specificitás, expressziós szint, őssejtekben mért expresszió, az antigénre pozitív daganatos esetek száma, az epitópok száma, valamint az antigén szubcelluláris lokalizációja. Noha egyetlen vizsgált antigén sem felelt meg maradéktalanul az összes kritériumnak, ami alapján ideális célpontnak lehetne nevezni, a WT1 az első helyen végzett a 75 közül.

Már a WT1-gyel végzett korai egérkísérletek is azt mutatták, hogy a gén terméke ígéretes célpont lehet a humán gyógyászatban is: a WT1 peptiddel immunizált egerek nem betegedtek meg WT1-pozitív leukemiás sejtek injektálását követően, ugyanakkor saját WT1-pozitív sejtjeik nem károsodtak (Oka és mtsai, 2000).

Az első klinikai kísérletek tüdő- és emlőrákban is mérhető klinikai választ (a tumortömeg regressziója, a daganatos markerek koncentrációjának csökkenése) értek el WT1 peptiddel; a kezelés helyi erythemán kívül semmilyen mellékhatással nem járt. Remisszióba került, normál vérképzéssel rendelkező *de novo* AML-es betegekben sem tapasztaltak mellékhatásokat, a terápia hatékonyan csökkentette a WT1-expresszió szintjét. MDS-ben ugyanakkor a nagy dózisú WT1 peptid súlyos leukocytopeniát okozott: ennek hátterében a WT1-et expresszáló, daganatosan elfajult hemopoietikus sejtek károsodása állhat. Mindez azt sugallja, hogy a WT1 peptiddel való immunizáció biztonságos olyan betegekben, akik adekvát hemopoiezissel rendelkeznek, ám ennek hiányában kockázatos, és csak alacsonyabb dózisú peptiddel végezhető (Oka és mtsai, 2003).

Az utóbbi években a fent említett daganatokon kívül glioblastomában, veserákban, myeloma multiplexben, valamint gyermekkori rhabdomyosarcomában is sikerrel tesztelték

a WT1 peptidet (*Sugiyama, 2010*). A legfrissebb tanulmányok eredményei alapján várható, hogy a WT1 elleni immunterápiát még szélesebb körben alkalmazzák majd a közeljövőben, ha sikerül tovább javítani az elérhető vakcinák klinikai hatékonyságán (*Lindstedt és mtsai, 2014*).

3. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk során klinikai kooperációban vizsgáltunk olyan eseteket, ahol egy-egy daganatos betegség háttérében gyanítható volt a WT1 gén szerepe. Konkrét projektjeinket és az azok kapcsán kitűzött célokat az alábbiakban ismertetem.

1. Részben a Denys-Drash szindrómára emlékeztető, ám atípusos klinikai tünetegyüttes háttérében álló WT1-rendellenesség kimutatása.

2. Igazolni a gyanút, hogy a WT1 eltéréseivel kapcsolatos klinikai szindrómákban az orvosi irodalom túlságosan sematikus képet vázol fel. Másképp fogalmazva, a WT1 molekuláris defektusainak palettája olyan sokszínű, hogy az esetek jelentős részében a klinikai kép nem felel meg egyetlen klasszikus diagnózisnak sem.

3. A WT1-expresszió vizsgálata hematológiai betegségekben, qRT-PCR segítségével. Kiemelt célunk volt annak leírása, hogy az expresszió milyen gyakran mutatható ki az ilyen szempontból mindezidáig alig vizsgált non-Hodgkin lymphomákban.

4. Adatok szolgáltatása arra vonatkozóan, hogy a WT1-pozitivitás hogyan befolyásolja a prognózist különböző non-Hodgkin lymphomák esetében.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A vizsgált betegek

A kutatásban közreműködő klinikáktól olyan betegek vérmintáit kaptuk meg, akikben a WT1 gén valamely strukturális vagy expressziós rendellenességére utalt a klinikai kép.

Az egyik vizsgált beteg (Cs. Cs.) vérmintája a DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinikájáról érkezett, ahol 3,5 g/d proteinuria, valamint csökkent GFR (38 ml/min/1,73 m²) miatt került nephrológiai kivizsgálásra, és vesebiopsziája FSGS-t igazolt. Cs. Cs. 30 éves férfi. Családi anamnézisében az egyik unokatestvér polydactyliája, ill. apai nagyanyjának diabeteze mellett szerepeltek olyan adatok, amelyek az urogenitális rendszer örökletes megbetegedését valószínűsítették: anyjánál zsugorvese miatt nephrectomiát végeztek, bátyjánál embryonalis carcinomát diagnosztizáltak 23 éves korában, míg húgánál 6 éves kora óta 0,5 g/d proteinuria áll fenn, mely nem progrediált a diagnózis óta eltelt 20 év alatt.

A beteg interszex külső genitáliákkal született. Kariótípusa 46, XY, ám az exploratív laparotomia női típusú belső genitáliákat igazolt. Ezek alapján a férfi pszeudohermafroditizmus diagnózisát állították fel, és mivel a választott nem férfi volt, ennek megfelelő pénisz- és húgycsőplasztikát végeztek.

Cs. Cs. több, különböző eredetű daganatos betegségben szenvedett élete során. 3 évesen pancytopenia, ill. hemoblastosis gyanúja miatt került felvételre a Heim Pál kórházban. Akut lymphoblastos leukémiát diagnosztizáltak, és Prednisolon-Vincristin indukciós kezelést alkalmaztak.

A kezelés megkezdése után 11 hónappal hasi rezisztenciát észleltek a betegnél, amely bal oldali vesetumornak bizonyult. A szövettan típusos trifázisos Wilms-tumort mutatott ki. Két éven át havonta alternáló kemoterápiát folytattak a két különböző malignitás ellen, melynek hatására mindkét betegség komplett remisszióba került (*Zimonyi és mtsai, 1985*).

Cs. Cs.-t 20 éves korában 3 hónapja fennálló tarkótáji fejfájás, szédülés, hypertonia miatt vizsgálták. Koponya CT-vizsgálattal túlnyomásos hydrocephalus internust, ill. a kisagy bal lebenyében egy 52x45 mm-es cisztikus képletet észleltek. Miután a tumort suboccipitalis feltárásból eltávolították, az szövettanilag angioblastoma cerebellinek (Lindau-tumor) bizonyult.

A genetikai vizsgálatokat megelőzően diagnosztizált FSGS háttérében minden típusos okot (reflux, gyógyszerek, obesitas) kizártak. A klinika azért kérte a vizsgálatot, mert az

urogenitális rendellenességekből és többfajta daganatból álló klinikai kép felveti a WT1 gén esetleges defektusát, mint kórokat.

A kutatás során vérmintákat vetettünk a betegből és közvetlen családtagjaiból, továbbá felhasználtuk Cs. Cs. Wilms-tumort, ill. FSGS-t mutató FFPE mintáit. Először atípusos Denys-Drash vagy Frasier szindróma irányában végeztünk vizsgálatokat (meghatároztuk a WT1 exonok, valamint az irodalomban relevánsnak tartott intronszakasz szekvenciáját), majd WT1 kópiaszám-analízist és immunfestést végeztünk.

A vizsgált betegek másik csoportja malignus hematológiai megbetegedésekben, főként non-Hodgkin lymphomákban szenvedett. 2007 márciusa és 2012 májusa között 53 betegről kaptunk vérmintákat: 25-nél DLBCL-t, 8-nál MCL-t, 9-nél PTCL-t, 2-nél Burkitt lymphomát, 2-nél MALT lymphomát, 7-nél pedig felnőttkori B-sejtes ALL-t diagnosztizáltak. (Az ALL-es esetek morfológiai jegyek, valamint *flow*-citométerrel meghatározott immunfenotípus alapján kerültek megerősítésre, míg NHL-ben sebészeti nyirokcsomómintából, vagy biopsziából történt a patológiai diagnózis, és az Ann Arbor rendszer alapján adták meg a klinikai stádiumot.)

A legtöbb esetben több vérmintát kaptunk egyazon betegről: egyet a diagnózis után, de még a kezelés megkezdése előtt, valamint néhányat a kezelés alatt és után. A vizsgálatokat a kutatási periódus végéig, az utolsó követési időpontig, vagy a beteg haláláig folytattuk.

Célunk az volt, hogy meghatározzuk, milyen gyakori a WT1-pozitivitás a fenti betegségekben, valamint adatokat szolgáltatassunk arra vonatkozóan, hogy a WT1 gén expressziós szintje befolyásolja-e a prognózist.

4.2. Laboratóriumi módszerek

4.2.1. DNS izolálás, PCR reakció a WT1 exonjainak vizsgálatára

A DNS izoláláshoz alvadásgátolt, -20 °C-on tárolt vérmintát használtunk. Az izolálást vérből GenElute Blood Genomic DNA Kit-tel (SIGMA) végeztük, majd a kapott DNS oldatot rövidtávon 4, hosszabb távon -20 °C-on tároltuk.

A DNS-ből hagyományos PCR reakció (40-45 ciklus) segítségével egyenként szaporítottuk fel az egyes WT1 exonokat, a környező intronszakaszokkal együtt, későbbi szekvenálás céljából. A vérből izolált DNS-sel, valamint a protokoll beállítása során megbízhatónak bizonyult primerekkel minden esetben értékelhető eredményeket kaptunk, ám a patológiai FFPE mintából (Cs. Cs. 1978-ban eltávolított Wilms-tumora) a DNS

izolálás nem volt eredményes. Noha NanoDrop segítségével azt mértük, hogy az izolált DNS koncentrációja megfelelő (65 ng/μl), még *nested* PCR segítségével sem sikerült amplifikálnunk a WT1 exonokat az izolátumból, ami feltehetően a formalin okozta degradációnak vagy a minta korának tudható be.

Az egyes exonok amplifikálásához használt (részben az irodalomból vett, részben saját tervezésű) primerekről az 1. táblázat tájékoztat.

1. táblázat. A WT1 gén exonjainak amplifikálásához használt primerek

<u>A vizsgált exon, a primer orientációja</u>	<u>A primer szekvenciája</u>	<u>A primer hossza</u>
1., forward	5'-TTC GGC TTA CGG GTC GTT G-3'	19 mer
1., reverz	5'-CGC TTC CGC TAT CCT CAC G-3'	19 mer
2., forward	5'-CGT CTT GCG AGA GCA CCG CTG-3'	21 mer
2., reverz	5'-TAA TTT GCT GTG GGT TAG GAA TTC-3'	24 mer
3., forward	5'-GGC TCA GGA TCT CGT GTC TC-3'	20 mer
3., reverz	5'-CCA AGT CCG CCG GCT CAT G-3'	19 mer
4., forward	5'-ATA ACT GTG CAG AGA TCA GTG G-3'	22 mer
4., reverz	5'-TGA ACA CAA CTC ACC AAC TAG G-3'	22 mer
5., forward	5'-CAG ATC CAT GCA TGC TCC ATT C-3'	22 mer
5., reverz	5'-CTC CTG CAT TGC CCC AGG TG-3'	20 mer
6., forward	5'-GAG CCA CAC TGA GCC TTT TTC CCT TC-3'	26 mer
6., reverz	5'-CAG GGC CAA AGA GTC CAT CAG TAA GG-3'	26 mer
7., forward	5'-AAG ACC TAC GTG AAT GTT CAC A-3'	22 mer
7., reverz	5'-TAC AAC ACC TGG ATC AGA CCT T-3'	22 mer
8., forward	5'-TCC AGC GAA GTG CCT TAG GC-3'	20 mer
8., reverz	5'-CCT AGC CCA AGG GAA CAC AG-3'	20 mer
9., forward	5'-TGC AGA CAT TGC AGG CAT GGC AGG-3'	24 mer
9., reverz	5'-CGC ACT ATT CCT TCT CTC AAC TGA G-3'	25 mer
10., forward	5'-ACT TCA CTC GGG CCT TGA TAG-3'	21 mer
10., reverz	5'-GTG GAG AGT CAG ACT TGA AAG-3'	21 mer

A PCR-es amplifikálást követően a terméket 2 százalékos agaróz gélen futtattuk, majd a várt DNS fragmentumnak megfelelő méretű sávot UV-fényben, borotvapengével kivágtuk

a gélből – ebből a DNS-t visszaizoláltuk. A visszaizoláláshoz Q-BIOgene – BIO 101 Systems GeneClean Kitet használtunk.

A visszaizolált DNS oldat már mentes volt minden aspecifikus DNS szakasztól, így ezt küldtük el szekvenálásra, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont DNS Szekvenáló Laboratóriumába. A szekvenálási eredményeket a WT1 gén adatbázisokban elérhető normál szekvenciájához hasonlítottuk.

4.2.2. Kópiaszám-vizsgálatok qRT-PCR segítségével

A WT1 gén kópiaszám-analíziséhez qRT-PCR-t (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System), valamint a kópiaszám mérésére kifejlesztett *assay*-ket használtunk (Taqman Copy Number Assay, Applied Biosystems). Az *assay*-k tartalmazznak primerpárokat a kívánt szakaszok amplifikálásához, valamint fluoreszcens Taqman próbákat a jel detektálásához. A vizsgált gén kópiaszámának megállapításához szükség van egy kontroll *assay*-re olyan génhez, amely mindenképpen két kópiával rendelkezik (a mi esetünkben RNáz P).

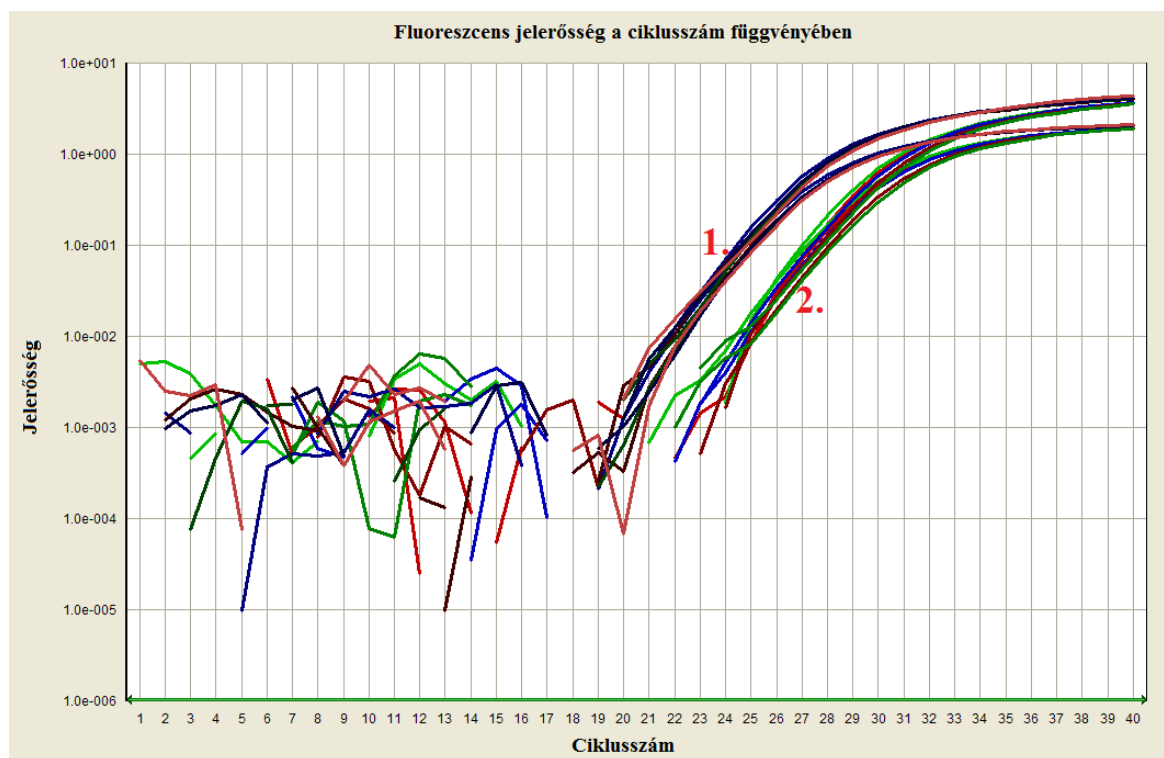
A kutatás során a WT1 mellett a környező gének (PAX6, EIF3M) kópiaszámát is meghatároztuk (erre azért van szükség, hogy be lehessen határolni egy esetleges delécio vagy duplikáció kiterjedését). A WT1 gén két végét (1. és 10. exon) külön akartuk vizsgálni, azonban egyik megrendelt *assay* sem bizonyult megbízhatónak az 1. exonhoz, így e helyett az 1. intron kópiaszámát mértük (2. táblázat).

2. táblázat. A kópiaszám-vizsgálatokhoz használt qRT-PCR assay-k

<u>A vizsgált génszakasz</u>	<u>Termékazonosító (Applied Biosystems)</u>
RNáz P (kontroll)	Taqman Copy Number Reference Assay, RNase P, Human
WT1, 1. intron	Hs03792206_cn
WT1, 10. exon	Hs02372360_cn
PAX6, 11. intron	Hs05237362_cn
EIF3M, 1. exon-intron határ	Hs01156534_cn
RCN1, 1. intron	Hs03779812_cn

A qRT-PCR-es abszolút kvantifikációt (7. ábra) követően a CopyCaller programot (verziószám: 1.0) használtuk ahhoz, hogy a target gén és az RNáz P közötti finom Ct

értékbeli különbségből kiszámítsuk a gén kópiaszámát. Az így kapott kópiaszám-grafikon pontos mérés esetén csak minimális szórást mutat (lásd az 5.1.2. alfejezetet). A CopyCaller program minden esetben kér egy ún. kalibrátor mintát, amely származhat egészséges kontrollszemélytől, vagy lehet olyan minta, amelynek kópiaszámát egy korábbi vizsgálatból ismerjük. A szoftver a kalibrátor mintához tartozó jelet pontosan az általunk megadott kópiaszámhoz (tipikus vizsgálat esetén 2-höz) rendeli hozzá, és ehhez viszonyítja a többi minta kópiaszámát. (A 10. és 12. ábrát a CopyCaller programmal készítettem, az ábrák alatti magyarázatban megadtam, hogy melyik mintát használtam kalibrátorként.)



7. ábra. Egy qRT-PCR-es kísérlet a PAX6 gén kópiaszámának vizsgálatára. A vizsgált mintából (1), valamint a kontrollmintából (2) egyaránt 5-5 párhuzamost mértünk össze. Mindkét mintában két csoportra oszlanak a görbék, a PAX6 és RNáz P géneknek megfelelően. Az 1. és a 2. minta között látható eltérést a különböző DNS koncentrációnak tulajdoníthatjuk.

4.2.3. Immunfestés WT1 elleni antitesttel

Az immunhisztokémiai festést a WT1 C-terminális epitópját felismerő nyúl poliklonális antitest, a WT1 C19 (Santa Cruz Biotechnology) segítségével végeztük. A megfestett minták Cs. Cs. gyermekkori Wilms-tumorából, valamint 30 éves korában vett (focalis segmentalis glomerulosclerosist mutató) vesebiopsziájából készült FFPE preparátumok voltak (lásd 4.1.).

4.2.4. RNS izolálás, a WT1-expresszió meghatározása qRT-PCR-rel

RNS izolálásra PAXgene Blood RNA Kiteket használtunk. A vérmintákat speciális csövekbe vetettük le (PAXgene Blood RNA Tubes), amelyek RNáz gátlót is tartalmaztak. Az izolált RNS koncentrációját NanoDrop segítségével megmértük, majd az RNS-en rövid időn belül reverz transzkripciót végeztünk High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével.

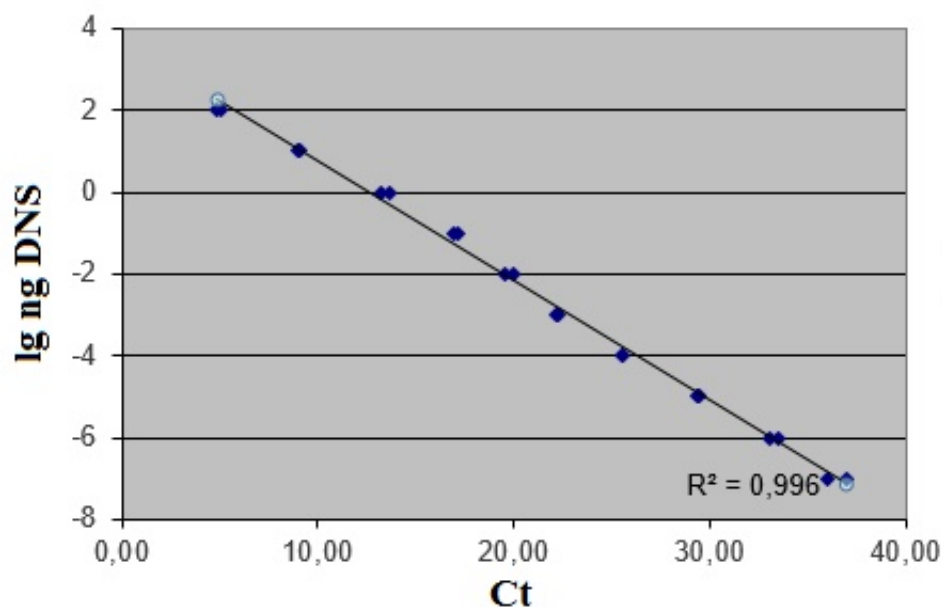
A cDNS mennyiségét az adott génre specifikus primerpárral és Taqman próbával (3. táblázat), qRT-PCR segítségével detektáltuk (génexpressziós analízisnél az egy mintából összemért párhuzamosok száma nem volt kötött, de minden esetben legalább 3 párhuzamossal dolgoztunk). A WT1 mellett itt is szükség volt egy referenciagénre, amely konstans és magas expressziót mutat. Az általunk választott GAPDH az irodalom szerint megfelelő endogén kontroll, hiszen expressziója nem tér el az egészséges és daganatos lymphoid szövetben (*Mazrouei és mtsai, 2012*), bár a GAPDH mellett két másik gént, az ABL1-et és a β -aktint is sikerrel alkalmazzák. Az eddig közölt adatok szerint nem egyértelmű, hogy a három referenciagén közül bármelyik jobban teljesít-e a másik kettőnél WT1 transzkripció *assay*-kben (*Ogawa és mtsai, 2004*).

3. táblázat. A génexpressziós vizsgálatokhoz használt qRT-PCR *assay*-k

<u>A vizsgált gén</u>	<u>Termékazonosító (Applied Biosystems)</u>
GAPDH (kontroll)	Hs99999905_m1
WT1	Hs00240913_m1

A további számításokhoz nem közvetlenül a Ct értékeket használtuk, hanem mind a WT1, mind a GAPDH génhez ismert koncentrációjú DNS oldatok PCR-es amplifikációját követően felvettünk egy-egy kalibrációs egyenest, hogy ezután a feldolgozott mintákból

kapott Ct értékekből következtetni lehessen a reverz transzkripció során képződött cDNS mennyiségére, amely arányos az eredeti mintában lévő WT1, ill. GAPDH mRNS mennyiségével. (A WT1-hez tartozó kalibrációs egyenes a 8. ábrán látható.) A WT1-expressziót egy standardizált, numerikus értékkel jellemeztük, amely a 10^4 db GAPDH mRNS-re jutó WT1 mRNS molekulák számát jelenti. Ezzel kiküszöbölhető az a probléma, hogy a különböző eredetű minták esetében igen eltérő lehet az abból nyert RNS koncentrációja, és ennek következtében változó Ct értékeket mérünk. A fent leírt, standardizált módszerrel igen alacsony (esetenként akár 1 ng/μl alatti) RNS koncentráció mellett is jól reprodukálható eredményeket kaptunk.



8. ábra. Kalibrációs egyenes a WT1 génhez, amely a Ct érték és a kísérleti elegyhez adott DNS mennyiség logaritmusa közötti összefüggést mutatja. A kék pontok jelzik az ismert koncentrációjú DNS oldatokkal kapott eredményeket, az ezekre illesztett egyenest használtuk a vizsgált betegmintákban lévő WT1 cDNS mennyiségének meghatározására.

4.3. Statisztikai módszerek

A génexpressziós vizsgálatok eredményének értékeléséhez statisztikai módszerekre is szükség volt, hiszen egyrészt meg kellett határoznunk egy *cut-off* értéket, amely fölött WT1-pozitívnak tekintettük az egyes mintákat, másrészt meg kellett mondanunk, hogy a WT1-

pozitivitás szignifikáns hatással van-e a prognózisra a különböző betegségekben. Statisztikai analízisre a MedCalc programot használtuk (verziószám: 12.3.0).

A *cut-off* érték számításához 35 egészséges kontrollszemélytől vettünk vért, és kiszámítottuk a GAPDH-hoz standardizált WT1-expressziós értékeket. (Egy bizonyos, legtöbbször igen alacsony expresszió egészséges személyekben is mérhető, hiszen a CD34+ véréképző sejtek kis százaléka kijut a perifériás vérbe, ezek egy része pedig expresszálja a WT1-et, ahogy a 2.4. alfejezetben láttuk.)

A detektált értékek 0,002 és 0,109 között változtak (4. táblázat). A logaritmikusan transzformált értékeken χ^2 illeszkedésvizsgálatot végeztünk, mely azt igazolta: az adatok normál eloszlást mutatnak ($p=0,9923$). Azon szemléletet alapul véve, hogy egy normál eloszlású változó esetében hozzávetőleg a felső 2,5 százalékhhoz tartozó értékek tekinthetők „magasnak”, a 97,5 percentilis értékét (0,108) kerekítettük 0,1-re, és ezt használtuk a WT1-pozitivitás *cut-off* értékeként a vizsgálat során.

4. táblázat. A kontrollszemélyekben mért, standardizált WT1-expressziós értékek

0,0133	0,0122	0,00287	0,0346	0,022
0,00257	0,00859	0,0144	0,0411	0,00862
0,0263	0,00796	0,0406	0,0275	0,108
0,0177	0,00716	0,0116	0,0178	0,0447
0,00661	0,00461	0,109	0,0184	0,00701
0,00839	0,00392	0,0199	0,0136	0,0247
0,0251	0,00735	0,0335	0,0167	0,0435

A betegeket diagnózis alapján osztottuk csoportokba, majd ezeken belül meghatároztuk a WT1-pozitív és WT1-negatív alcsoportokat. Bizonyos betegeknél a WT1-expressziós érték átlépte a *cut-off* küszöböt valamilyen irányban: a kezelés hatására negatívvá vált, vagy egy eredetileg WT1-negatív beteg a kezelés ellenére pozitív mintát produkált. Ezért esetenként a „végig negatív” és a „végig pozitív” alcsoportok mellett szükség volt további beosztásra is.

Ezután meghatároztuk a hetekben számított teljes (TT), valamint betegségmentes túlélést (BMT) az egyes alcsoportokba tartozó betegeknél. A TT-t a diagnózis időpontjától a vizsgálat végéig, vagy a beteg haláláig mértük, míg a BMT-t a komplett remisszió időpontjától a relapszusig, a beteg haláláig, vagy a vizsgálati időszak végéig adtuk meg. (Ha

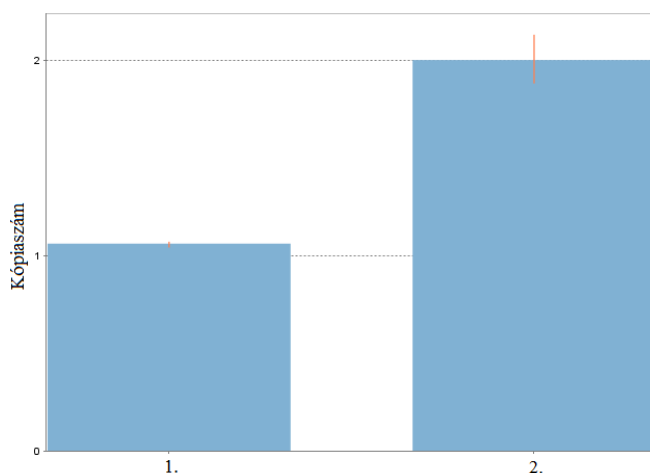
egy betegnél nem sikerült remissziót elérni, annál értelemszerűen csak TT-t tudtunk számítani, BMT-t nem.)

Minden diagnózison belül külön Kaplan-Meier túlélési görbéket vettünk fel az egyes (WT1-pozitív és WT1-negatív) alcsoportokban. Ezután a görbéket összehasonlítottuk a lograng-próba segítségével, hogy lássuk, volt-e statisztikailag szignifikáns különbség (5 százalékos szignifikanciaszint mellett) a WT1-et expresszáló és nem expresszáló esetek között a túlélésben.

5.1.2. Kópiaszám-analízis

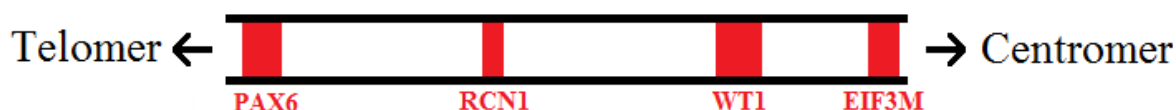
Mivel mutációt nem sikerült kimutatnunk a WT1 génben, a következő lépésben azt vizsgáltuk, nem állhat-e deléció a kórkép hátterében.

Először a WT1 gén 10. exonjának kópiaszámát viszonyítottuk egészséges kontrollszemélyéhez. (A módszert illetően a 4.2.2. alfejezetre utalunk.) Azt az eredményt kaptuk, hogy Cs. Cs. mindössze egyetlen WT1 kópiával rendelkezik, vagyis valóban delécióról van szó (10. ábra).

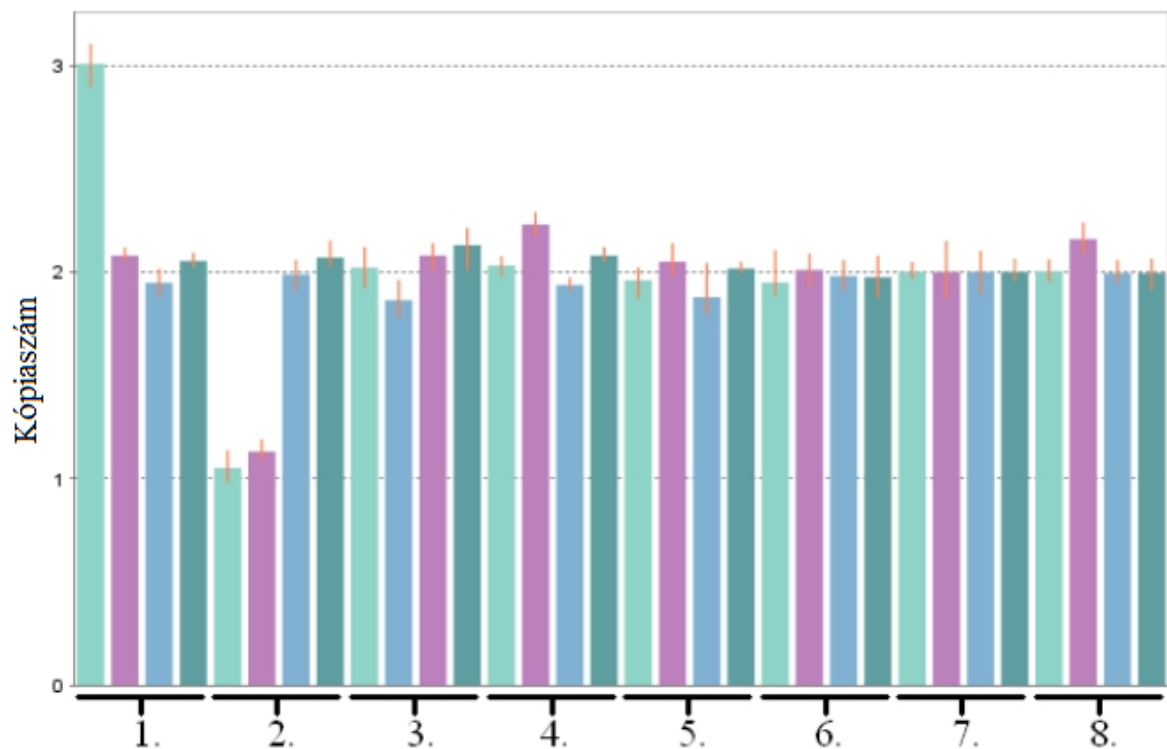


10. ábra. A WT1 gén 10. exonjának kópiaszáma Cs. Cs.-ben (1), valamint egy egészséges kontrollszemélyben (2). A 2. volt a kalibrátor minta.

Ezt követően megvizsgáltuk a gén mindkét végét, valamint a 11p13 kromoszomális régió környező génjeit (11. ábra) az összes családtagban. Az eredmények azt mutatták, hogy Cs. Cs. esetében a teljes WT1 gén deletálódott (ám a deléció nem terjed ki a WT1-et körülvevő génekre), míg húga extra kópiával rendelkezik a gén 5' szakaszára nézve. Érdekes módon mindkét szülő, valamint Cs. Cs. embrionális carcinomával operált bátyja is negatívnak bizonyult (12. ábra).



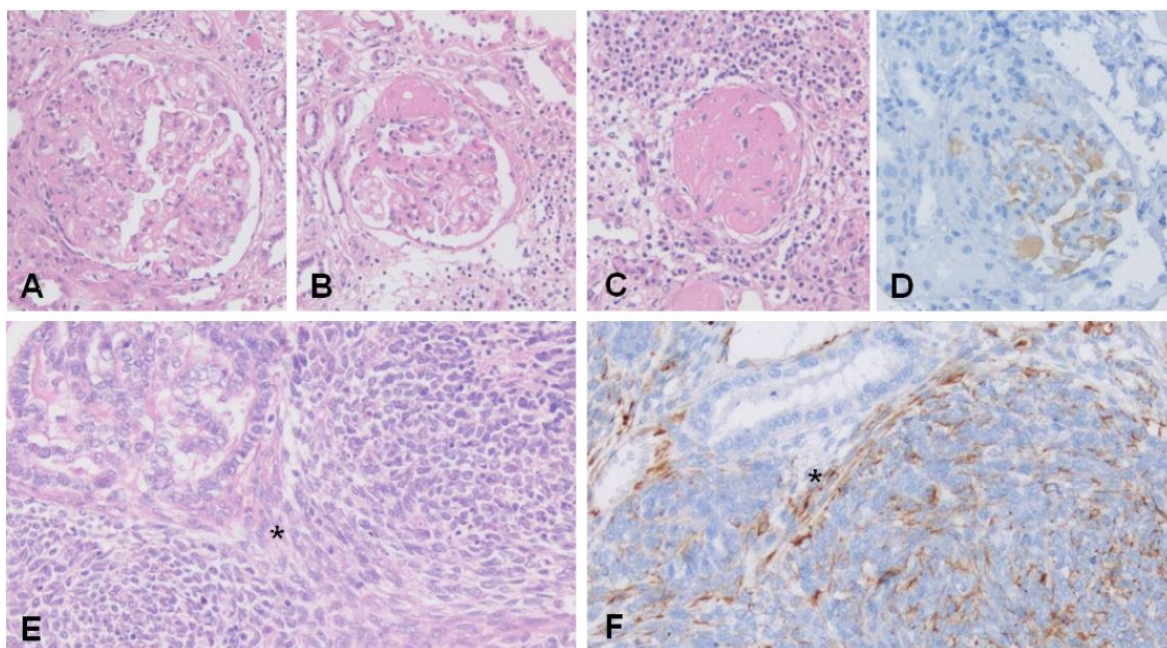
11. ábra. A WT1 gén és közvetlen környezete a 11p13 kromoszomális régióban.



12. ábra. A qRT-PCR-rel végzett kópiaszám-analízis eredményei. Világoszölddel a WT1 gén 5' végét (1. intron) ábrázoltuk, míg lilával a 3' végét (10. exon). A környező gének közül kékkel jelölve az EIF3M, sötétzölddel pedig a PAX6 látható (az RCN1-et nem ábrázoltam, de minden mintában 2 kópiát mutatott). A 2. számú minta tartozik Cs. Cs.-hez, míg az 1. a húgáé, az 5. a bátyjáé, a 3. és 4. a két szülőé, a 6., 7. és 8. pedig egészséges kontrollszemélyek mintái. Minden assay-hez a 7. mintát használtuk kalibrátorként.

5.1.3. Immunhisztokémia

Cs. Cs. két FFPE mintáját festettük meg WT1 elleni antitesttel: a 2004-ben vett vesebiopsziát, amely előrehaladott FSGS-t igazolt, jól látható intima-proliferációval, valamint az 1978-as, trifázisos Wilms-tumort mutató mintát (13. ábra). Az újabb mintában a WT1-pozitivitás normális mintázatát észleltük, mely a nem daganatos vesére jellemző: kizárólag a podocyták expresszálták a WT1-et. Említésre méltó azonban, hogy csak igen alacsony fokú pozitivitást láttunk, és a sejtmagi területek egyáltalán nem festődtek az antitesttel.



13. ábra. Az FSGS-t mutató vesebiopsziában látott glomeruláris elváltozások spektruma (A, B, C). A néhány megmaradt glomerulusban a podocyták gyenge WT1-pozitivitást mutattak (D). Trifázisos Wilms-tumor sebészeti mintában (E). A WT1-immunpozitivitás (F) jelen volt a daganat stromális (*), valamint blastemás (jobb oldalon) komponensében, ám az epitheliális területek negatívnak mutatkoztak (balra, fent). A WT1-pozitivitás mindkét mintában citoplazmatikus (nagyítás: 200x).

5.2. WT1-expresszió malignus hematológiai betegségekben

5.2.1. Diffúz nagy B-sejtes lymphoma

Az 53 betegből 25 szenvedett DLBCL-ben. A kapott eredményeink szerepelnek a Függelékben olvasható közleményünkben (Ujj és mtsai, 2014), e közlemény azonban megosztott felhasználásra került a két első szerző között, így a DLBCL-lel kapcsolatos eredmények nem képezik jelen dolgozatom témáját.

5.2.2. Köpenysejtes lymphoma

A 8 MCL-es eset adatait az 5. táblázat tartalmazza. Az idetartozó betegek életkora 38 és 74 év között változott, a medián életkor 60 év volt. (A táblázat szerint B. L. hetekben mért

teljes túlélése meghaladja a vizsgálat időtartamát, amely 270 hét volt; ennek magyarázatát lásd az alábbiakban.)

5. táblázat. A vizsgált betegek (MCL).

<u>Csoport</u>	<u>Azonosító</u>	<u>Kimenetel</u>	<u>TT</u>	<u>BMT</u>
<i>WT1-negatív</i>	N. I.	Él	141	105
<i>WT1-negatív</i>	T. J.	Él	195	106
<i>WT1-negatív</i>	V. L.	Él	255	216
<i>WT1-negatív</i>	K. L. L.	Meghalt	238	-
<i>Negatívból pozitívvá vált</i>	H. A.	Meghalt	84	16
<i>Negatívból pozitívvá vált</i>	B. L.	Meghalt	381	21
<i>WT1-pozitív</i>	T. A.	Meghalt	113	73
<i>Pozitívból negatívvá vált</i>	V. S.	Él	156	115

A köpenysejtes lymphoma kezelése a hyper-CVAD kemoterápiás protokoll szerint történt, a legtöbb esetben rituximabbal kiegészítve. (Ha relapszus jelentkezett, CHOP vagy DHAP protokollt, míg autológ őssejttranszplantáció esetén BEAM protokollt alkalmaztak.) WT1-pozitivitást az esetek felében (4 beteg) észleltünk.

Az egyik beteg (B. L.) azután került be a vizsgálatba, hogy 5 évvel korábban diagnosztizált lymphomája relapszust mutatott (a teljes túlélést az eredeti diagnózis időpontjától számítottuk). A kezdetben mért negatív érték (0,0026) 1 évvel később szokatlanul magas (2,07) expresszióba csapott át. Ekkor az MDS kezdeti jelei mutatkoztak a csontvelőben, és a fokozatosan kifejlődő MDS 18 hónappal később a beteg halálához vezetett. Ebben az esetben a WT1-expresszió emelkedésének mértéke inkább az MDS-re, mintsem a non-Hodgkin lymphomára utal, így kivettük az alábbi statisztikákból, és a Megbeszélés 6.2. alfejezetében külön foglalkozunk vele.

A megmaradt 7 esetben felvettünk egy-egy Kaplan-Meier görbét a teljes és a betegségmentes túlélésre. A görbék megtekinthetők a Függelékben mellékelt közleményünkben (Ujj és mtsai, 2014), jelen értekezésben azonban nem szerepelnek, ahogy kimaradtak a perifériás T-sejtes lymphoma és az ALL esetében is. Ennek az az oka, hogy (a diffúz nagy B-sejtes lymphoma kivételével) az egyes betegségekben nem állt rendelkezésünkre akkora betegpopuláció, hogy az alapján meggyőző ábrákat tudjunk prezentálni. Ebben (a non-Hodgkin lymphomák esetében) az egyes daganattípusok ritkasága is szerepet játszott. Mégis úgy gondoljuk, az eredményeknek helye van a dolgozatban, hiszen

fontos kérdéseket vetnek fel még akkor is, ha ezek megválaszolásához több betegcsoporton végzett kutatásra, de legalábbis jóval nagyobb mintaszámra lenne szükség.

MCL-ben az alacsony esetszám ellenére mind a TT ($p=0,0082$), mind a BMT ($p=0,0177$) esetében szignifikáns különbséget tapasztaltunk a WT1-negatív (vagy a kezelés hatására azzá vált), és a WT1-pozitív vagy negatívból pozitívvá vált betegek között.

Érdemes néhány szót külön ejteni azon esetekről, ahol a WT1-expresszió átlépte a *cut-off* értéket valamilyen irányban. Egy betegnél (V. S.) pozitív (0,288) expressziót mértünk a diagnózis időpontjában, mely négyhavi hyper-CVAD kezelés után 0,0018-ra csökkent. A beteg több mint 2 éve, jelenleg is életben van. Két esetben ennek ellenkezőjét tapasztaltuk: a negatív WT1-expresszió pozitívvá vált, és a beteg nem sokkal később elhalálozott. B. L. esetét fent már említettük, de egy „valódi” MCL-es esetben (H. A.) is tapasztaltuk ezt.

5.2.3. Perifériás T-sejtes lymphoma

PTCL-es csoportunkba 9 beteg tartozott, 50 éves medián életkorral (32-től 67 évig).

A betegség kezelésére a klasszikus kemoterápiás protokollok (CHOP, DHAP) valamelyikét alkalmazták, esetenként alemtuzumabbal kombinálva. Autológ őssejttranszplantációt is végeztek azon betegeknél, akik legalább részleges remisszióba kerültek; ezekben az esetekben kondicionáló kezelésként BEAM protokollt használtak.

A PTCL-re vonatkozó legfontosabb adatokat a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat. A vizsgált betegek (PTCL)

Csoport	Azonosító	Kimenetel	TT	BMT
WT1-negatív	P. Z.	Meghalt	57	-
WT1-negatív	B. F.	Meghalt	76	-
WT1-negatív	P. Z. É.	Meghalt	112	-
WT1-negatív	B. F.	Meghalt	136	39
WT1-negatív	Sz. L.	Meghalt	178	-
WT1-pozitív	P. E.	Meghalt	29	-
WT1-pozitív	J. J.	Meghalt	79	-
WT1-pozitív	Á. L.	Meghalt	121	51
Pozitívból negatívvá vált	Gy. J.	Meghalt	111	52

Pozitív WT1-expressziót 4 esetben mértünk: 3 betegnél a teljes megfigyelési időszak alatt, 1-nél pedig csak a kezelés kezdeti szakaszában (6. táblázat). Ám a fent részletezett MCL-lel ellentétben, PTCL-ben a WT1-negatív és WT1-pozitív alcsoport prognózisa nem mutatott különbséget. A lograng-próba eredménye $p=0,3198$ volt TT-re, és $p=0,8084$ BMT-re.

5.2.4. Felnőttkori akut lymphoblastos leukemia

Vizsgált betegeink kisebb csoportját (7 személyt) nem lymphomával, hanem B-sejtes ALL-lel diagnosztizálták (7. táblázat). A betegek életkora 19-től 65 évig terjedt a diagnóziskor, a medián életkor 48 év volt. A kezelésre Hölzer-protokollt (Hölzer és mtsai, 1983) alkalmaztak, Glivec-kel kiegészítve abban a két esetben (M. J., Sz. L.), ahol Philadelphia-kromoszóma, vagyis $t(9;22)$ volt kimutatható.

7. táblázat. A vizsgált betegek (ALL)

<u>Csoport</u>	<u>Azonosító</u>	<u>Kimenetel</u>	<u>TT</u>	<u>BMT</u>
WT1-negatív	S. I.	Meghalt	2	-
WT1-negatív	O. M.	Meghalt	7	-
WT1-pozitív	Sz. D. J.	Meghalt	3	-
WT1-pozitív	K. F.	Meghalt	30	25
WT1-pozitív	M. J.	Meghalt	77	41
Pozitívból negatívvá vált	P. Cs.	Él	204	196
Pozitívból negatívvá vált	Sz. L.	Él	208	189

A 7-ből 5 esetben találtunk WT1-pozitivitást, és megvizsgáltuk ennek hatását a prognózisra.

A teljes túlélésben látott különbségeket nem tudtuk értékelni, mivel a 2 WT1-negatív eset klinikailag gyors lefolyással járt, és korai halálhoz vezetett. Azon betegeknél viszont, akiknél elértük a remissziót, jelentős különbség látszik a végig WT1-pozitív, valamint a kezelés hatására negatívvá vált esetek között. (Az előbbi két beteg csak rövid időre került remisszióba, 25, ill. 41 héttel később elhalálozott, míg az utóbbi két eset jelenleg is remisszióban van.) A két görbét összehasonlító lograng-próba az alacsony betegszám ellenére sincs messze attól, hogy szignifikánsnak lehessen nevezni ($p=0,0896$).

5.2.5. MALT és Burkitt lymphoma

A kutatás során 2 MALT, valamint 2 Burkitt lymphomás esetet is megvizsgáltunk, azonban ezek mindegyike WT1-negatívnak bizonyult.

Burkitt lymphomában nem lehetett remissziót elérni, és mindkét beteg meghalt (18, ill. 38 hét után). A MALT lymphomás esetek ugyanakkor jól reagáltak a kezelésre, és jelenleg is remisszióban vannak, 136, ill. 203 hét után.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. WT1 mikrodeléció okozta komplex, többfajta neoplasiával járó klinikai kép

Cs. Cs. klinikai fenotípusát összevetve a kutatás során talált genotípussal, meglehetősen erőltetettnek tűnik a Denys-Drash, vagy a késői kezdetű Frasier szindróma diagnózisa. Az FSGS inkább a Frasier szindrómát támasztaná alá, ez esetben viszont atípusos lelet lenne a Wilms-tumor (lásd 2.5.5.). Mivel a WT1 génben sem találtuk meg a 9. intron jellegzetes mutációját, úgy véljük, betegünk esetében nem Frasier szindrómáról van szó.

Denys-Drash szindrómában jellemző tünetként kezelhetnénk a Wilms-tumort, azonban e betegségben inkább korai kezdetű, gyors lefolyású DMS-t várnánk, mint FSGS-t (lásd 2.5.4.). Ha ehhez hozzászámítjuk azt az eredményt, hogy az exonok szekvenciájában nincs eltérés, akkor a DDS-t is kizárhatjuk, mint diagnózist.

Két lehetőség adódik tehát: vagy úgy soroljuk be a beteg fenotípusát, mint a Denys-Drash/Frasier spektrum (lásd 2.5.6.) egy atípusos manifestációját, vagy kibővítve e spektrumot, a WAGR szindrómával azonos csoportba tartozó kórképként határozzuk meg Cs. Cs. betegségét. Meglátásunk szerint mind a klinikai kép, mind a molekuláris vizsgálatok eredményei ez utóbbi elképzelést támogatják.

A WAGR szindróma, ahogy a 2.5.3. alfejezetben láttuk, a 11p13 régió delécióját jelenti, és a WT1, valamint a PAX6 lokuszok mellett még számos gént érinthet (*Xu és mtsai, 2008*). Almind és mtsai (2009) közöltek egy esetet, ahol a deléció kiterjedt a WT1 génre, de a PAX6-ra nem; ebben az esetben azonban a WT1 mellett további 43 gén is érintett volt. Nincs tudomásunk olyan közleményről, amely a miénkhez hasonló esetről, vagyis kizárólag a WT1-et érintő mikrodelécióról számolna be.

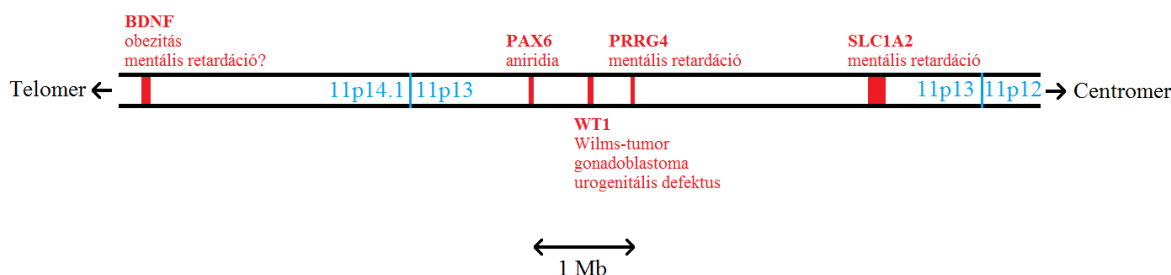
Mindezzel együtt a talált fenotípus (Wilms-tumor és férfi pszeudohermafroditizmus meglete aniridia, mentális retardáció és obezitás nélkül) jól beilleszthető abba a képbe, amely az irodalmi adatok alapján kirajzolódik a régió fontosabb génjeinek szerepéről. Ahogy a 2.5.3. részben láttuk, WAGR szindrómánál a Wilms-tumor, gonadoblastoma, valamint az urogenitális fejlődési rendellenességek hátterében a WT1 deléciója áll, míg a szem fejlődésében szerepet játszó PAX6 haploinsufficienciája aniridiát okoz, a szindrómához gyakran kapcsolódó obezitásért pedig valószínűleg a BDNF lokusz a felelős. A WAGR

tünetegyüttes és az obezitás társulását már a 90-es években megfigyelték, ezeket az eseteket újabban a WAGRO szindróma névvel illeti a szakirodalom (Brémond-Gignac és mtsai, 2005).

Továbbra sem pontosan tisztázott azonban a mentális retardáció eredete. Míg Xu és mtsai (2008) 3 gént (BDNF, SLC1A2, PRRG4) gyanúsítottak a tünet lehetséges okozóiként, addig Almind és mtsai (2009) ezek közül az SLC1A2 gént emelik ki (igaz, a PRRG4 is deletálódott a fent említett, mentális retardációban szenvedő betegükben). Egy újabb közlemény a WAGR-tünetegyüttes részeként gyakran jelentkező autisztikus viselkedés és fejlődési visszamaradás okozójaként egy 1,6 Mb hosszúságú szakaszt jelöl meg, amely a PAX6, a WT1 és a PRRG4 gént tartalmazza (Yamamoto és mtsai, 2014).

Úgy tűnik tehát, hogy a WAGR és WAGRO szindrómákat nem különálló entitásként kell kezelnünk, hanem leírhatunk egy szélesebb deléciós spektrumot a 11p13 és 11p14.1 kromoszomális régiók területén (14. ábra). E spektrumon belül a mi esetünk a központi gén, a WT1 izolált delécióját képviseli, az annak megfelelő fenotípussal. Ha több mikrodeléciós szindrómát írtak volna le ebben a régióban (genotípus-fenotípus asszociációkkal együtt), akkor nem kizárt, hogy a „WG”, „WGR” és „WAG” elnevezéseket is használná az irodalom.

Gének és a deléciójuk esetén jelentkező fenotípus a 11p13 kromoszomális régióban és környékén



14. ábra. A WT1 kapcsán leírt deléciós szindrómák illusztrációja. WAGRO szindróma esetében minden ábrázolt gén delécióra kerül, míg WAGR szindrómánál csak a 11p13 génjei. Izolált WT1 deléciónál csak az ahhoz tartozó tüneteket észleltük.

Habár a WAGR szindróma kapcsán az „urogenitális rendellenességek” alatt elsősorban a nemi szervek malformációit értették a múltban, mára világos, hogy bele kell érteni a podocytá-betegséget is, amely veseelégtelenséghez vezethet. Breslow és mtsai (2003) a

WAGR szindrómás betegek 53 százalékában találtak veselégtelenséget 20 évvel a Wilms-tumor diagnózisa után. A Frasier szindrómához képest későbbi kezdetű, lassabban progrediáló proteinuriáról számoltak be, amely fiatal felnőttkorban torkollik veseelégtelenségbe, ahogy az Cs. Cs. esetében is történt.

Ezen esetekben (a saját betegünkhöz hasonlóan) első megközelítésben felvetődik egy olyan, kórélettani szemléletű magyarázat is, hogy a nephrectomia után a megmaradt vesére háruló nagyobb terhelés, a kompenzatórikus hiperfiltráció miatt fejlődne ki a veseelégtelenség. Az irodalmi adatok (*Breslow és mtsai, 2005*) alapján ez nem látszik valószínűnek: unilaterális Wilms-tumort követően mindössze 0,6 százalék, bilaterális daganat esetén pedig 12 százalék a valószínűsége a végstádiumú veseelégtelenség kialakulásának WT1-negatív, urogenitális rendellenességektől mentes betegekben.

Az a magyarázat sem kielégítő, hogy a Wilms-tumor kezelésére használt kemo- és sugárterápia utóhatásaként jelentkezne a veseelégtelenség (*Bárdi és mtsai, 2004*). Ráadásul az FSGS olyan WAGR szindrómás esetekre is jellemző, ahol nem jelentkezett Wilms-tumor, így a fenti tényezők (nephrectomia utáni hiperfiltráció, daganatellenes terápia mellékhatásai) biztosan kizárhatók (*Iijima és mtsai, 2012*).

Marad tehát az a lehetőség, hogy a WT1 gén defektusa áll a glomerulopathia hátterében. Cs. Cs. esetében ezt támasztja alá, hogy az FSGS-t mutató szövettani mintában a szokásosnál gyengébben festődtek a podocyták a WT1 elleni antitesttel (*13. ábra*), ami a géntermék csökkent mennyiségére utalhat. Ez annyit jelent, hogy a Frasier és Denys-Drash szindrómához hasonlóan a WT1 deléciója is járhat urogenitális fejlődési rendellenességgel, daganat és podocyta-betegség triászával, vagyis azon klinikai spektrum részeként kell rá tekinteni, amelybe a DDS és az FS tartozik. Ha számításba vesszük, hogy saját betegünkben hiányzott a PAX6 jellegzetes aniridiával járó deléciója, akkor könnyű belátni, hogy a WAGR szindróma speciális esetei komoly differenciáldiagnosztikai nehézséget okozhatnak, így a mutációk szokásos vizsgálata mellett mindenképp indokolt lehet a WT1 kópiaszám-analízise is.

Cs. Cs. betegségében talán az a legszokatlanabb, hogy egyetlen betegnél többfajta malignitás (ALL, Wilms-tumor, angioblastoma cerebelli) jelentkezett. Ismeretes persze, hogy a gyermekkori daganatos betegségek kezelése később másodlagos tumorokat eredményezhet: egy vizsgálat szerint a Wilms-tumor diagnózisa után 15 évvel 1,6 százalék volt a különböző malignitások kumulatív incidenciája, beleértve az akut leukémiát is (*Breslow és mtsai, 1995*). Azonban (saját közleményünket kivéve) nincs nyoma olyan esetnek az irodalomban, ahol a leukémia jelentkezett először, és ezt követte a Wilms-tumor.

Ahogy a 2.5.7. alfejezetben ismertettük, az akut leukemiák bizonyos eseteit összefüggésbe hozták strukturális WT1 defektusokkal, egy esetben pedig WAGR szindrómás betegben is kimutatták a megmaradt WT1 allélt érintő mutációt AML háttérében (*Pritchard-Jones és mtsai, 1994*). Ezek alapján úgy tűnik, a Cs. Cs. esetében megfigyelt malignitásokért inkább a WT1 deléciója, és az emiatti daganatos predispozíció lehet felelős, mintsem a kemoterapeutikumok.

Ami a radioterápiát illeti, annak szerepe legalábbis felmerül a kisgyei angioblastoma esetében, hiszen jól ismert, hogy a koponyát ért besugárzás után másodlagos agytumорок (pl. meningeomák) képződhetnek. Az agyban igen ritka cavernosus hemangiomát elsősorban olyan gyermekekben írták le, akik 10 éves koruk előtt estek át sugárkezelésen (*Heckl és mtsai, 2002*). Két okból mégsem látszik igazán valószínűnek, hogy a radioterápiában kellene keresnünk a daganat okát: egyrészt ezen cavernosus hemangiomák esetében legtöbbször a besugárzás után rövidebb időn (8-10 éven) belül alakul ki a tumor (*Keezer és Del Maestro, 2009*), másrészt pedig, noha számos agytumort összefüggésbe hoztak már sugárkezeléssel (*Vinchon és mtsai, 2011*), az angioblastoma nem tartozik közéjük. Kézenfekvőbbnek tűnik, hogy a WT1 eltérése áll a daganat háttérében, hiszen amint a 2.4. alfejezetben bemutattuk, a gén fontos szereplő az angiogenesis szabályozásában.

Érdekes lett volna kimutatni, hogy betegünkben a Wilms-tumor kialakulása megfelel-e a 2.5.2. részben bemutatott modellnek (egy öröklött deléció, valamint a másik kópia lokális mutációja), azonban sajnos az 1978-as, Wilms-tumoros mintából nem volt elég hatékony a DNS izolálás (lásd 4.2.).

Ugyancsak figyelemre méltó a WT1 gént érintő többszörös kópiaszámbeli anomália a beteg családjában. Az irodalmi adatok szinte teljes hiányában nehéz megmondani, hogy vajon a WT1 gén részleges duplikációja, melyet Cs. Cs. húgában mutattunk ki, felelős lehet-e a klinikailag észlelt enyhe proteinuriáért. (Valószínűsíthető, hogy a két normál kópiáról átíródó géntermék mellett jelen van egy csonka fehérje, amelyből hiányzik az a szakasz, amit a 3' oldalon elhelyezkedő exonok kódolnak, vagyis pontosan az a régió, amely a 2.2. alfejezetben leírtak szerint funkcionális szempontból a legjelentősebbnek tűnik, hiszen minden izoproteinben megtalálható. Gyaníthatjuk, de teljes bizonyossággal nem tudjuk állítani, hogy egy ilyen fehérje nincs befolyással a WT1 által szabályozott élettani folyamatokra.)

Ha a lányban és bátyjában ugyanaz a génterület lenne érintett a duplikációban, ill. delécióban, arra az egyik szülőben bekövetkezett transzlokáció lenne a kézenfekvő magyarázat – ehhez hasonló esetet közöltek Dolan és mtsai (2011). (Ők a duplikáció enyhe

fenotípusos következményeit hangsúlyozzák, amely egybevág saját esetünkkel.) Mivel azonban Cs. Cs. esetében a teljes gén delécióra került, húgánál viszont csak az 5' szakasza duplikálódott, ez a magyarázat kizárható. Feltevésünk szerint a WT1 gént valamiért nagy gyakorisággal érinti egyenlőtlen *crossing over* az egyik szülőben (az anya valószínűbb jelöltnek tűnik, mivel az apa ágán nem fordult elő vese- vagy urogenitális betegség). Tudomásunk szerint ilyen esetet a WT1 gén vagy a 11p13 kromoszomális régió kapcsán még nem közölt az irodalom, más gének esetében azonban ismert a jelenség (*Baumer és mtsai, 1998*).

Amennyiben sikerül újabb vérmintához jutnunk a betegtől és húgától, érdekes lehetőség lenne a látott kópiaszám-eltérések pontos határainak tisztázása MLPA, esetleg array-CGH segítségével.

6.2. WT1-expresszió lymphoid eredetű malignitásokban

A 2.5.7. alfejezetben említettük, hogy a WT1-expresszió qRT-PCR-es mérését jelenleg főként AML-ben végzik. Bár myeloid és lymphoid daganatos sejtvonalakban egyaránt kimutatható az emelkedett expresszió, ennek genetikai háttere (legalábbis valamilyen mértékben) biztosan különbözik: kimutatták pl., hogy az AWT1 promoter hipermetilációja a myeloid eredetű neoplasia specifikus markere (*Guillaumet-Adkins és mtsai, 2014*). Saját kutatásunkban, melynek eredményeiről az 5.2. alfejezetben beszámoltam, a WT1-ről képződő mRNS mennyiségét a ritkábban vizsgált, lymphoid eredetű malignitásokban, non-Hodgkin lymphomákban és ALL-ben mértük meg.

Különösen a lymphomákra igaz, hogy a WT1 gén expressziójával és annak klinikai jelentőségével (némileg meglepő módon) mostanáig keveset foglalkozott a szakirodalom. A jelenleg elérhető közlemények szerzői immunhisztokémiai módszerekkel mutatták ki a WT1 fehérjét non-Hodgkin lymphomás daganatszövetből (*Drakos és mtsai, 2005; Wang és mtsai, 2012*), ill. Hodgkin-lymphomás nyirokcsomóból (*Vadasz és mtsai, 2013*). E publikációk legfontosabb eredményeit összefoglaltuk az említett alfejezetben.

Wang és mtsai (2012) közzétették a mostanáig egyetlen statisztikai vizsgálatot arra vonatkozóan, hogy a WT1 expressziója befolyásolja-e a prognózist egy bizonyos NHL (ALCL) esetében. Arra a következtetésre jutottak, hogy a gén expressziója nem szignifikáns tényező a teljes túlélés szempontjából – kérdéses azonban, hogy a módszer, amelyet alkalmaztak, mennyire alkalmas a WT1 prognosztikai szerepének megítélésére. Mivel

tumorszövetből végezték az expresszió vizsgálatát, betegenként csak egy mintát analizáltak, majd kiszámították a TT-t. Nem felejthetjük el azonban, hogy a BMT lényegesen magasabb szignifikanciát mutathat, mint a TT (amelybe a gyógyíthatatlan esetek is beleszámítanak). Az akut leukemiákkal kapcsolatos publikációk többsége is arról számol be, hogy a WT1 markerszerepe nem jelentős a diagnóziskor, ám a gén esetleges expressziója jelentősen befolyásolja a már sikeresen kezelt betegek túlélését, vagyis a minimális reziduális betegség fontos markere (Nowakowska-Kopera és mtsai, 2009); igaz, újabb eredmények alapján ezt csak AML-ben állíthatjuk nagy bizonyossággal, ALL esetén a BMT-ben mért különbség sem mindig szignifikáns (lásd 2.5.7.).

Az első nehéz döntés tehát, amelyet meg kellett hoznunk, az volt: milyen módszert és mintákat használjunk a kutatás során.

Logikus érv lenne az irodalomban használt nyirokcsomó- és tumorminták mellett, hogy ezek lényegesen nagyobb koncentrációban tartalmazzák a daganatsejteket, mint a vér. Ám, ahogy a 4.2. részben láttuk, a qRT-PCR érzékenysége elegendő ahhoz, hogy vérminták alapján is különbséget tudjunk tenni a WT1-et expresszáló és nem expresszáló esetek között. E vizsgálat során az volt az elsődleges célunk, hogy az 5 éves periódus alatt minden betegről viszonylag nagyszámú mintát gyűjtsünk és értékeljünk, így képet kapjunk a betegség molekuláris és klinikai állapotának összefüggéseiről.

Amennyiben neoplasztikus nyirokcsomókat, vagy sebészeti daganatmintákat használtunk volna, két komoly nehézséggel kellett volna szembenéznünk. Az egyik, hogy ezen minták egyszeri értékelése után nem kaptunk volna több mintát ugyanattól a betegről, ez pedig lehetetlenné teszi a betegség időbeli követését. A másik probléma, hogy e minták mellé igen nehéz megfelelő kontrollt állítani, így nem könnyű megmondani, hogy milyen szintű expressziót tekintünk WT1-pozitívnak. Az egyes laboratóriumokban eltérőek lehetnek a mintavételre, a minták tárolására és feldolgozására vonatkozó protokollok, így egy irodalomból vett *cut-off* érték használata sem lett volna szerencsés. Úgy gondoljuk, hogy az általunk választott módszer (vérminta elemzése) abból a szempontból is előnyös, hogy jelentős számú kontrollmintából határozhattuk meg a WT1-pozitivitás küszöbértékét.

Az ALL esetében természetesen a csontvelői mintavétel merül fel a perifériás vér alternatívájaként. Az irodalomban mindkettőt sikerrel használták a WT1-expresszió qRT-PCR-es mérésére, egyes szerzők azonban arról számolnak be, hogy a perifériás vérből kapott eredmények kiértékelése könnyebb lehet. Ennek az a magyarázata, hogy a WT1-pozitív CD34+ hemopoietikus őssejtek igen kis arányban jutnak ki a csontvelőből a perifériás vérbe, így a vérben tapasztalható „hátteraj” mintegy 1 logaritmus egységgel alacsonyabb annál,

amit a csontvelőben mérhetünk (*Cilloni és mtsai, 2008*). Ez, valamint a könnyebb hozzáférhetőség és a lymphomás vérmintákkal való összevethetőség voltak a fő érveink a perifériás vérminták használata mellett.

Közleményünkben elsőként számoltunk be WT1-pozitív köpenysejtes lymphomáról: bár Drakos és mtsai (2005) megvizsgáltak 6 MCL-es esetet, ezek mindegyike WT1-negatívnak mutatkozott. (Természetesen, ahogy fent láttuk, elvi különbség volt a két vizsgálat között, hogy még a 2005-ös közleményben közvetlenül a daganatszövetben próbálták megfesteni a fehérjét, addig mi a perifériás vérben keringő lymphomasejtekből mutattuk ki a WT1 mRNS jelenlétét.)

A betegek túlélésében látott különbség még az alacsony betegszámot figyelembe véve is azt sugallja, hogy a WT1-expresszió prognosztikai szempontból sem érdektelen; különösen, ha figyelembe vesszük azon eseteket, ahol a WT1-expresszió valamilyen irányban átlépte a *cut-off* értéket. (Azt is érdemes azonban megjegyeznünk, hogy a köpenysejtes lymphoma esetében a nagy relapszuskockázat miatt eleve nehéz igazi gyógyulásról beszélni, még a több éves követés után is valószínűsíthető, hogy valójában inkább a relapszus későbbre tolódásáról lehet szó a kezelésre jól reagáló esetek többségében.) Ahogy a mellékelt közleményben, úgy itt is szeretném kihangsúlyozni, hogy több, nagyobb esetszámú vizsgálatra lenne szükség a WT1-expresszió prognosztikai szerepének bizonyítására lymphomákban.

Egy esetben a génexpresszió jelentős emelkedésével egyidejűleg az MDS jeleit észleltük a csontvelőben. E beteg halála nem az MCL-lel, hanem az MDS-sel függött össze, az pedig ismert az irodalomból, hogy a WT1 magas expressziója az MDS korai jeleként is értelmezhető (*Gurbuxani, 2007*). A WT1-expresszió vizsgálata tehát ebből a szempontból is fontos lehet a non-Hodgkin lymphomás betegeknél, főleg a hosszú ideig kezelt esetekben, ahol nagyobb valószínűséggel lehet számítani a myelodysplasiás szindróma kialakulására.

Némileg meglepő, hogy mindkét általunk vizsgált Burkitt lymphomás eset WT1-negatívnak bizonyult. A szakirodalom régóta feltételezi, hogy a Burkitt lymphoma kialakulásában kórokként szerepelhetnek a WT1 gén elváltozásai, noha a közlemények alacsony száma miatt e kérdés sem mentes az ellentmondásoktól. Írtak már le olyan esetet is, ahol a WT1-nek sem strukturális, sem expressziós rendellenessége nem volt kimutatható, de konszenzusnak tekinthető, hogy bizonyos altípusokban fontos lehet a gén vizsgálata (*Ferrari és mtsai, 1997; Perotti és mtsai, 1998*). Drakos és mtsai (2005) 5 esetből 4-et találtak WT1-pozitívnak.

A B- és T-sejtes lymphomák WT1-expressziójára vonatkozó, máig összegyűlt irodalmi adatokat összevontam a saját eredményeinkkel, és a 8., ill. a 9. táblázatban ábrázoltam. Igyekeztem bemutatni, hogy az egyes kórképekre mennyire jellemző a WT1-pozitivitás, és mely betegségekben feltételezhető, hogy befolyásolja a túlélést.

8. táblázat. WT1-expresszió B-sejtes non-Hodgkin lymphomákban (irodalmi és saját adatok összegzése)

<u>Lymphoma típusa</u>	<u>WT1-pozitív esetek száma</u> <u>(összes vizsgált eset)</u>	<u>Prognosztikai jelentőség</u>
<i>Diffúz nagy B-sejtes lymphoma</i>	14 (43)	Valószínű
<i>Köpenysejtes lymphoma</i>	4 (14)	Lehetséges
<i>Burkitt lymphoma</i>	6 (12)	Nem ismert
<i>B-sejtes lymphoblastos lymphoma</i>	1 (2)	Nem ismert
<i>MALT lymphoma</i>	0 (15)	Nem valószínű
<i>Kis lymphocytás lymphoma</i>	0 (9)	Nem valószínű
<i>Follicularis lymphoma</i>	0 (8)	Nem valószínű

9. táblázat. WT1-expresszió T-sejtes non-Hodgkin lymphomákban (irodalmi és saját adatok összegzése)

<u>Lymphoma típusa</u>	<u>WT1-pozitív esetek száma</u> <u>(összes vizsgált eset)</u>	<u>Prognosztikai jelentőség</u>
<i>Anaplasztikus nagysejtes lymphoma</i>	59 (106)	Kérdéses
<i>Perifériás T-sejtes lymphoma</i>	4 (35)	Nem valószínű
<i>T-sejtes lymphoblastos lymphoma</i>	2 (4)	Nem ismert
<i>Angioimmunoblastos T-sejtes lymphoma</i>	0 (13)	Nem valószínű
<i>Mycosis fungoides</i>	0 (6)	Nem valószínű
<i>Extranodális NK/T-sejtes lymphoma</i>	0 (5)	Nem valószínű

A fenti táblázatokat összevetve elmondhatjuk, hogy az eddig megjelent közlemények (a sajátunkat is beleértve) több összefüggést találtak a WT1-expresszió és a B-sejtes NHL kialakulása, prognózisa között, de a lymphoid leukemiákban végzett megfigyelések alapján valószínűsíthető, hogy a gén kifejeződésének egyes T-sejtes lymphomákban is szerepe lehet. Noha kutatásunkban sikerült WT1-expressziót kimutatnunk PTCL-ben, ennek prognosztikai jelentősége a saját betegpopulációnkban nem igazolható.

Ami az ALL-t illeti, a saját eredményeink megerősítik az utóbbi időben megjelent nagy esetszámú tanulmányok konklúzióját (lásd 2.5.7.): bár kérdéses, hogy a WT1 expressziója önmagában szignifikáns hatással van-e a túlélésre, a génexpresszió változásai összefüggésben lehetnek a prognózissal. A 2.5.9. alfejezetben már beszéltünk róla, hogy a WT1 fontos célpont lehet a daganatellenes immunterápiában, itt pedig azt is megemlítjük, hogy újabb eredmények szerint ALL-ben is sikerült beteg gyermekek T-sejtjeiből többek közt a WT1-re, mint antigénre specifikus sejtvonalakat előállítani, és csökkenteni a leukemiás blasztok számát (Weber és mtsai, 2013).

Összesítve az eredményeket, noha a közleményünk ALL-ben (a kis esetszám miatt) nem sokat tesz hozzá a korábban leírt adatokhoz, a non-Hodgkin lymphomák vonatkozásában

fontos új eredményt prezentál: a WT1-pozitivitás több kórképben is kimutatható, mint korábban gondolták, és bizonyos lymphomatípusokban akár a leukemiákhoz hasonlóan befolyásolhatja a prognózist. Így tehát a WT1 szerepének vizsgálata a pathogenesisben már nem csak elméleti jelentőséggel bír, de klinikai szempontból is hasznos lehet. A témában megjelenő, jövőbeli közlemények eredményeitől függően az sem elképzelhetetlen, hogy a WT1 fehérje e betegségekben ugyanúgy terápiás célponttá válik majd, ahogy az a leukemiák, és bizonyos szolid tumorok esetében történt.

6.3. Fontosabb eredményeink

1. Elsőként számoltunk be izolált WT1 mikrodelécióról.

2. Igazoltuk, hogy a WT1 deléciójával járó esetek klinikailag beilleszkedhetnek a Denys-Drash/Frasier spektrumba. A WT1 defektusokat leíró hagyományos diagnózisok túlságosan leegyszerűsítőek.

3. Adataink alapján felmerül, hogy a WT1 expressziójának prognosztikai szerepe lehet bizonyos non-Hodgkin lymphomákban.

4. Elsőként írtunk le WT1-et expresszáló köpenysejtes lymphomát.

Az értekezés 14 ábrát és 9 táblázatot tartalmaz.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A WT1 gén terméke egy rendhagyó transzkripció faktor, amely különböző celluláris tényezők függvényében egyaránt képes aktiválni, valamint represszálni bizonyos promotereket, ill. egy izoformája révén poszttranszkripció szinten is szabályozza targetjeit. A gén klinikailag elsősorban a gonádok és más szervek fejlődésében, valamint a daganatok pathogenesisében játszott kettős szerepe (onkogén és tumorszupresszor) miatt jelentős.

A bemutatott kutatás során egyrészt egy férfi pszeudohermafroditizmussal, FSGS-sel, Wilms-tumorról, ALL-lel és angioblastoma cerebellivel járó, komplex klinikai kép háttérében kerestük a WT1 gén defektusát. Vérből izolált DNS-ből elvégeztük az egyes exonok PCR-es amplifikálását és szekvenálását, valamint a gén kópiaszám-analízisét qRT-PCR-rel, az FFPE mintákat pedig WT1 elleni antitesttel festettük.

Az eredmények szerint a betegnél a WT1 génre lokalizált mikrodélécióról van szó: ez a WAGR szindróma speciális, a PAX6-ot nem érintő esetére utal. A beteg húgában a gén részleges duplikációját mutattuk ki, amely felveti a meiotikus *crossing over* rendellenességét az egyik szülőben.

Másik tanulmányunkban non-Hodgkin lymphomás és akut lymphoid leukemiás betegekben vizsgáltuk a WT1-expresszió gyakoriságát és prognosztikai szerepét. Ehhez bizonyos időközönként vérmintákat vettünk a betegektől, és qRT-PCR segítségével mutattuk ki a WT1 expresszióját, valamint annak időbeli változását.

Először számoltunk be WT1-pozitív MCL-es esetekről, miután a vérben keringő lymphomasejtekből kimutattuk az RNS-t. MCL-ben a WT1 gén expressziója (valamint annak megváltozása) az alacsony esetszám ellenére szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel, ehhez hasonló tendenciát figyeltünk meg ALL-ben is. PTCL-ben találtunk ugyan WT1-pozitivitást, ám az nem befolyásolta a prognózist. A vizsgált MALT és Burkitt lymphomás esetek WT1-negatívnak mutatkoztak.

Eredményeink azt sugallják, hogy a WT1 nem csak leukemiákban, de esetleg a non-Hodgkin lymphomák bizonyos típusaiban is használható lehet prognosztikai markerként, vagy akár terápiás célpontként is.

SUMMARY

WT1 encodes a unique transcription factor, which may activate or repress certain promoters depending on cellular cofactors, while one of the protein's isoforms also regulates its targets at the posttranscriptional level. The gene guides the development of the gonads, as well as several other organs, and is involved in tumorigenesis as a tumor suppressor or as an oncogene in different malignancies.

One of our research projects involved finding the WT1 defect responsible for a complex clinical entity consisting of male pseudohermaphroditism, FSGS, Wilms tumor, ALL and cerebellar angioblastoma. After extracting DNA from the patient's blood sample, we amplified all WT1 exons by PCR, and had them sequenced. We also performed copy number analysis by qRT-PCR, and stained FFPE samples by an antibody against WT1.

Results showed a microdeletion restricted to the gene WT1 – accordingly, the patient's disease was classified as a special case of WAGR syndrome, which did not involve the PAX6 locus. A partial duplication of WT1 was detected in the patient's sister, which raises the possibility of an abnormality affecting meiotic crossing over in one of the parents.

In another study, we determined the frequency and prognostic significance of WT1 expression in non-Hodgkin lymphomas and acute lymphoid leukemia. We regularly took blood samples from each patient, and used qRT-PCR to assess WT1 expression levels and their changes over the observation period.

For the first time to our knowledge, we documented WT1-positive MCL cases, by detecting RNA from circulating lymphoma cells. In MCL, WT1 expression (and its changes) were found to be significantly associated with prognosis despite the low number of enrolled cases; a similar trend was apparent in ALL. WT1-positivity was present in PTCL, but did not affect survival. Studied cases of MALT and Burkitt lymphoma all proved to be WT1-negative.

Our results suggest that apart from leukemias, WT1 might also become a prognostic marker and a potential future therapeutic target in certain types of non-Hodgkin lymphomas.

8. IRODALOMJEGYZÉK

8.1. Hivatkozások

Al-Hussain T, Ali A, Akhtar M (2014) Wilms tumor: an update. *Adv Anat Pathol* **21**: 166-173.

Almind GJ, Brondum-Nielsen K, Bangsgaard R, *et al.* (2009) 11p microdeletion including WT1 but not PAX6, presenting with cataract, mental retardation, genital abnormalities and seizures: a case report. *Mol Cytogenet* **2**: 6.

Amin EM, Oltean S, Hua J, *et al.* (2011) WT1 Mutants Reveal SRPK1 to Be a Downstream Angiogenesis Target by Altering VEGF Splicing. *Cancer Cell* **20**: 768-780.

Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: *in vivo* definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* **99**: 409-419.

Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, *et al.* (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* **17**: 467-470.

Baumer A, Dutly F, Balmer D, *et al.* (1998) High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* **7**: 887-894.

Bárdi E, Oláh AV, Bartyik K, *et al.* (2004) Late effects on renal glomerular and tubular function in childhood cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* **43**: 668-673.

Bergmann L, Miething C, Maurer U, *et al.* (1997) High levels of Wilms' tumor gene (*wt1*) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* **90**: 1217-1225.

Bor YC, Swartz J, Morrison A, *et al.* (2006) The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev* **20**: 1597-1608.

Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, *et al.* (2006) Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* **20**: 254-263.

Bradford ST, Wilhelm D, Bandiera R, *et al.* (2009) A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry *in vivo*. *Hum Mol Genet* **18**: 3429-3438.

Breslow NE, Collins AJ, Ritchey ML, *et al.* (2005) End stage renal disease in patients with Wilms tumor: results from the National Wilms Tumor Study Group and the United States Renal Data System. *J Urol* **174**: 1972-1975.

Breslow NE, Norris R, Norkool PA, *et al.* (2003) Characteristics and outcomes of children with the Wilms tumor-Aniridia syndrome: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol* **21**: 4579-4585.

Breslow NE, Takashima JR, Whitton JA, *et al.* (1995) Second malignant neoplasms following treatment for Wilm's tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. *J Clin Oncol* **13**: 1851-1859.

Brémond-Gignac D, Crolla JA, Copin H, *et al.* (2005) Combination of WAGR and Potocki-Shaffer contiguous deletion syndromes in a patient with an 11p11.2-p14 deletion. *Eur J Hum Genet* **13**: 409-413.

Burns WC, Thomas MC (2010) The molecular mediators of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) and their role in renal pathophysiology. *Expert Rev Mol Med* **12**:e17.

Busse A, Gökbuget N, Siehl JM, *et al.* (2009) Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults and impact on clinical outcome. *Ann Hematol* **88**: 1199-1205.

Call KM, Glaser T, Ito CY, *et al.* (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* **60**: 509-520.

Camci C, Kalender ME, Paydas S, *et al.* (2011) Prognostic significance of Wilms Tumor 1 (WT1) protein expression in breast cancer. *Gaziantep Med J* **17**: 67-72

Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, *et al.* (2011) Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transplant* **25**: 308–316.

Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, *et al.* (1996) RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 7562-7566.

Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, *et al.* (2011) Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1. *PLoS Genet* **7**: e1002404.

Chau YY, Hastie ND (2012) The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet* **28**: 515-524.

Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, *et al.* (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* **15**: 5323-5337.

Cilloni D, Messa F, Arruga F, *et al.* (2008) Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* **93**: 921-924.

Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, *et al.* (2004) Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet* **13**: 405-415.

Dallosso AR, Hancock AL, Malik S, *et al.* (2007) Alternately spliced WT1 antisense transcripts interact with WT1 sense RNA and show epigenetic and splicing defects in cancer. *RNA* **13**: 2287-2299.

Davies RC, Calvio C, Bratt E, *et al.* (1998) WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* **12**: 3217-3225.

Dechsukhum C, Ware JL, Ferreira-Gonzalez A, *et al.* (2000) Detection of a novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. *Mol Diagn* **5**: 117-128.

Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, *et al.* (1967) Association d'un syndrome anatomo-pathologique de pseudohermaphrodisme masculin, d'une tumeur de Wilms, d'une néphropathie parenchymateuse et d'un mosaïcisme XX/XY. *Arch Fr Pediatr* **24**: 729–739.

Depping R, Schindler SG, Jacobi C, *et al.* (2012) Nuclear transport of Wilms' tumour protein Wt1 involves importins α and β . *Cell Physiol Biochem* **29**: 223-232.

Dohi S, Ohno S, Ohno Y, *et al.* (2010) WT1 expression correlates with angiogenesis in endometrial cancer tissue. *Anticancer Res* **30**: 3187-3192.

Dolan M, Berry SA, Rubin KR, Hirsch B (2011) Deletion and duplication of 11p13-11p14: reciprocal aberrations derived from a paternal insertion. *Am J Med Genet A* **155**: 2775-2783.

Drakos E, Rassidakis GZ, Tsioli P, *et al.* (2005) Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **13**: 132-137.

Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM (1970) A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* **76**: 585–593.

Essafi A, Webb A, Berry RL, *et al.* (2011) A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell* **21**: 559-574.

Ferrari A, Perotti D, Giardini R, *et al.* (1997) Disseminated Burkitt's lymphoma after kidney transplantation: a case report in a boy with Drash syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* **19**: 151-155.

Fraizer GC, Wu YJ, Hewitt SM, *et al.* (1994) Transcriptional regulation of the human Wilms' tumor gene (WT1). Cell type-specific enhancer and promiscuous promoter. *J Biol Chem* **269**: 8892-8900.

Fukuzawa R, Heathcott RW, More HE, Reeve AE (2007) Sequential WT1 and CTNNB1 mutations and alterations of beta-catenin localisation in intralobar nephrogenic rests and associated Wilms tumours: two case studies. *J Clin Pathol* **60**: 1013-1016.

Gao Y, Toska E, Denmon D, *et al.* (2014) WT1 regulates the development of the posterior taste field. *Development* **141**: 2271-2278.

Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, *et al.* (2009) Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol* **332**: 273-286.

Gross I, Morrison DJ, Hyink DP, *et al.* (2003) The receptor tyrosine kinase regulator Sproutyl is a target of the tumor suppressor WT1 and important for kidney development. *J Biol Chem* **278**: 41420-41430.

Guillaumet-Adkins A, Richter J, Otero MD, *et al.* (2014) Hypermethylation of the alternative AWT1 promoter in hematological malignancies is a highly specific marker for acute myeloid leukemias despite high expression levels. *J Hematol Oncol* **7**: 4.

Gurbuxani S (2007) WT1 expression in myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* **48**: 456-457.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, *et al.* (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 9618-9622.

Hammes A, Guo JK, Lutsch G, *et al.* (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* **106**: 319-329.

Han JC, Liu QR, Jones M, *et al.* (2008) Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med* **359**: 918-927.

Hancock AL, Brown KW, Moorwood K, *et al.* (2007) A CTCF-binding silencer regulates the imprinted genes AWT1 and WT1-AS and exhibits sequential epigenetic defects during Wilms' tumourigenesis. *Hum Mol Genet* **16**: 343-354.

Hanson IM, Seawright A, Hardman K, *et al.* (1993) PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet* **2**: 915-920.

Hanson J, Gorman J, Reese J, Fraizer G. (2007) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF, Gene Promoter by the Tumor Suppressor, WT1. *Front Biosci* **12**: 2279–2290.

Heckl S, Aschoff A, Kunze S (2002) Radiation-induced cavernous hemangiomas of the brain: a late effect predominantly in children. *Cancer* **94**: 3285-3291.

Heesch S, Goekbuget N, Stroux A, *et al.* (2010) Prognostic implications of mutations and expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **95**: 942-949.

Hewitt SM, Fraizer GC, Saunders GF (1995) Transcriptional silencer of the Wilms' tumor gene WT1 contains an Alu repeat. *J Biol Chem* **270**: 17908-17912.

Hohenstein P, Hastie ND (2006) The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* **15**: R196-R201.

Hossain A, Saunders G (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* **276**: 16817-16823.

Hou HA, Huang TC, Lin LI, *et al.* (2010) WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood* **115**: 5222-5231.

Hölzer D, Thiel E, Löffler H, *et al.* (1983) Recruiting patients and results of a preliminary study on the therapy of acute lymphatic leukemia and acute undifferentiated leukemia in adults. *Onkologie* **6**: 170-174.

Hu S, Chen Z, Gu W, *et al.* (2008) The transcriptional activity of WT1 gene promoter and enhancer in cell lines with diverse tissue origin. *Int J Hematol* **87**: 498-506.

Huff V (2011) Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer* **11**: 111-121.

Iijima K, Someya T, Ito S, *et al.* (2012) Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele. *Pediatrics* **129**: e1621-e1625.

Johnson DG (2000) The paradox of E2F1: oncogene and tumor suppressor gene. *Mol Carcinog* **27**: 151-157.

Keezer MR, Del Maestro R (2009) Radiation-induced cavernous hemangiomas: case report and literature review. *Can J Neurol Sci* **36**: 303-310.

Kim MS, Yoon SK, Bollig F, *et al.* (2010) A novel Wilms tumor 1 (WT1) target gene negatively regulates the WNT signaling pathway. *J Biol Chem* **285**: 14585-14593.

Klamt B, Koziell A, Poulat F, *et al.* (1998) Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* **7**: 709-714.

Kohsaka T, Tagawa M, Takekoshi Y, *et al.* (1999) Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum Mutat* **14**: 466-470.

Kovács G, Müller J, Erdélyi D, Csóka M (2014) Malignus hematológiai betegségek tünettana és kezelése gyermekkorban. *Magy Orv* **22(6-7)**: 26-31.

Koziell A, Grundy R (1999) Frasier and Denys-Drash syndromes: different disorders or part of a spectrum? *Arch Dis Child* **81**: 365–369.

Ladomery M, Dellaire G (2002) Multifunctional zinc finger proteins in development and disease. *Ann Hum Genet* **66**: 331-342.

Ladomery M, Sommerville J, Woolner S, *et al.* (2003) Expression in *Xenopus* oocytes shows that WT1 binds transcripts *in vivo*, with a central role for zinc finger one. *J Cell Sci* **116**: 1539-1549.

Laity JH, Dyson HJ, Wright PE (2000) Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 11932-11935.

Lambert J, Lambert J, Nibourel O, *et al.* (2014) MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget* **5**: 6280-6288.

Li X, Wu L, Ying S, *et al.* (2007) Wilms' tumor gene (WT1) is predominantly expressed in clonal hematopoietic cells in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* **48**: 601-604.

Lindstedt I, Lindgren MA, Andersson E, Engström W (2014) The WT1 Gene - Its Role in Tumourigenesis and Prospects for Immunotherapeutic Advances. *In Vivo* **28**: 675-681.

Little MH, Wells C (1997) A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* **9**: 209-225.

Little MH, Williamson KA, Mannens M, *et al.* (1993) Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum Mol Genet* **2**: 259-264.

Little SE, Hanks SP, King-Underwood L, et al. (2004) Frequency and heritability of WT1 mutations in nonsyndromic Wilms' tumor patients: a UK Children's Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol* **22**: 4140-4146.

Lobry C, Oh P, Aifantis I (2011) Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* **208**: 1931-1935.

Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V (2000) Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* **60**: 6288-6292.

Malik K, Salpekar A, Hancock A, et al. (2000) Identification of differential methylation of the WT1 antisense regulatory region and relaxation of imprinting in Wilms' tumor. *Cancer Res* **60**: 2356-2360.

Markus A, Heinrich B, Raitskin O, et al. (2006) Stimulation of alternative splicing by human Lark (RBM4) is regulated by WT1 *in vivo*. *Exp Cell Res* **312**: 3379-3388.

Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, et al. (2010) Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* **42**: 89-93.

Mazrouei S, Ziaei A, Tanhaee AP, et al. (2012) Apoptosis inhibition or inflammation: the role of NAIP protein expression in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas compared to non-neoplastic lymph node. *J Inflamm Lond* **9**: 4.

McTaggart SJ, Algar E, Chow CW, et al. (2001) Clinical spectrum of Denys-Drash and Frasier syndrome. *Pediatr Nephrol* **16**: 335-339.

Miles CG, Slight J, Spraggon L, et al. (2003) Mice lacking the 68-amino-acid, mammal-specific N-terminal extension of WT1 develop normally and are fertile. *Mol Cell Biol* **23**: 2608-2613.

Miller-Hodges E, Hohenstein P (2012) WT1 in disease: shifting the epithelial-mesenchymal balance. *J Pathol* **226**: 229-240.

Miwa H, Beran M, Aunders GF (1992) Expression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* **6**: 405-409.

Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, *et al.* (2002) High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **8**: 1167-1171.

Moffett P, Bruening W, Nakagama H, *et al.* (1995) Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 11105-11109.

Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, *et al.* (1999) YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **126**: 1845-1857.

Morrison AA, Viney RL, Lodomery MR (2008) The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochim Biophys Acta* **1785**: 55-62.

Müller RF (1994) The Denys-Drash syndrome. *J Med Genet* **31**: 471–477.

Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart - van Houten DL, *et al.* (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* **93**: 445-454.

Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, *et al.* (1995) Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol Cell Biol* **15**: 1489-1498

Natoli TA, McDonald A, Alberta JA, *et al.* (2002) A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Mol Cell Biol* **22**: 4433-4438.

Niksic M, Slight J, Sanford JR, *et al.* (2004) The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum Mol Genet* **13**: 463-471.

Nowakowska-Kopera A, Sacha T, Florek I, *et al.* (2009) Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* **50**: 1326-1332.

Ogawa H, Ikegame K, Kawakami M, *et al.* (2004) WT1 gene transcript assay for relapse in acute leukemia after transplantation. *Leuk Lymphoma* **45**: 1747-1753.

Oji Y, Kitamura Y, Kamino E, *et al.* (2009) WT1 IgG antibody for early detection of nonsmall cell lung cancer and as its prognostic factor. *Int J Cancer* **125**: 381-387.

Oka Y, Tsuboi A, Murakami M, *et al.* (2003) WT1 peptide-based immunotherapy for patients with overt leukemia from myelodysplastic syndrome (MDS) or MDS with myelofibrosis. *Int J Hematol* **78**: 56-61.

Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, *et al.* (2000) Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol* **164**: 1873-1880.

Pennucci V, Zini R, Norfo R, *et al.* (2014) Abnormal expression patterns of WT1-as, MEG3 and ANRIL long non-coding RNAs in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis and their clinical correlations. *Leuk lymphoma* **16**: 1-5.

Perotti D, Mondini P, Giardini R, *et al.* (1998) No evidence of WT1 involvement in a Burkitt's lymphoma in a patient with Denys-Drash syndrome. *Ann Oncol* **9**: 627-631.

Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, *et al.* (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* **346**: 194-197.

Pritchard-Jones K, Renshaw J, King-Underwood L (1994) The Wilms tumour (WT1) gene is mutated in a secondary leukaemia in a WAGR patient. *Hum Mol Genet* **3**: 1633-1637.

Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Tournay OE, *et al.* (1990) Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* **250**: 1259-1262.

Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U (1978) Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* **61**: 604-610.

Richard DJ, Schumacher V, Royer-Pokora B, *et al.* (2001) Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev* **15**: 328-339.

Ritchie MF, Yue C, Zhou Y, *et al.* (2010) Wilms tumor suppressor 1 (WT1) and early growth response 1 (EGR1) are regulators of STIM1 expression. *J Biol Chem* **285**: 10591-10596.

Rivera MN, Haber DA (2005) Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* **5**: 699-712.

Rose EA, Glaser T, Jones C, *et al.* (1990) Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* **60**: 405-508.

Sadek HA, El-Metnawey WH, Shaheen IA, *et al.* (2011) Quantitative assessment of Wilms tumor 1 (WT1) gene transcripts in Egyptian acute lymphoblastic leukemia patients. *J Investig Med* **59**: 1258-1262.

Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, *et al.* (1999) Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem* **274**: 23456-23462.

Schedl A, Hastie N (1998) Multiple roles for the Wilms' tumour suppressor gene, WT1 in genitourinary development. *Mol Cell Endocrinol* **140**: 65-69.

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* **372**: 679-683.

Sugiyama H (2010) WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and Cancer Immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* **40**: 377-387.

Suri M, Kelehan P, O'Neill D, *et al.* (2007) WT1 mutations in Meacham syndrome suggest a coelomic mesothelial origin of the cardiac and diaphragmatic malformations. *Am J Med Genet A* **143**: 2312-2320.

Tiberio G, Digilio MC, Giannotti A (2000) Obesity and WAGR syndrome. *Clin Dysmorphol* **9**: 63-64.

Tosello V, Mansour MR, Barnes K, *et al.* (2009) WT1 mutations in T-ALL. *Blood* **114**: 1038-1045.

Vadasz Z, Shasha-Lavsky H, Nov Y, *et al.* (2013) Wilms' Tumor Gene 1: A Possible New Proangiogenic Factor in Hodgkin Lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **21**: 177-180.

Vidovic K, Svensson E, Nilsson B, *et al.* (2010) Wilms' tumor gene 1 protein represses the expression of the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in human hematopoietic progenitors and in leukemic cells. *Leukemia* **24**: 992-1000.

Vinchon M, Leblond P, Caron S, *et al.* (2011) Radiation-induced tumors in children irradiated for brain tumor: a longitudinal study. *Childs Nerv Syst* **27**: 445-453.

Wagner KD, Wagner N, Bondke A, *et al.* (2002) The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* **16**: 1117-1119.

Wagner KD, Wagner N, Schedl A (2003) The complex life of WT1. *J Cell Sci* **116**: 1653-1658.

Wagner N, Michiels JF, Schedl A, Wagner KD (2008) The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels *in vivo*. *Oncogene* **27**: 3662-3672.

Wagner N, Wagner KD, Scholz H, *et al.* (2006) Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**: R779-R787.

Wagner N, Wagner KD, Xing Y, *et al.* (2004) The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc* **15**: 3044-3051.

Wang YF, Yang YL, Gao ZF, *et al.* (2012) Clinical and laboratory characteristics of systemic anaplastic large cell lymphoma in Chinese patients. *J Hematol Oncol* **5**: 38.

Weber G, Caruana I, Rouse RH, *et al.* (2013) Generation of tumor antigen-specific T cell lines from pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia--implications for immunotherapy. *Clin Cancer Res* **19**: 5079-5091.

Wilhelm D, Englert C (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev* **16**: 1839–1851.

Xu S, Han JC, Morales A, *et al.* (2008) Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. *Cytogenet Genome Res* **122**: 181-187.

Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, *et al.* (2014) Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. *Am J Med Genet A* **164A**: 634-638.

Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, *et al.* (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **454**: 109-113.

Zimonyi I, Kemény K, Marosi A (1985) Akut lymphoid leukaemia kezelése közben diagnosztizált Wilms tumor a gyermekkorban. *Orv Hetil* **126**: 91-92.

8.2. Hivatalos igazolás az értekezés alapjául szolgáló saját közleményekről



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/297/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Buglyó Gergely

Neptun kód: E02J75

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1*. Ujj, Z., **Buglyó, G.**, Udvardy, M., Vargha, G., Biró, S., Rejtő, L.: WT1 Overexpression Affecting Clinical Outcome in Non-Hodgkin Lymphomas and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathol. Oncol. Res.* 20 (3), 565-570, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-013-9729-7>
IF:1.806 (2013)
2. **Buglyó, G.**, Méhes, G., Vargha, G., Biró, S., Mátyus, J.: WT1 microdeletion and slowly progressing focal glomerulosclerosis in a patient with male pseudohermaphroditism, childhood leukemia, Wilms tumor and cerebellar angioblastoma. *Clin. Nephrol.* 79 (5), 414-418, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5414/CN107276>
IF:1.232

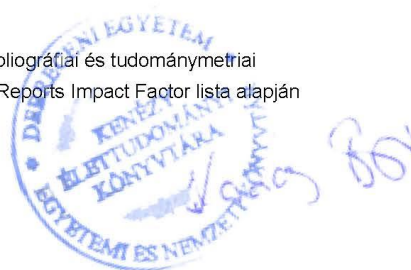
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,038

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,038

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.09.19.

*Ujj Zsófia és Buglyó Gergely megosztott első szerzők.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu

9. TÁRGYSZAVAK

Tárgyszavak: Wilms tumor 1, mikrodeléció, focalis segmentalis glomerulosclerosis, pszeudohermafroditizmus, génexpresszió, leukemia, non-Hodgkin lymphoma, köpenysejtes lymphoma

Keywords: Wilms tumor 1, microdeletion, focal segmental glomerulosclerosis, pseudohermaphroditism, gene expression, leukemia, non-Hodgkin lymphoma, mantle cell lymphoma

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, prof. dr. Biró Sándornak, amiért bevezetett ebbe az izgalmas kutatási területbe, és gondos irányítása alatt befejezhettem PhD munkámat.

Ugyancsak köszönettel tartozom szerzőtársaimnak, dr. Mátyus Jánosnak, dr. Ujj Zsófiának, dr. Rejtő Lászlónak, dr. Vargha Györgynek, dr. Méhes Gábornak, és prof. dr. Udvardy Miklósnak.

Szeretném megköszönni dr. Beyer Dánielnek, ill. a Humángenetikai Tanszék oktatóinak a kutatásomhoz, valamint jelen dolgozathoz fűzött hasznos tanácsaikat.

Külön köszönet illeti Kosztolányi Katalin asszisztentst a kísérletes munkában nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért.

Köszönöm a Humángenetikai Tanszék minden más munkatársának is, hogy mindig baráti légkörben dolgozhattam.

Végül köszönöm családomnak, hogy mellettem álltak, és támogattak abban, hogy befejezhessem ezt a dolgozatot.