UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM WYDZIAŁ LEKARSKI

Karol Stożek

Znaczenie zmian ekspresji i polimorfizmów genu WT1 w ostrej białaczce szpikowej u dzieci

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Walentyna Balwierz

Praca wykonana w Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum Kierownik jednostki: prof. dr hab. med. Walentyna Balwierz

Kraków 2012

Składam serdeczne podziękowania Pani Profesor Walentynie Balwierz za życzliwość, opiekę naukową oraz pomoc w trakcie powstawania niniejszej pracy.

Dziękuję Panu Doktorowi Mirosławowi Bik-Multanowskiemu za pomoc i cenne wskazówki podczas realizacji badań naukowych, Pani Doktor Annie Madetko-Talowskiej oraz całemu zespołowi Laboratorium Genetyki Molekularnej za wsparcie i miłą atmosferę podczas prowadzenia badań.

> Chciałbym podziękować moim przyjaciołom za to, że zawsze byli blisko mnie.

Dziękuję moim Rodzicom i całej mojej rodzinie za cierpliwość, wsparcie i wiarę w sens tego co robię.

SPIS TREŚCI

1. Wykaz skrótów	6
2. Wstęp	
2.1. Białaczki wieku dziecięcego	
2.2. Etiologia i epidemiologia AML	
2.3. Podstawy rozpoznania AML	
2.4. Klasyfikacja AML	
2.5. Charakterystyka immunologiczna w ostrej białaczce szpikowej	14
2.6. Zmiany cytogenetyczne i molekularne w AML	
2.7. Diagnostyka molekularna	
2.8. Leczenie AML	
2.9. Gen WT1	
2.9.1. Mutacje genu WT1	
2.9.2. Polimorfizmy genu WT1 w AML	
2.10. Gen FLT3	
3. Cel pracy	
4. Materiał i metody	
4.1. Charakterystyka badanej populacji	
4.2. Stosowane analizy statystyczne	
4.2.1. Metody statystyczne	
4.2.2. Charakterystyka przeprowadzonych analiz	
4.3. Metody i sprzęt laboratoryjny wykorzystane podczas doświadczeń	
4.3.1. Izolacja komórek monojądrzastych ze szpiku i krwi	obwodowej
z zastosowaniem wirowania w gradiencie gęstości przy użyciu odczy	nnika Ficoll
(Sigma-Aldrich)	
4.3.2. Izolacja RNA z zastosowaniem odczynnika Trizol (Invitrogen)	
4.3.3. Izolacja DNA z zastosowaniem odczynnika Trizol (Invitrogen)	
4.3.4. Analiza powtórzeń FLT3-ITD w oparciu o reakcję PCR	
4.3.5. Analiza ilościowa genów fuzyjnych z zastosowaniem reakcji RQ	-PCR 36
4.3.5.1. Odwrotna transkrypcja – RT PCR (Invitrogen)	
4.3.5.2. PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) z zastosowani	em systemu
TaqMan	

4.3.6. Analiza ilościowa genu WT1 z zastosowaniem reakcji PCR w czasie
rzeczywistym (RQ-PCR)
4.3.7. Analiza polimorfizmów wybranych odcinków genu WT1 metodą DHPLC
i sekwencjonowania44
5. Wyniki badań
5.1. Analiza występowania wybranych genów fuzyjnych54
5.2. Analiza powtórzeń tandemowych ITD w genie FLT355
5.3. Analizy dotyczące ekspresji genu WT157
5.3.1. Porównanie poziomu ekspresji genu WT1 we krwi obwodowej między
pacjentami z AML i zdrowymi osobami57
5.3.2. Analizy dotyczące ekspresji genu WT1 w badanej grupie pacjentów z AML
przed rozpoczęciem leczenia58
5.3.2.1. Ekspresja genu WT1 w szpiku kostnym
5.3.2.2. Ekspresja genu WT1 w krwi obwodowej
5.3.3. Poziom ekspresji genu WT1 a cechy związane z pacjentem
5.3.3.1. Płeć a ekspresja genu WT159
5.3.3.2. Wiek w chwili rozpoznania a poziom ekspresji genu WT1 59
5.3.4. Poziom ekspresji genu WT1 a cechy związane z białaczką60
5.3.4.1. Typ AML a poziom ekspresji genu WT161
5.3.4.2. Grupy ryzyka a poziom ekspresji genu WT1
5.3.4.2.1. Grupy ryzyka a poziom ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym 62
5.3.4.2.2. Grupy ryzyka a poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej63
5.3.4.3. Ekspresja genu WT1 a obecność wybranych genów fuzyjnych64
5.3.4.4. Wstępna liczba leukocytów a poziom ekspresji genu WT1 w krwi
obwodowej
5.3.4.5. Liczba blastów w krwi obwodowej a ekspresja genu WT167
5.3.4.6. Odsetek blastów w szpiku kostnym w chwili rozpoznania AML a
ekspresja genu WT168
5.3.5. Ocena różnic ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej
przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii
5.3.5.1. Porównanie ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej
przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii
analizowana u wszystkich ocenianych pacjentów70

5.3.5.2. Porównanie ekspresja genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej
przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii
analizowana u poszczególnych pacjentów71
5.3.6. Odsetek blastów w szpiku kostnym w 15. dniu leczenia (ocena wczesnej
odpowiedzi) a ekspresja genu WT173
5.3.7. Ocena przeżycia całkowitego
5.3.7.1. Analiza przeżycia całkowitego w całej badanej grupie
5.3.7.2. Analiza przeżycia całkowitego zależnie od grypy ryzyka
5.3.7.3. Analiza przeżycia całkowitego zależnie od ekspresji genu WT1
w obserwowanej grupie76
5.3.8. Gen WT1 i wybrane geny fuzyjne jako potencjalne markery monitorowania
minimalnej choroby resztkowej77
5.3.8.1. Zmiany ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych programu
terapeutycznego
5.3.8.1.1. Zmiany ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych
programu terapeutycznego u tych samych pacjentów
5.3.8.1.2. Zmiany ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych
programu terapeutycznego u wszystkich pacjentów włączonych do badań 81
5.3.8.2. Zmiany ekspresji genu WT1 i genów fuzyjnych w różnych punktach
czasowych programu terapeutycznego
5.3.8.3. Analiza polimorfizmów wybranych sekwencji związanych z regulacją
ekspresji genu WT1
5.4. Ocena stabilności RNA w otrzymanych próbkach szpiku i krwi obwodowej 97
6. Dyskusja
7. Wnioski 117
8. Streszczenie
9. Abstract
10. Piśmiennictwo
11. Spis tabel
12. Spis wykresów 158
13. Spis rycin

1. Wykaz skrótów

ABL	onkogen typu 1, z ang. c-ABL oncogene 1		
ALL	ostra białaczka limfoblastyczna, z ang. acute lymphoblastic		
	leukemia		
AML	ostra białaczka szpikowa, z ang. acute myeloid leukemia		
AML1	gen ostrej białaczki szpikowej 1, z ang. acute myeloid leukemia 1		
	gene		
AML1-ETO	gen fuzyjny powstały na skutek rearanżacji genów AML1 i ETO		
APL	ostra białaczka promielocytowa, z ang. acute promyelocytic		
	leukemia		
ATRA	kwas all-trans retinowy, z ang. all-trans retinoic acid		
CBFβ	gen czynnika wiążącego β , <i>z ang. core binding factor</i> β <i>gene</i>		
CBFβ-MYH11	gen fuzyjny powstały na skutek rearanżacji genów CBFβ		
	i MYH11		
CCL23	ligand chemokiny 23, z ang. chemokine (C-C motif) ligand 23		
CD	antygen różnicowania komórkowego, z ang. cluster of		
	differentiation		
cDNA	komplementarny DNA, ang. complementary DNA		
CEBPA	białko wzmacniające α wiążące motyw CCAAT, z ang.		
	CCAAT/enhancer-binding protein alpha		
CR	region konserwatywny, z ang. conserved region		
DFS	przeżycie wolne od choroby, z ang. disease-free survival		
DHPLC	wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa, z ang.		
	denaturating high performance liquid chromatography		
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy, z ang. deoxyribonucleic acid		
dNTPs	trifosforany deoksynukleotydów, z ang. deoxynucleotide		
	triphosphates		
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy, z ang. ethylene-		
	diaminetetraacetic acid		
EGR1	gen wczesnej odpowiedzi na wzrost 1, z ang. early growth		
	response 1 gene		
ETO	inaczej MTG8 - szpikowy transformujący gen chromosomu 8,		
	z ang. myeloid transforming gene chromosome 8		

Ex	ekson, z ang. exon		
FAB	klasyfikacja francusko-amerykańsko-brytyjska, z ang.		
	French-American-British		
FAM	karboksy-fluoresceina, z ang. carboxyfluorescine		
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, z ang. fluorescent in situ		
	hybridization		
FL	ligand FLT-3, z ang. FLT-3 ligand		
FLT3	receptor FLT3 o charakterze kinazy tyrozynowej, z ang.		
	receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3		
FMS	inaczej CSF1R, receptor czynnika 1 stymulującego tworzeni		
	kolonii, z ang. colony stimulating factor 1 receptor		
GAGED2	antygen G2 z rodziny D, z ang. G antigen family D member 2		
HEPES	kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynylo] etanosulfonowy,		
	z ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid		
HRG	grupa wysokiego ryzyka, <i>z ang. high risk group</i>		
ITD	wewnętrzne powtórzenia tandemowe, z ang. internal tandem		
	duplication		
KIT	receptor czynnika wzrostu komórek tucznych/macierzystych,		
	z ang. mast/stem cell growth factor receptor		
KTS	lizyna (K) – treonina (T) – seryna (S)		
LFS	czas przeżycia wolny od białaczki, z ang. leukemia-free survival		
MLL	gen białaczek szpikowej i limfo blastycznej, z ang. mixed-lineage		
	leukemia gene		
MRD	minimalna choroba resztkowa, z ang. minimal residual disease		
mRNA	informacyjny RNA, z ang. messenger RNA		
MSLN	mezotelina, z ang. mesothelin		
MYH11	gen łańcucha ciężkiego miozyny typu 11 z mięśnia gładkiego,		
	z ang. myosin, heavy chain 11, smooth muscle gene		
NCN	znormalizowana liczba kopii, z ang. normalized copy number		
NF-E1	inaczej czynnik transkrypcyjny YY1, z ang. YY1 transcription		
	factor		
NPM1	nukleofozmina 1, z ang. Nucleophosmin 1		
OS	całkowite przeżycie, z ang. overall survival		
PAX2	gen 2 kasety parującej, z ang. paired box gene 2		

PAX8	gen 8 kasety parującej, z ang. paired box gene 8		
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanami, z ang. phosphate		
	buffered saline		
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy, z ang. polymerase chain reaction		
PDGFRa	receptor α płytkopochodnego czynnika wzrostu, <i>z ang</i> .		
	platelet-derived growth factor receptor alpha		
PDGFRβ	receptor β płytkopochodnego czynnika wzrostu, <i>z ang</i>		
	platelet-derived growth factor receptor beta		
PML-RARa	gen fuzyjny powstały na skutek rearanżacji genów PML i RAR α		
PPGLBC	Polska Pediatryczna Grupa ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków		
PRAME	gen preferencyjnie ekspresjonowanego antygenu czerniaka, z ang.		
	preferentially expressed antigen of melanoma gene		
PTD	częściowe tandemowe duplikacje, z ang. partial tandem		
	duplication		
pz	par zasad		
RARα	receptor α kwasu retinowego, z ang. retinoic acid receptor alpha		
RC	remisja całkowita		
RNA	kwas rybonukleinowy, z ang. ribonucleic acid		
RTKs	receptor kinaz tyrozynowych, z ang. receptor tyrosine kinases		
RT PCR	PCR z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji, z ang. polymerase		
	chain reaction reverse transcription		
RUNX1	czynnik transkrypcyjny typu 1 związany z karłowatością, z ang.		
	runt - related transcription factor 1		
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu, z ang. single nucleotide		
	polymorphism		
Sp1	czynnik transkrypcyjny Sp1, z ang. Sp1 transcription factor		
SPAG6	antygen 6 białek witki plemnika, z ang. sperm associated antigen		
	6 (sperm flagellar protein)		
SRG	grupa standardowego ryzyka, z ang. standard risk group		
ST18	białko 18 hamujące nowotworzenie, z ang. suppression of		
	tumorigenicity 18		
STAT3	przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji typu 3, z ang. signal		
	transducer and activator of transcription 3		

TAMRA	karboksy-tatrametylorodamina, z ang. carboxytetramethyl-	
	rhodamine	
TE	bufor Tris-EDTA	
UCRBP	białko motywu UCR wiążące DNA, z ang. UCR-motif	
	DNA-binding protein	
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia, z ang. World Health	
	Organization	
WT1	gen 1 guza Willmsa, z ang. Willm's tumor 1 gene	
YY1	czynnik transkrypcyjny YY1, z ang. YY1 transcription factor	

2. Wstęp

2.1. Białaczki wieku dziecięcego

Nowotwory układu krwiotwórczego stanowią najczęstszą (30%) grupę spośród wszystkich chorób rozrostowych u dzieci. Białaczki ze względu na przebieg choroby dzielimy na ostre i przewlekłe. Wśród postaci ostrych wyróżnia się dwie najczęściej występujące: ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL) i ostrą białaczkę szpikową (AML), stanowiące odpowiednio: 80% i 15% przypadków. Pozostałe postaci ostrej białaczki, czyli ostra białaczka niezróżnicowana, ostra białaczka mieszana i mięsak szpikowy, występują rzadko i u dzieci nie przekraczają 0,5%. Białaczka przewlekła stanowi 3-5% [12, 35, 99, 139].

AML jest chorobą dotyczącą klonalnego rozrostu niedojrzałych komórek z układu granulopoetycznego, monocytarnego, erytropoetycznego, megakariocytarnego. Nadmierna liczba komórek blastycznych w szpiku powoduje zahamowanie prawidłowej hematopoezy. Skutkuje to niedokrwistością, trombocytopenią i zaburzeniami odporności, co objawia się między innymi osłabieniem, apatią, krwawieniem i podatnością na zakażenia. Komórki nowotworowe, krążące we krwi obwodowej, posiadają zdolność naciekania tkanek. AML jest chorobą zróżnicowaną pod względem morfologii i zmian cytogenetycznych [12, 139].

2.2. Etiologia i epidemiologia AML

Zapadalność na białaczki wynosi około 3,5 przypadków na 100 000 osób w ogólnej populacji dziecięcej. W Polsce odpowiada to około 350 nowym zachorowaniom na ALL i około 80 na AML rocznie. Ostre białaczki występują nieco częściej u płci męskiej (1,2:1). W przypadku AML rozkład częstości występowania choroby w zależności od płci nie jest tak zaznaczony [12, 56, 99].

Przyczyny powstania białaczki nie są znane. Rozwój nowotworów jest bardzo złożony i zależy od wielu czynników zarówno genetycznych jak i środowiskowych. W patogenezie białaczek istotną rolę odgrywają takie czynniki jak: promieniowanie jonizujące, środki chemiczne (np. benzen), leki alkilujące. Podwyższone ryzyko wystąpienia białaczki obserwuje się u osób spokrewnionych, np. u rodzeństwa [12, 48, 74, 118, 175].

Białaczki częściej diagnozuje się u osób, u których stwierdzone są pewne zaburzenia genetyczne. Do takich zaburzeń należą m. in.: Zespół Downa, zespół Blooma, zespół Shwachmana, zespół Rubinsteina i Taybiego, zespół Wiskotta-Aldricha i niedokrwistość Fanconiego. AML może występować również jako wtórny nowotwór [12, 74, 118, 175].

2.3. Podstawy rozpoznania AML

W każdym przypadku białaczki konieczne jest wykonanie morfologii i obrazu krwi obwodowej. Rozpoznanie tej choroby powinno być ustalone na podstawie badania szpiku kostnego, a tylko w wyjątkowych sytuacjach na badaniu krwi obwodowej (hiperleukocytoza blastyczna i zły stan ogólny dziecka). Szpik do badania powinien być pobierany w specjalistycznym ośrodku, dysponującym możliwościami pełnej oceny cytomorfologicznej, cytochemicznej i cytoenzymatycznej, immunologicznej, cytogenetycznej i molekularnej [12].

Głównym kryterium rozpoznania AML jest obecność 25% lub więcej mieloblastów we krwi lub szpiku, wywodzących się z linii nielimfoidalnej, z układów takich, jak: granulocytarny, monocytarny, erytroidalny i megakariocytarny. Atypowe promielocyty w białaczce promielocytowej i promonocyty z różnicowaniem monocytarnym w białaczce mieloblastycznej są uważane za ekwiwalent blastów. W większości przypadków szpik jest bogatokomórkowy i całkowicie zasiedlony przez komórki blastyczne [12, 139]. Rozpoznanie pierwotnej erytroleukemii jest bardzo rzadkie i jest oparte m. in. na procentowej (ponad 50%) zawartości atypowych erytroblastów. Zaleca się, aby odsetek blastów w szpiku był określony na podstawie liczenia co najmniej 500 komórek w preparatach rozmazowych barwionych wg Romanowskiego. We krwi różnicowanie powinno obejmować ponad 200 komórek nieerytroidalnych. Rekomendacje dotyczące klasyfikacji odnoszą się wyłącznie do próbek pobranych przed chemioterapią [12].

Badanie cytochemiczne i cytoenzymatyczne ułatwiają różnicowanie ALL i AML oraz typów białaczki w obrębie AML. Wykonuje się barwienia, takie jak: reakcja PAS, barwienie na obecność mieloperoksydazy (MPO), sudanem czarnym B (BB) oraz na obecność specyficznej esterazy chlorooctanu (AS-D) naftolu i niespecyficznej esterazy alfa naftolu, hamowanej całkowicie przez fluorek sodu (NSE+NAT) [12, 21].

2.4. Klasyfikacja AML

Klasyfikację AML można prowadzić na podstawie morfologii komórek, immunofenotypu i zmian cytogenetycznych. Według klasyfikacji FAB (francusko-amerykańsko-brytyjskiej) wyróżnia się 8 typów AML: M₀-M₇.

Typ M_0 (białaczka skrajnie niezróżnicowana) na ogół charakteryzuje się blastami średnich rozmiarów o jądrach okrągłych lub lekko wklęsłych z widoczną obecnością jednego bądź dwóch jąderek oraz brakiem pałeczek Auera. Cytoplazmę cechują brak ziarnistości i różny stopień zasadochłonności. W nielicznych przypadkach małe komórki blastyczne mogą przypominać limfoblasty. Typ M_0 stanowi 0-6% przypadków AML u dzieci. Zaburzenia cytogenetyczne występujące w tym typie to trisomia 4, trisomia 8, trisomia 13 i monosomia 7 [12, 103, 131, 175].

Typ M_1 (białaczka bez cech dojrzewania) cechują blasty bezziarniste przypominające typ L2 w ALL lub posiadające drobne ziarnistości. Mogą być obecne pałeczki Auera. Typ M_1 stanowi 10-21% przypadków AML u dzieci [12, 103, 131, 175].

Typ M_2 (białaczka z cechami dojrzewania) charakteryzują blasty o licznych ziarnistościach. Często obserwuje się pałeczki Auera. Typ ten jest obecny w 27-30% przypadków AML u dzieci. Obserwowane zmiany cytogenetyczne to t(8;21), t(6;9), rzadziej t(8;16) [12, 74, 103, 131, 175].

 M_3 (białaczka promielocytowa) związany jest obecnościa Typ Z nieprawidłowych promielocytów, które stanowia główny klon komórek nieerytroidalnych. Komórki cechują nerkowate lub dwupłatowe jądra, liczne ziarnistości oraz skupiska pałeczek Auera (tzw. fagoty). Wyróżnia się wariant (M3v) z komórkami uboższymi w ziarnistości. Charakterystyczną zmianą cytogenetyczną obserwowaną w tym typie jest t(15;17). Opisano również aberrację t(11;17) [12, 74, 103, 175]. W dziecięcej AML typ M₃ występuje u 2-17% chorych. W przypadku Ameryki Środkowej i Południowej jak również krajów basenu Morza Śródziemnego stwierdza się częstsze występowanie typu M₃ u dzieci [12, 19, 64, 78, 133, 137, 171, 182, 211, 213].

Typ M_4 (białaczka mielomonocytowa), w którym występują komórki układu mieloidalnego i monocytarnego, stanowiące 20-80% komórek nieerytroidalnych. W przypadku wyższego niż 80% odsetka komórek monocytarnych rozpoznaje się typ M_5 . Monoblasty są dużymi komórkami charakteryzującymi się obfitą cytoplazmą zasadochłonną. W cytoplazmie mogą być obecne wakuole i ziarnistości azurofilne. Obserwuje się duże, okrągłe jądra z jednym lub więcej jąderkami. Promonocyty posiadają jądra bardziej nieregularne, cytoplazmę mniej zasadochłonną i czasem bardziej zaznaczone ziarnistości, rzadko występują ziarnistości azurofilne i wakuole. W krwi obwodowej obserwuje się zwiększoną liczbę monocytów, które są bardziej dojrzałe niż monocyty w szpiku. Typ M₄ jest obecny u 16-25% przypadków dzieci z AML. W części przypadków występuje inv(16) [12, 74, 175].

Typ M_5 (białaczka monoblastyczna) charakteryzuje się obecnością monoblastów, promonocytów lub monocytów, które stanowią ponad 80% komórek szpiku o charakterze nieerytroidalnym. Wyróżnia się podtyp M_5a (ostra białaczka monoblastyczna) i M_5b (ostra białaczka monocytowa) w zależności od stopnia zróżnicowania komórek. Pałeczki Auera są rzadko obecne. Typ M_5 stanowi 13-22% przypadków AML u dzieci. Obserwowane są aberracje t(9;11), t(8;16) jak również rearanżacje w obrębie genu MLL inne niż t(9;11) [12, 74].

Typ M_6 (erytroleukemia) występuje wtedy, gdy w szpiku stwierdza się erytroblasty o różnym stopniu dojrzewania z przesunięciem w kierunku form niedojrzałych. Erytroleukemię rozpoznaje się wtedy, gdy erytroblasty stanowią ponad 50% wszystkich komórek jądrzastych szpiku, a mieloblasty ponad 30% pozostałych komórek. Obserwuje się komórki dysplastyczne z megaloblastycznymi jądrami, obecne są także formy dwu lub wielojądrzaste. Wakuole komórkowe są słabo rozdzielone. Typ M_6 jest obecny u 0-5% przypadków dziecięcej AML. Często występują zmiany strukturalne w obrębie chromosomów 5 i 7 [12, 23].

Typ M₇ (białaczka megakariocytowa) charakteryzują komórki o charakterze polimorficznym, blasty stanowią powyżej 30% komórek jądrzastych szpiku. Megakarioblasty zawierają okrągłe, lekko nieregularne jądro i jedno do trzech jąderek. Cytoplazma zasadochłonna, często bez ziarnistości, może tworzyć nibynóżki. W cytoplazmie często widoczne są pęcherzyki. Blasty małe z wysokim stosunkiem jądra do cytoplazmy mogą przypominać limfoblasty. W rozmazie widoczne są również: mikromegakariocyty, fragmenty megakarioblastów, dysplastyczne płytki i neutrofile z małą liczbą ziarnistości. Typ M₇ obserwuje się u 4-8% przypadków AML u dzieci [12, 74, 175].

W roku 2001 Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *z ang. World Health Organisation*) zaproponowała nowy podział AML. Klasyfikacja WHO, w przeciwieństwie do FAB, uwzględnia nie tylko zmiany morfologiczne

i immunofenotypowe, ale także zaburzenia cytogenetyczne. W diagnostyce białaczek odsetek blastów w szpiku obniżono z 30% do 20%. Od 2008 roku, po wprowadzeniu kolejnych zmian, klasyfikacja WHO została powszechnie wprowadzona do diagnostyki AML u dorosłych. Klasyfikacja WHO nie uwzględnia jednakże odrębności występujących w wieku dziecięcym, w związku z tym nie została jeszcze rutynowo wprowadzona w hematologii i onkologii dziecięcej [6, 202].

2.5. Charakterystyka immunologiczna w ostrej białaczce szpikowej

Тур	Markery immunologiczne
Ma	Ekspresja jednego lub więcej antygenów takich jak: CD11b, CD13, CD14 (<10%), CD15 (10-49%), CD33, CD65, HLA DR, CD34.
1010	Koekspresja markerów linii T (10-49%)): CD2, CD7.
	Koekspresja markerów linii B (10-49%): CD19.
	CD13, CD15, CD33, CD65, HLA DR, CD34.
M_1	Koekspresja markerów linii T (10-49%): CD2, CD7.
	Koekspresja markerów linii B (10-49%): CD19.
	CD13, CD15, CD33, CD65, HLA DR, CD34.
M ₂	Koekspresja markerów linii T (10-49%): CD2, CD7.
	Koekspresja markerów linii B (10-49%): CD19.
Ma	CD13, CD15, CD33, CD65.
1013	Koekspresja markerów linii T (10-49%): CD2.
	CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD65, HLA
M_4	DR, CD34.
	Koekspresja markerów linii T: CD2 (20-49%), CD4 (>80%), CD7 (10-49%).
	CD4, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD65,
	HLA DR.
M ₅	Koekspresja markerów linii T: CD2 (20-49%), CD7 (10-49%), CD56 (10-49%).
	CD34 – czesto ujemny
M ₆	CD13, CD33, glikoforyna A (100%).
	CD 36, CD41, CD61, dodatnie mogą być CD13 i CD33, ujemne
M_7	markery (często u dzieci): CD45, HLA DR, CD34.
	Markery limfoidalne: ujemne (czasem może występować CD7).

Tabela 1. Występowanie antygenów powierzchniowych w określonym typie AML [11, 12].

W diagnostyce ostrych białaczek nadal ważną rolę odgrywają badania immunologiczne [21, 175]. W AML ekspresji ulegają antygeny powierzchniowe, odróżniające komórki białaczkowe od komórek prawidłowych. Antygeny uznawane za specyficzne dla ostrej białaczki szpikowej to m. in.: CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD41, CD61 i glikoforyna A. Mogą pojawić się również antygeny charakterystyczne dla linii limfoidalnych T i B, ale w mniejszym odsetku. Około 60% blastów wykazuje silnie zróżnicowaną ekspresję antygenów, a ich występowanie związane jest często z określonym typem AML (Tabela 1) [11, 12, 175, 195].

2.6. Zmiany cytogenetyczne i molekularne w AML

U pacjentów z AML wyróżnia się zmiany związane ze specyficznymi rearanżacjami chromosomalnymi (Tabela 1) oraz związane ze zmianą ekspresji poszczególnych genów.

Badania cytogenetyczne stanowią ważny rodzaj badań w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego. Nieprawidłowości dotyczą zmian liczbowych i strukturalnych w obrębie chromosomów. Identyfikacja specyficznych nieprawidłowości pozwala na bardziej precyzyjną diagnozę oraz zakwalifikowanie pacjenta do odpowiedniego typu AML i grupy ryzyka. Najczęściej występujące zmiany cytogenetyczne o istotnym znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym przedstawiono w Tabelach 1-3 [12, 78, 147, 175, 177].

Pacjenci z normalnym kariotypem, w grupie dziecięcej, stanowią 15-30% wszystkich przypadków AML. Natomiast u dorosłych brak zmian cytogenetycznych wykazuje 40-47% pacjentów [78, 213].

W komórkach białaczkowych u dzieci z AML nieprawidłowości chromosomalne stwierdzane są u około 80% przypadków, a ich częstość zależy od grupy etnicznej czy regionu geograficznego [19, 41, 59, 64, 81, 116, 122, 136, 171, 178, 182, 238]. Najczęściej występującymi zmianami są: t(1;22), t(6;9), t(8;21), t(9;11), t(11q23), t(15;17), inv3/t(3;3), inv16 i monosomia 7 (Tabela 2). Każda z tych zmian związana jest z charakterystycznymi cechami biologicznymi i klinicznymi białaczki [77, 78, 100, 170, 175, 177, 213].

Wśród niekorzystnych czynników prognostycznych, oprócz aberracji chromosomalnych (Tabela 3), wyróżnia się również: początkową liczbę krwinek białych powyżej 100000/mm³, AML jako wtórny nowotwór, zespół mielodysplastyczny

poprzedzający AML, M₅, złą odpowiedź na zastosowane leczenie indukcyjne, w tym opóźnioną remisję [12].

W wyniku niektórych rearanżacji chromosomowych powstają geny fuzyjne. W przypadku dziecięcej AML ich występowanie waha się od 31 do 45% wszystkich przypadków. Obecność danego genu fuzyjnego związana jest często z określonym typem AML. Ze względu na znaczenie diagnostyczne i rokownicze genów fuzyjnych ich oznaczenie powinno być przed rozpoczęciem leczenia.

AML1-ETO powstaje na skutek translokacji t(8;21)(q22;q22) i jest jednym z częstszych zaburzeń spotykanych w dziecięcej AML. W tym przypadku dochodzi do fuzji genu AML1 (RUNX1) na chromosomie 21q22 i ETO na chromosomie 8q22. Wśród pacjentów z AML translokacja t(8;21) występuje w 7-16% i jest korelowana z typem M₂ wg klasyfikacji FAB [19, 41, 64, 78, 116, 136, 171, 178, 213, 238]. Obecność tej translokacji częściej stwierdza się u dzieci starszych i płci męskiej, charakteryzuje się wysokim odsetkiem remisji i długotrwałym przeżyciem. Pomimo tego u części pacjentów obserwuje się nawrót choroby [137, 192, 206]. Ryzyko wznowy AML zwiększa m. in. obecność mutacji w obrębie genu KIT (silny związek z gorszym rokowaniem) i genu FLT3 oraz powtórzenia tandemowe w obrębie tego genu [151, 206, 254]. W przypadku dodatkowych zmian, w tym delecji 9q, niektórzy autorzy sugerują również gorsze rokowanie [64, 78, 137, 178, 213, 238].

Translokacja t(15;17)(q22;q21) związana z ostrą białaczką promielocytową (AML M₃), powstaje na skutek fuzji genu RAR α na chromosomie 17q11-21 i PML na chromosomie 15q22. Powstały transkrypt koduje białko PML-RAR α , które wpływa na zahamowanie różnicowania promielocytów [136]. Obecnie uzyskuje się dobre wyniki leczenia (70-90% wyleczeń zarówno dzieci, jak i dorosłych) z zastosowaniem chemioterapii i pochodnych kwasu retinowego, który indukuje różnicowanie niedojrzałych komórek w tym typie białaczki [116]. Obecność t(15;17) wydaje się być częstsza w przypadku płci żeńskiej jak również charakteryzuje się częstszym występowaniem izoform bcr2 i bcr3 [133]. Wśród dzieci z M₃ stosunkowo często stwierdza się duplikację FLT3-ITD, co jest silnie skorelowane z wysoką liczbą leukocytów [8]. Dodatkowe aberracje genetyczne to trisomia chromosomu 8 i rzadziej izochromosom 17q [136].

Inwersję chromosomu 16 (inv16) łączy się przede wszystkim z typem M_4 wg klasyfikacji FAB z eozynofilią. Zaburzenie to zostało opisane również w innych typach AML tj. M_0 , M_1 , M_2 i M_5 [29]. Rearanżacja ta skutkuje pojawieniem się genu

fuzyjnego CBFβ-MYH11, powstałego z połączenia genu CBFβ 16q22 i genu MYH11 16p13 [19, 29]. Częstość występowania inv16 w przypadku grupy pediatrycznej AML wynosi 3-8%, częstsze występowanie obserwowano u rasy żółtej [29, 30, 64, 78, 122, 136, 137, 178, 213, 238, 246]. Pacjenci z tą aberracją mają lepsze rokowania i wykazują znacznie wyższy odsetek remisji całkowitej niż w przypadku pacjentów z prawidłowym kariotypem [19, 178, 238]. Trisomia 22 jest zaburzeniem często korelowanym z inv16. Dodatkowymi zaburzeniami chromosomalnymi są trisomia 8 i zaburzenia 7q [8, 136, 242, 254].

Tabela 2. Główne nieprawidłowości chromosomalne i zaburzenia genowe w dziecięcej AML [147, 175, 177].

Kariotyp	Zmiana genetyczna	Dominujący typ wg FAB	Częstość występowania (%)
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	M2, eozynofilia	12-15
zaburzenia 11q23	MLL-różne	M4, M5	10-15
t(9;11)(p21-22;q23)	MLL-AF9	M5	6-8
t(15;17)(q22;q12-21)	PML-RARa	M3, M3v	8-10
inv16(p13q22) t(16;16)(p13;q22)	CBFβ-MYH11	M4Eo, eozynofilia	6-8
t(10;11)(p13;q21)	AF10-CALM	różne typy	2
t(6;9)(p23;q34)	DEK-CAN	M2, bazofilia	1
t(8;16)(p11;p13)/inv(8)(11q13)	MOZ-CBP/TIF2	M4, M5	1
t(1;22)(p13;q13)	RBM15-MKL1	M7	<1
t(3;5)(q25;q34)	NPM-MFL1	M2	<1
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	M1	<1
t(11;20)(p15;q11)	NUP98-TOP1	różne typy	<1
monosomia 7 lub delecja 7q		dysplazja	2
trisomia 8*		różne typy	2
trisomia 21 ⁺		M7	2
złożony (≥ 3 zaburzeń)		różne typy	10-15
prawidłowy		różne typy	20-25

* pojedyncze zaburzenie chromosomalne

⁺ pojedyncze zaburzenie chromosomalne w zespole Downa

Grupa ryzyka	Zmiany cytogenetyczne		
	t(8;21)		
Korzystna	t(15;17)		
	inv(16)		
	Brak zmian		
Pośrednia	Niezakwalifikowane zaburzenia cytogenetyczne do żadnej z grup ryzyka		
	Monosomia 5		
	Monosomia 7		
	Del(5q)		
	Del(7q)		
Niekorzystna	t(6;9)		
	t(9;22)		
	zaburzenia 11q		
	zaburzenia 3q		
	złożone (klon prezentujący ≥5 zaburzeń cytogenetycznych)		

Tabela 3. Rearanżacje chromosomowe i związane z nimi grupy ryzyka [78].

Rearanżacje dotyczące genu MLL są jednymi z najczęściej obserwowanych zaburzeń w dziecięcej AML, zwłaszcza w typach M₄ i M₅. Stanowią one od 14-22% przypadków i są łączone z różnym znaczeniem prognostycznym [65, 81, 171, 182, 193, 213]. W przypadku dzieci poniżej pierwszego roku życia zmiany w obrębie MLL dotyczą powyżej 50% przypadków [19, 33, 81, 176, 229, 230]. Do dziś znanych jest ponad 50 translokacji MLL, w których udział biorą różne geny partnerskie. Do obserwowanych rearanżacji 11q23 należa: najczęściej t(9;11)(p21;q23), t(10;11)(p13;q23) i t(11;19)(q23;p13) [81]. Translokacje MLL t(11q23), inne niż t(9;11), w wielu przypadkach korelowano z gorszym rokowaniem, ale niektórzy autorzy łączą opisywane zmiany z pośrednią grupą ryzyka [16, 33]. Obecność zmian cytogenetycznych w obrębie MLL nie wpływa na rokowanie pacjentów z niskiej grupy ryzyka, u których stwierdzono obecność zmian t(8;21), inv(16) lub t(15;17) [153]. W obrębie genu MLL może dochodzić do tzw. częściowych tandemowych duplikacji MLL-PTD. Występują one rzadko u dzieci, ale wpływają na gorsze rokowanie, krótszy całkowity czas przeżycia (OS, *z ang. overall survival*) i przeżycie wolne od choroby (DFS, *z ang. disease-free survival*) [16, 204, 205].

Tabela 4. Kryteria klasyfikacji pacjentów do określonej grupy ryzyka wg programu AML BFM Interim 2004. Program stosowany od 2005 r. w ośrodkach Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBC) [12].

Grupa standardowego ryzyka (SRG)	Grupa wysokiego ryzyka (HRG)
AML FAB M ₃ , t(15;17)	AML FAB M ₀
AML + zespół Downa	AML FAB M ₁ /M ₂ bez pałeczek Auera
AML FAB M ₁ /M ₂ z pałeczkami Auera*	AML FAB M ₄
AML FAB M ₁ /M ₂ ; t(8;21)*	AML FAB M5
AML FAB M ₄ Eo*; inv(16)*	AML FAB M ₆
	AML FAB M7

* Gdy duplikacja genu FLT3 lub w 15 dniu leczenia odsetek blastów >5%, lub odnowa blastyczna po aplazji stwierdzonej w 15 dniu leczenia – pacjenta należy przekwalifikować do grupy wysokiego ryzyka.

W AML ulegają podwyższonej ekspresji geny takie jak: WT1 (70-90%), BAD-BAX-BCL2 (70-80%), PRAME (60%), CCL23, GAGED2, MSLN, SPAG6 i ST18. Duplikacja genu FLT3 stanowi jeden z niekorzystnych czynników prognostycznych [98, 110, 119, 163, 177, 214].

2.7. Diagnostyka molekularna

Ważnym elementem diagnostycznym w AML są badania genetyczne obejmujące jakościowe i ilościowe oznaczenia molekularnych zmian w genotypie pacjentów. Badania molekularne charakteryzują się wysoką czułością (w porównaniu do technik mikroskopowych) przez co odgrywają istotną rolę w przypadku monitorowania choroby oraz określenia ryzyka wystąpienia wznowy choroby. Wykrywanie w czasie i po zakończonym leczeniu przetrwałych komórek białaczkowych ma duże znaczenie prognostyczne w wyodrębnieniu pacjentów z niskim i wysokim ryzykiem niepowodzenia leczenia, co może stanowić podstawę do różnicowania terapii. Za całkowitą remisję uznaje się maksymalny odsetek blastów w obrazie szpiku na poziomie 5%. Uważa się, że w momencie remisji stwierdzonej mikroskopowo, u pacjenta może być obecnych nadal około 10¹⁰ komórek białaczkowych, określanych mianem minimalnej choroby resztkowej (MRD) [147, 165, 175]. W celu oznaczania MRD stosowane są metody immunologiczne (cytometria przepływowa) i molekularne (PCR i QRT-PCR).

W ostatnich latach, w monitorowaniu MRD, podkreśla się znaczenie genów fuzyjnych. Niestety nie występują one we wszystkich przypadkach ostrych białaczek, a częstość ich występowania zależy również od wieku pacjenta i typu białaczki. Poszukuje się zatem innych markerów umożliwiających monitorowanie MRD. Jednym z markerów genetycznych, wykorzystanych w oznaczaniu MRD może być gen WT1, ulegający nadekspresji w ponad 70% (70-90%) przypadków AML u dzieci [18, 20, 108, 119, 142, 156, 163].

2.8. Leczenie AML

Terapia stosowana w AML ma na celu zniszczenie komórek białaczkowych w szpiku kostnym i we wszystkich pozaszpikowych lokalizacjach choroby z doprowadzeniem do wyleczenia przy użyciu wielolekowej terapii. Pierwszym zadaniem leczenia jest uzyskanie remisji choroby, a następnie jej utrzymanie. Ogólne zasady terapii AML obejmują z reguły: cytoredukcję (u pacjentów z liczbą krwinek białych powyżej 50000/mm³), leczenie indukcyjne, a następnie dwufazową lub blokową konsolidację, intensyfikację leczenia w grupie wyższego ryzyka, zapobieganie białaczce ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz leczenie podtrzymujące i postępowanie wspomagające. Faza intensyfikacji leczenia bywa uzupełniana lub zastępowana przez autologiczne lub allogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych [12, 21, 103, 118, 175].

Leczenie indukcyjne bazuje na zastosowaniu najskuteczniejszych leków w AML tj.: cytarabiny, tioguaniny, etopozydu oraz antracyklin (daunorubicyna, idarubicyna lub mitoksantron) [40, 60, 104, 140, 183, 187]. Podczas leczenia dochodzi do aplazji szpiku kostnego. Działanie cytostatyków ma różne mechanizmy. Leki te mogą powodować odcinkowe złamania DNA, wbudowywać się pomiędzy nici DNA hamując w ten sposób jego syntezę, a jako analogi zasad purynowych lub pirymidynowych blokować transkrypcję. Uzyskaną remisję zwykle konsoliduje się cykliczną chemioterapią W okresie immunosupresji należy stosować intensywne działanie wspomagające [1, 202]. Znaczenie leczenia konsolidującego i podtrzymującego remisję AML nadal jest przedmiotem badań i kontrowersji. Przeszczepienie szpiku kostnego, rozpoczęte w AML pod koniec lat siedemdziesiątych, stanowi obecnie uznany element leczenia, szczególnie w grupie wysokiego ryzyka. Jednakże obserwowana poprawa wyników leczenia, uzyskiwana po zastosowaniu konwencjonalnej chemioterapii, szczególnie w grupach niskiego ryzyka, zmusza do dokonania ponownej analizy i weryfikacji wskazań do allogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych [12].

Wprowadzany w 2005 r. w ośrodkach Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBC) program leczenia AML (AML BFM Interim 2004), stosowany przez Niemiecką Onkologiczną Pediatryczną grupę (BFM) przedstawiono w zarysie na Rycinie 1.

U dzieci, u których rozpoznano typ M_3 (APL – białaczka promielocytowa, *z ang. acute promyelocytic leukemia*), a także u pacjentów z zespołem Downa stosuje się odpowiednie modyfikacje terapii.

W przypadku APL równocześnie z chemioterapią stosuje się kwas all-trans retinowy (ATRA). Stymuluje on różnicowanie komórek białaczkowych do dojrzałych granulocytów i ich śmierci [212, 220], co przyczynia się do istotnego zmniejszenia objawów skazy krwotocznej. W APL często występują zaburzenia krzepnięcia. Zastosowanie ATRA znacząco wpłynęło na zmniejszenie liczby zgonów spowodowanych krwawieniami [132]. W przypadku wysokiej liczby krwinek białych zastosowanie chemioterapii przed ATRA powoduje obniżenie ryzyka wystąpienia tzw. zespołu ATRA, występującego u 10% leczonych dzieci. Zespół ten charakteryzuje się wysoką gorączką, niewydolnością oddechową, wysiękami w obrębie opłucnej i osierdzia. Wprowadzenie do APL preparatu ATRA spowodowało istotny wzrost odsetka uzyskanych i utrzymujących się remisji [76, 222].

U dzieci z zespołem Downa obserwuje się wyższą zapadalność na białaczki [85] ale wyniki leczenia AML, w tej grupie pacjentów, są zadawalające i często lepsze niż u dzieci bez zespołu Downa [38, 115, 127, 181]. Dzieci z zespołem Downa i AML w porównaniu do dzieci nie obarczonych tym zespołem są młodsze, mają niższą liczbę białych krwinek oraz częściej typ M₇ [38, 86, 115, 181, 210, 252]. Obecnie w AML u dzieci z zespołem Downa programy leczenia są mniej intensywne niż ogólnie stosowane. Dobrą odpowiedź na zastosowaną chemioterapię uzyskuje się stosując niższe dawki antracyklin i cytarabiny [68, 221, 253]. Komórki białaczkowe u dzieci w zespole Downa wykazują wyższą podatność na apoptozę [84, 180]. Często u tych

dzieci, białaczkę poprzedza zespół mielodysplastyczny. W tym przypadku zastosowanie terapii takiej jak dla AML daje dużą szansę na wyleczenie [115, 212].



*** Inne postępowanie dla dzieci z AML z zespołem Downa i dla dzieci z AML M₃

**** Jeden raz w tygodniu, przez 4 tygodnie od rozpoczęcia leczenia podtrzymującego

Rycina 1. Ogólny schemat leczenia AML BFM Interime 2004 [12].

Dzięki stosowanym metodom leczenia AML 75-85% dzieci uzyskuje remisje. U ponad 25% pacjentów dochodzi do wznowy choroby. Wyniki leczenia nawrotów są ciągle złe [37, 39, 50, 51, 52, 175, 177].

2.9. Gen WT1

Gen WT1 opisano jako gen związany z dziecięcym guzem Willms'a. Zbudowany jest z dziesięciu eksonów zlokalizowanych na chromosomie 11 (11p13). Koduje białka, o charakterze czynników transkrypcyjnych, o wielkości 52-65 kDa (potencjalnie 16 izoform). Białka zbudowane są z dwóch głównych domen: N i C-terminalnej. Domena N, bogata w reszty proliny i glutaminy, bierze udział w regulacji transkrypcji. C-terminalna domena, wiążąca DNA, zawiera cztery Cys₂His₂ struktury palców cynkowych kodowanych przez eksony 7-10. Palce cynkowe II, III i IV wykazują około 64% homologii do motywów cynkowych w EGR1. Palec cynkowy I odgrywa ważną rolę w wiązaniu RNA [14, 27, 28].

mRNA genu WT1 posiada dwa miejsca inicjacji translacji oraz podlega alternatywnemu składaniu, w którym udział biorą dwa niezależne od siebie regiony: ekson 5 (Ex5) oraz odcinek, o długości 9 par zasad (pz) na 3' końcu eksonu 9 (pomiędzy palcami cynkowymi III i IV), kodujący trzy aminokwasy - lizynę, treoninę i servne (KTS). Ex5, kodujący sekwencje 17 aminokwasów (w tym pięć servn i jedna treoninę – potencjalne miejsca fosforylacji białkowej), w dojrzałym mRNA może zostać właczony bądź wykluczony. Obecność sekwencji KTS wpływa na specyficzność wiązania do DNA. W wyniku obróbki potranskrypcyjnej powstają cztery izoformy mRNA: Ex5⁻-KTS⁻, Ex5⁺-KTS⁻, Ex5⁻-KTS⁺ i Ex5⁺-KTS⁺. Alternatywne składanie regulowane jest w zależności od typu komórek (wykazuje tkankową specyficzność) jak również zależy od stopnia zróżnicowania (dotyczy również typów AML wg klasyfikacji FAB). Regulacja może odbywać się na poziomie zależności pomiędzy różnymi izoformami i/lub innymi czynnikami co może mieć znaczący wpływ na równowage pomiędzy proliferacja, różnicowaniem i apoptozą. Różne izoformy WT1 pełnia odmienne funkcje komórkowe m. in. regulują procesy transkrypcji (poprzez wiązanie się do DNA) czy składania mRNA [14, 80, 113, 134, 186].

Gen WT1 jest ważnym czynnikiem regulatorowym. Bierze udział we wzroście i rozwoju komórek organizmu. Jego ekspresja jest tkankowo specyficzna. W rozwoju embrionalnym ekspresja genu WT1 związana jest głównie z układem moczowo-płciowym. Aktywność genu wymagana jest również dla prawidłowego rozwoju gonad, nerek, serca, siatkówki i płuc. Pełni kluczową rolę w prawidłowej miogenezie jak również w różnicowaniu płci. Wykazano powiązania pomiędzy wysoką ekspresją genu WT1 a chorobami nowotworowymi układu hematopoetycznego (białaczki i zespoły mielodysplastyczne) czy niektórych guzów litych [22, 80, 93, 111, 141, 148, 150, 154, 174, 188, 189, 209, 226, 235].

W prawidłowym szpiku kostnym poziom ekspresji genu WT1 utrzymuje się na relatywnie niskim poziomie. Związane jest to z ograniczeniem ekspresji do niezróżnicowanych komórek CD34⁺. Aktywność WT1 w macierzystych komórkach hematopoetycznych, a nie w dojrzałych leukocytach, sugeruje jego rolę w prawidłowej hematopoezie [10, 91]. Wiele badań prowadzonych na liniach komórkowych wykazuje spadek transkryptu genu WT1 w momencie indukcji różnicowania się komórek. Ponadto konstytutywna ekspresja WT1, w komórkach pozbawionych jego endogennej ekspresji, powoduje zahamowanie różnicowania i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Zmiana poziomu ekspresji WT1 może mieć wpływ na różnicowanie za pośrednictwem innych czynników transkrypcyjnych tj. STAT3. Sugeruje się również zaangażowanie genu WT1 W samoodnawianie się wczesnych komórek progenitorowych szpiku [4, 96, 157, 172, 200, 217]. W prawidłowych komórkach hematopoetycznych WT1 zachowuje się jak gen supresorowy. Dzieje się tak poprzez ekspresję genu we wczesnych komórkach szpiku kostnego, co hamuje ich proliferację, wzrost i redukuje tworzenie się kolonii komórkowych. Badania sugerują, iż wpływ na taki charakter genu ma obecność domen cynkowych w białkach, a ich utrata (delecja domeny) znosi opisywany efekt [58, 218, 219].

W przypadku ostrych białaczek szpikowych obserwuje się podwyższoną ekspresję genu WT1. Relatywnie niższy poziom ekspresji tego genu obserwowany jest w typach M_5 - M_7 w stosunku do pozostałych typów AML wg klasyfikacji FAB. Wyższą ekspresję opisano w przypadku typu M_3 . Różne izoformy, w badaniach przeprowadzonych in vitro, wykazują odmienny wpływ na hematopoezę i leukemogenezę. W przypadku białka fuzyjnego AML1-ETO wykazano, że obecność izoformy Ex5⁺-KTS⁺ wpływała na rozwój białaczki, z chwilą gdy obecność tylko AML1-ETO powodowała zmienioną mielopoezę. U chorych na AML wykazano częstszą obecność izoform WT1 Ex5⁺ [18, 58, 96, 130, 154, 168, 208, 227].

2.9.1. Mutacje genu WT1

W ciągu ostatniej dekady wykazano, że cechy kliniczne chorych z AML korelują z różnymi zmianami genetycznymi. Do zmian tych należą między innymi mutacje w genie NPM1, wewnątrz tandemowa duplikacja genu FLT3 (ITD, *z ang. internal tandem duplication*) lub mutacje w obrębie CEBPA. Spostrzeżenia te dotyczyły głównie osób dorosłych, u których nie stwierdzono zmian cytogenetycznych. Wiadomo już, że FLT3-ITD wiąże się z gorszym rokowaniem, podczas gdy mutacje w genie NPM1 lub CEBPA korelowane są lepszymi wynikami leczenia [26, 53, 107, 173, 185, 196, 199, 231].

Mutacje w obrębie genu WT1 po raz pierwszy opisano pod koniec lat 90. Obecnie wiadomo, że mutacje genu WT1 dotyczą około 10% przypadków AML w grupie dorosłych bez zmian cytogenetycznych, u dzieci odsetek ten może być wyższy (około 20%) [90]. Opisywane zmiany najczęściej spotykane są w obrębie eksonów 7 i 9, określanych jako miejsca genu o podwyższonym ryzyku wystąpienia mutacji [105, 106, 149, 167, 216, 234]. Mutacje stwierdzono również w eksonach 1, 2, 3 i 8, ale w mniejszym odsetku [70, 90, 105, 223]. Eksony 7 i 9 kodują pierwszy i trzeci palec cynkowy aktywnego białka. Obecne mutacje mogą więc wpływać niekorzystnie na interakcję białka WT1 (czynnik transkrypcyjny) z genami docelowymi [7].

U pacjentów ze zmianami w obrębie genu WT1 zaobserwowano wyraźny wzrost występowania innych zmian genetycznych takich jak: FLT3-ITD (również w grupie pediatrycznej) i mutacje w genie CEBPA. Natomiast w przypadku obecności zmian w genie NPM1 nie odnotowano wzrostu innych zmian molekularnych [70]. Stwierdzono, że mutacje w obrębie WT1 częściej występowały u osób młodszych i u pacjentów, którzy mieli wyższy odsetek blastów w szpiku [70, 90, 167, 185, 234].

Niezależnie od grupy wiekowej pacjentów z AML, wśród osób z obecną mutacją w obrębie genu WT1 zaobserwowano wyższy odsetek zgonów. Ryzyko zgonów z powodu AML było szczególnie wysokie w przypadku równoczesnego występowania FLT3-ITD [70, 90, 167]. Uważa się, że mutacja w obrębie genu WT1 może zwiększać ryzyko wznowy AML [185].

2.9.2. Polimorfizmy genu WT1 w AML

Najczęściej opisywanym polimorfizmem genu WT1, w ostrej białaczce szpikowej, jest rs16754. Polimorfizm ten opisany został w eksonie 7 omawianego genu. Obserwowane warianty w obrębie SNP rs16754 to: A/A, A/G i G/G. Częstość występowania danego wariantu jest różna i zależy od szerokości geograficznej [42, 87, 89, 121]. Obecność G/G [17] lub G/A została opisana jako korzystny czynnik rokowniczy (dłuższe RFS i OS) w przeciwieństwie do wariantu A/A [42]. Natomiast inni autorzy nie obserwowali różnic w wystąpieniu określonego wariantu SNP [87] lub sugerują częstsze występowanie homozygoty G/G w grupie pacjentów, u których stwierdzono obecność źle rokujących markerów molekularnych (FLT3-ITD) lub cytogenetycznych [121].

2.10. Gen FLT3

FLT3 jest genem kodującym receptor, który należy do III klasy receptorów kinaz tyrozynowych (RTKs). Należy on do tej samej rodziny co gen KIT, FMS czy receptory płytkopochodnych czynników wzrostu PDGFR α i PDGFR β . Receptory te odgrywają krytyczną rolę w prawidłowej hematopoezie, prawdopodobnie z wyjątkiem PDGFR α . Biorą udział w różnicowaniu i wzroście monocytów (c-FMS), a także proliferacji i różnicowaniu hematopoetycznych komórek prekursorowych (c-KIT, FLT3). Natomiast PDGFR β i jego ligandy odgrywają prawdopodobną rolę w prawidłowej megakariocytopoezie [129, 138, 184, 191].

FLT3 ulega ekspresji w prekursorowych komórkach szpiku kostnego, w grasicy i węzłach limfatycznych [191]. Jego ekspresję zaobserwowano również w komórkach mózgu, łożyska, wątroby i gonad [135, 190]. Podwyższoną ekspresję receptora FLT3 stwierdzono również na powierzchni komórek białaczkowych linii mieloidalnej (AML) oraz limfoidalnej (ALL) i innych nowotworów [43, 46, 47, 54, 55, 73]. W tych przypadkach stymulacja ligandem FL wzmacniała różnicowanie i hamowała apoptozę, co wskazuje na rolę tego czynnika w procesach nowotworzenia [251]. Sugeruje się, że wysoki poziom mRNA genu FLT3 u pacjentów z AML może być powiązany z autoaktywacją receptora co łączy się z gorszym OS [164].

Najczęściej występujące mutacje w obrębie genu FLT3 to wewnątrz tandemowa duplikacja (FLT3-ITD) oraz mutacje punktowe, dotyczące zmiany reszty kwasu asparaginowego na inny aminokwas w pozycji D835.

W przypadku AML u dzieci częstość mutacji FLT3-ITD szacuje się na 5-22% [8, 97, 109, 126, 146, 254]. Występowanie FLT3-ITD zależy od typu AML według klasyfikacji FAB. Podwyższoną częstość występowania mutacji obserwowano w typach M_3 i M_5 , rzadziej w M_6 i M_7 [2, 67, 110, 158, 224]. Większość prac dotyczących AML przedstawia obecność mutacji FLT3-ITD jako czynnika źle rokującego. Często FLT3-ITD wiązana jest z niskim odsetkiem uzyskania remisji całkowitych (RC) oraz długich OS i przeżyć wolnych od białaczki (LFS, *z ang. leukemia-free survival*) [2, 8, 107, 109, 110, 126, 146, 152, 243, 254]. Obecnie kontynuowane są badania nad inhibitorami aktywacji receptora FLT3 [61, 240].

3. Cel pracy

Celem badań jest:

- oznaczenie molekularnych zmian w białaczce mieloblastycznej u dzieci i oszacowanie częstości występowania wybranych markerów molekularnych, w tym genów fuzyjnych (AML1-ETO, CBFβ-MYH11, PML-RARα), ekspresji genu WT1 i duplikacji FLT3;
- 2. zebranie danych demograficznych oraz na temat typów AML i zmian chromosomowych u pacjentów biorących udział w badaniu;
- ocena korelacji między ekspresją genu WT1 a konwencjonalnymi czynnikami prognostycznymi, takimi jak:
 - ✓ typ białaczki wg klasyfikacji FAB,
 - ✓ wstępna liczba leukocytów i blastów w krwi obwodowej,
 - ✓ wiek w chwili rozpoznania AML,
 - ✓ odsetek blastów w cytologicznej ocenie szpiku w 0. i 15. dniu leczenia indukcyjnego;
- analiza obecności polimorfizmów w obrębie sekwencji promotora oraz sekwencji wzmacniających genu WT1 i określenie ich wpływu na zmianę poziomu ekspresji tego genu;
- 5. ocena stabilności RNA w dostarczonym materiale (szpik kostny i krew obwodowa), określenie warunków bankowania i katalogowania próbek.

4. Materiał i metody

4.1. Charakterystyka badanej populacji

Badaniem objęto 69 (53,1%) dzieci (wiek 0,2-18,5, mediana 11,2 lat) spośród 130 z nowo rozpoznaną pierwotną AML w okresie 01.03.2006-31.06.2009 r. w 14 ośrodkach PPGLBC. Warunkiem włączenia pacjentów do badania było uzyskanie odpowiedniego materiału do badań molekularnych ze szpiku i/lub krwi obwodowej, pobranego przed rozpoczęciem leczenia białaczki oraz istotnych danych klinicznych. Wszyscy chorzy byli leczeni wg programu AML-BFM INTERIM 2004 (Tabela 4, Rycina 1).

Charakterystykę kliniczną badanej grupy 69 pacjentów przedstawiono w Tabelach 5 i 13. Rozkład płci był podobny. Wstępna liczba krwinek białych wynosiła od 1000 do 573 000/mm³ (mediana 29 300), a liczba blastów w krwi obwodowej 0-561 540/mm³ (mediana 11 000). Reprezentowane były wszystkie typy AML wg klasyfikacji FAB, a najczęściej stwierdzono typ M₂ (31,9%). Do grupy wysokiego i standardowego ryzyka zakwalifikowano odpowiednio: 25 i 44 pacjentów. Informacje dotyczące wyników badań cytogenetycznych uzyskano o 34 (49,3%) pacjentach, w tym u 30 kariotyp był nieprawidłowy (Tabela 6). Wśród wszystkich oznaczonych kariotypów najczęściej występującymi zaburzeniami były: t(8;21) /26,5%/, t(15;17) /8,8%/, inv(16) /5,9%/, oraz t(10;11), trisomia 8, 19, 21 i monosomia 7.

4.2. Stosowane analizy statystyczne

4.2.1. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 5. Badane cechy poddano wstępnej analizie statystycznej. Do analiz porównawczych cech jakościowych wykorzystano test Chi-kwadrat oraz jego modyfikacje, stosowane zależnie od liczebności badanej grupy oraz liczebności oczekiwanych. Zależnie od wyników zastosowanych wcześniej testów, porównywano je za pomocą testu U Manna-Whitneya (w przypadku zmiennych nie mających rozkładu normalnego), a dla zmiennych o rozkładzie normalnym stosowano test t-Studenta. W przypadku zmiennych zależnych stosowano test t-Studenta dla par wiązanych. Krzywe przeżycia oszacowano przy użyciu metody Kaplana-Meiera. Różnice pomiędzy

Tabela 5. Charakterystyka pacjentów.

Parametr		Liczba pacjentów lub wartość	
		badanego parametru (%)	
	Zenska	32 (46,4%)	
Płeć	Męska	37 (53,6%)	
Wiek (lata)	Zakres	0,2-18,5	
	Mediana	11,2	
Leukocyty (/mm ³)	Zakres	1 000-573 000	
	Mediana	29 300	
Blasty (/mm ³)	Zakres	0-561 540	
	Mediana	11 000	
	M_0	9 (13,0%)	
	M ₁	9 (13,0%)	
	M ₂	22 (31,9%)	
Typ wg FAB	M ₃	5 (7,2%)	
Typ wg PAD	M4	14 (20,3%)	
	M ₅	8 (11,6%)	
	M ₆	1 (1,4%)	
	M ₇	1 (1,4%)	
Grupa ryzyka	Standardowa (SRG)	25 (36,2%)	
	Wysoka (HRG)	44 (63,8%)	
Remisje całkowite		58 (84,1%)	
Brak remisji		11 (15,9%)	
Wznowa		18 (26,1%)	
Żyjący		45 (65,2%)	
Zgonv	Z powodu białaczki	15 (21,7%)	
	Z powodu powikłań	9 (13,0%)	

Tabela 6.	Charakterystyka	zaburzeń ch	iromosomalnyc	h/kariotypu.

Parametr			Liczba pacjentów (%)	
	Prawidłowy stwierdzony		4 (5,8)	
	Nieprawidłowy stwierdzony			
Kariotyp	Obserwowane zmiany	<pre>monosomie: 7, 10, 11, 14, 15; trisomie: 3, 8, 18, 19, 21, 22; tetrasomia: 8; translokacje: t(2;14), t(5;9), t(8;21), t(10;11), t(15;17); inwersja: inv(16); delecje: del(5), del(6), del(8), del(9), del(12), del (16), liczne delecje; der(13;14), der(5), der(9); +mar(19), +mar(5), +mar(18); hiperploidie.</pre>	30 (43,5)	34 (49,3)
	Brak danych		35 (50,7)	

grupami wyodrębnionymi pod względem występowania badanego czynnika porównywano przy pomocy testów Mentel-Cox'a i Gehan-Breslow-Wilcoxon'a. Jako poziom istotności przyjęto wartość p<0,05. W przypadku różnic stwierdzanych przy wartości p pomiędzy 0,05 a 0,1 wynik interpretowano jako trend w kierunku wzrostu lub obniżenia prawdopodobieństwa wystąpienia ocenianego wydarzenia.

4.2.2. Charakterystyka przeprowadzonych analiz

W celu określenia zależności pomiędzy poziomem ekspresji genu WT1 u dzieci z AML a charakterystyką pacjenta i cech choroby, wykonano badania porównawcze, w których uwzględniono następujące parametry:

- ✓ Związane z pacjentem: wiek, płeć;
- ✓ Związane z chorobą: typ AML, grupa ryzyka, liczba krwinek białych oraz liczba blastów w krwi obwodowej i odsetek blastów w szpiku kostnym przed rozpoczętym leczeniem.

W celu oceny znaczenia prognostycznego nadekspresji genu WT1 w AML u dzieci, przeprowadzono analizy porównawcze pomiędzy obecnością tego markera a:

- ✓ Wczesną odpowiedzią na leczenie ocenianą w 15. dniu leczenia indukcyjnego (odsetek blastów w szpiku kostnym)
- ✓ Czasem przeżycia całkowitego (OS, *z ang. overall survival*). OS obliczano od daty rozpoczęcia leczenia do daty zakończenia obserwacji lub zgonu.

Przeprowadzono również analizę obecności polimorfizmów w obrębie sekwencji promotora oraz sekwencji wzmacniających genu WT1 i zbadano ich wpływ na zmianę ekspresji tego genu.

Oceniono także stabilność RNA w dostarczonym materiale (szpik kostny i krew obwodowa) oraz określono warunki bankowania i katalogowania próbek.

Obserwacje zakończono 30.11.2010 r.

4.3. Metody i sprzęt laboratoryjny wykorzystane podczas doświadczeń

Sprzęt laboratoryjny używany w czasie przeprowadzanych analiz przedstawiono w Tabeli 7. Przedstawiony poniżej sposób przygotowania materiału do badań molekularnych oraz zastosowane metody zostały wcześniej opublikowane [13].

4.3.1. Izolacja komórek monojądrzastych ze szpiku i krwi obwodowej z zastosowaniem wirowania w gradiencie gęstości przy użyciu odczynnika Ficoll (Sigma-Aldrich)

Próbki po dostarczeniu do laboratorium poddawane były obróbce w celu izolacji materiału. Pierwszym etapem było uzyskanie frakcji komórek monojądrzastych. W tym celu szpik i krew obwodową poddawano wirowaniu w gradiencie gęstości z zastosowaniem odczynnika Ficoll według poniższej procedury:

- Do krwi/szpiku dodawano 1x PBS (Gibco), dopełniając do 5 lub 10 ml w zależności od objętości próbki (np. 3 ml materiału + 2 ml 1x PBS, 7 ml materiału + 3 ml 1x PBS);
- Przygotowywano probówki wirownicze typu Falcon (o objętości 10 ml) zwierające po 5 ml odczynnika Ficoll;
- Do probówek zawierających Ficoll dodawano, delikatnie po ściance, po 5 ml krwi/szpiku rozcieńczonych 1x PBS;

Tabela 7. Sprzęt laboratoryjny wykorzystywany podczas doświadczeń.

Termocykler T3 Biometra	Biometra, Niemcy	
Termocykler 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, USA	
Termocykler 2400 Gene Amp PCR Syst.	Applied Biosystems, USA	
Wirówka Labofuge 400R, Function Line	Heraeus, Niemcy	
Wirówka GmCLab	Gilson, USA	
Aparat do elektroforezy - Owl B1A Easy Cast	Owl Separation Syst., USA	
Aparat do elektroforezy - Owl B3 Buffer Puffer	Owl Separation Syst., USA	
Aparat do elektroforezy- Owl A2 Gator	Owl Separation Syst., USA	
Worteks GVLab	Gilson, USA	
Waga laboratoryjna XL - 610	Denver Instrument, Niemcy	
Transiluminator TM - 40	UVP, LLC, USA	
pH - metr CP - 551	Elmetron, Polska	
Spektrofotometr NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scient., USA	
Mieszadło magnetyczne MM5	Polamed, Polska	
Pipety automatyczne	Eppendorf, Gilson, USA	
Cylindry miarowe, kolby miarowe	Simax, Czechy	
Probówki typu eppendorf, falcon, strip	Eppendorf, Axygen, USA	
7500 RealTime PCR System	Applied Biosystems, USA	
płytki 96 dołkowe, folie optyczne	Applied Biosystems, USA	
DHPLC - WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System	Transgenomic, USA	

- 4. Wirowano w temperaturze pokojowej, przy prędkości 400 x g, przez 30 min.;
- Zbierano górną fazę zwierającą osocze, a warstwę komórek mononuklearnych, znajdujących się na granicy faz w postaci białego pierścienia, zbierano do czystej probówki wirowniczej;

- Komórki przemywano dwukrotnie 1x PBS i wirowano w temperaturze 4 °C, przy prędkości 250 x g, przez 10 min.;
- Odciągano PBS a osad komórkowy zwieszano w 0,5 ml 1x PBS, obliczano liczbę wyizolowanych komórek;
- Po ponownym zwirowaniu i odciągnięciu PBS do osadu komórkowego dodawano odpowiednią objętość odczynnika Trizol (Invitrogen) (1 ml na 5-10 x 10⁶ komórek), materiał przechowywano w probówkach typu Eppendorf, w temperaturze -20 °C do czasu izolacji RNA i DNA.

4.3.2. Izolacja RNA z zastosowaniem odczynnika Trizol (Invitrogen)

Izolację całkowitego RNA, z komórek monojądrzastych, przeprowadzano z zastosowaniem Trizolu według procedury przedstawionej poniżej.

- Wyizolowane komórki monojądrzaste homogenizowano odpowiednią ilością Trizolu (1 ml na 5-10 x 10⁶ komórek);
- 2. Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min.;
- Dodawano 300 µl chloroformu (Sigma-Aldrich) na 1 ml użytego Trizolu, a następnie przepipetowywano do uzyskania jednolitego roztworu, inkubowano 2-3 min. w temperaturze pokojowej;
- 4. Wirowano w temperaturze 4 °C przy prędkości 12000 x g przez 15 min.;
- 5. Fazę wodną przenoszono do czystej probówki typu Eppendorf;
- Do uzyskanej fazy wodnej, zawierającej RNA, dodawano równą objętość alkoholu izopropylowego (POCH), mieszano przez kilkukrotne obracanie probówki, inkubowano w -20 °C (1-24 godz.);
- 7. Wirowano w temperaturze 4 °C przy prędkości 12000 x g przez 20 min.;
- Supernatant odciągano, a osad RNA przemywano 75% alkoholem etylowym (POCH) (1 ml);
- 9. Wirowano w temperaturze 4 °C przy prędkości 12000 x g przez 5 min.;
- 10. Odciągano etanol. RNA suszono w temperaturze pokojowej a następnie rozpuszczano w odpowiedniej objętości wody wolnej od nukleaz (Sigma-Aldrich). Mierzono absorbancję próbek przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific), przy długości fali 260 nm (dla kwasów nukleinowych) i 280 nm (dla białek) w celu określenia stężenia oraz czystości RNA;

11. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80 °C.

4.3.3. Izolacja DNA z zastosowaniem odczynnika Trizol (Invitrogen)

DNA izolowano z zastosowaniem odczynnika Trizol (kolejny etap po izolacji RNA) lub zestawu do izolacji DNA na mikrokolumnach (Qiagen).

Do izolacji DNA na mikrokolumnach używano 200 µl szpiku (lub krwi obwodowej) pobranego z próbki wyjściowej. Izolacja DNA na mikrokolumnach przebiegała według procedury dołączonej przez producenta do zestawu izolacyjnego.

Izolację DNA z zastosowaniem Trizolu przeprowadzano według poniższej procedury:

- Po usunięciu fazy wodnej, zawierającej RNA, do fazy organicznej dodawano 330 µl 100 % alkoholu etylowego (na 1 ml Trizolu użytego do wstępnej homogenizacji) a następnie mieszano przez kilkukrotne odwrócenie probówki;
- 2. Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2-3 min.;
- 3. Wirowano w temperaturze 4 °C, przez 10 min. przy prędkości 2000 x g;
- 4. Supernatant usuwano a osad DNA przemywano dwukrotnie roztworem 0,1 M cytrynianu sodu w 10 % etanolu (1 ml na 1 ml Trizolu użytego do wstępnej homogenizacji). Podczas każdego płukania próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. od czasu do czasu mieszając;
- Po każdym płukaniu wirowano w temperaturze 4 °C, przez 5 min., przy prędkości 2000 x g. (Dodatkowe płukanie przeprowadzano dla próbek zawierających powyżej 200 μg materiału);
- DNA zawieszano w 75% etanolu (1,5-2 ml etanolu na 1 ml Trizolu użytego do wstępnej homogenizacji) i inkubowano 10-20 min. w temperaturze pokojowej od czasu do czasu mieszając;
- 7. Wirowano w temperaturze 4°C, przez 5min., przy prędkości 2000 x g;
- 8. DNA suszono w temperaturze pokojowej przez 5-15 min. a następnie rozpuszczano w roztworze zawierającym 8 mM NaOH (POCH), 0,1 M HEPES (Sigma-Aldrich) i 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) (300-600 µl roztworu w zależności od ilości uzyskanego DNA) lub w buforze TE. Następnie mierzono stężenie wyizolowanego DNA przy użyciu spektrofotometru, przy długości fali 260 nm (kwasy nukleinowe) i 280 nm (białka) w celu określenia czystości próbek;

9. Próbki przechowywano w temperaturze -20 °C.

4.3.4. Analiza powtórzeń FLT3-ITD w oparciu o reakcję PCR

Metoda PCR umożliwia specyficzną amplifikację *in vitro* wybranych odcinków DNA i RNA (przepisanych na cDNA), dzięki wykorzystaniu dwóch starterów komplementarnych do sekwencji docelowej. Użyte startery ograniczają długość syntetyzowanego łańcucha. Typowa reakcja PCR obejmuje około 30 powtarzających się cykli obejmujących: denaturację, przyłączanie starterów, syntezę z zastosowaniem termostabilnej polimerazy. W każdym cyklu dochodzi do podwojenia wyjściowej liczby matryc.

Reakcji PCR poddawano fragment genu FLT3, w którym dochodzi do powtórzeń tandemowych ITD. Prawidłowa długość badanego odcinka wynosi 329 pz (par zasad) co stanowiło podstawę dalszej analizy uzyskanych wyników.

W celu przeprowadzenia reakcji PCR stosowano startery (TIB MOLBIOL) o następujących sekwencjach:

F: 5' – GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC – 3',

R: 5' – CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC – 3'.

W celu przeprowadzenia reakcji przygotowywano mieszaninę reakcyjną wg składu podanego w Tabeli 8. Warunki termiczne reakcji PCR przedstawiono na Rycinie 2.

	Stężenie początkowe	Objętość w µl	Objętość w µl
Bufor C [Eur _x]	10 x stężony	5	2,5
dNTPs [Eur _x]	5 mM	2	1
Starter F	100 µM	0,4	0,2
Starter R	100 µM	0,4	0,2
Polimeraza DNA [Eur _x]	2,5 U/µl	0,8	0,4
H ₂ O		39,4	18,7
DNA		2	2
Objętość końcowa		50 (reakcję można prowadzić w objętości 25µl)	25

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla analizy powtórzeń FLT3-ITD.



Rycina 2. Warunki termiczne reakcji PCR dla analizy powtórzeń ITD w genie FLT3.

Wynik reakcji PCR uzyskiwano poprzez detekcję powstałego produktu na żelu agarozowym. W tym celu na żel nakładano po 15 µl mieszaniny reakcyjnej po PCR obciążonej 6 x buforem ładującym (3 µl). Elektroforezę prowadzono w 3,5% żelu agarozowym, w obecności markera wielkości i próbek kontrolnych (prawidłowej i z powtórzeniami ITD) – Rycina 3.



Rycina 3. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla analizy ITD w genie FLT3: ścieżka 1 – marker wielkości 100 pz, ścieżka 2 – kontrola pozytywna (dodatkowy prążek, powyżej prążka prawidłowego, świadczy o obecności powtórzeń tandemowych w jednym z alleli genu FLT3. Allel z duplikacją charakteryzuje się dłuższym produktem reakcji PCR w porównaniu do allela prawidłowego o długości 329 pz, przez co jego migracja w żelu agarozowym jest opóźniona – następuje rozdział prążków), ścieżka 3 – kontrola negatywna (próbka prawidłowa; obserwowany jest tylko jeden prążek na wysokości 329 pz - żaden z alleli nie posiada powtórzeń ITD; oba prążki migrują z tą samą prędkością – nie dochodzi do ich rozdziału w żelu agarozowym). Elektroforeza prowadzona w 3,5% żelu agarozowym.

4.3.5. Analiza ilościowa genów fuzyjnych z zastosowaniem reakcji RQ-PCR

Do przeprowadzenia ilościowej reakcji RT-PCR i RQ-PCR 4 transkryptów genów fuzyjnych (AML1-ETO, CBFβ-MYH11, PML-RARα /podtyp bcr1 i bcr3/) zastosowano protokół opracowany przez Europe Against Cancer Program [69, 232]. W badaniach pominięto oznaczanie podtypu bcr2 z powodu rzadkiego występowania tego typu zmiany (5%).

Obecność i liczbę transkryptów genów fuzyjnych przeprowadzano z zastosowaniem technologii TaqMan w reakcji RQ-PCR, po uprzednim przepisaniu informacji genetycznej z RNA na cDNA, przy użyciu reakcji odwrotnej transkrypcji.
Dla każdego z genów stosowano specyficzną sondę i startery. Analiza ilościowa poziomu ekspresji badanych genów była możliwa dzięki zastosowaniu krzywych standardowych dla każdego z genów fuzyjnych oraz dla genu referencyjnego ABL.

4.3.5.1. Odwrotna transkrypcja – RT PCR (Invitrogen)

Reakcja odwrotnej transkrypcji umożliwia amplifikację wybranego fragmentu RNA. W trakcie reakcji RT PCR sekwencja RNA zostaje przepisana na cDNA komplementarne. Reakcję katalizuje RNA-zależna polimeraza DNA (odwrotna transkryptaza). Enzym ten, pochodzenia wirusowego, wykazuje aktywność polimerazową w kierunku 5' \rightarrow 3'.

Synteza cDNA może być przeprowadzona w zależności od użytych starterów: heksamerów, oligo(dT) czy starterów specyficznych do wybranej sekwencji RNA.

W niniejszej pracy, w reakcji RT PCR, używano starterów w postaci heksamerów, krótkich odcinków oligonukleotydowych (startery przypadkowe) przyłączających się losowo do nici RNA. Tak przeprowadzona reakcja odwrotnej transkrypcji umożliwia uzyskanie cDNA z całkowitego RNA.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano na 1 µg całkowitego RNA uzyskanego z krwi i szpiku pacjenta.



Rycina 4. Warunki termiczne reakcji RT PCR.

RT PCR przeprowadzano według poniższej procedury.

- 1. 1 µg całkowitego RNA zawieszano w 10 µl H₂O wolnej od nukleaz;
- 2. Inkubowano przez 10 min. w termobloku, w temperaturze 70 °C;

- 3. Szybko przenoszono na lód. Po ochłodzeniu próbek dodawano mieszaninę reakcyjną przygotowywaną według składu podanego w Tabeli 9;
- 4. Probówki przenoszono do termobloku. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w warunkach termicznych podanych na Rycinie 4.

	Stężenie początkowe	Objętość w µl
RT bufor	5 x stężony	4
Heksamery	3 μg/μl	0,1
dNTP	10 mM	1
DTT		2
RNase OUT (inhibitor RNaz)	40 U/µ1	0,5
SSII (odwrotna transkryptaza)	200 U/µ1	1
H ₂ O		1,4
RNA		10
Objętość końcowa		20

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji (RT PCR).

Po zakończonej reakcji, próbki cDNA przechowywano w temperaturze -20 °C do czasu dalszych analiz.

4.3.5.2. PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR) z zastosowaniem systemu TaqMan

W metodzie TaqMan wykorzystuje się sondy molekularne specyficzne do badanej sekwencji. Sondy znakowane są na końcach 5' barwnikiem reporterowym np. FAM (karboksyfluoresceina), a na końcach 3' barwnikiem tłumiącym (wygaszającym fluorescencję) np. TAMRA (karboksy-tetrametylorodamina). Na etapie przyłączania starterów sonda hybrydyzuje do amplifikowanego DNA. W kolejnym etapie, w trakcie wydłużania powstającej nici DNA, sonda zostaje zdegradowana przez polimerazę Taq mającą aktywność egzonukleazy 5' \rightarrow 3'. Uwolnienie barwników związanych z sondą powoduje wzrost fluorescencji mierzonej w próbce (barwnik reporterowy). Zaletą metody TaqMan jest jej swoistość, wadą zastosowanie specyficznej sondy dla każdego badanego fragmentu DNA.

Na matrycy uzyskanego cDNA przeprowadzano ilościowy RQ-PCR w technologii TaqMan przy użyciu Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), specyficznych starterów oraz sond znakowanych znacznikami (Applied Biosystems).

Do przeprowadzenia reakcji stosowano sondy i startery o następujących sekwencjach:

AML1-ETO:

ENF701 5' – CAC CTA CCA CAG AGC CAT CAA A – 3'

ENR761 5' – ATC CAC AGG TGA GTC TGG CAT T – 3'

ENP747 FAM5' – AAC CTC GAA ATC GTA CTG AGA AGC ACT CCA – 3'TAMRA

CBF_β-MYH11:

ENF803 5' - CAT TAG CAC AAC AGG CCT TTG A - 3'

ENR862 5' – AGG GCC CGC TTG GAC TT – 3'

ENPr843 FAM5' – TCG CGT GTC CTT CTC CGA GCC T – 3'TAMRA

PML-RARa (bcr1):

ENF903 5' – TCT TCC TGC CCA ACA GCA A – 3'

ENR962 5' - GCT TGT AGA TGC GGG GTA GAG - 3'

ENP942 FAM3' - AGT GCC CAG CCC TCC CTC GC - 3'TAMRA

PML-RARa (bcr3):

ENF905 5' – CCG ATG GCT TCG ACG AGT T – 3'

ENR962 5' – GCT TGT AGA TGC GGG GTA GAG – 3'

ENP942 FAM3' - AGT GCC CAG CCC TCC CTC GC - 3'TAMRA

Równolegle do amplifikacji poszczególnych genów fuzyjnych, dla tej samej próbki cDNA, przeprowadzano amplifikację genu kontrolnego ABL. Sekwencje starterów i sondy dla genu referencyjnego **ABL** używanych w RQ-PCR przedstawiono poniżej:

ENF1003 5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'

ENR1063 5' - GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'

ENPr1043 FAM5' – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – 3'TAMRA.

Pierwszym etapem przygotowania reakcji RQ-PCR było rozcieńczenie cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji. W tym celu do objętości 20 µl cDNA

dodawano 30 µl wody wolnej od nukleaz, uzyskując końcową objętość 50 µl. Do oznaczeń używano po 5 µl rozcieńczonego cDNA na reakcję.

W celu przeprowadzenia RQ-PCR przygotowywano mieszaninę reakcyjną według składu podanego w Tabeli 10.

Reakcje prowadzano na płytkach 96 dołkowych z zastosowaniem aparatu typu 7500 RealTime PCR System (Applied Biosystems) w warunkach termicznych przedstawionych na Rycinie 5.

	Stężenia początkowe	Objętość w µl	Objętość w µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	2 x stężony	25	12,5
Sonda	2 μM dla genów fuzyjnych i genu ABL (wyjątek AML1-ETO – 1 μM)	5	2,5
Starter F	3 μM dla genów fuzyjnych i genu ABL	5	2,5
Starter R	3 μM dla genów fuzyjnych i genu ABL	5	2,5
H ₂ O		5	0
cDNA		5	5
Objętość końcowa		50 (reakcję można prowadzić w połowie objętości)	25

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej podczas amplifikacji produktów dla genów fuzyjnych i genu ABL z zastosowaniem systemu TaqMan.

Dzięki analizie porównawczej amplifikacji genu fuzyjnego w odniesieniu do poziomu genu kontrolnego wyliczano znormalizowaną ilość kopii genu fuzyjnego tzw. NCN (*ang. normalized copy number*). NCN wyrażano jako liczbę kopii genu fuzyjnego w przeliczeniu na 10⁴ kopii genu ABL.

Do wyliczenia bezwzględnej liczby kopii genu fuzyjnego i genu kontrolnego ABL wykreślane były krzywe standardowe dla kolejnych rozcieńczeń plazmidów (Ipsogen), zawierających badane transkrypty. Rycina 6a przedstawia przykładową krzywą standardową dla genu ABL wyliczoną na podstawie uzyskanego poziomu fluorescencji (Rycina 6b).



Rycina 5. Warunki termiczne dla reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla wybranych genów fuzyjnych.



Rycina 6a. Przykładowa krzywa standardowa dla genu ABL wyliczona na podstawie poziomu fluorescencji (Rycina 6b) odczytanej podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym.



Rycina 6b. Przykładowy poziom fluorescencji dla genu ABL odczytany podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

4.3.6. Analiza ilościowa genu WT1 z zastosowaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR)

Analiza ilościowa poziomu transkryptu dla genu WT1 przebiegała analogicznie jak w przypadku analizy ilościowej genów fuzyjnych.

Etapy analizy ilościowej amplifikacji genu WT1 obejmowały:

I. Reakcję odwrotnej transkrypcji na matrycy RNA z krwi i szpiku pacjentów;

II. RQ – PCR na matrycy uzyskanego cDNA.

W celu przeprowadzenia reakcji RQ-PCR dla genu WT1 stosowano sondę i startery (Applied Biosystems) o następujących sekwencjach:

WT1:

WT1F: 5' – CAG GCT GCA ATA AGA GAT ATT TTA AGC T – 3'

WT1R: 5' – GAA GTC ACA CTG GTA TGG TTT CTC A – 3'

WT1Pr: FAM5' – CTT ACA GAT GCA CAG CAG GAA GCA CAC TG – 3'TAMRA.

Tabela	11.	Skład	mieszaniny	reakcyjnej	stosowanej	podczas	amplifikacji	produktów	dla	genu	WT1
i genu A	ABL	z zasto	sowaniem sy	stemu TaqM	Man.						

	Stężenia początkowe	Objętość w µl	Objętość w µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	2 x stężony	25	12,5
Sonda	2 μM dla genu ABL (dla genu WT1 – 3 μM)	5	2,5
Starter F	3 μM dla genu ABL (dla genu WT1 – 2 μM)	5	2,5
Starter R	3 μM dla genu ABL (dla genu WT1 – 2 μM)	5	2,5
H ₂ O		5	0
cDNA		5	5
Objętość końcowa		50 (reakcję można prowadzić w połowie objętości)	25

Równolegle do amplifikacji genu WT1, dla tej samej próbki cDNA, przeprowadzano amplifikację genu kontrolnego ABL. Sekwencje starterów i sondy dla genu referencyjnego ABL przedstawiono w rozdziale dotyczącym analizy ilościowej genów fuzyjnych.

W celu przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu WT1 przygotowywano mieszaninę reakcyjną według składu podanego w Tabeli 11.



Rycina 7a. Przykładowa krzywa standardowa dla genu WT1 wyliczona na podstawie poziomu fluorescencji (Rycina 7b) odczytanej podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym (krzywe standardowe dla genów fuzyjnych analogiczne jak dla genu WT1 – ilość kopii plazmidów).



Rycina 7b. Przykładowy poziom fluorescencji dla genu WT1 odczytany podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym (krzywe standardowe dla genów fuzyjnych analogiczne jak dla genu WT1 – ilość kopii plazmidów).

Reakcje prowadzano z zastosowaniem aparatu typu 7500 RealTime PCR System (Applied Biosystems) w warunkach termicznych przedstawionych na Rycinie 8.

Podobnie jak dla genów fuzyjnych i w tym przypadku określano wartość NCN (dla genu WT1) jak również wykreślano krzywą standardową dla genu WT1 i genu referencyjnego ABL.

Rycina 7a przedstawia przykładową krzywą standardową dla genu WT1. Przykładową krzywą standardową dla genu ABL przedstawiono w rozdziale dotyczącym analizy ilościowej genów fuzyjnych.



Rycina 8. Warunki termiczne reakcji RealTime PCR dla genu WT1.

4.3.7. Analiza polimorfizmów wybranych odcinków genu WT1 metodą DHPLC i sekwencjonowania

Denaturująca wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (DHPLC, z ang. denaturating high performance liquid chromatography) jest metoda przesiewowego poszukiwania mutacji punktowych. Optymalna długość badanych produktów powinna wynosić od 100 do 500 par zasad. Wpływa to na czułość stosowanej metody (92-100%). Badane fragmenty amplifikuje się za pomocą reakcji PCR. Do celów wykrywania mutacji wykorzystywane jest tworzenie się heterodupleksów pomiędzy fragmentami DNA poddanymi denaturacji, a następnie renaturacji. Zmiana nukleotydu wpływa na powstanie mieszanej populacji homo- i heterodupleksów w skutek hybrydyzacji prawidłowych i zmutowanych nici badanych odcinków DNA. W trakcie chromatografii, prowadzonej temperaturze częściowo W denaturujacej, homo- i heterodupleksy wymywane są z kolumny w różnym czasie. Na chromatogramie homozygota obserwowana jest jako pojedynczy pik natomiast heterozygota jako kilka pików.

Na matrycy DNA przeprowadzone zostały reakcje PCR z zastosowaniem specyficznych starterów dla rejonów regulatorowych genu WT1. Amplifikacji poddano odcinek promotora oraz sekwencje potencjalnych regionów wzmacniających ekspresję badanego genu. Namnożone fragmenty posłużyły analizie oznaczenia występowania polimorfizmów genetycznych przy użyciu metody DHPLC oraz sekwencjonowania. Badane sekwencje przedstawiono na Rycinach 9-11.

W celu przeprowadzenia reakcji PCR zaprojektowano startery o następujących sekwencjach:

- dla regionu promotora (dla badanej sekwencji użyto dwóch par starterów w celu późniejszego sekwencjonowania całego regionu):

F1: 5' – GAC AGT TCT AGA AGC AAG AGC C – 3'
R1: 5' – GCT CCA TTC ACT CAG CAG CC – 3'
F2: 5' – GGG TTG AAG AGG AGG GTG TC – 3'
R2: 5' – GCG GAG CGT GTG CTG AGA C – 3'
dla regionu sekwencji wzmacniającej w intronie 3:
F3: 5' – GTG GGA CCT TCT TCC TGT GAG – 3'
R3: 5' – CTA CCT CCT TCC CTT GAC GTC – 3'

Fragment I badanej sekwencji promotora genu WT1

Fragment II badanej sekwencji promotora genu WT1

421	CCGACCTCTGGAACCCACAAAGGGCCACCTCTTTCCCCAGTGACCCCAAGATCATGGCCA	480
481	CTCCCCTACCCGACAGTTCTAGAAGCAAGAGCCAGGACTCAAGGGTGCAAAGCAAGGGTAT	540
541	ACGCTTCTTTG <mark>A</mark> AGCTTGACTGAGTTCTTTCTGCGCTTTCCTGAAGTTCCCGCCCTCTTG	600
601	GAGCCTACCTGCCCCCCCCCCAAACCACTCTTTTAGATTAACAACCCCATCTCTACTCC	660
661	CACCGCATTCGACCCTGCCCGGACTCACTGCTTACCTGAACGGACTCTCCAGTGAGACGA	720
721	GGCTCCCACACTGGCGAAGGCCAAGAAGGGGAGGTGGGGGGGG	780
781	CAGCTGAGAGCGCGTGTTGGAGGAGGAGGGGGGGGGGGG	840
841	ACCCGCCCTCACCCCAGCTGCGAGGGCGCCCCCCAAGGAGCAGCGCGCGC	900
901	GCTTG <mark>GGCTGCTGAGTGAATGGAGC</mark> GGCCGAGCCTCCTGGCTCCTCCTCTCCCCGCGCC	960
961	GCCGGCCCCTCTTATTTGAGCTTTGGGAAGCTGAGGGCAG <mark>CCAGGCAGCTGGGGTAAGGA</mark>	1020
1021	GTTCAAGGCAGCGCCCACACCCGGGGGGCTCTCCGCAACCCGACCGCCTGTCCGCTCCCCC	1080
1081	ACTTCCCGCCCTCCCTCCCACCTACTCATTCACCCACCCA	1140
1141	CAGCCCAGGCGCCCGGGCCCCGCCGTCTCCTCGCCGCGATCCTGGACTTCCTCTTGCTGC	1200
1201	A <mark>C</mark> GACCCGGCTTCCACGTGTGTCCCGGAGCCGGC <mark>GTCTCAGCACACGCTCCGC</mark> TCCGGGC	1260
1261	CTGGGTGCCTACAGCAGCCAGAGCAGCAGGGAGTCCGGGACCCGGGCGGCATCTGGGCCA	1320
1321	AGTTAGGCGCCGCCGAGGCCAGCGCTGAACGTCTCCAGGGCCGGAGGAGCCGCGGGGCGT	1380
1381	CCGGGTCTGAGCCGCAGCAAATGGGCTCCGACGTGCGGGACCTGAACGCGCTGCTGCCCG	1440
1441	CCGTCCCCTCCCTGGGTGGCGGCGGCGGCGGCTGTGCCCTGCCTGTGAGCGGCGCGCGC	1500
1501	GGGCGCCGGTGCTGGACTTTGCGCCCCCGGGCGCTTCGGCTTACGGGTCGTTGGGCGGCC	1560
1561	CCGCGCCGCCACCGGCTCCGCCGCCACCCCCGCCGCCGCCGCCTCACTCCTTCATCAAAC	1620
1621	AGGAGCCGAGCTGGGGCGGCGCGGAGCCGCACGAGGAGCAGTGCCTGAGCGCCTTCACTG	1680
1681	TCCACTTTTCCGGCCAGTTCACTGGCACAGCCGGAGCCTGTCGCTACGGGCCCTTCGGTC	1740
1741	CTCCTCCGCCCAGCCAGGCGTCATCCGGCCAGGCCAGGATGTTTCCTAACGCGCCCTACC	1800
1801	TGCCCAGCTGCCTCGAGAGCCAGCCCGCTATTCGCAATCAGGGTAAGTAGGCCGGGGAGC	1860
1861	GCCCCCTACGCGCGGGGCAGTGGCGCCAGGGACTCTCCGCTCTAGGACACCCCCCTCTCC	1920

Rycina 9. Rycina przedstawia proksymalny odcinek regionu promotora genu WT1, który poddano amplifikacji. Kolorem czerwonym zaznaczono nukleotyd początkowy (A) i końcowy (G) badanej sekwencji. Kolorem fioletowym zaznaczono sekwencje komplementarne dla pierwszej pary starterów (F1-R1), na zielono sekwencje komplementarne dla drugiej pary (F2-R2). Kolorem żółtym zaznaczono miejsca startu transkrypcji genu.

Ekson I

9601	GCCCCCGGCCGGGGTGCAGGACGGAGATCGGGTCGCAACAGGGCCCTGCGGGGAGGCTGC	9660
9661	TCTGGCCCGC <mark>GTGGGACCTTCTTCCTGTGAG</mark> CGGGAGGCCCAAGGCCAGCTTCATTCCCT	9720
9721	TCCAAGCTTTTCCCCGCTCCGTGCTTCCTCTTCTCGCCTCTCGCTCCACCTTCTCTCCCC	9780
9781	CAAATTTTTTCTTCAACTTTGGGTGAACTTGGCCGGCCGCCCGC	9840
9841	CCTAGTAACTGCGGCGCACACCAGCCCGCACGGGGCTGGAAGTTGGGGCGGGGGCCGGGG	9900
9901	AGCAGCAGCGCGAGGCCTGTGCGGCCCGGGATTGGGCGCGCATGACCTCATAGCCCCCTC	9960
9961	CTCCCTGGTGCTCGGGGATCCTGACACCGGCTGCCCCCAAACCCATCCCCATCCTCCCTC	10020
10021	CCCTCCGCGCGGGGACCCGGGGCT <mark>GACGTCAAGGGAAGGAGGTAG</mark> TGAGGTCATGAAGGA	10080
10081	AGGAAAAGCGCCTGCCCTGGGAGATTGGGTGGGGGAGTGGCCGCGCCTGGGGGACTGTCC	10140

Rycina 10. Rycina przedstawia sekwencję wzmacniającą w intronie 3 genu WT1. Kolorem zielonym zaznaczone sekwencje komplementarne dla użytych starterów (para F3-R3).

- dla regionu sekwencji wzmacniającej na końcu 3':

F4: 5' – CCT TTC CAG GGC AAC TGA GTG – 3'

R4: 5' – GCA GTT GAA ACA ATC AAT GTG GC – 3'.

49621	TAGTCCTTTTGAAAAGTTCAGATACATCACTGGGAGGGCATAGGCTGAACACCTAGTACA	49680
49681	ATTGAATTTACAGCTGTACTTGCTATAAATCAGCTCAGC	49740
49741	TTCCAGGGCAACTGAGTG	49800
49801	TTCTGTTCTGGTGTATGGTTTTTGAATTGTAAATAAGGAGATTAATTTGGTGCAGCCCCT	49860
49861	CTCAGCTCCATTATCTTGGGGGCTTGCATGCATTCCGGGTTTTATTTCTTCATTTAAAATG	49920
49921	CGTCTCAAACAGATGGAAGCCTAGCTATGGAGACTGTTTTACATTGAAGTGCAGCTCAAA	49980
49981	GTTTGGGCAGCCTAAAAGTCAGGTCCAGAGGCCCCTCTTATTTTGCATCTGGCTCTTGCA	50040
50041	TCACTGTTAATTATAGCGAGTGTGGTGACTCATTTATATCAGCCGTTTTTATCTTTCCT	50100
50101	GCCAGAAGACAGCATTTCTCTGGAGAAGCTCAGGACAAGCATGGCA <mark>A</mark> ACGTCAGCGAGTC	50160
50161	GGAAAGAGCCAGGTCTTACAACAAAAGTACA <mark>GCCACATTGATTGTTTCAACTGC</mark> ACAGGG	50220
50221	AAGAACAGAGATTCTCAGACGACCCTGTAAGTTTAGCTTGCAGTTAAGATCATGGGCTAT	50280

Rycina 11. Rycina przedstawia sekwencję wzmacniającą na końcu 3' genu WT1. Kolorem czerwonym zaznaczono nukleotyd początkowy (C) i końcowy (A) badanej sekwencji. Kolorem zielonym zaznaczone sekwencje komplementarne dla użytych starterów (para F4-R4).

Reakcję PCR przeprowadzano na 150 ng DNA. W tym celu mierzono stężenie DNA w próbkach, a następnie próbkę zawierającą 150 ng DNA uzupełniano wodą wolną od nukleaz do całkowitej objętości 10 µl (wyrównanie objętości próbek). W celu przeprowadzenia reakcji PCR przygotowywano mieszaninę reakcyjną według składu podanego w Tabeli 12.

Produkty DNA poddawano elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym w celu oszacowania poprawnego przebiegu i wydajności reakcji PCR. W tym celu na żel agarozowy nakładano po 10 µl mieszaniny reakcyjnej obciążonej buforem ładującym. Elektroforezę prowadzono w obecności markera wielkości. Pojawienie się prążków o długości około 400 pz (dla odcinka sekwencji wzmacniającej w obrębie intronu 3) oraz o długości około 450 pz (dla odcinków promotora I, II oraz sekwencji wzmacniającej 3') świadczyło o obecności właściwych produktów (Ryciny 14-17). Próbki przechowywano w temperaturze -20 °C do dalszych analiz.

Warunki termiczne reakcji PCR dla sekwencji promotora genu WT1 przedstawiono na Rycinie 12 (pary starterów F1-R1, F2-R2).



Rycina 12. Warunki termiczne reakcji PCR dla analizy regionów promotora I i II genu WT1.

	Stężenie początkowe	Objętość w µl
Bufor C [Eur _x]	10x	5
dNTP	5mM	2
Starter F	50µM	0,8
Starter R	50µM	0,8
Polimeraza Gold [Eur _x]	2,5U/µl	0,8
H ₂ O		30,6
DNA	150ng	10
Objętość końcowa		50

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla amplifikacji badanych odcinków promotora i sekwencji wzmacniających genu WT1.

Warunki termiczne reakcji PCR dla sekwencji wzmacniających genu WT1 przedstawiono na Rycinie 13 (pary starterów F3-R3, F4-R4).

W kolejnym etapie analizy wprowadzano zapis sekwencji badanych odcinków DNA do aparatu WAVE 1500 (Transgenomic), umożliwiającego prowadzenie analiz techniką DHPLC, korzystając z oprogramowania (Nucleic Acid Fragment Analysis System) w celu określenia temperatury częściowo denaturującej badane fragmenty. Spośród uzyskanych profili termicznych wybierano najwłaściwszy dla danego fragmentu (Ryciny 18-21): - dla sekwencji odcinka I promotora (para starterów F1-R1) – 60 °C,

- dla sekwencji odcinka II promotora (para starterów F2-R2) - 65 °C,



Rycina 13. Warunki termiczne reakcji PCR dla analizy regionów wzmacniających - intron 3 i koniec 3' genu WT1.



Rycina 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu I promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F1-R1. Ścieżka 1 – marker wielkości 100 pz, ścieżki 2 i 3 – produkty amplifikacji fragmentu I promotora genu WT1 o długości 434 pz.



Rycina 15. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu II promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F2-R2. Ścieżka 1 – marker wielkości 100 pz, ścieżki 2 i 3 – produkty amplifikacji fragmentu II promotora genu WT1 o długości 455 pz.

- dla sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (para starterów F3-R3) – 66 °C,

- dla sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) – 59 °C.

Do przeprowadzenia reakcji DHPLC używano 10 µl mieszaniny PCR. Próbki poddawano denaturacji w temperaturze 95 °C przez 5 min. a następnie renaturacji w temperaturze pokojowej przez 10 min celem zwiększenia efektywności tworzenia heterodupleksów. Tak przygotowane próbki umieszczano w aparacie WAVE 1500. Chromatografię badanych odcinków DNA przeprowadzano w temperaturach ustalonych wcześniej dla danej sekwencji. Jako wynik dla danej próbki uzyskiwano specyficzny chromatogram.



Rycina 16. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu sekwencji wzmacniającej (intron 3) genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F3-R3. Ścieżka 1 – marker wielkości 100 pz, ścieżki 2 i 3 – produkty amplifikacji fragmentu wzmacniającego w intronie 3 genu WT1 o długości 395 pz.



Rycina 17. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F4-R4. 1 – marker wielkości 100 pz, 2 i 3 – produkty amplifikacji fragmentu wzmacniającego na końcu 3' genu WT1 o długości 477 pz.

W dalszym etapie analizy zmian polimorficznych w badanych sekwencjach genu WT1, produkty PCR poddawano sekwencjonowaniu. Próbki wirowano na minikolumnach do oczyszczania DNA, w celu pozbycia się użytych reagentów reakcji PCR. Oczyszczanie, z zastosowaniem zestawu CleanUp DNA fragments purification kit (A&A Biotechnology), przeprowadzano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Oczyszczone próbki (10 µl produktu PCR) poddawano sekwencjonowaniu w firmie zewnętrznej (Genomed, Warszawa). Analizę sekwencji prowadzono w oparciu o otrzymany w wyniku sekwencjonowania fluorogram (Rycina 22).





Rycina 18. (a) Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji odcinka I promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F1, R1. (b) Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury; do rozdziału we wszystkich temperaturach użyto tej samej próbki kontrolnej.



Rycina 19. (a) Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji odcinka II promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F2, R2. (b) Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury; do rozdziału we wszystkich temperaturach użyto tej samej próbki kontrolnej.



Rycina 20. (a) Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji wzmacniającej genu WT1 w intronie 3, amplifikowanej z zastosowaniem starterów F3, R3. (b) Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury; do rozdziału we wszystkich temperaturach użyto tej samej próbki kontrolnej.



Rycina 21. (a) Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1, amplifikowanej z zastosowaniem starterów F4, R4. (b) Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury; do rozdziału we wszystkich temperaturach użyto tej samej próbki kontrolnej.



Rycina 22. Przykładowy wynik reakcji sekwencjonowania z zastosowaniem automatycznego sekwenatora kapilarnego.

5. Wyniki badań

5.1. Analiza występowania wybranych genów fuzyjnych

Pierwszym etapem badań było określenie częstości występowania wybranych zmian genetycznych u dzieci z rozpoznaną AML *de novo*. Badania prowadzono w kierunku obecności wybranych genów fuzyjnych tj. AML1-ETO, PML-RARA (bcr1, bcr3) i CBFβ-MYH11.

Tabela 13. Zaburzenia molekularne: wybrane geny fuzyjne i inne zmiany genetyczne oznaczone przed rozpoczęciem leczenia.

Parametr				Liczba pacjentów (%)
			Typ wg FAB	
Dadama	aanse furgering	AML1-ETO	M_2	9 (13%)
Badane	geny luzyjne	PML-RARα	M ₃	3 (4%)
		CBFβ-MYH11	M_4	2 (3%)
Douvtérzonio ELT2 ITD		Typ wg FAB	6 (8.7%)	
-			$M_0-M_4\left(z\;wyj.\;M_2\right)$	0 (0,170)
	Liczba kopii genu WT1 /10 000 kopii genu ABL	Szpik (n=63)	Zakres	0,59-37 596
			Mediana	2339,1
		Krew (n=45)	Zakres	0,43-11 513
			Mediana	1457,6
			<1	5 (7,2%)
WT1	Logarytm liczby kopii genu WT1 (n=63) w szniku kostnym		≥1 - <2	8 (11,6%)
			≥2 - <3	9 (13,0%)
	W I I (II=05)	w szpiku köstnym	≥3 - <4	34 (49,3%)
			<u>≥</u> 4	7 (10,1%)
			<1	6 (13,3%)
	Logarytm li	czby kopii genu	≥1 - <2	1 (2,2%)
	WT1 (n	=45) w krwi	≥2 - <3	11 (24,5%)
	obw	vodowej	≥3 - <4	23 (51,1%)
			≥4	4 (8,9%)

Wśród 69 pacjentów ocenianych w obecnie przedstawianej pracy u 14 (20%) stwierdzono obecność badanych genów fuzyjnych. Poszczególne transkrypty genowe

tj. AML1-ETO, PML-RARα i CBFβ-MYH11 wykryto odpowiednio: u 9 (13%), 3 (4%) i 2 (3%) pacjentów. Wyniki przedstawiono w Tabeli 13 i na Wykresie 1.



Wykres 1. Wykres kołowy przedstawiający częstość (%) występowania wybranych genów fuzyjnych w populacji badanej. Jako 100% przyjęto 69 pacjentów.

5.2. Analiza powtórzeń tandemowych ITD w genie FLT3

Wśród wszystkich ocenianych 69 pacjentów u 6 (8,7%) wykazano zmiany ITD w obrębie genu FLT3. Obecność powtórzeń tandemowych w genie FLT3 stwierdzono w typach AML: M_0 , M_1 , M_3 , i M_4 . Wyniki przedstawiono w Tabeli 14 oraz na Wykresie 2. U żadnego dziecka z najczęściej (31,9%) występującym typem M_2 , nie stwierdzono duplikacji genu FLT3.





U jednej pacjentki (BE) uzyskano obraz elektroforetyczny (Rycina 23) świadczący o większym obszarze objętym badaną zmianą mutacyjną niż w przypadku pozostałych pacjentów, u których stwierdzono obecność ITD w genie FLT3

(Rycina 24). Produkt PCR dla allelu z duplikacją charakteryzował się długością około 600 pz. Pacjentkę BE zakwalifikowano do typu M_3 z potwierdzoną obecnością genu fuzyjnego PML-RAR α . Dziecko to zmarło w piątej dobie po rozpoznaniu z powodu powikłań (nasilone krwawienie w przebiegu wykrzepiania śródnaczyniowego).

Typ AMI	Liczebność (%)			
Typ MinL	FLT3-ITD nieobecne	FLT3-ITD obecne		
\mathbf{M}_0	8 (89)	1(11)		
\mathbf{M}_1	8 (89)	1 (11)		
M ₂	22 (100)	0 (0)		
M ₃	2 (40)	3 (60)		
M4	13 (93)	1 (7)		
M5	8 (100)	0 (0)		
M6	1 (100)	0 (0)		
M7	1 (100)	0 (0)		

Tabela 14. Wewnętrzna tandemowa duplikacja genu FLT3. Częstość występowania powtórzeń ITD w badanej grupie dzieci z AML a typy ostrej białaczki szpikowej.

1 2 3 4 5 6



Rycina 23. Obraz elektroforetyczny analizy ITD w genie FLT3. Ścieżka 1 – marker wielkości 100 pz, ścieżka 2 – kontrola pozytywna (dodatkowy prążek, powyżej prążka prawidłowego, świadczy o obecności powtórzeń tandemowych w jednym z alleli genu FLT3), identyczny obraz obserwowano u wszystkich pacjentów ze zmianą mutacyjną – rycina 24, ścieżka 3 –pacjentka BE (jeden z prążków migruje na wysokości kontroli prawidłowej 329 pz, drugi prążek migruje wolniej na wysokości około 600 pz), ścieżki 4, 5, 6 – troje pacjentów, u których nie zdiagnozowano obecności powtórzeń ITD. Elektroforeza prowadzona w 3,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny.



Rycina 24. Obraz elektroforetyczny analizy ITD w genie FLT3. Ścieżka 1 – marker wielkości 100 pz; ścieżki 2, 4 – pacjenci, u których zdiagnozowano obecność powtórzeń ITD (prezentowany obraz prążków obserwowano u wszystkich pacjentów ze zmianą ITD); ścieżki 3, 5 pacjenci, u których nie zdiagnozowano obecności powtórzeń ITD. Elektroforeza prowadzona w 3,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny.

5.3. Analizy dotyczące ekspresji genu WT1

5.3.1. Porównanie poziomu ekspresji genu WT1 we krwi obwodowej między pacjentami z AML i zdrowymi osobami

W badaniach wykorzystano materiał pobrany od 6 zdrowych dorosłych ochotników. Do analizy włączono 45 pacjentów, dla których oznaczono liczbę kopii transkryptu genu WT1 w krwi obwodowej w chwili rozpoznania. Poziom ekspresji wyrażono w liczbą kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL (Wykres 3).



Wykres 3. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL) w krwi obwodowej u ludzi zdrowych i u chorych na AML. Na wykresie zaznaczono wartości średniej wraz z błędem standardowym.

Wyniki przedstawiono w Tabeli 15. Stwierdzono istotnie wyższą (p<0,001) liczbę kopii genu WT1 we krwi obwodowej w komórkach u pacjentów z AML w porównaniu do osób zdrowych.

Ekspresja genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)	Zdrowi ochotnicy (n=6)	Badani pacjenci z AML (n=45)	Wartość p (Test Manna- Whitneya)
Mediana	1,48	1458,00	
Zakres	0,98 - 2,01	0,43 – 11513,00	
Średnia	1,51	3059,00	<0,001
Odchylenie standardowe	0,42	3537,00	1
Błąd standardowy	0,17	527,30	1

Tabela 15. Porównanie zdrowej grupy kontrolnej z grupą chorych na AML *de novo* w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej.

5.3.2. Analizy dotyczące ekspresji genu	WT1 w badanej	grupie pacjentów	z AML
przed rozpoczęciem leczenia			

5.3.2.1. Ekspresja genu WT1 w szpiku kostnym

Ekspresję genu WT1 w próbkach szpiku kostnego przed rozpoczęciem leczenia AML, oznaczono u 63 pacjentów. Liczba kopii genu WT1/10⁴ kopii genu ABL wynosiła 0.59-37 596 (mediana 2339,1). Pięćdziesięciu (81,2%) chorych prezentowało w chwili rozpoznania AML (punkt zerowy) nadekspresję tego genu co najmniej o dwa rzędy wielkości względem kontroli, co umożliwia pomiar MRD. U 41 (59,4%) dzieci, w punkcie 0 badania, stwierdzono nadekspresję genu WT1 o trzy rzędy wielkości względem kontroli (Tabela 13).

5.3.2.2. Ekspresja genu WT1 w krwi obwodowej

Ekspresję genu WT1 w próbkach krwi obwodowej przed rozpoczęciem leczenia AML, oznaczono u 45 pacjentów. Liczba kopii genu WT1/10⁴ kopii genu ABL wynosiła 0.43-11 513 (mediana 1457,7). Trzydziestu dziewięciu (86,7%) chorych

prezentowało w chwili rozpoznania AML (punkt zerowy) nadekspresję tego genu co najmniej o dwa rzędy wielkości względem kontroli, co umożliwia pomiar MRD. U 27 (60,0%) dzieci, w punkcie 0 badania, stwierdzono nadekspresję genu WT1 o trzy rzędy wielkości względem kontroli (Tabela 13).

5.3.3. Poziom ekspresji genu WT1 a cechy związane z pacjentem

Do badań włączono 63 pacjentów, u których oznaczono poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w chwili rozpoznania.

5.3.3.1. Płeć a ekspresja genu WT1

Porównano liczbę kopii genu WT1, przeliczoną na 10^4 kopii genu ABL, w zależności od płci. Wyniki przedstawiono na Wykresie 4 i w Tabeli 16. Nie stwierdzono różnic w ekspresji genu WT1 pod względem płci (p=0,5308).

5.3.3.2. Wiek w chwili rozpoznania a poziom ekspresji genu WT1

Sprawdzono również jak zmienia się poziom ekspresji genu WT1 w zależności od wieku dziecka. Poziom ekspresji genu WT1 nie korelował z wiekiem pacjenta w chwili rozpoznania AML. Współczynnik determinacji wyniósł R²=0,003958 (Wykres 5).



Wykres 4. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w czasie rozpoznania, w zależności od płci (M – męska, Ż – żeńska). Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczono średnią wraz z wartościami błędu standardowego.

Tabela 16. Porównanie poziomu ekspresji WT1 w zależności od płci pacjenta w szpiku w chwili rozpoznania.

Ekspresja genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)	płeć męska (n=33)	płeć żeńska (n=30)
Mediana	1982	2610
Zakres	0,59 - 37596	0,75 - 21128
Średnia	5299	4175
Odchylenie standardowe	8676	4697
Błąd standardowy	1510	857,6
Wartość p (test t)	0,53	308



Wykres 5. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w zależności od wieku dziecka w chwili rozpoznania choroby. Na wykresie zaznaczono linię regresji wraz z 95% przedziałem ufności.

5.3.4. Poziom ekspresji genu WT1 a cechy związane z białaczką

Do badań włączono 63 pacjentów, u których oznaczono poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w chwili rozpoznania.

5.3.4.1. Typ AML a poziom ekspresji genu WT1

W kolejnej analizie sprawdzono czy poziom ekspresji genu WT1 różni się w zależności od typu AML wg klasyfikacji FAB. Oceniane grupy badano testem t przy 95% przedziale ufności dla średniej. Do badań nie włączono typów M_6 (n=1) i M_7 (n=1) ze względu na pojedyncze przypadki. Wyniki przedstawiono na Wykresie 6 i w Tabelach 17-18.



Wykres 6. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w zależności od typu AML wg FAB. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczono średnią wraz z wartościami błędu standardowego.

Tabela 17. Poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w chwili rozpoznania w zależności od typu AML wg FAB.

Ekspresja genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)	M ₀ (n=7)	M ₁ (n=10)	M ₂ (n=20)	M ₃ (n=4)	M ₄ (n=14)	M ₅ (n=6)
Mediana	4649	2321	1758	11310	5047	15,49
Zakres	662,4 - 6191	6,490 - 9621	13,33 - 37596	6642 - 21128	4,650 - 13195	0,5900 - 5562
Średnia	3639	3312	5731	12597	4711	939
Odchylenie standardowe	2262	3354	10679	6121	4247	2265
Błąd standardowy	855,1	1061	2388	3060	1135	924,7

Najwyższy poziom ekspresji genu WT1 stwierdzono w typie M_3 , a najniższy w typie M_5 (wartości mediany i średnich). Istotną statycznie różnicę stwierdzono tylko w przypadku porównania znormalizowanej liczby kopii genu WT1 między podgrupą z AML M_3 a innymi analizowanymi typami AML (p<0,010), z wyjątkiem typu M_2 (p=0,2311). Wśród 20 ocenianych pacjentów z typem M_2 u dwojga uzyskano bardzo wysoką ekspresję genu WT1 (34449,32 i 37596,31 liczby kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL), co mogło mieć wpływ na uzyskany wynik istotności. Po odrzuceniu tych skrajnie wysokich wartości uzyskano również istotną różnicę w ekspresji genu WT1 między typem M_2 i M_3 (p<0,0001).

AML	\mathbf{M}_{0}	M_1	M ₂	M ₃	M_4	M_5
M ₀	X	0,8263	0,6159	0,0059**	0,5427	0,0552
M ₁	0,8263	X	0,4935	0,0029**	0,3965	0,1491
M ₂	0,6159	0,4935	X	0,2311	0,7377	0,2922
M ₃	0,0059**	0,0029**	0,2311	X	0,0087**	0,0025**
M_4	0,5427	0,3965	0,7377	0,0087**	X	0,0570
M ₅	0,0552	0,1491	0,2922	0,0025**	0,0570	X

Tabela 18. Porównanie poziomu ekspresji WT1 w szpiku w chwili rozpoznania w zależności od typu AML wg FAB. W tabeli podano wartości p dla porównywanych podgrup.

5.3.4.2. Grupy ryzyka a poziom ekspresji genu WT1

Zbadano czy ekspresja genu WT1 oznaczona w próbkach szpiku i krwi obwodowej pobranych przed rozpoczęciem leczenia AML korelowała z grupami ryzyka (SRG i HRG).

5.3.4.2.1. Grupy ryzyka a poziom ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym

Badaniem objęto 63 pacjentów, u których oznaczono poziom ekspresji genu WT1 w materiale pobranym ze szpiku. Do SRG i HRG zakwalifikowano odpowiednio 25 i 38 pacjentów (Wykres 7). Nie stwierdzono różnic w znormalizowanej liczbie kopii genu WT1 (p=0,6956) między porównywanymi grupami (Tabela 19).



Wykres 7. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w czasie rozpoznania, w zależności od grupy ryzyka. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczono średnią wraz z wartościami błędu standardowego.

Tabela 19.	Porównanie	grup pa	acjentów	(SRG,	HRG)	WΖ	zależności	od	poziomu	ekspresji	WT1	W	szpiku
w chwili ro	zpoznania.												

Ekspresja genu WT1 (liczba kopij genu	Grupy ryzyka			
WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)	SRG (n=25)	HRG n=(38)		
Mediana	1690	2638		
Zakres	13,33 - 37596	0,59 - 34449		
Średnia	5196	4479		
Odchylenie standardowe	8386	6092		
Błąd standardowy	1677	988		
Wartość p (test t)	0,6	956		

5.3.4.2.2. Grupy ryzyka a poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej

Ekspresję genu WT1 we krwi obwodowej oznaczono u 45 pacjentów z AML, w tym u 13 w SRG i 32 w HRG (Wykres 8). Nie stwierdzono różnic w znormalizowanej liczbie kopii genu WT1 (p=0,2850) między porównywanymi grupami (Tabela 20).



Wykres 8. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej w czasie rozpoznania w zależności od grupy ryzyka. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczono średnią wraz z wartościami błędu standardowego.

Tabela 20. Porównanie grup pacjentów (SRG, HRG) w zależności od poziomu ekspresji WT1 w krwi obwodowej w chwili rozpoznania.

Ekspresja genu WT1	Grupy ryzyka			
WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)	SRG (n=13)	HRG (n=32)		
Mediana	1015	1718		
Zakres	1,72-7925	0,43-11513		
Średnia	2166	3422		
Odchylenie standardowe	2551	3843		
Błąd standardowy	707,4	679,3		
Wartość p (test t)	0,2850			

5.3.4.3. Ekspresja genu WT1 a obecność wybranych genów fuzyjnych

W kolejnym etapie sprawdzono czy obecność zmiany w postaci genu fuzyjnego, tj. AML1-ETO, PLM-RARα czy CBFβ-MYH11, może łączyć się z różnym poziomem transkryptu genu WT1. W tym celu pacjentów, u których stwierdzono obecność wymienionych zmian, podzielono na trzy grupy w zależności od rodzaju obecnego genu fuzyjnego. Do badania włączono 14 pacjentów: 9 z AML1-ETO, 3 z PLM-RARα i 2 z CBFβ-MYH11 (Wykres 9). Wyniki przedstawiono w Tabeli 21.



Wykres 9. Wykres logarytmiczny liczby kopii genu WT1 wyrażonej na 10^4 kopii genu ABL w szpiku w zależności od obecności AML1-ETO, CBF β -MYH11 i PML-RAR α . Na wykresie zaznaczono wartości średniej wraz z wartościami błędu standardowego.

Tabela 21. Wartości uzyskane dla liczby kopii genu WT1 na 10^4 kopii genu ABL w szpiku w zależności od obecności transkryptów fuzyjnych AML1-ETO, CBF β -MYH11 i PML-RAR α .

Ekspresja genu WT1 (liczba kopij genu	Oznaczone geny fuzyjne				
WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)	AML1-ETO (n=9)	CBFβ-MYH11 (n=2)	PML-RARα (n=3)		
Mediana	1982	19505	10668		
Zakres	151,1 - 37596	4562 - 34449	6642 - 21128		
Średnia	5643	19505	12813		
Odchylenie standardowe	12050	21134	7478		
Błąd standardowy	4017	14944	4317		

Wysoką średnią i medianę liczby kopii genu WT1 stwierdzono u pacjentów z genem fuzyjnym CBFβ-MYH11 i PML-RARα, a stosunkowo niską z AML1-ETO. Ze względu na małą liczebność podgrup pacjentów z CBFβ-MYH11 i PLM-RARα nie przeprowadzono szczegółowych analiz statystycznych.

5.3.4.4. Wstępna liczba leukocytów a poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej



Wykres 10. Wykres logarytmiczny przedstawiający wstępną liczbę leukocytów w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczono wartość średniej z wartościami błędu standardowego.

W kolejnym etapie analiz zbadano czy poziom ekspresji genu WT1 oznaczony w krwi obwodowej zależał od wstępnej liczby leukocytów. W tym celu pacjentów przydzielono do dwóch grup w zależności od znormalizowanej liczby kopii genu WT1 (powyżej i poniżej mediany, wynoszącej 1457 kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL). Do analizy zakwalifikowano 45 pacjentów, którzy mieli oznaczoną ekspresję genu WT1 w próbce krwi pobranej przed rozpoczęciem leczenia AML oraz dostępne informacje o wstępnej liczbie krwinek białych. Wyniki przedstawiono na Wykresie 10 i w Tabeli 22. Średnie wartości liczby leukocytów dla grup pacjentów z <1457 i \geq 1457 kopii genu WT1 w krwi obwodowej wynosiły odpowiednio: 31,08 i 97,85 x 10³/mm³ (około trzy razy wyższe w grupie z wyższą ekspresją genu WT1), a mediany odpowiednio: 21,00 i 43,00 x 10³/mm³ (około dwa razy wyższe w grupie z \geq 1457 kopii WT1). Różnice były istotne statystycznie (p=0,0365).

Liczba leukocytów przed rozpoczęciem	Liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL			
leczenia (1000x10 ³ /mm ³)	<1457 (n=22)	≥1457 (n=23)		
Mediana	21,00	43,00		
Zakres	1,4 – 158,5	2,6 - 573,0		
Średnia	31,08	97,85		
Odchylenie standardowe	35,79	140,8		
Błąd standardowy	7,63	29,35		
Wartość p (test t)	0,0365*			

Tabela 22. Porównanie liczby leukocytów w krwi obwodowej w dwóch grupach różniących się ekspresją genu WT1 w krwi obwodowej (<1457 kopii i ≥1457 kopii na 10⁴ kopii genu ABL).

5.3.4.5. Liczba blastów w krwi obwodowej a ekspresja genu WT1

Oceniono czy liczba blastów w krwi obwodowej zależy od ekspresji genu WT1 we krwi obwodowej. Badania przeprowadzono w 2 grupach chorych (Wykres 11) różniących się znormalizowaną liczbą kopii genu WT1 (powyżej i poniżej mediany wynoszącej 1457). Do badania zakwalifikowano 45 pacjentów z oznaczoną ekspresją genu WT1 i obliczoną liczbą blastów w krwi obwodowej (/mm³) przed rozpoczęciem leczenia. Wyniki przedstawiono w Tabeli 23.

Stwierdzono, że mediany liczby blastów w krwi obwodowej w chwili rozpoznania, były podobne w obu porównywanych grupach. Natomiast średnia liczba blastów była znacznie wyższa w grupie pacjentów z wyższą ekspresją genu WT1, a różnice były na granicy istotności statystycznej (p=0,0514). Należy jednak zwrócić uwagę na skrajnie wysokie wartości liczby blastów u dwojga dzieci z wysoką ekspresją genu WT1 (316,5 i 561,5 x 10^3 blastów/mm³), co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki badań.



Wykres 11. Wykres przedstawiający liczbę blastów/mm³ w zależności od liczby kopii genu WT1 w krwi obwodowej w czasie rozpoznania. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczona średnia z wartościami błędu standardowego.

Tabela 23. Porównanie liczby blastów w krwi obwodowej w chwili diagnozy AML w dwóch grupach pacjentów różniących się poziomem ekspresji genu WT1 (<1457 i \geq 1457 kopii na 10⁴ kopii genu ABL) w dniu 0.

Wstępna liczba blastów w krwi	Liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL			
obwodowej $(1000 \times 10^3 / \text{mm}^3)$	<1457 (n=22)	≥1457 (n=23)		
Mediana	44,5	48,0		
Zakres	0,0 - 71,33	0,0 - 561,5		
Średnia	15,50	73,19		
Odchylenie standardowe	20,92	133,4		
Błąd standardowy	4,46	27,82		
Wartość p (test t)	0,0514			

5.3.4.6. Odsetek blastów w szpiku kostnym w chwili rozpoznania AML a ekspresja genu WT1

Przeanalizowano czy odsetek blastów w szpiku kostnym, oceniony w chwili rozpoznania zależy od ekspresji genu WT1 oznaczonego w szpiku przed rozpoczęciem leczenia białaczki (dzień 0). Badania przeprowadzono w dwóch grupach chorych wydzielonych w zależności od mediany (wynoszącej 2321) liczby kopii genu WT1 na



Wykres 12. Wykres przedstawiający odsetek komórek blastycznych w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku w czasie rozpoznania. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczona średnia z wartościami błędu standardowego.

Tabela 24. Porównanie odsetka blastów w szpiku kostnym w chwili rozpoznania w dwóch grupach pacjentów różniących się ekspresją genu WT1 oznaczoną w szpiku w dniu 0. (<2321 kopii i >2321 kopii na 10⁴ kopii genu ABL).

Odsetek blastów w szpiku kostnym przed	Ekspresja genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)			
rozpoczęciem leczenia	<2321 (n=29)	>2321 (n=29)		
Mediana	71,0	75,0		
Zakres	19,2 - 96,0	31,0 - 99,0		
Średnia	64,68	71,21		
Odchylenie standardowe	23,09	21,79		
Błąd standardowy	4,288	4,046		
wartość p (test t)	0,2727			

10⁴ kopii genu referencyjnego ABL. Badanie przeprowadzono w grupie 58 dzieci z oznaczoną ekspresją genu WT1 w szpiku kostnym w dniu 0. i znanym odsetkiem

blastów w szpiku kostnym w chwili rozpoznania AML. Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono na Wykresie 12 i w Tabeli 24. Wykazano, że średni odsetek blastów w szpiku w chwili rozpoznania był podobny w obu porównywanych grupach, różniących się ekspresją genu WT1 (p=0,2727).

5.3.5. Ocena różnic ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii

Przeanalizowano różnice ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej i w szpiku kostnym oznaczonej w próbkach pobranych w różnych okresach leczenia. W celu usystematyzowania danych okres terapii podzielono na punkty czasowe, odpowiadające następującym dniom realizowanego protokołu terapeutycznego: 0., 15., 30., 50., 75., 100., 150. i \geq 200.

5.3.5.1. Porównanie ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii analizowana u wszystkich ocenianych pacjentów



Wykres 13. Wykres logarytmiczny liczby kopii genu WT1 wyrażonej na 10⁴ kopii genu ABL w szpiku i krwi obwodowej w dniu rozpoznania dla wszystkich próbek uzyskanych od pacjentów. Na wykresie zaznaczono wartości średniej wraz z wartościami błędu standardowego. Wyniki dla pozostałych punktów leczenia przedstawiono w Tabeli 25.

W badaniu wykorzystano wszystkie próbki krwi obwodowej i szpiku kostnego, uzyskane od pacjentów z AML w chwili wstępnego diagnozowania i w różnych etapach leczenia (Wykres 13). Wykazano, że nie było istotnych różnic w ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej oznaczanej w próbkach pobranych w dniach: 0., 50., 75., 100., 150. i >200. Natomiast stwierdzono istotne różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w próbkach szpiku i krwi obwodowej pobranych w dniach 15. i 30. (p odpowiednio: 0,0305 i 0,0272). Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w Tabeli 25.

dzień	materiał	n	mediana	wartości min/max	średnia	odchyl. standard.	błąd standard.	p – test t
0	Szpik	63	2339	0,59 – 37596,00	4764	7035	886,3	0.1290
0.	Krew	45	1457	0,43 – 11513,00	3059	3537	527,3	0,1380
15	Szpik	23	53,51	0,00 – 6128,00	1050	1688	352,0	0.0305*
15.	Krew	15	5,09	0,00 - 428,10	61,59	123,2	31,80	0,0505
30	Szpik	31	39,81	0,00 – 5828,00	728,80	1468	263,7	0.0272*
50.	Krew	23	6,05	0,98 - 258,00	30,99	67,14	14,00	0,0272
50	Szpik	22	37,33	5,60 – 7355,00	891,80	2070	441,2	0 1738
50.	Krew	11	3,56	0,00 - 74,09	16,22	25,80	7,78	0,1750
75	Szpik	23	42,99	3,86 – 9928,00	690,3	2210	460,8	0 2046
75.	Krew	20	2,72	0,00 - 780,30	50,58	175,6	39,26	0,2010
100	Szpik	32	36,34	0,00 – 5034,00	520,2	1339	236,7	0.3488
100.	Krew	21	3,78	0,00 – 2262,00	222,0	660,8	144,2	0,3488
150	Szpik	15	45,11	9,84 – 5190,00	392,4	1328	342,8	0 8833
150.	Krew	8	2,34	0,82 – 3711,00	478,3	1307	462,0	0,8852
>200.	Szpik	11	30,09	3,37 – 1674,00	372,8	612,2	184,6	0 5654
	krew	7	1,83	0,00 - 1388,00	208,3	520,5	196,7	0,5054

Tabela 25. Porównanie wartości ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej (liczba kopii genu WT1 na 10^4 kopii genu ABL) pochodzących od wszystkich ocenianych pacjentów, od których uzyskano materiał w kolejnych wyznaczonych punktach czasowych tj. 0., 15., 30., 50., 75., 100., 150., >200.; n - liczebność badanych grup.

5.3.5.2. Porównanie ekspresja genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii analizowana u poszczególnych pacjentów

Porównano ekspresję geny WT1 w szpiku kostnym i krwi obwodowej w próbkach pochodzących od tych samych pacjentów, pobranych w różnych punktach czasowych terapii (Wykres 14).



Wykres 14. Wykres logarytmiczny liczby kopii genu WT1 wyrażonej na 10⁴ kopii genu ABL w szpiku i krwi obwodowej w dniu rozpoznania dla tych samych pacjentów. Na wykresie, dla szpiku i krwi, zaznaczono wartości średniej wraz z wartościami błędu standardowego. Wyniki dla pozostałych dni leczenia przedstawiono w Tabeli 26.

Tabela 26. Porównanie wartości ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej (liczba kopii genu WT1
na 10 ⁴ kopii genu ABL) pochodzących od tych samych pacjentów w kolejnych wyznaczonych punktach
czasowych tj. dni: 0., 15., 30., 50., 75., 100., 150., >200.; n – liczebność badanych grup.

dzień	materiał	n	mediana	wartości min/max	średnia	odchyl. standard.	błąd standard.	p – test par wiązanych
0.	szpik	39	2001	0,59 – 37596,00	5460	8515	1363	0,0356*
	krew	39	1574	1,55 – 11513,00	3056	3442	551,2	
15.	szpik	8	623,80	48,50 – 2544,00	979,3	1006	355,5	0,0276*
	krew	8	30,10	1,70 – 270,70	61,04	89,57	31,67	
30.	szpik	20	36,60	3,40 – 865,30	115,70	199,70	44,66	0,0107*
	krew	20	4,30	0,98 - 258,00	22,02	57,34	12,82	
50.	szpik	8	31,92	8,17 – 419,30	131,60	173,50	61,32	0,0772
	krew	8	3,02	1,34 - 58,45	12,39	20,02	7,08	
75.	szpik	16	44,37	3,86 – 696,50	89,03	164,40	41,11	0,0039**
	krew	16	3,33	0,39 - 780,30	52,85	194,00	48,51	
100.	szpik	14	30,46	11,17 – 113,80	35,19	25,29	6,76	0,0005***
	krew	14	2,42	0,43 - 26,42	6,66	8,80	2,35	
150.	szpik	6	46,95	9,84 - 83,67	42,25	27,58	11,26	0,0205*
	krew	6	1,40	0,82 - 8,91	2,75	3,11	1,27	
>200.	szpik	6	22,62	8,57 - 75,18	30,58	25,53	10,42	0,0425*
	krew	6	1,70	1,31 - 6,36	2,68	1,96	0,81	
Istotność statystyczną badano testem dla par wiązanych przy 95% przedziale ufności dla średniej. Wyniki przedstawiono w Tabeli 26. Istotne różnice w poziomie ekspresji genu WT1, dla tych samych pacjentów, uzyskano w dniach: 0., 15., 30., 75., 100., 150. i >200. (p odpowiednio: 0,0356, 0,0276, 0,0107, 0,0039, 0,0005, 0,0205 i 0,0425). Natomiast w dniu 50. różnica pomiędzy poziomem ekspresji genu WT1 w szpiku i w krwi była na granicy istotności. (p = 0,0772).

5.3.6. Odsetek blastów w szpiku kostnym w 15. dniu leczenia (ocena wczesnej odpowiedzi) a ekspresja genu WT1



Wykres 15. Wykres logarytmiczny przedstawiający odsetek komórek blastycznych (%) w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku w dniu 15. Na wykresie, dla każdej z grup, zaznaczona średnia z wartościami błędu standardowego.

Wśród 29 pacjentów z niższym poziomem ekspresji WT1 (rząd wielkości względem kontroli <1, >1, >2) u 28 (96,6%) odsetek blastów w szpiku kostnym w 15. dniu leczenia był niższy od 5%. Tylko w jednym (3,4%) przypadku z niższą ekspresją genu WT1 odsetek blastów był wyższy od 5% i wynosił 5,7%. W grupie, w której stwierdzono >2321 kopii genu WT1 na 10^4 kopii ABL (rząd wielkości względem kontroli >3 i >4), u 16 pacjentów (55,2%) odsetek blastów był niższy od 5%, a u 13 (44,8%) wyższy niż 5% blastów (maksymalnie 70%). Odsetek blastów w szpiku kostnym oceniany w 15. dniu leczenia był istotnie wyższy (p=0,0123) w grupie pacjentów z liczbą kopii genu WT1 >2321 w porównaniu do grupy z niższą ekspresją tego genu.

Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono na Wykresie 15 i w Tabeli 27.

Tabela 27. Porównanie odsetka blastów w szpiku kostnym w 15. dniu leczenia w dwóch grupach pacjentów różniących się ekspresją genu WT1 oznaczonego w szpiku w dniu 0. (<2321 kopii i >2321 kopii na 10^4 kopii genu ABL).

Odsetek blastów w szpiku	Ekspresja genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10 ⁴ kopii genu ABL)			
dniu leczenia	<2321 (n=29)	>2321 (n=29)		
Mediana	2,0	3,5		
Zakres	0,0-5,7	0,0-70,0		
Średnia	2,097	9,072		
Odchylenie standardowe	1,485	14,45		
Błąd standardowy	0,275	2,684		
wartość p (test t)	0,0123*			

5.3.7. Ocena przeżycia całkowitego

W badanej grupie pacjentów przeprowadzono ocenę przeżycia metodą Kaplana-Meiera, zarówno w obrębie całej grupy pacjentów, jak również w grupach dzieci wydzielonych pod względem poziomu ekspresji genu WT1.

5.3.7.1. Analiza przeżycia całkowitego w całej badanej grupie

W grupie 69 dzieci objętych badaniem do końca czasu obserwacji zmarło łącznie 24 pacjentów, w tym 15 z powodu progresji białaczki i 9 z powodu powikłań we wczesnym okresie choroby. Zakres czasu przeżycia całkowitego wynosił od 0,2 do 64,4 (mediana: 27,4, średnia: 27,2) miesięcy. Zgony wystąpiły w czasie od 0,2 do 22 (mediana: 6,3, średnia: 7,9) miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Ponad 3-letnie i 5-letnie OS wynosiło 64,9%.

Najwyższą śmiertelność odnotowano w ciągu pierwszych 22 miesięcy od chwili rozpoznania. W ciągu tego okresu oceniana populacja zmalała do 64,9% i taki stan utrzymywał się przez kolejne 42 miesiące aż do czasu zakończenia obserwacji (Wykres 16).



Wykres 16. Krzywa całkowitego przeżycia (OS) dla wszystkich badanych dzieci (n=69).

5.3.7.2. Analiza przeżycia całkowitego zależnie od grypy ryzyka



Wykres 17. Krzywa całkowitego przeżycia (OS) dla pacjentów zakwalifikowanych do SRG i HRG.

Porównano krzywe OS (Wykres 17) między pacjentami zakwalifikowanymi do SRG (n=25) i HRG (n=44). W grupie SRG ponad: 2-letnie i 4-letne OS wynosiło 79,5%, a w grupie HRG 56,6%. W HRG najwyższa śmiertelność przypadała na okres pierwszych 19 miesięcy od rozpoczęcia leczenia. Do tego czasu odsetek dzieci pozostających przy życiu wynosił 56,6%. W przypadku SRG do 17 miesiąca terapii przeżyło 92,0% pacjentów. Najwyższą śmiertelność dla tej grupy odnotowano

pomiędzy 17 a 22 miesiącem trwania leczenia. W tym czasie liczba pacjentów z SRG spadła do 79,5%. Uzyskane wartości p < 0,05 przy 95% przedziale ufności dla średniej potwierdziły istotne różnice pomiędzy badanymi grupami (Tabela 28).

Grupa ryzyka	Odsetek ponad 4- letniego OS	Test Mentel – Cox'a	Test Gehan-Breslow- Wilcoxon'a
SRG	79,5%	$Chi^2 - 4,004$	Chi ² – 4,366
HRG	56,6%	p-0,0454*	p - 0,0367*

Tabela 28. Przeżycie całkowite a grupy ryzyka (SRG i HRG).

5.3.7.3. Analiza przeżycia całkowitego zależnie od ekspresji genu WT1 w obserwowanej grupie



Wykres 18. Krzywa Kaplana – Meiera przedstawiająca prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów w zależności od wstępnego poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku.

W celu określenia wpływu poziomu ekspresji genu WT1 na wynik leczenia przeanalizowano OS w dwóch grupach pacjentów różniących się poziomem ekspresji genu WT1 (Wykres 18). W przypadku genu WT1 przyjęto medianę równą 2339 kopii na 10^4 kopii genu ABL jako wartość dzielącą badaną populację na dwie grupy. Pierwszą, w której nie stwierdzono nadekspresji lub ekspresja tego genu była tylko nieznacznie podwyższona (rząd wielkości względem kontroli: <1, >1, >2) i grupę z bardzo wysoką ekspresją genu WT1 (rząd wielkości względem kontroli: >3 i >4) w szpiku. W grupie pacjentów z bardzo wysoką ekspresją genu WT1 najwyższa śmiertelność przypadała na okres pierwszych 19 miesięcy od rozpoczęcia terapii. Do tego czasu odsetek dzieci nadal żyjących wynosił 57,1%. Natomiast w grupie z poziomem ekspresji WT1 \leq 2339 kopii na 10⁴ kopii ABL do 19 miesiąca terapii przeżyło 78,1% pacjentów. Najwyższą śmiertelność dla tej grupy odnotowano do 22 miesiąca trwania leczenia, po tym czasie liczebność populacji spadła do poziomu 71,9%. Dzieci z niską lub nieznacznie podwyższoną ekspresją genu WT1 uzyskały wyższy odsetek ponad 4-letniego OS niż z wysoką ekspresją, ale różnice nie były istotne statystycznie (Tabela 29).

Tabela 29. Porównanie grup pacjentów z poziomem ekspresji genu WT1 w szpiku ≤2339 kopii i >2339 kopii na 10⁴ kopii genu ABL.

Liczba kopii genu WT1	Odsetek ponad 4- letniego OS	Test Mentel – Cox'a	Test Gehan-Breslow- Wilcoxon'a
≤2339	71,9%	Chi ² – 1,465	Chi ² – 1,396
>2339	57,1%	p – 0,2262	p - 0,2375

5.3.8. Gen WT1 i wybrane geny fuzyjne jako potencjalne markery monitorowania minimalnej choroby resztkowej

5.3.8.1. Zmiany ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych programu terapeutycznego

5.3.8.1.1. Zmiany ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych programu terapeutycznego u tych samych pacjentów

Przeanalizowano poziom ekspresji genu WT1 w próbkach szpiku kostnego i krwi obwodowej pochodzących od tych samych pacjentów, w kolejnych punktach czasowych określonych programem leczenia. Wcześniej przedstawione w obecnej pracy wyniki badań wykazały, że poziom ekspresji genu WT1 w tym samym punkcie czasowym był istotnie wyższy w szpiku niż w krwi obwodowej (Tabela 26). Dlatego badania dotyczące zmian ekspresji tego genu w różnych punktach czasowych przeprowadzono odrębnie dla próbek pobranych ze szpiku kostnego i z krwi obwodowej. Dane dotyczące ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych, dla tego samego pacjenta, przedstawiono na Wykresach 19-21 oraz w Tabeli 30 (dla szpiku) i Tabeli 31 (dla krwi obwodowej).



Wykres 19. Wykres logarytmiczny poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej, wyrażony w liczbie kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL w kolejnych punktach leczenia. Próbki w każdym punkcie terapii pochodzą od tych samych pacjentów. Na wykresie, dla szpiku i krwi, zaznaczono wartości błędu standardowego. Zielone słupki – szpik, czerwone słupki – krew.

Szpik kostny

Stwierdzono istotny spadek liczby transkryptu genu WT1 w próbce pobranej ze szpiku kostnego w 15. dniu w porównaniu do punktu zerowego (p=0,0151). W tym przypadku mediana i średnia znormalizowanej liczby transkryptu badanego genu zmniejszyły się odpowiednio: 7 i 5,5 razy. Porównując różnice w ekspresji WT1 pomiędzy dniem 0. a dniem 30. zaobserwowano obniżenie ekspresji o 53 razy w odniesieniu do mediany i 8 razy dla średniej (p=0,0038), a między dniem 15. a 30. zanotowano spadek poziomu ekspresji o 11 razy dla mediany i 2 razy dla średniej (p=0,0132). Natomiast porównując zmiany w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku pomiędzy dniem 30. i pozostałymi punktami leczenia (50., 75., 100., 150. i >200.) nie stwierdzono istotnych różnic (wartości p > 0,05).

Krew obwodowa

Badając poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej w dniu 15., stwierdzono istotne zmniejszenie (p=0,0030) liczby kopii genu WT1 w stosunku do dnia 0. dla tych samych pacjentów. Wykazano obniżenie się ekspresji genu WT1 o 112 razy dla mediany i 10 razy dla średniej. Porównując różnice pomiędzy dniem 0. a dniem 30. spadek poziomu ekspresji genu WT1 wyniósł 211 razy dla mediany i 29 razy dla średniej (p=0,0004). Między dniem 15. a 30. zanotowano spadek poziomu ekspresji badanego genu o 12 razy dla mediany i 3 razy dla średniej, różnice nie były istotne (p=0,0991). Porównując zmiany w poziomie ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej pomiędzy dniem 30. i pozostałymi punktami leczenia (50., 75., 100., 150. i >200.) rónież nie zaobserwowano istotnych różnic (p > 0,05).



Wykres 20. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w dniu 0. i w 15. dniu leczenia (A), w dniu 15. i 30. (B), w dniu 0. i w 30. dniu leczenia (C). Na wykresie zaznaczono wartości średniej wraz z wartościami błędu standardowego.

Tabela 30. Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku pomiędzy dniami 0. i 30., 15. i 30. oraz 0. i 30. dla tych samych pacjentów; n – liczebność badanych grup.

Dzień	Materiał	n	Mediana	Wartości min/max	Średnia	Odchyl. standard.	Błąd standard.	Wartość p - test par wiązanych
0.	szpik	22	1775	4,62 - 37596	5474	8263	1762	0.0151*
15.	szpik	22	250,2	0,0 - 6128	1097	1712	365	0,0131
15.	szpik	16	543,00	0,0 - 6128	1425	1911	477,6	0.0122*
30.	szpik	16	46,89	0,0 - 3373	565,3	1042	260,6	0,0132
0.	szpik	29	2339	0,75 - 37596	6212	9192	1707	0.0028**
30.	szpik	29	43,88	0,0 - 5828	776,5	1507	279,9	0,003811



Wykres 21. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej w dniu 0. i w 15. dniu leczenia (A), w dniu 15. i 30. (B), w dniu 0. i w 30. dniu leczenia (C). Na wykresie zaznaczono wartości średniej wraz z wartościami błędu standardowego.

Dzień	Materiał	n	Mediana	Wartości min/max	Średnia	Odchyl. standard.	Błąd standard.	Wartość p (test par wiązanych)
0.	krew	15	1574	0,43 - 8273	2760	2993	772,7	0.0030**
15.	krew	15	14,84	0,0 - 1728	268,4	542	139,9	0,0030**
15.	krew	12	73,25	1,66 - 428,1	109,7	129,6	37,42	0.0001
30.	krew	12	6,115	1,51 - 258,0	33,56	72,73	21,00	0,0991
0.	krew	21	1377	0,43 - 8273	2379	2598	567	0.000/***
30.	krew	21	6,05	1,65 - 1244	82,03	272	59,35	0,0004

Tabela 31. Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej pomiędzy dniami 0. i 30., 15. i 30. oraz 0. i 30. dla tych samych pacjentów; n – liczebność badanych grup.

Porównując uzyskane wyniki dla szpiku i krwi obwodowej pochodzących od tych samych pacjentów można zauważyć, że poziom ekspresji genu WT1 w krwi obniżał się znacznie w ciągu pierwszych 15 dni leczenia, plasując się na poziomie, którego wartości w kolejnych punktach nie różniły się w sposób istotny między sobą (p>0,05). Natomiast w przypadku szpiku poziom ekspresji badanego genu spadał istotnie w pierwszych 15 dniach terapii. Istotny spadek transkryptu genu WT1 występował również między 15. dniem i 30., a w kolejnych badanych punktach liczba kopii tego transkryptu utrzymywała się na podobnym poziomie (p > 0.05).

5.3.8.1.2. Zmiany ekspresji genu WT1 w różnych punktach czasowych programu terapeutycznego u wszystkich pacjentów włączonych do badań

Podobne badania porównawcze dla zmian ekspresji genu WT1 w poszczególnych punktach czasowych programu terapeutycznego jak dla tych samym pacjentów, przeprowadzono dla wszystkich próbek uzyskanych w wyznaczonych punktach czasowych terapii. W pracy przedstawiono ogólny wykres poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku i w krwi (Wykres 22). Wyniki przedstawiono w Tabeli 32.



Wykres 22. Wykres logarytmiczny poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej w kolejnych etapach leczenia. Próbki pochodzą od wszystkich pacjentów. Na wykresie, dla szpiku i krwi, zaznaczono wartości błędu standardowego. Słupki zielone – szpik, słupki czerwone – krew.

Dla próbek pochodzących od wszystkich 69 pacjentów w poszczególnych dniach terapii uzyskano wartości ekspresji genu WT1 (Tabela 32) wykazujące podobne tendencje jak w przypadku próbek pochodzących od tych samych pacjentów (Tabele 30 i 31). Porównując zmiany w poziomie ekspresji genu WT1 pomiędzy dniem 30 i kolejnymi punktami leczenia nie zaobserwowano istotnych różnic dla wszystkich próbek zebranych w trakcie badań (wartości p > 0,05).

Dzioń	Dzień Moterioł		Madiana	Wartości	Śradnia	Odchyl.	Błąd	р
DZIEII	Materia	11	Meulalla	min/max	Steullia	standard.	standard.	(test t)
0.	szpik	65	2339,00	0,59 – 37596,00	4718,00	6952,00	862,30	0.01/15*
15.	szpik	23	53,51	0,00 – 6128,00	1050,00	1688,00	352,00	0,0143
15.	szpik	23	53,51	0,00 – 6128,00	1050,00	1688,00	352,00	0.4595
30.	szpik	31	39,81	0,00 – 5828,00	728,80	1468,00	263,70	0,4393
0.	szpik	65	2339,00	0,59 – 37596,00	4718,00	6952,00	862,30	0.0022**
30.	szpik	31	39,81	0,00 – 5828,00	728,80	1468,00	263,70	0,0022
0.	krew	45	1458,00	0,43 – 11513,00	3059,00	3537,00	527,30	0.0017**
15.	krew	15	5,09	0,00 - 428,10	61,59	123,20	31,80	0,0017
15.	krew	15	5,09	0,00 - 428,10	61,59	123,20	31,80	0 3 2 8 2
30.	krew	23	6,05	0,98 - 258,00	30,99	67,14	14,00	0,3282
0.	krew	47	1458,00	0,43 – 11513,00	3048,00	3508,00	511,70	0.0001***
30.	krew	23	6,05	0,98 - 258,00	30,99	67,14	14,00	-,

Tabela 32. Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku i w krwi obwodowej pomiędzy dniami 0. i 30., 15. i 30. oraz 0. i 30. dla wszystkich próbek uzyskanych od pacjentów; n - liczebność badanych grup.

5.3.8.2. Zmiany ekspresji genu WT1 i genów fuzyjnych w różnych punktach czasowych programu terapeutycznego



Wykres 23. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.

W kolejnym etapie badań przeanalizowano przebieg leczenia pacjentów, u których stwierdzono obecność jednego z badanych genów fuzyjnych, względem genu WT1 (Wykresy 23-33). Dla każdego z pacjentów przedstawiono punkty, w których pobrano materiał (szpik, krew obwodowa) do badania w trakcie leczenia.



Wykres 24. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 25. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 26. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 27. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 28. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 29. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 30. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 31. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 32. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego PML-RARα. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.



Wykres 33. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego CBFβ-MYH11. Na wykresie zaznaczone punkty leczenia, w których pobrano materiał od pacjenta (szpik, krew). Poziom ekspresji badanych genów wyrażony na 10⁴ kopii genu ABL.

Przebieg krzywych w trakcie terapii, zarówno dla genu WT1 jak i wybranego genu fuzyjnego (Wykresy 23-33), przedstawia podobne tendencje w trakcie

monitorowania MRD. W przypadku pacjenta 1 (Wykres 23) i 2 (Wykres 24) znaczny wzrost poziomu ekspresji genu WT1 i genu fuzyjnego odpowiadał wystąpieniu wznowy choroby. W chwili wznowy (odpowiednio 418 i 752 dzień terapii) wartości dla ekspresji obu markerów były porównywalne do tych stwierdzonych w chwili rozpoznania. U pozostałych pacjentów stwierdza się wyraźne obniżenie poziomu ekspresji w kolejnych punktach leczenia.

5.3.8.3. Analiza polimorfizmów wybranych sekwencji związanych z regulacją ekspresji genu WT1

W kolejnym etapie doświadczeń przeprowadzono badania na obecność polimorfizmów genetycznych, występujących w obrębie regionów regulatorowych genu WT1. Regiony promotora i sekwencji wzmacniających genu WT1, które zostały poddane amplifikacji przy użyciu metody PCR z zastosowaniem specyficznych starterów, rozdzielono na kolumnie stosując metodę DHPLC. Uzyskano następujące chromatogramy:

- dla odcinka promotora 1 (para starterów F1-R1):



Rycina 25. Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka promotora 1 genu WT1. Przedstawiono po jednym z wykresów dla pięciu grup uzyskanych w trakcie rozdziału DHPLC.

- dla odcinka promotora 2 (para starterów F2-R2):



Rycina 26. Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka promotora 2 genu WT1. Przedstawiono po jednym z wykresów dla trzech grup uzyskanych w trakcie rozdziału DHPLC.

- dla sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (para starterów F3-R3):



Rycina 27. Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka sekwencji wzmacniającej w intronie 3 genu WT1. Przedstawiono po jednym z wykresów dla trzech grup uzyskanych w trakcie rozdziału DHPLC.

- dla sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4):



Rycina 28. Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1. Przedstawiono po jednym z wykresów dla czterech grup uzyskanych w trakcie rozdziału DHPLC.

Analiza otrzymanych chromatogramów umożliwiła wyodrębnienie 5 grup dla odcinka promotora I, 3 grup dla odcinka promotora II, 3 grup dla sekwencji wzmacniającej w obrębie intronu 3 i 4 grup dla sekwencji wzmacniającej na 3' końcu wyodrębnionych genu WT1, podczas przesiewowego badania DHPLC. Sekwencjonowaniu poddano po jednej próbce z każdej grupy (w sumie 15 próbek). Obecność zmian polimorficznych analizowano u 53 pacjentów (76,8% z wszystkich pacjentów włączonych do badań), dla których uzyskano produkty w reakcji PCR dla wszystkich czterech badanych regionów genu WT1. Podczas analizy uzyskanych danych pod uwagę brano zarówno znane już polimorfizmy genu WT1, jak również szukano nowych zmian w obrębie badanych sekwencji. Uzyskane sekwencje porównano z sekwencją umieszczoną w bazie danych ENSEMBL:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ Gene/Summary?g=ENSG00000184937.

Poniżej przedstawiono wyniki sekwencjonowania:

- region promotora I (para starterów F1-R1), Ryciny 29-32:



Rycina 29. Wariant: rs72893528

G/C (C/G - S)11:32457545 (nić wiodąca). Sekwencja niekodująca, powyżej miejsca startu transkrypcji. Brak informacji dla tego SNP. W badanej sekwencji DNA obecność U wszystkich ocenianych pacjentów w badanej sekwencji DNA stwierdzono G.



11:32457386 (nić wiodąca) niekodująca, powyżej miejsca startu transkrypcji. Podane 2 indywidualne genotypy. W badanej sekwencji DNA obecność G stwierdzono u 91 % pacjentów. Na Rycinie 31 przedstawiono drugi wariant obserwowany w tej pozycji.

Rycina 31. Wariant: rs2234579

powyżej



C/insA/G 11: 32457352 – 32457351 (nić wiodąca). Sekwencja niekodująca, powyżej miejsca startu transkrypcji. U wszystkich ocenianych pacjentów w badanej sekwencji DNA stwierdzono obecność insercji A.

Rycina 32. Wariant: brak danych na temat mutacji.

- region promotora II (para starterów F2-R2), Ryciny 33 i 34:



T/C (A/G - R) 11:32457138 (nić wiodąca). Sekwencja 5' UTR, pozycja w transkrypcie: 39. Częstość alleli: A=0,392; G=0,608. Częstość genotypów: A/A=0,203; A/G=378; G/G=0,419. Podane 76 indywidualnych genotypy. U wszystkich ocenianych pacjentów w badanej sekwencji DNA stwierdzono T.

Rycina 33. Wariant: rs2234580



Rycina 34. Wariant: rs5030133





Rycina 35. Wariant: rs5030177

A/G (T/C - Y) 11:32448744 (nić wiodąca) Sekwencja intronowa, niekodująca. Częstość alleli: C=0,006; G=0,994. Częstość genotypów: T/C=0,011; T/T=0,989. Podane 91 indywidualnych genotypów. U wszystkich ocenianych pacjentów w badanej sekwencji DNA stwierdzono A.



-/C (-/G - Typ: delecja) 11:32448595-32448594 (nić wiodąca). Sekwencja intronowa, niekodująca. Brak informacji dla tego SNP. U wszystkich ocenianych pacjentów w badanej sekwencji DNA stwierdzono GC.

Rycina 36. Wariant: rs35925541



$T/G \; (A/C - M)$

11:32448569 (nić wiodąca). Sekwencja intronowa, niekodująca. Częstość alleli: A=0,372; C=0,628. Częstość genotypów: A/A=0,178; A/C=0,389; C/C=0,433. Podane 92 indywidualne genotypy. W badanej sekwencji DNA obecność T stwierdzono u 66% pacjentów. Na Rycinie 38 przedstawiono drugi wariant obserwowany w tej pozycji.



T/G (A/C - M) 11:32448569 (nić wiodąca). Sekwencja intronowa, niekodująca. Częstość alleli: A=0,372; C=0,628. Częstość genotypów: A/A=0,178; A/C=0,389; C/C=0,433. Podane 92 indywidualne genotypy W badanej sekwencji DNA obecność T/G stwierdzono u 34% pacjentów.

Rycina 38. Wariant: rs5030178

- region sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4), ryciny 39-44:



Rycina 40. Wariant: rs5030335



Rycina 43. Wariant: rs5030338



T/A 11: 32408629 (nić wiodąca). sekwencja poniżej genu, niekodująca. W badanej sekwencji DNA obecność T/A stwierdzono u 32,1% pacjentów. W pozostałych przypadkach obserwowano T (61,9%).

Rycina 44. Wariant: brak danych na temat SNP.

Po przeanalizowaniu trzech badanych odcinków genu WT1, tj. sekwencji proksymalnego odcinka regionu promotora i dwóch sekwencji wzmacniających, zaobserwowano obecność zarówno znanych SNP, jak również dwóch nowych, dotąd nie opisanych zmian nukleotydowych (brak danych w bazie ENSEMBL).

Wśród znanych SNP wykazano:

Wariant rs72893528 (G/C) dotyczy sekwencji niekodującej, znajdującej się powyżej miejsca startu transkrypcji. U wszystkich pacjentów włączonych do analizy stwierdzono obecność G w obu allelach (homozygota). W związku z brakiem danych na temat tego SNP nie porównano częstości występowania homozygoty G/G w stosunku do populacji kontrolnej (brak w bazie ENSEMBL).

Wariant rs2234579 (G/T) występuje w regionie sekwencji niekodującej, znajdującej się powyżej miejsca startu transkrypcji. W przypadku 91% pacjentów stwierdzono obecność G w obu allelach (homozygota). U 9% pacjentów wariant ten występował jako heterozygota G/A. W związku z obecnością w bazie ENSEMBL tylko dwóch indywidualnych genotypów nie porównywano częstości występowania zaobserwowanych zmian.

Wariant rs2234580 (T/C) znajduje się w obrębie regionu 5'UTR (ewentualna zmiana nukleotydu nie zmienia sekwencji białkowej) genu WT1 i zajmuje 39 pozycję w transkrypcie. U wszystkich pacjentów włączonych do analizy stwierdzono obecność T w obu allelach (homozygota). Częstość występowania genotypów T/T, T/C i C/C w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 20,3%, 37,8% i 41,9% (ENSEMBL).

Wariant rs5030133 (C/T) znajduje się w obrębie regionu 5'UTR genu WT1 i zajmuje 196 pozycję w transkrypcie. U wszystkich pacjentów włączonych do analizy stwierdzono obecność C w obu allelach (homozygota). Częstość występowania opisanych genotypów C/C i C/T w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 98,7% i 1,3% co dopowiada uzyskanym wartościom 100% C/C w badanej populacji.

Wariant rs5030177 (A/G) znajduje się w obrębie regionu sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (sekwencja intronowa, niekodująca) genu WT1. U wszystkich pacjentów włączonych do analizy stwierdzono obecność A w obu allelach (homozygota). Częstość występowania opisanych genotypów A/A i A/G w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 98,9% i 1,1% co dopowiada uzyskanym wartościom 100% A/A w badanej populacji.

Wariant rs35925541 występuje w obrębie regionu sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (sekwencja intronowa, niekodująca) genu WT1. W przypadku obecności tego wariantu dochodzi do delecji nukleotydu G w pozycji 11:32448595. U żadnego z badanych pacjentów nie stwierdzono delecji wymienionego nukleotydu.

Wariant rs5030178 (T/G) występuje w obrębie regionu sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (sekwencja intronowa, niekodująca) genu WT1. U 66% pacjentów stwierdzono obecność T w obu allelach (homozygota), u 34% pacjentów T/G. Częstość występowania opisanych genotypów T/T, T/G i G/G w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 17,8%, 38,9% i 43,3% co dopowiada uzyskanym wartościom dla genotypu T/G w populacji badanej. Wariant T/T w przypadku pacjentów występował 3,7 razy częściej niż w populacji kontrolnej (ENSEMBL).

Wariant rs5030335 (C/T) dotyczy sekwencji wzmacniającej znajdującej się na końcu 3' (sekwencja poniżej genu, niekodująca) genu WT1. U 80% badanych pacjentów stwierdzono obecność C w obu allelach (homozygota), u 20% pacjentów C/T. Częstość występowania opisanych genotypów C/C, C/T i T/T w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 86,7%, 11,7% i 1,7% co odpowiada uzyskanym wartościom dla genotypów C/C i C/T w populacji badanej.

Wariant rs5030336 (G/A) występuje w sekwencji wzmacniającej znajdującej się na końcu 3' (sekwencja poniżej genu, niekodująca) genu WT1. U 97% pacjentów stwierdzono obecność G w obu allelach (homozygota), u 3% G/A. Częstość występowania opisanych genotypów G/G i G/A w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 96,5% i 3,5% co odpowiada uzyskanym wartościom dla genotypów G/G i G/A w populacji badanej.

Wariant rs5030337 (T/C) występuje w sekwencji wzmacniającej znajdującej się na końcu 3' (sekwencja poniżej genu, niekodująca) genu WT1. U wszystkich pacjentów włączonych do analizy stwierdzono obecność T w obu allelach (homozygota). Częstość występowania opisanych genotypów T/T i T/C w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 98,8% i 1,2% co odpowiada uzyskanym wartościom dla genotypu T/T w populacji badanej.

Wariant rs5030338 (G/A) dotyczy sekwencji wzmacniającej znajdującej się na końcu 3' (sekwencja poniżej genu, niekodująca) genu WT1. U wszystkich pacjentów włączonych do analizy stwierdzono obecność G w obu allelach (homozygota). Częstość występowania opisanych genotypów G/G, G/A i A/A w populacji kontrolnej wynosiła odpowiednio: 90,7%, 8,1% i 1,2% co odpowiada uzyskanym wartościom dla genotypu G/G w populacji badanej.

Przeanalizowano związek pomiędzy obecnością stwierdzonych, znanych SNP genu WT1 a poziomem ekspresji tego genu. Nie wykazano wpływu tych polimorfizmów na poziom ekspresji genu WT1 (p>0,05).

Dodatkowo stwierdzono dwie zmiany, dotychczas nieopisane w bazie ENSEMBL. Dotyczyły one: 1) sekwencji promotora (sekwencja niekodująca powyżej miejsca startu transkrypcji) i 2) sekwencji wzmacniającej znajdującej się na końcu 3' (sekwencja niekodująca) genu WT1. W obrębie badanej sekwencji proksymalnej promotora genu WT1, u wszystkich badanych pacjentów z AML, uzyskano obraz sekwencjonowania wskazujący na obecność insercji A między nukleotydami C i G znajdującymi się w pozycjach 11:32457352 i 11:32457351 badanego genu. Druga opisywana zmiana (wcześniej nie opisany SNP) dotyczy zamiany T/A w pozycji 11:32408629, która występowała u 32% obecnie przedstawianych pacjentów.

Przeprowadzone analizy dla zmiany T/A (11:32408629) nie wykazały wpływu jej obecności na poziom ekspresji genu WT1. Porównując grupę pacjentów, u których stwierdzono obecność opisywanej zmiany (T/A) z pacjentami bez zmiany, nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie ekspresji genu WT1 (p>0,05).

5.4. Ocena stabilności RNA w otrzymanych próbkach szpiku i krwi obwodowej

Materiał do badań molekularnych, z użyciem RNA, stanowiły próbki szpiku kostnego i krwi obwodowej pobrane od pacjentów z AML na antykoagulant (EDTA). Pomimo wytycznych, dotyczących zabezpieczenia i transportu, część materiału uległa degradacji. Na Wykresach 34-35 przedstawiono graficznie rozkład zebranego materiału w poszczególnych punktach czasowych leczenia z uwzględnieniem próbek, które uległy degradacji i materiału, który wykorzystano do analiz. Dane zebrano w Tabeli 33.

Spośród 249 przesłanych próbek ze szpiku kostnego, RNA uległo degradacji w 29 (11,6%), w tym najczęściej w materiale pobranym w dniach: 15. (23,3%), 75. (17,9%) i 150. (16,7%). Najniższy odsetek zdegradowanego RNA uzyskano w próbkach pochodzących z punktu 0. (3,1%) i pobranych powyżej 200. dnia (0%).

Spośród 177 przesłanych próbek z krwi obwodowej, RNA uległo degradacji w 27 (15,3%), w tym najczęściej w materiale pobranym w dniach: 50. (31,2%), 75. (20,0%) i >200. (22,9%). Najniższy odsetek zdegradowanego RNA uzyskano w próbkach pochodzących z punktu 0. (5,3%).



Wykres 34. Wykres przedstawiający rozkład próbek RNA uzyskanych ze szpiku w kolejnych punktach terapii.



Wykres 35. Wykres przedstawiający rozkład próbek RNA uzyskanych z krwi obwodowej w kolejnych punktach terapii.

Materiał	Dzień leczenia	Materiał otrzymany	Materiał analizowany (%)	Degradacja materiału (%)
	0.	65	63 (96,9)	2 (3,1)
	15.	30	23 (76,7)	7 (23,3)
	30.	35	31 (88,6)	4 (11,4)
	50.	25	22 (88,0)	3 (12,0)
Szpik	75.	28	23 (82,1)	5 (17,9)
	100.	37	32 (86,5)	5 (13,5)
	150.	18	15 (83,3)	3 (16,7)
	>200.	11	11 (100,0)	0 (0,0)
	Razem	249	220 (88,4)	29 (11,6)
	0.	47	45 (95,7)	2 (5,3)
	15.	18	15 (83,3)	3 (16,7)
	30.	28	23 (82,1)	5 (17,9)
	50.	16	11 (68,8)	5 (31,2)
Krew	75.	25	20 (80,0)	5 (20,0)
	100.	25	21 (84,0)	4 (16,0)
	150.	9	8 (88,9)	1 (11,1)
	>200.	9	7 (77,8)	2 (22,2)
	Razem	177	150 (84,7)	27 (15,3)

Tabela 33. Materiał w postaci RNA analizowany w kolejnych punktach terapii.

Na degradację RNA w badanych próbkach miały wpływ: obecność skrzepów (najprawdopodobniej niedostateczne wymieszanie materiału z antykoagulantem, n=10, 34,5%), liza komórek (zamrożenie materiału, n=4, 13,8%), zbyt długi transport (powyżej 48 godzin, n=8, 27,6%), transport w temperaturze powyżej +4°C

(temperatura otoczenia, n=7, 24,1%). W przypadku zdegradowanego RNA, z otrzymanego materiału izolowano tylko DNA, które posłużyło do oznaczenia FLT3-ITD.

Przyczyna	Materiał				
RNA	Szpik (%)	Krew (%)			
Zamrożenie	4 (13,8)	4 (14,8)			
Transport pow. 48 godz.	8 (27,6)	8 (29,6)			
Transport w temperaturze otoczenia	7 (24,1)	6 (22,3)			
Obecność skrzepów	10 (34,5)	9 (33,3)			

Tabela 34. Przyczyny degradacji/braku RNA w próbkach.

6. Dyskusja

AML jest jedną z postaci złośliwych nowotworów układu krwiotwórczego, charakteryzującą się niekontrolowanym rozrostem niedojrzałych krwinek białych (innych niż limfocyty) lub erytroblastów i komórek produkujących płytki krwi (megakariocyty). Dochodzi do zahamowania prawidłowej czynności szpiku i wyparcia z niego prawidłowych komórek, a w dalszym etapie do ciężkiej niedokrwistości, skazy krwotocznej i zaburzeń odporności, a także zaburzeń funkcji wielu narządów (nacieki komórek nowotworowych). Nieprawidłowe komórki stwierdzane w ostrych białaczkach reprezentują klonalny rozrost i zahamowanie na pewnym etapie rozwoju prawidłowej hematopoezy. Proces nowotworowy jest wynikiem zaburzonej funkcji komórki (nieprawidłowe: przekazywanie sygnałów, apoptoza, transkrypcja i różnicowanie komórek) wskutek kumulowania się wielu zmian genetycznych pod wpływem różnych czynników [12, 48, 74, 118, 139, 175].

Cytogenetyczne i molekularne badania komórek białaczkowych stanowią ważny element w diagnozowaniu białaczek. Zidentyfikowanie specyficznych dla danego podtypu białaczki nieprawidłowości cytogenetycznych, pozwala na dokładniejszą diagnozę i lepszą kwalifikację do grup ryzyka. Biologia AML różni się zasadniczo od patogenezy innych rodzajów białaczek, często dochodzi do powstania białek fuzyjnych, kodowanych przez geny powstałe wskutek translokacji chromosomowej [12, 78, 147, 175, 177].

Zmiany w obrębie kariotypu stwierdza się u ponad 70% dzieci z AML [19, 41, 59, 64, 81, 116, 122, 136, 171, 178, 182, 238]. Anomalie dotyczą liczby chromosomów lub zmian strukturalnych (inwersje, translokacje i delecje), bądź obu tych aberracji. Identyfikacja zaburzeń jest tym istotniejsza, że ich obecność koreluje się z przebiegiem choroby [78]. Do najczęstszych zaburzeń chromosomalnych należą: t(8;21), t(15;17), inv(16), t(9;11), t(11q23), monosomia 7, t(1;22), inv(3)/t(3;3), i t(6;9), ale rzeczywista częstość występowania poszczególnych zaburzeń chromosomalnych i molekularnych udzieci z AML jest ciągle nieznana [77, 78, 100, 170, 175, 177, 213]. Dlatego podjęto badania w tym temacie.

Do badań własnych włączono pacjentów, u których stwierdzono AML jako nowotwór pierwotny. Materiał badany, odpowiadający powyższym kryteriom, otrzymano od 69 (53,1%) dzieci spośród 130 z nowo rozpoznaną pierwotną AML w okresie 01.03.2006-31.06.2009 r. w 14 ośrodkach PPGLBC. W ocenianej grupie pacjentów było nieco więcej chłopców w porównaniu do dziewcząt (1,15:1), co jest zgodne z innymi doniesieniami [56, 99].

Obecnie przedstawiana praca stanowi element wieloośrodkowych badań, których celem było wdrożenie standardów badań molekularnych, służących do identyfikacji i określenia poziomu wybranych markerów nowotworowych u dzieci z AML na terenie Polski. W przeprowadzonych badaniach skupiono się nad najczęściej występującymi zmianami, stanowiącymi istotny znany czynnik rokowniczy (powtórzenie ITD w genie FLT3) lub potencjalny marker dla oznaczenia minimalnej choroby resztkowej (MRD), takich jak obecność transkryptów mRNA powstałych na skutek rearanżacji chromosomowych tj.: t(8;21) (AML1-ETO), t(15;17) (PML-RARα) i inv16 (CBFβ-MYH11) oraz nadekspresję genu WT1.

Występowanie wybranych genów fuzyjnych. W materiale własnym łącznie u 14 (20%) pacjentów stwierdzono obecność jednego z wyżej wymienionych transkryptów (Wykres 1).

Według danych literaturowych występowanie transkryptu fuzyjnego AML1-ETO stwierdza się u 7-16% w populacji dziecięcej, a jego obecność kojarzona jest z typem M_2 wg klasyfikacji FAB [19, 41, 64, 78, 116, 136, 171, 178, 213, 238]. W przedstawionej obecnie grupie pacjentów z AML gen AML1-ETO wykryto w 13% przypadków. Wszyscy oceniani pacjenci z obecnym genem AML1-ETO byli zakwalifikowani do typu M_2 , co jest zgodne z obserwacjami innych autorów.

Obecność transkryptu fuzyjnego PML-RAR α stwierdza się u 2-10% w populacji dziecięcej z AML. Translokacja t(15;17) związana jest z ostrą białaczką promielocytową (typ M₃ wg klasyfikacji FAB) [19, 64, 78, 133, 136, 137, 171, 182, 211, 213]. W badanej obecnie grupie dzieci z AML gen fuzyjny PML-RAR α stwierdzono w 4% przypadków, a obecność opisywanego genu dotyczyła typu M₃.

Występowanie transkryptu fuzyjnego CBF β -MYH11 stwierdza się u 3-8% w grupie pediatrycznej z AML. Inwersję chromosomu 16 koreluje się z typem M₄ [29, 30, 64, 78, 122, 136, 137, 178, 213, 238, 246]. W materiale własnym gen fuzyjny CBF β -MYH11 stwierdzono w 3%. Pacjenci z powyższą nieprawidłowością byli zakwalifikowani do typu M₄ wg FAB.

W badaniach własnym nie analizowano wpływu obecności transkryptów fuzyjnych na przebieg leczenia, utrzymywania się remisji lub czasu przeżycia pacjenta ze względu na małą liczebność podgrup.

Analiza obecnie przedstawianego materiału wskazuje na trafność doboru specyficznych sond i starterów użytych w metodzie PCR w czasie rzeczywistym (*z ang. Real Time PCR*) do ilościowego oznaczania genów fuzyjnych [69, 232]. Zestawy do badań zostały dobrane tak, aby produkty amplifikacji obejmowały kodujące transkrypty powstałe na skutek rearanżacji chromosomowej. Diagnostyka jest szybka i pozwala na dokładne określenie poziomu nieprawidłowych transkryptów. Ponadto uzyskane wyniki badań molekularnych były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą FISH (wyniki uzyskane z dokumentacją pacjenta), co pozwala stwierdzić przydatność metody PCR w czasie rzeczywistym do oznaczeń i wprowadzenia jej do rutynowej diagnostyki AML.

Występowanie powtórzeń FLT3-ITD. Obecność powtórzeń FLT3-ITD w AML związana jest z niekorzystnym rokowaniem. W grupie chorych, u których stwierdza się tą nieprawidłowość, obserwuje się niski odsetek remisji całkowitych, długich przeżyć i skrócenie czasu przeżycia wolnego od choroby [2, 8, 107, 109, 110, 126, 146, 152, 243, 254]. Częstość występowania FLT3-ITD stwierdza się u 5-22% dzieci chorych na AML [8, 97, 109, 126, 146, 254]. W przedstawionej obecnie grupie dzieci z AML występowanie powtórzeń tandemowych ITD stwierdzono w 8,7% (Wykres 2). Powtórzenia ITD w badanej grupie dotyczyły zawsze zmian w obrębie jednego allela genu FLT3.

Analizując materiał własny wykazano, że powtórzenia tandemowe FLT3-ITD częściej występowały w przypadku określonych typów wg FAB. To zaburzenie najczęściej stwierdzono w typie: M_3 (60%). W typach M_0 , M_1 i M_4 odsetek powtórzeń tandemowych FLT3-ITD, był podobny i wynosił odpowiednio: 11%, 11% i 7% (Tabela 14), a w pozostałych typach nie znaleziono tej zmiany. Z danych literaturowych wynika, że w grupie pediatrycznej częściej stwierdza się obecność FLT3-ITD w typach M_1 (15-22%), M_3 (25-67%) i M_4 (8-20%) [109, 126]. Przeprowadzone badanie na dużej grupie chorych (234 pacjentów) wykazało, że FLT3-ITD było obecne we wszystkich typach AML z wyjątkiem M_7 , a najwyższy odsetek przypadków z tą nieprawidłowością wykazano w M_0 - M_3 i w M_6 u dzieci z AML (11-25%) [254]. Istnieją również prace, przedstawiające rzadsze występowanie FLT3-ITD, stwierdzona nieprawidłowość dotyczyła typów M_1 - M_4 [101, 112]. Przedstawione powyżej doniesienia oraz wyniki badań własnych wskazują na częstsze występowanie FLT3-ITD w typach M_0 - M_4 u dzieci z AML.

Natomiast u pacjentów dorosłych obecność FLT3-ITD stwierdzano we wszystkich typach AML, a częstość tej zmiany tylko nieznacznie różniła się między poszczególnymi typami [71, 110, 143, 198, 215]. Zaobserwowano, że odsetek FLT3-ITD w danym typie AML zmieniał się również w obrębie grup wiekowych u dorosłych [5].

U pacjentki BE (materiał własny), u której stwierdzono obecność FLT3-ITD zaobserwowano, że badany region różnił się w stosunku do pozostałych pacjentów z opisywaną zmianą. Przy zastosowaniu tego samego zestawu starterów do reakcji PCR stwierdzono, że ITD u pacjentki BE obejmowało większy obszar genu. Długość produktu PCR (Rycina 23) dla jednego z prążków w tym przypadku wynosiła około 600 pz (prawidłowy produkt PCR to 329 pz), podczas gdy pozostali pacjenci z FLT3-ITD (Rycina 24) wykazywali obecność zmiany obejmującej około 50 pz. Pacjentka BE miała ustalony typ M_3 ze stwierdzoną translokacją t(15;17). Zmarła w piątej dobie po rozpoznaniu z powodu powikłań (intensywne krwawienia i posocznica). W dostępnej literaturze sugeruje się, że długość genu objęta zmianą ma istotne znaczenie dla czasu przeżycia [143, 145]. Im większy region objęty jest ITD tym gorsze rokowanie, co może tłumaczyć niekorzystny przebieg choroby w przedstawionym powyżej przypadku.

W obecnie przedstawianych badaniach ograniczono się do oznaczenia częstości powtórzeń tandemowych genu FLT3 u dzieci z AML. Nie analizowano wpływu obecności wykrytej zmiany na wyniki leczenia, a także nie sekwencjonowano otrzymanych prążków. Uzyskane pozytywne wyniki (obecność FLT3-ITD) zgodnie z obowiązującymi w PPGLBC kryteriami decydowały o zakwalifikowaniu pacjenta do HRG z wyjątkiem typu M₃ i białaczki z zespołem Downa (Tabela 4). Jednakże, w przypadku obecności FLT3-ITD próbki powinny zostać poddane sekwencjonowaniu, aby określić wielkość obszaru objętego powtórzeniami w celu zbadania znaczenia rokowniczego obszaru genu objętego zmianą, co powinno być przedmiotem dalszych badań.

Znaczenie zmian w obrębie genu WT1. Gen WT1 ulega nadekspresji u ponad 70% (70-90%) przypadków dziecięcej AML [18, 20, 108, 119, 142, 156, 163]. W związku z tym prowadzone są badania nad wykorzystaniem tego markera do monitorowania leczenia AML. W niektórych doniesieniach przedstawiono wpływ liczby transkryptu genu WT1 na całkowite przeżycie [15, 18, 95, 161, 197, 244].

Porównując poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej przedstawianej obecnie grupie dzieci z AML z grupą osób zdrowych, zaobserwowano wyraźnie wyższy poziom ekspresji tego genu u pacjentów z białaczką (Wykres 3, Tabela 15). Podobne różnice pomiędzy chorymi a zdrowymi przedstawiają dane zawarte w literaturze [15, 79, 159].

W materiale własnym, w chwili rozpoznania AML, u 92,8% stwierdzono nadekspresję genu WT1 w próbce otrzymanej ze szpiku kostnego, co jest zgodne z danymi przedstawianymi w dostępnej literaturze [18, 20, 108, 119, 142, 156, 163]. U 81,2% pacjentów poziom ekspresji genu WT1 był co najmniej o dwa rzędy wielkości wyższy względem kontroli. Poziomy transkryptu genu WT1 oznaczone w krwi obwodowej pobranej od obecnie analizowanej grupy pacjentów z AML wykazywały podobne tendencje do uzyskanych w badaniach szpiku kostnego (Tabela 13).

Poziom ekspresji genu WT1 a cechy związane z pacjentem i z białaczką. W badaniach własnych nie wykazano różnic między poziomem ekspresji genu WT1 w zależności od płci i wieku dziecka (Wykresy 4-5, Tabela 16). W innych badaniach stwierdzono niższą ekspresję tego genu u niemowląt w porównaniu do starszych dzieci [20]. W obecnie analizowanym materiale wykazano, że najwyższa ekspresja genu WT1 była w typie M₃ (Wykres 6, Tabela 17 i 18), a najniższa w M₅. Według danych literaturowych, w przypadku AML, obserwowano wyraźnie wyższy poziom ekspresji genu WT1 w typach M₀-M₃, a niższy w typach M₄-M₇[163, 168, 227], co wykazano również w analizach własnego materiału. W typie M₅ stwierdza się szczególnie niski poziom ekspresji genu WT1 [227].

W materiale własnym nie stwierdzono związku pomiędzy poziomem ekspresji genu WT1 a grupami ryzyka ustalonymi zgodnie z kryteriami stosowanego programu terapeutycznego (Wykresy 7-8, Tabele 19-20). Inne badania wykazały brak związku między ekspresją genu WT1 a cytogenetycznymi grupami ryzyka [20]. W obecnie przedstawianych badaniach sprawdzono również czy obecność badanych genów fuzyjnych tj.: AML1-ETO, PML-RARα i CBFβ-MYH11 może korelować z różnym poziomem ekspresji genu WT1. Stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu WT1 u pacjentów z obecnym genem fuzyjnym CBFβ-MYH11 i PML-RARα w porównaniu do genu AML1-ETO (Wykres 9, Tabela 21). Ze względu na niską liczebność podgrup pacjentów z CBFβ-MYH11 i PML-RARα nie przeprowadzono szczegółowych analiz statystycznych. Nieliczne dostępne publikacje przedstawiające zależności między ekspresją genu WT1 a rodzajem genu fuzyjnego, wskazują na obecność różnic w zależności od rodzaju występujących aberracji [120, 163, 237]. Najwyższy poziom ekspresji genu WT1 opisywany był w przypadku fuzji PML-RARα [163], a najniższy poziom ekspresji genu WT1 obserwowany był u pacjentów ze zmianą AML1-ETO [120, 163, 237].

W obecnie przedstawionych badaniach wykazano, że w grupie dzieci z wyższą ekspresją genu WT1 oznaczoną przed rozpoczęciem leczenia w próbce krwi obwodowej była istotnie wyższa mediana liczby leukocytów (p=0,037) w porównaniu do grupy z niższą ekspresją tego genu (Wykres 10, Tabela 22). U pacjentów z wyższą ekspresją genu WT1 stwierdzono również wyższą liczbę blastów w krwi obwodowej (Wykres 11, Tabela 23), ale różnice pomiędzy porównywanymi grupami były na pograniczu istotności (p= 0,051). Natomiast nie wykazano związku pomiędzy poziomem ekspresji genu WT1 a odsetkiem blastów stwierdzonym w szpiku kostnym przed rozpoczęciem leczenia (Wykres 12, Tabela 24). Boublikova i wsp. nie stwierdzili związku między poziomem ekspresji genu WT1 a wstępną liczbą leukocytów [20].

Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku kostnym i w krwi obwodowej przed rozpoczęciem leczenia oraz w różnych punktach czasowych terapii. Badając poziom ekspresji genu WT1 zaobserwowano, że jego wartości różnią się istotnie w zależności od rodzaju materiału jakim jest szpik i krew obwodowa. Porównując poziom ekspresji badanego genu dla próbek krwi i szpiku pochodzących od tych samych pacjentów stwierdzono wyższy poziom transkryptu tego genu w szpiku (Tabela 26). Ważną informacją jest to, że wartości ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej w kolejnych punktach leczenia tj. w dniach: 30., 50., 75., 100., 150. i ≥200 miały wartości zbliżone do wartości prawidłowych. Średnia wartość mediany dla liczby transkryptu WT1 w opisywanych punktach czasowych wyniosła 2,69 kopii (1,4-4,3 kopii). W przypadku szpiku mediana dla poziomu ekspresji WT1 w dniach 30.≥200. wynosiła średnio 35,48 kopii/10⁴ kopii ABL (22,6-44,4 kopii). Według danych literaturowych wartości poziomu genu WT1 w szpiku u osób zdrowych mogą przyjmować wartości 0,73-6,03 kopii na 10⁴ kopii ABL [163]. Inni autorzy uważają, że stosunek kopii genu WT1 do ABL równy 1:16 w szpiku jest wartością graniczną, powyżej której poziom ekspresji genu WT1 obserwowany jest tylko w grupie osób chorych [162]. Dla leukocytów krwi obwodowej wartości prawidłowe liczby transkryptu WT1 mogą przyjmować wartości w zakresie 0-4,9 kopii na 10⁴ kopii ABL [159, 163]. Uzyskane własne wyniki badań sugerują słuszność badania szpiku, w trakcie leczenia AML, z uwagi na szybkie obniżenie liczby kopii genu WT1 w krwi

obwodowej do poziomu obserwowanego w populacji zdrowej, podczas gdy poziom ekspresji genu WT1 w szpiku utrzymuje się nadal na podwyższonym poziomie przez dłuższy okres czasu.

Ekspresja genu WT1 a odpowiedź na wstępne leczenie. W badaniu własnym przeanalizowano również wpływ poziomu ekspresji genu WT1 na rodzaj odpowiedzi na leczenie indukcyjne ocenianej w 15. dniu realizacji programu terapeutycznego (Wykres 15). W przypadku pacjentów, u których w szpiku poziom ekspresji genu WT1 był poniżej wartości mediany (rząd wielkości <1, >1 i >2 względem kontroli), u ponad 96% chorych w dobie 15. odsetek blastów był niższy od 5%. Natomiast w grupie pacjentów, u których poziom ekspresji WT1 był powyżej wartości mediany aż w 49% odsetek komórek blastycznych był wyższy od 5% (maksymalnie 70%) (Wykres 15, Tabela 27). W chwili rozpoznania w obu porównywanych grupach nie obserwowano różnic - odsetek blastów w szpiku był podobny i wynosił około 73% (Wykres 12, Tabela 24). Odsetek blastów w szpiku kostnym powyżej 5%, stwierdzony w 15. dniu terapii, stanowi jeden z najbardziej niekorzystnych czynników rokowniczych [147, 165, 175]. Obserwacje własne wskazują na niekorzystny wpływ wysokiego poziomu ekspresji genu WT1 na wstępne wyniki leczenia co zostało również przedstawione przez innych autorów [15, 18, 95, 161].

Poziom genu WT1 a całkowity czas przeżycia. Analizując długość przeżycia w badanej obecnie grupie zaobserwowano, że w ciągu pierwszych 22 miesięcy doszło do największego odsetka zgonów (Wykres 16). Porównując krzywe przeżycia dla SRG i HRG (Wykres 17) z wykresem przeżycia dla całej populacji badanych pacjentów stwierdzono, że główny wpływ na spadek liczebności badanej populacji miała wysoka śmiertelność pacjentów w HRG (Tabela 28). Ważnym aspektem było sprawdzenie czy poziom ekspresji genu WT1 wpływa na długość przeżycia u chorych na AML. Dzieci z niską lub nieznacznie podwyższoną ekspresją genu WT1 (n=32) uzyskały wyższy odsetek ponad 4-letniego OS niż z wysoką ekspresją (n=31), ale różnice nie były istotne statycznie (Tabela 29). Niektóre dane literaturowe potwierdzają to spostrzeżenie [15, 18, 95, 161], ale istnieją prace przedstawiające zarówno odmienne wyniki badań [197, 244], jak również wykazujące brak wpływu poziomu ekspresji genu WT1 na OS [82]. Uzyskane w obecnie przedstawianej pracy wyniki badań nie wykazują wpływu oznaczonego poziomu ekspresji genu WT1 przed włączeniem leczenia na przeżycie pacjentów z AML.

Gen WT1 i wybrane geny fuzyjne jako potencjalne markery monitorowania minimalnej choroby resztkowej. Monitorowanie minimalnej choroby resztkowej jest ważnym aspektem sprawdzającym przebieg choroby oraz skuteczność terapii. Pozwala na szybkie stwierdzenie wczesnej progresji lub nawrotu choroby i podjęcie odpowiednich kroków terapeutycznych. Coraz częściej rozważa się możliwość wykorzystanie poziomu ekspresji genu WT1 jako markera w monitorowaniu MRD u pacjentów z AML [108, 159, 163, 194]. Trend ten związany jest z wysoką częstością nadekspresji genu WT1 w tej grupie chorych, a zwłaszcza u dzieci [18, 20, 108, 119, 142, 156, 163].

W trakcie prowadzonych badań własnych sprawdzono różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w kolejnych punktach terapii. Zaobserwowano istotne różnice w ekspresji tego genu w trzech początkowych punktach czasowych tj.: dzień rozpoznania (0.), dzień 15. i 30. (Tabele 30-32). W dalszych punktach nie stwierdzono istotnych zmian, a wartości poziomu ekspresji były zbliżone do oznaczonych w dniu 30. W przypadku wznowy choroby stwierdzono wzrost ekspresji genu WT1 do poziomu obserwowanego w chwili rozpoznania (Wykresy 23-25). Podobne tendencje zaobserwowano w przypadku oznaczeń w krwi obwodowej.

Porównując przebieg wykresów poziomu transkryptów dla badanych genów fuzyjnych z poziomem transkryptu dla genu WT1 można zauważyć porównywalną kinetykę zmian (Wykresy 23-33). Podobne obserwacje przedstawiono w dostępnym piśmiennictwie [34, 161, 227, 237]. Sugeruje to możliwość wykorzystania genu WT1 jako potencjalnego markera monitorowania MRD. Niektórzy autorzy wskazują na wykorzystanie poziomu ekspresji genu WT1 jako markera MRD dopiero wtedy, gdy nie są dostępne inne transkrypty charakterystyczne dla danego typu AML [82]. W białaczce najbardziej specyficznym markerem jest obecność charakterystycznej zmiany dotyczącej zmian kariotypu jak np. gen fuzyjny, którego produkt powstaje na drodze rearanżacji chromosomowej. W przypadku obecności genu fuzyjnego, poziom ekspresji WT1 może dostarczać dodatkowych informacji o przebiegu leczenia. Oznaczona wstępnie wysoka ekspresja genu WT1 umożliwia pomiar MRD w kolejnych punktach terapii (Tabele 30-32).

W badaniach własnych nie przeprowadzono szczegółowych analiz statystycznych, dotyczących zmian poziomu ekspresji dla badanych fuzyjnych transkryptów, tj. genów: AML1-ETO, PML-RARα i CBFβ-MYH11, ze względu na małe liczebności grup pacjentów, u których stwierdzono te zmiany. W obecnie
przedstawianej pracy, poziom ekspresji i monitorowanie MRD za pomocą transkryptów fuzyjnych, dla poszczególnych pacjentów, przedstawiono graficznie na wykresach (Wykresy 23-33). Zamieszczone wykresy przedstawiają zmianę poziomu mRNA w trakcie terapii. Na podstawie otrzymanych wartości można śledzić poziom komórek nowotworowych i skuteczność leczenia indywidualnie, w wybranej grupie pacjentów.

Analiza polimorfizmów wybranych sekwencji związanych z regulacją ekspresji genu WT1. Wysoka ekspresja genu WT1 u pacjentów z AML wydaje się być związana ze zmianami w obrębie sekwencji regulatorowych tego genu. W związku z dużym odsetkiem pacjentów z nadekspresją genu WT1 w materiale własnym, podjęto próbę analizy wybranych sekwencji tego genu (sekwencja promotora - część proksymalna i dwie sekwencje wzmacniające – intron 3 i koniec 3'). Wiele badań dotyczących zmian genetycznych w obrębie genu WT1, obejmuje części kodujące genu a więc eksony [70, 90, 105, 106, 149, 167, 216, 223, 234]. Do miejsc, w których stwierdzono obecność znaczących w AML mutacji lub SNP należą ekson 7 i ekson 9 [17, 42, 87, 89, 105, 106, 121, 149, 167, 216, 234]. Sekwencje poddane analizie, znajdujące się poza sekwencją kodującą genu, wybrano na podstawie wyników badań innych autorów [66, 92], którzy wykazali faktyczny związek tych sekwencji z regulacją ekspresji genu WT1.

W przeprowadzonych własnych badaniach laboratoryjnych wykorzystano DHPLC, jako technikę przesiewową pozwalającą na wyodrębnienie 15 grup względem identycznego przebiegu chromatogramów, indywidualnych dla każdego z pacjentów. Dla każdej z wyodrębnionych grup (ten sam zapis chromatogramu) wybrano losowo sekwencje reprezentatywne, które nastepnie pojedyncze zostały poddane sekwencjonowaniu. Wykryto liczne, opisane już wcześniej polimorfizmy (Ryciny 29-31, 33-43), które znajdują się w bazie danych ENSEMBL. W przedstawianej obecnie pracy nie badano korelacji między rodzajem stwierdzonych polimorfizmów a przynależnością pacjenta do określonego typu AML wg klasyfikacji FAB oraz grupy ryzyka (SRG, HRG) i wynikami leczenia, ale przeanalizowano związek pomiędzy obecnością stwierdzonych znanych SNP genu WT1 a poziomem ekspresji tego genu. Nie wykazano jednakże wpływu tych polimorfizmów na poziom ekspresji genu WT1 (p>0,05).

W trakcie analizy sekwencyjnej wybranych odcinków genu WT1 oprócz znanych już polimorfizmów wykryto nowe zmiany, dotąd nie opisane w dostępnym piśmiennictwie. Należą do nich: zmiana T/A w pozycji 11:32408629 w obrębie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1 (Rycina 44) i obecność insercji A w pozycji pomiędzy 11:32457352 a 11:32457351 w sekwencji promotorowej genu (Rycina 32). Analizy przeprowadzone dla zmiany T/A w pozycji 11:32408629 nie



Rycina 45. Sekwencja części proksymalnej promotora poddana analizie sekwencyjnej. Sekwencję CR (tłum. w tekście) zaznaczono na czerwono. Na zielono zaznaczone nukleotydy GC, miejsce w którym dochodzi do insercji A (tłum. w tekście). Strzałkami zaznaczono miejsca startu transkrypcji (podwójne podkreślenia), +1 jako główne miejsce startu. Potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych zostały podkreślone [66].

wykazały wpływu jej obecności na poziom ekspresji genu WT1 (p>0,05). Interesujący jest fakt, że opisywana zmiana dotyczyła sekwencji ściśle związanej z ekspresją genu (sekwencja wzmacniająca na końcu 3' genu WT1) i była stwierdzona w stosunkowo dużej (32%) grupie obecnie przedstawianych pacjentów z AML.

Natomiast insercja A (pozycja pomiędzy 11:32457352 a 11:32457351) dotyczy regionu niekodującego części promotorowej genu WT1. Badany odcinek promotora (Rycina 45) wybrano do analizy w niniejszej pracy na podstawie wcześniejszych badań [66], w których wykazano, że powyższa sekwencja posiada zarówno liczne potencjalne miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne, jak również miejsca inicjacji transkrypcji. Ponadto opisywany fragment o długości ok. 650 pz odgrywa znaczącą rolę w regulacji ekspresji genu WT1, wpływając na podniesienie poziomu transkryptu tego genu [92]. Obecność insercji A jest tym istotniejsza, iż występuje w obrębie sekwencji potencjalnie rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny YY1 (dawniej F-ACT1 [66, 125]). Omawiana insercja została zidentyfikowana u wszystkich pacjentów badanych pod względem obecnych polimorfizmów genu WT1.

Ludzki czynnik transkrypcyjny YY1, znany jako NF-E1 [166], UCRBP [63] i δ [83], jest białkiem zbudowanym z 414 aminokwasów i charakteryzuje się wysoką homologią międzygatunkową (około 95% podobieństwa na poziomie mRNA) [248]. YY1 wykazuje działanie regulatorowe na ekspresję wielu genów komórkowych jak i wirusowych poprzez oddziaływanie z docelową sekwencją DNA w obrębie promotorów tych genów [203, 207]. Obecnie znanych jest przeszło 1600 miejsc rozpoznawanych przez czynnik transkrypcyjny YY1 w około 2500 promotorów genów kręgowców i 93 miejsca w promotorach 129 genów wirusowych [94]. YY1 może aktywować lub hamować transkrypcję genów w zależności od względnego stężenia [25], obecności innych specyficznych czynników tkankowych [203] czy sekwencji promotorowych otaczających miejsca wiązania dla YY1 [207].

Istnieją modele wyjaśniające potencjalną rolę YY1 w aktywacji bądź hamowaniu aktywności genów docelowych. W przypadku aktywacji transkrypcji oddziaływanie YY1 może odbywać się na poziomie interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi a następnie wiązania do DNA [9, 31, 124, 201, 228]. Inny opisany mechanizm to hamowanie aktywności represora i/lub odsłonięcie domeny aktywacyjnej [225]. YY1 może również aktywować ekspresję genów poprzez włączenie koaktywatora, który wywołuje odpowiedź genu docelowego [3, 9, 123, 247, 249]. Ponadto, przyłączenie YY1 do DNA może powodować zmiany w strukturze

chromatyny i tym samym ułatwiać przyłączenie innych czynników transkrypcyjnych do sekwencji docelowych wpływając na poziom ekspresji genów [245, 250].



Rycina 46. Modele przedstawiające potencjalne mechanizmy regulacji ekspresji genów na poziomie hamowania transkrypcji przez czynnik transkrypcyjny YY1. A) mechanizm kompetycji, w którym sekwencja docelowa aktywatora obejmuje sekwencję rozpoznawaną przez YY1, B) mechanizm blokowania procesu transkrypcji poprzez przyłączenie YY1 poniżej miejsca wiązania aktywatora, C) hamowanie transkrypcji na poziomie oddziaływania YY1 z aktywatorem – upośledzenie działania aktywatora, D) oddziaływanie YY1 z korepresorem [75, 203].

Hamowanie procesu transkrypcji przez YY1 może dotyczyć różnych interakcji opisywanego czynnika w obrębie promotora genu docelowego. Postulowane są mechanizmy, prowadzące do obniżenia poziomu aktywności transkrypcyjnej przy udziale YY1 (Rycina 46). Jeden z nich wskazuje na obecność sekwencji docelowych

dla aktywatorów transkrypcji, które pokrywają się z miejscami rozpoznawanymi przez YY1. W tym przypadku dochodzi do zajęcia opisywanego miejsca przez YY1 (kompetycja), w wyniku czego blokowana jest transkrypcja [24, 125, 155, 160, 203, 233]. Innym przykładem blokowania transkrypcji poprzez YY1 jest jego przyłączenie poniżej miejsca wiązania aktywatora transkrypcji (dystalnie, w kierunku 3'). Dzieje się tak w przypadku promotorów posiadających dodatkowe miejsca wiązania YY1. W tej sytuacji, pomimo obecności aktywatora, nie dochodzi do aktywacji genu na poziomie mRNA [75]. Hamowanie transkrypcji może zachodzić również na zasadzie bezpośredniego oddziaływania YY1 z aktywatorem procesu. Zakłóca to działanie aktywatora i tym samym przebieg procesu aktywacji genu [72]. Innym modelem hamowania transkrypcji przez YY1 jest jego interakcja z pomocniczym białkiem inhibitorowym (korepresor). Korepresor w tym przypadku bezpośrednio wpływa na obniżenie aktywacji transkrypcji bądź bierze udział w przebudowie/kondensacji chromatyny [72, 225].

Promotor genu WT1 jest sekwencją bogatą w GC, nie posiada typowego TATA box, miejsca CCAAT czy innego elementu inicjującego [88, 169]. Podobnie do wielu innych tego typu promotorów, WT1 posiada liczne miejsca wiązania czynnika Sp1 [36, 88]. Potencjalne miejsce wiązania YY1 w badanej sekwencji promotora genu WT1 znajduje się powyżej (w kierunku 5') regionu bogatego w miejsca rozpoznawane przez czynnik Sp1, jak również PAX2 czy PAX8 i przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji [66]. Region CR (*z ang. conserved region*) rozpoznawany przez wymienione czynniki transkrypcyjne obejmuje sekwencję wysoce konserwatywną w sekwencji promotora, obejmującą 38 par zasad [44, 45, 49]. Badania dotyczące potencjalnego znaczenia opisywanych czynników transkrypcyjnych (Sp1, PAX2, PAX8) wskazują, że wpływają one na poziom transkryptu genu WT1. Dotyczy to również wiązania do regionu CR [36, 44, 45, 49].

Podwyższoną ekspresję genu WT1 stwierdza się w wysokim odsetku pacjentów z AML [18, 20, 108, 119, 142, 156, 163]. Obecność insercji A, w potencjalnym miejscu wiązania czynnika YY1, może sugerować rolę tego czynnika w regulacji ekspresji badanego genu. Zakładając, że regulacja ekspresji genu WT1 zachodziłaby na poziomie wiązania YY1 do sekwencji promotorowej genu (Rycina 46 B), obecność opisanej insercji może znosić taką zależność poprzez uniemożliwienie przyłączenia się czynnika YY1 do sekwencji docelowej. W takim przypadku nie dochodziłoby do oddziaływania czynnika YY1 (potencjalnie wpływającego na regulację ekspresji genu WT1 poprzez

hamowanie procesu transkrypcji) z aktywatorami transkrypcji. Transkrypcja mogłaby zachodzić stale, skutkując wysokim poziomem mRNA genu WT1 w komórkach nowotworowych.

Stabilność RNA. Krew i szpik kostny w związku z obecnością komórek jądrzastych i możliwością izolacji RNA, stanowią ważne źródło pozwalające określić profil ekspresji genowej pacjenta [117, 239]. RNA jest materiałem genetycznym podatnym na działanie RNaz, przez co wykazuje niższą stabilność od DNA. W związku z tym, w pracy z RNA należy zachować zarówno szczególnie wysoki poziom czystości odczynników, jak również odpowiednio zabezpieczyć materiał biologiczny przed izolacją. Ważna jest także temperatura transportu materiału biologicznego, jak również temperatura i warunki przechowywania wyizolowanego RNA [57].

W materiale własnym zaobserwowano degradację RNA w części próbek pochodzących od pacjentów. Najczęstszą przyczyną było niedostateczne wymieszanie krwi i szpiku z antykoagulantem, jak również transport w temperaturze otoczenia lub zbyt długi transport. W przypadku zamrożenia dochodziło do pękania elementów morfotycznych co uniemożliwiało oddzielenie komórek jądrzastych i izolację RNA.

Komórki zachowują swoją żywotność do 48 godzin od pobrania [57]. Z obserwacji własnych wynika, że transport materiału biologicznego nie powinien przekraczać 48 godzin od jego pobrania. RNA wyizolowane z krwi i szpiku, otrzymanych w ciągu doby, nie wykazywało wstępnej degradacji. Na dobrą kondycję RNA miała również wpływ temperatura podczas transportu, wynosząca 4-8°C. Znane są zestawy do izolacji RNA z krwi lub szpiku kostnego [117, 179]. Wadą niestety są wysokie koszty. Niektórzy autorzy, w celu podniesienia stabilności RNA, sugerują usunięcie erytrocytów przed lizą leukocytów w Trizolu [102] lub użycie formamidu do zawieszenia wyizolowanego RNA [32].

Rozwój wiedzy medycznej i doskonalenie technik biotechnologicznych pozwalają na dokładne poznanie coraz większej liczby mechanizmów transformacji nowotworowej. Wyjaśnienie natury poszczególnych procesów ontogenezy umożliwia umieszczenie ich na liście potencjalnych celów terapii. W przyszłości planuje się opracowanie nowych sposobów leczenia dostosowanych do zaburzeń molekularnych w komórce nowotworowej, co poprawi diagnozowanie i zwiększenie efektywności leczenia nowotworów, a także zmniejszy ryzyko powikłań.

Cytogenetyczne i molekularne badania komórek białaczkowych stanowią ważny element w diagnozowaniu białaczek. Zidentyfikowanie specyficznych dla danego

podtypu białaczki nieprawidłowości cytogenetycznych, pozwala na dokładniejszą diagnozę i lepszą kwalifikację do grup ryzyka. Biologia AML różni się zasadniczo od patogenezy innych rodzajów białaczek. W AML często dochodzi do powstania białek fuzyjnych, kodowanych przez geny powstałe wskutek translokacji chromosomowej.

Obecnie 50-60% dzieci z AML uzyskuje wieloletnie bezobjawowe przeżycie [37, 39, 50, 51, 52, 175, 177]. Lepsze poznanie biologii tej choroby może w przyszłości pomóć w odkryciu nowych czynników pozwalających na precyzyjną stratyfikację do grup terapeutycznych, jak również zastosowanie odpowiedniej terapii. Prowadzone badania nad nowymi preparatami leczniczymi dotyczą m. in.: modyfikatorów oporności na leki, inhibitorów proteasomów, inhibitorów transdukcji sygnałów ukierunkowanych na gen RAS (np. inhibitory transferazy farnezylowej) oraz na kinazy tyrozynowe, kodowane przez geny FLT3 i c-kit, czynników nasilających apoptozę oraz nowych sposobów immunoterapii. Prowadzone są przedkliniczne badania nad szczepionkami działającymi na gen WT1, geny telomerazy i geny homeotyczne (*z ang. homeobox genes*) [62, 74, 114, 128, 202, 241]. Zastosowanie nowych metod leczenia, dostosowanego nie tylko intensywnością do grupy ryzyka, ale także specyficznością do zmian występujących w danym typie AML oraz unowocześnienie terapii wspomagającej, może przyczynić się do zwiększenia wyleczalności oraz zmniejszenia powikłań terapii i poprawy jakości życia pacjentów.

Zastosowanie nowych metod leczenia, dostosowanych intensywnością nie tylko do grupy ryzyka, ale także specyficznością do odpowiedniego typu białaczki może doprowadzić do dalszej poprawy zarówno wyleczalności, jak i zmniejszenia niepożądanych skutków terapii przeciwbiałaczkowej.

Przedstawione w obecnej pracy badania cytogenetyczne i molekularne są niezbędne do zakwalifikowania pacjenta do określonej grupy ryzyka oraz wyboru optymalnego leczenia i monitorowania choroby resztkowej. Badanie określonych nieprawidłowości chromosomalnych stanowi ważny czynnik prognostyczny choroby. Duplikacja genu FLT3 stanowi jeden z najbardziej niekorzystnych czynników prognostycznych.

Dalsze badania dotyczące znaczenia poziomu ekspresji, polimorfizmów i mutacji genu WT1, ze względu na jego specyficzną wielokierunkową funkcję w komórce, może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów odpowiadających za powstanie i progresję AML. Ponadto, ze względu na kluczową

rolę tego genu w proliferacji i różnicowaniu komórek, zahamowanie jego nieprawidłowej funkcji może stanowić potencjalny cel terapeutyczny.

7. Wnioski

- W porównaniu do danych literaturowych w materiale własnym transkrypty oznaczonych genów fuzyjnych (AML1-ETO [13%], PML-RARα [4%], CBFB-MYH11 [3%]), duplikacja genu FLT3-ITD [8,7%] i nadekspresja genu WT1 [81,2%] występowały z podobną częstością.
- 2. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że:
 - ✓ dzieci z wyższą liczbą kopii genu WT1 miały istotnie wyższą liczbę leukocytów,
 - ✓ odsetek blastów w szpiku kostnym oznaczony w 15. dniu leczenia był istotnie wyższy w grupie pacjentów z wysoką liczbą kopii genu WT1,
 - ✓ poziom ekspresji genu WT1 w tym samym punkcie czasowym był istotnie wyższy w szpiku kostnym niż w krwi obwodowej.
- 3. Dzieci z niską ekspresją genu WT1 uzyskały wyższy odsetek ponad 4-letnich przeżyć [78%] niż z wysoką ekspresją tego genu [57%], ale różnice nie były istotne statystycznie.
- 4. Badania w kolejnych punktach czasowych wykazały systematyczny spadek zarówno transkryptów genów fuzyjnych, jak i genu WT1, co może być wykorzystane w monitorowaniu MRD u dzieci z AML. Konieczne jest jednak przeprowadzenie kolejnych badań w celu oznaczenia istotnie statystycznego punktu czasowego pomiaru MRD i jego poziomu, określającego zwiększone ryzyko wystąpienia wznowy białaczki.
- 5. Analizy dotyczące fragmentów genu WT1 odpowiedzialnych za regulację jego ekspresji wykazały obecność 11 znanych SNP oraz dwóch nowych, nie opisanych wcześniej zmian. W przypadku stwierdzonych znanych polimorfizmów nie wykazano wpływu ich obecności na poziom ekspresji genu WT1. Nowa zmiana, insercja A, występowała u wszystkich badanych pacjentów, natomiast zmiana T/A (32% pacjentów) nie wykazała wpływu na ekspresję genu WT1.
- 6. Przedstawione w literaturze dane dotyczące nieprawidłowości występujących w genie WT1 na przebieg AML u dzieci są niejednoznacze. Dlatego konieczne jest prowadzenie dalszych badań w celu lepszego zrozumienia roli tego genu w etiopatogenezie AML, co może przyczynić się do głębszego poznania tej choroby i wyodrębnienia nowych czynników rokowniczych, a także do opracowania innowacyjnych, bardziej specyficznych sposobów terapii.

8. Streszczenie

Wprowadzenie. Ostra białaczka szpikowa (AML) stanowi 10-15% złośliwych nowotworów układu krwiotwórczego u dzieci. Charakteryzuje się niekontrolowanym rozrostem niedojrzałych krwinek białych (innych niż limfocyty) lub erytroblastów i megakarioblastów. Obecnie stosowane metody leczenia pozwalają na osiągnięcie około 75% wyleczeń u wszystkich dzieci z chorobą nowotworowa, ale w AML tylko 50% dzieci uzyskuje wieloletnie bezobjawowe przeżycia. Biologia AML różni się zasadniczo od biologii innych rodzajów białaczek. W przeprowadzonych badaniach własnych skupiono się nad najczęściej występującymi zmianami molekularnymi, stanowiącymi istotny znany już czynnik rokowniczy (powtórzenia tandemowe ITD w genie FLT3) lub potencjalne markery dla oznaczenia minimalnej choroby resztkowej (MRD), takie jak patologiczne transkrypty mRNA powstałe w wyniku rearanżacji chromosomowych tj.: AML1-ETO [t(8;21)], PML-RARα [t(15;17)] i CBFβ-MYH11 [inv16]. Szczególną uwagę zwrócono na zmiany dotyczące nadekspresji i polimorfizmów genu WT1.

Pacjenci, materiał i metody. Do badań własnych włączono 69 (53,1%) dzieci (0,2-18,5, mediana 11,2 lat) spośród 130 z nowo rozpoznaną pierwotną AML (w okresie 01.03.2006-31.06.2009 r. w 14 ośrodkach Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Białaczek i Chłoniaków), od których uzyskano kwalifikujące się do badań molekularnych próbki szpiku i/lub krwi obwodowej (pobrane co najmniej przed rozpoczęciem leczenia białaczki) oraz istotne dane kliniczne. Wszyscy chorzy byli leczeni wg programu AML-BFM INTERIM 2004. Wstępna liczba krwinek białych wynosiła od 1000 do 573 000/mm³ (mediana 29 300), a liczba blastów w krwi obwodowej wynosiła od 0 do 561 540/mm³ (mediana 11 000). Reprezentowane były wszystkie typy AML wg klasyfikacji FAB, a najczęściej stwierdzono typ M₂ (31,9%). Do grupy wysokiego (HRG) i standardowego ryzyka (SRG) zakwalifikowano odpowiednio: 25 i 44 pacjentów. Informacje dotyczące wyników badań cytogenetycznych uzyskano o 34 (49,3%) pacjentach, w tym u 30 kariotyp był nieprawidłowy. Wśród wszystkich oznaczonych kariotypów najczęściej występującymi zaburzeniami były: t(8;21) [26,5%], t(15;17) [8,8%], inv(16) [5,9%].

Badania molekularne wykonywano w próbkach szpiku i krwi w czasie diagnozowania AML oraz w 6 określonych punktach protokołu celem poszukiwania resztkowych komórek nowotworowych posiadających to samo zaburzenie genetyczne. Do przeprowadzenia ilościowej reakcji RT-PCR i RQ-PCR 4 transkryptów genów fuzyjnych (AML1-ETO, CBFβ-MYH11, PML-RARα /podtyp bcr1 i bcr3/) zastosowano protokół opracowany przez Europe Against Cancer Program. Do zbadania ekspresji genu WT1 zastosowano startery opisane przez Trka i wsp. W próbce DNA przeprowadzano analizę duplikacji genu FLT3 przy pomocy starterów komplementarnych do regionu JM. Analizę polimorfizmów wybranych odcinków genu WT1 wykonano metodą DHPLC i sekwencjonowania.

W celu określenia zależności pomiędzy poziomem ekspresji genu WT1 a cechami związanymi z pacjentem i białaczką, wykonano badania porównawcze, w których uwzględniono następujące parametry: wiek, płeć; typ AML, grupa ryzyka, liczba krwinek białych oraz liczba blastów w krwi obwodowej i odsetek blastów w szpiku kostnym przed rozpoczętym leczeniem. W celu oceny znaczenia prognostycznego nadekspresji genu WT1 przeprowadzono analizy porównawcze pomiędzy obecnością tego markera a wczesną odpowiedzią na leczenie ocenianą w 15. dniu leczenia indukcyjnego (odsetek blastów w szpiku kostnym) i czasem przeżycia całkowitego (OS). Oceniono również stabilność RNA w dostarczonym materiale (szpik kostny i krew obwodowa). Analizy statystyczne wykonano z użyciem programu GraphPad Prism 5. Obserwacje zakończono 30.11.2010 r.

Wyniki. Wśród 69 badanych dzieci z AML u 9 (13%) pacjentów wykryto transkrypt dla genu fuzyjnego AML1-ETO. U 3 (4%) chorych stwierdzono transkrypt dla genu PML-RAR α (podtyp bcr3), a u 2 (3%) innych transkrypt genu CBF β -MYH11. W 6 (8,7%) przypadkach były obecne powtórzenia tandemowe (ITD) w genie FLT3. Duplikację genu FLT3 najczęściej stwierdzono w typie M₃ (60%).

Liczba kopii genu WT1/10⁴ kopii genu ABL oznaczona w chwili rozpoznania AML (punkt 0.) u 45 dzieci w próbkach krwi wynosiła 0.43-11 513 (mediana 1457,7), w tym 39 (86,7%) chorych prezentowało nadekspresję tego genu co najmniej o dwa rzędy wielkości względem kontroli. Poziom ekspresji genu WT1 we krwi oznaczono również u 6 zdrowych dorosłych ochotników. Stwierdzono istotnie wyższą (p<0,001) liczbę kopii genu WT1 we krwi obwodowej w komórkach u pacjentów z AML w porównaniu do osób zdrowych.

U 63 pacjentów liczba kopii genu WT1/10⁴ kopii genu ABL szpiku kostnym w punkcie 0 wynosiła 0.59-37 596 (mediana 2339,1), w tym 50 (81,2%) chorych prezentowało nadekspresję tego genu co najmniej o dwa rzędy wielkości względem kontroli.

Nie wykazano różnic w ekspresji genu WT1 w zależności od płci i wieku dziecka. Najwyższy poziom ekspresji genu WT1 występował w typie M_3 , najniższy w typie M_5 . Nie stwierdzono różnic w liczbie kopii genu WT1 oznaczonej we krwi i w szpiku kostnym między HRG i SRG. Najwyższą średnią i medianę liczby kopii genu WT1 stwierdzono u pacjentów z genem fuzyjnym CBF β -MYH11 i PML-RAR α , a najniższą z AML1-ETO. Dzieci z większą liczbą kopii genu WT1 oznaczoną przed rozpoczęciem leczenia miały istotnie wyższą liczbę leukocytów (p=0,0365). Średnia liczba blastów była wyższa w grupie pacjentów z wyższą ekspresją genu WT1, ale różnice były na granicy istotności statystycznej (p=0,0514). Wykazano, że średni odsetek blastów w szpiku w chwili rozpoznania AML był podobny w obu porównywanych grupach, różniących się ekspresją genu WT1.

Wykazano, że poziom ekspresji genu WT1 w tym samym punkcie czasowym był wyższy w szpiku niż w krwi obwodowej. Istotne różnice w poziomie ekspresji genu WT1, dla tych samych pacjentów, uzyskano w dniach: 0., 15., 30., 75., 100., 150. i >200. (p odpowiednio: 0,0356, 0,0276, 0,0107, 0,0039, 0,0005, 0,0205 i 0,0425). Natomiast w dniu 50. różnica pomiędzy poziomem ekspresji genu WT1 w szpiku i w krwi była na granicy istotności (p = 0,0772). Odsetek blastów w szpiku kostnym oceniany w 15. dniu leczenia był istotnie wyższy (p=0,0123) w grupie pacjentów z liczbą kopii genu WT1 >2321 w porównaniu do grupy z niższą ekspresją tego genu.

W grupie 69 dzieci objętych badaniem do końca czasu obserwacji zmarło łącznie 24 pacjentów, w tym 15 z powodu progresji białaczki i 9 z powodu powikłań we wczesnym okresie choroby. Ponad 4-letnie OS wynosiło 64,9%. W SRG (n=25) ponad 4-letne OS wynosiło 79,5%, a w HRG (n=44) 56,6%. Różnice były istotne statystycznie (p= 0,04). Dzieci z niską lub nieznacznie podwyższoną ekspresją genu WT1 uzyskały wyższy odsetek ponad 4-letniego OS (78,1%) niż z wysoką ekspresją (57,1%), ale różnice nie były istotne statystycznie.

Stwierdzono istotny spadek liczby transkryptu genu WT1 w próbce pobranej ze szpiku kostnego w 15. dniu w porównaniu do punktu zerowego (p=0,0151), a także pomiędzy dniem 0. a dniem 30. (p=0,0038) i między dniem 15. a 30. (p=0,0132). Natomiast porównując zmiany w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku pomiędzy dniem 30. i pozostałymi punktami leczenia (50., 75., 100., 150. i >200.) nie stwierdzono istotnych różnic (wartości p > 0,05). Badania w krwi obwodowej u tych samych pacjentów wykazały istotny spadek liczby kopii genu WT1 między dniem 0. i 15. (p=0,0030), a także między dniem 0. i 30. (p=0,0004). Porównując zmiany w poziomie

ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej pomiędzy dniem 30. i pozostałymi punktami leczenia (15. 50., 75., 100., 150. i >200.) nie zaobserwowano istotnych różnic. Krzywe obrazujące zmiany ekspresji genu WT1 i obecnego genu fuzyjnego w przebiegu terapii wykazywały podobne tendencje.

Obecność zmian polimorficznych analizowano u 53 pacjentów (76,8% z wszystkich pacjentów włączonych do badań). Po przeanalizowaniu trzech badanych odcinków genu WT1, tj. sekwencji proksymalnego odcinka regionu promotora i dwóch sekwencji wzmacniających, stwierdzono 11 znanych SNP. Obecność tych polimorfizmów nie miała wpływu na poziom ekspresji genu WT1. Dodatkowo stwierdzono dwie nowe zmiany w obrębie 1) sekwencji promotora i 2) sekwencji wzmacniającej znajdującej się na końcu 3'. W obrębie badanej sekwencji proksymalnej promotora genu WT1, u wszystkich badanych pacjentów z AML, uzyskano obraz sekwencjonowania wskazujący na obecność insercji A między nukleotydami C i G znajdującymi się w pozycjach 11:32457352 i 11:32457351 badanego genu. Druga opisywana zmiana dotyczyła zamiany T/A w pozycji, która występowała u 32% ocenionych pacjentów i nie miała wpływu na poziom ekspresji genu WT1. W przypadku insercji A jej obecność dotyczyła sekwencji potencjalnie rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny YY1 mogący brać udział w regulacji ekspresji genu WT1.

Spośród 249 przesłanych próbek ze szpiku kostnego, RNA uległo degradacji w 29 (11,6%), najczęściej w materiale pobranym w dniu 15. (23,3%). Spośród 177 przesłanych próbek z krwi obwodowej, RNA uległo degradacji w 27 (15,3%). Na degradację RNA w badanych próbkach miały wpływ obecność skrzepów (34,5%), dostarczenia materiału w czasie dłuższym niż 48 godzin od pobrania (27,6%) i transport próbek w nieodpowiednich warunkach (37,9%).

Podsumowanie. Lepsze poznanie biologii tej choroby może w przyszłości pomóc w odkryciu nowych czynników pozwalających na bardziej precyzyjną stratyfikację do grup terapeutycznych, jak również zastosowanie bardziej specyficznego leczenia. W celu wyboru odpowiedniej terapii powinny być kontynuowane badania nad zaburzeniami biorącymi udział w złożonym procesie nowotworzenia oraz nad istotnymi czynnikami wpływającymi na przebieg choroby. Określone zaburzenia molekularne mogą również stanowić cel terapeutyczny przez wprowadzenie leczenia hamującego lub korygującego skutki tych nieprawidłowości.

Chromosomalne nieprawidłowości i zaburzenia genowe, identyfikujące mieloidalne komórki białaczkowe mają nie tylko diagnostyczną wartość, ale coraz

istotniejsze terapeutyczne implikacje. W porównaniu do danych literaturowych transkrypty badanych 3 genów fuzyjnych (AML1ETO, PML-RARα i CBFβ-MYH11), a także duplikacja genu FLT3 i nadekspresja genu WT1 oznaczonych we własnym materiale występowały z podobną częstością. U ponad 80% ocenianych pacjentów w chwili rozpoznania AML stwierdzono wysoką ekspresję genu WT1. Badania molekularne w kolejnych punktach czasowych wykazywały systematyczny spadek liczby kopii transkryptów genu fuzyjnego i genu WT1, co może być wykorzystane do oznaczania choroby resztkowej u pacjentów z AML. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu ustalenia istotnie statystycznego punktu czasowego pomiaru MRD i jego poziomu, określającego ryzyko wystąpienia wznowy AML.

9. Abstract

Introduction. Acute Myeloid Leukemia (AML) is associated with 10-15% of all malignant tumors of the hematopoietic system in children. Its major characteristics include uncontrolled growth of immature white blood cells (excluding lymphocytes), erythroblasts and megakaryoblasts. Generally, current treatment strategies lead to complete remission of the neoplasm in about 75% of cases, though for AML such a remission is observed only in ~50% of children. One of the reasons for this occurrence is that AML substantially differs on the molecular level from other types of leukemia. Experiments and analyses conducted within this study focused mainly on the presence of the most frequently occurring genetic markers of the disease (Internal Tandem Duplications, ITD within the FLT3 gene) or potential markers for minimal residual disease (MRD); these included presence of pathological mRNA transcripts arising from chromosomal rearrangements (i.e. AML1-ETO [t(8;21)], PML-RAR α [t(15;17)] and CBF β -MYH11 [inv16]). Special consideration was given to alterations in the WT1 gene expression levels and polymorphisms within the WT1 gene.

Patients, materials and methods. Current study included 69 children (53.1%) aged 0.2-18.5 years (median of 11.2 years), selected from the primary AML group (n=130; admission time: 01.03.2006-31.06.2009; source: 14 Polish Pediatric Centers of Leukemia and Lymphoma Group). Bone marrow and/or peripheral blood samples were collected from each subject at least one year before the commencement of the treatment. All patients were treated according to AML-BFM INTERIM 2004 programme. The initial white blood cells count was 1,000-573,000/mm³ (median 29,300), and the peripheral blood blasts number was in the range of 0-561,540/mm³ (median 11,000). All types of AML (according to FAB classification) were represented within the group and M₂ was the most common type (31.9%). Population was stratified into high risk group (HRG; n=25) and standard risk group (SRG; n=44). Cytogenetic data were obtained from 34 patients (49.3%) and in 30 cases an abnormal karyotype was discovered. Among all analyzed sampled, the most frequent abnormalities were: t(8;21) [26.5%], t(15;17) [8.8%], inv(16) [5.9%].

Molecular analysis was conducted on bone marrow and peripheral blood samples at the time of the AML diagnosis and in further 6 protocol data points, in order to determine the residual cancer cells presenting similar genetic alteration. Europe Against Cancer Program protocol was used in RT-PCR and RQ-PCR reactions targeting 4 fusion transcripts (AML1-ETO, CBF β -MYH11, PML-RAR α /subtypes bcr1 and bcr3/). Primers designed by Trka *et al.* were used in order to analyze expression of the WT1 gene. Duplications of FLT3 gene in DNA samples were detected with primers specific for the JM region. Polymorphisms of selected regions of WT1 gene were analyzed with DHPLC and sequencing.

To determine correlation between WT1 expression levels and AML occurrence in children, a comparison study was carried out. Within the study following parameters were analyzed: age, gender, AML type, risk group, white blood cells count, peripheral blood blasts count, and proportion of bone marrow blasts prior to the treatment. To evaluate the prognostic value of WT1 gene expression levels, comparative analysis was conducted in order to determine the association between expression levels and early response to the treatment (proportion of blasts in bone marrow on day 15), as well as overall survival (OS). Further, RNA stability was evaluated (for bone marrow and peripheral blood samples). Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 5 programme. The study was terminated on 30.11.2010.

Results. Among 69 included AML children, AML1-ETO fusion gene transcript was detected in 9 cases (13%). In 3 cases (4%) the PML-RAR α gene transcript (subtype bcr3) was identified, and in 2 other cases (3%) the CBF β -MYH11 gene transcript was detected. ITD of FLT3 gene was detected in 6 individuals (8.7%). This mutation was the most frequent one for the M₃ AML type (60%).

The number of WT1 gene copies (per 10^4 ABL gene copies) detected at the moment of AML recognition (time point 0) in blood samples of 45 subjects was 43-11,513 (median 1,457.7), and overexpression of WT1 gene was observed in 39 patients (86.7 %; at least 100 × increase in gene expression, compared to the control). The level of WT1 gene expression was also assessed in samples from 6 healthy volunteers. WT1 expression levels were significantly higher (p<0.001) in peripheral blood cells of AML subjects compared to healthy subjects.

At time point 0, in bone marrow samples derived from 63 AML patients, the copy number of WT1/10⁴ ABL gene was assessed to be 0.59-37,596 (median 2339.1) and in 50 (81.2%) cases WT1 transcript levels were more than 100 × higher compared to the control group.

No significant age or gender related differences in WT1 gene transcript levels were identified. The highest expression of WT1 gene was observed for the AML M₃ type, whereas the lowest one for the AML M_5 type. No differences in WT1 gene expression were observed between HRG and SRG groups. The highest average and median of WT1 transcript copy number was noted in patients with CBF β -MYH11 and PML-RAR α fusion genes, and the lowest one in patients with AML1-ETO fusion gene. Children with higher WT1 gene expression levels, as determined prior to the commencement of the therapy, had significantly more leukocytes (p=0.0365). The average number of blasts was higher in the group of patients with higher expression of WT1 gene, but these differences were of borderline significance (p=0.0514). It was observed that the average proportion of blasts in bone marrow at the moment of AML recognition was similar for both compared groups, which differed in WT1 gene expression.

Furthermore, data analysis revealed that at certain time point WT1 transcript levels were higher in bone marrow compared to the peripheral blood cells. Significant differences in the WT1 gene expression levels for each patient was observed in days: 0, 15, 30, 75, 100, 150 and >200 (p: 0.0356, 0.0276, 0.0107, 0.0039, 0.0005, 0.0205 and 0.0425 respectively). However, on day 50. the difference between expression of gene WT1 in bone marrow and blood cells was of borderline significance (p = 0.0772). On day 15 of the treatment course, the proportion of blasts in bone marrow was substantially higher (p=0.0123) in the group of patients with WT1 gene transcript levels >2,321 compared to the group characterized by lower WT1 gene expression.

Of 69 children included, 24 died before the end of the study. Cause of death for 15 of them was leukemia progression and for 9 disease complication at early stages. OS > 4 years was observed for 64.9% of cases. In the SRG (n=25) OS > 4 years was observed for 79.5% of cases, and in the HRG (n=44) for 56.6% of cases. These differences were statistically significant (p=0.04). Proportion of patients reaching OS > 4 was higher for children with low or slightly increased WT1 gene expression (78.1%), compared with children with high WT1 expression (57.1%); observed differences were not statistically significant.

Vast decrease in WT1 gene transcript number compared to the baseline was observed for bone marrow samples on day 15 (p=0.0151). Similar relation was observed for day 0 vs day 30 and day 15 vs day 30 (p=0.0038 and p=0.0132, respectively). Nevertheless, analysis of WT1 gene expression levels on day 30. and subsequent time points (days 50, 75, 100, 150 and >200) revealed no significant differences (p>0.05). Blood analysis for individual patients showed significant decrease in WT1 transcript

level between day 0 and day 15 (p=0.0030), as well as between day 0 and day 30 (p=0.0004). Comparison of WT1 gene expression levels in peripheral blood on day 30 and other time points of the treatment (15, 50, 75, 100, 150 and >200) revealed no significant changes. Curves representing changes in expression of WT1 gene and the fusion gene showed similar tendencies during the treatment.

The presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was studied in a total of 53 patients (76.8% of all patients included in the study). After examination of three regions of WT1 gene that included sequences of proximal part of the promoter region and two enhancers 11 known SNPs were affirmed. Their presence did not influence WT1 gene expression. Additionally, two new changes were recognized, one in the promoter region and the other one in the enhancer element located on the 3' terminus. Within the analyzed promoter proximal sequence of WT1 gene in all of the AML patients, presence of the adenine insertion between C and G nucleotides at positions 11:32,457,352 and 11:32,457,351 of the analyzed gene was confirmed. The second described alteration was present in 32% of patients and consisted of T/A change in position 11:32,408,629; this polymorphism had no effect on WT1 gene expression. Of interest is that the aforementioned A insertion was located in the promoter region potentially recognized by YY1 transcription factor. One may assume that such a change may play an important role in WT1 gene expression.

Among 249 bone marrow samples received, in 29 (11.6%) RNA was degraded. This applied mostly to the clinical specimens collected on day 15 (23.3%). In 117 peripheral blood samples received, RNA was degraded in 27 (15.3%). Alleged reasons for RNA degradation included: presence of blood clots (34.5%), delayed material delivery (>48h; 27.6%) and inappropriate transport conditions (37.9%).

Summary. Better understanding of AML biology may in the future aid in recognition of new markers that would support appropriate therapeutic group stratification. Furthermore, it may also improve the decisive process for the choice of treatment. Nonetheless, further studies are required to determine the influence of aforementioned alterations on the complex process of carcinogenesis and disease progression. Identified molecular targets may be also used as treatment targets, supporting the individually profiled therapy.

Chromosomal malignancies and gene disturbances characteristic for myeloid leukemia cells are of importance not only for diagnostic purposes, but also constitute important therapeutic targets. Obtained results showing presence of transcripts of 3 analyzed fusion genes (AML-1ETO, PML-RARα and CBFβ-MYH11), FLT3-ITD and WT1 gene overexpression were consistent with ones presented in the literature. In more than 80% of patients, high expression of WT1 gene was detected at the moment of AML diagnosis. Subsequent molecular studies revealed a systematic decrease in the level of fusion gene and WT1 gene expression, which may be useful as diagnostic tool for MRD monitoring in AML patients. Further research is warranted, as recognition of time-dependency and MRD levels may support prediction of AML recurrence.

10. Piśmiennictwo

- 1. Absalon M. J., Smith F.O.: Treatment strategies for pediatric acute myeloid leukemia. Expert Opin Pharm. 2009; 10(1): 57-79.
- Abu-Duhier F. M., Goodeve A. C., Wilson G. A., Care R. S., Peake I. R., Reilly J. T.: Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. Br J Haematol. 2001; 113(4): 1076-7.
- Adams D. J., van der Weyden L., Mayeda A., Stamm S., Morris B. J., Rasko J. E.: ZNF265 - a novel spliceosomal protein able to induce alternative splicing. J Cell Biol. 2001; 154(1): 25-32.
- Alberta J. A., Springett G. M., Rayburn H., Natoli T. A., Loring J., Kreidberg J. A., Housman D.: Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. Blood 2003; 101, 2570-4.
- Andersson A., Johansson B., Lassen C., Mitelman F., Billström R., Fioretos T.: Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. Eur J Haematol. 2004; 72(5): 307-13.
- **6.** Arber D. A.: Realistic pathologic classification of acute myeloid leukemias. Am J Clin Pathol. 2001; 115(4): 552-60.
- 7. Ariyaratana S., Loeb D. M.: The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. Expert Rev Mol Med. 2007; 14: 1-17.
- Arrigoni P., Beretta C., Silvestri D., Rossi V., Rizzari C., Valsecchi M. G., Cazzaniga G., Biondi A.: FLT3 internal tandem duplication in childhood acute myeloid leukaemia: association with hyperleucocytosis in acute promyelocytic leukemia. Br J Haematol. 2003; 120: 89-92.
- 9. Austen M., Lüscher B., Lüscher-Firzlaff J. M.: Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP responsive element binding protein (CPB) binding protein. J Biol Chem. 1997; 272(3): 1709-17.
- **10.** Baird P. N., Simmons P.J.: Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. Exp Hematol. 1997; 25: 312-20.
- **11.** Balana-Nowak A., Zdziłowska E.: Cytometria przepływowa w diagnostyce immunofenotypowej ostrych białaczek. Post Biol Kom. 2008; 35(24): 65-102.

- Balwierz W.: Ostra białaczka szpikowa. Onkologia i Hematologia Dziecięca (red. Chybicka A., Sawicz-Birkowska K.). Wydawnictwo PZWL, Warszawa, 2008, 220-243, Tom I.
- 13. Balwierz W., Pietrzyk J. J., Skotnicki A. B., Wątor G., Stożek K., Zawada M., Skoczeń S., Florek I., Libura M.; Badania molekularne w ostrej białaczce szpikowej u dzieci i u dorosłych. Hematologia molekularna - patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze (red. M. Witt, T. Szczepański, M. Dawidowska); Poznań 2009.
- **14.** Bardeesy N., Pelletier J.: Overlapping RNA and DNA binding domains of the wt1 tumor suppressor gene product. Nucleic Acids Res. 1998; 26(7): 1784-92.
- 15. Barragán E., Cervera J., Bolufer P., Ballester S., Martín G., Fernández P., Collado R., Sayas M. J., Sanz M. A.: Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. Haematologica 2004; 89(8): 926-33.
- **16.** Basecke J., Whelan J. T., Griesinger F., Bertrand F. E.: The MLL partial duplication in acute myeloid leukemia. Br J Haematol. 2006; 135: 438-49.
- 17. Becker H., Maharry K., Radmacher M. D., Mrózek K., Metzeler K. H., Whitman S. P., Schwind S., Kohlschmidt J., Wu Y. Z., Powell B. L., Carter T. H., Kolitz J. E., Wetzler M., Carroll A. J., Baer M. R., Moore J. O., Caligiuri M. A., Larson R. A., Marcucci G., Bloomfield C. D.: Clinical outcome and gene- and microRNA-expression profiling according to the Wilms tumor 1 (WT1) single nucleotide polymorphism rs16754 in adult de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. Haematologica 2011; 96(10): 1488-95.
- 18. Bergmann L., Miething C., Maurer U., Brieger J., Karakas T., Weidmann E., Hoelzer D.: High levels of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. Blood 1997; 90, 1217-25.
- 19. Betts D. R., Ammann R. A., Hirt A., Hengartner H., Beck Popovic M., Kuhne T., Nobile L., Caflisch U., Wacker P., Niggli F. K.: The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). European J Haematology 2007; 78: 468-76.
- 20. Boublikova L., Kalinova M., Ryan J., Quinn F., O'Marcaigh A., Smith O., Browne P., Stary J., McCann S. R., Trka J., Lawler M.: 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 2006; 20(2): 254-63.

- Bradford C. A.: Cytochemistry. Hematology. Clinical principles and application (red. Robak B. F., Saunders W. B.), WB Saunders Company, Philadelphia 2002; 385-395.
- 22. Bruening W., Gros P., Sato T., Housman D., Pelletier J.: Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. Cancer Invest. 1993; 11, 393-399.
- 23. Brunning R. D., Matutes E., Flandrin G. Vardiman J. W., Bennett J.: Acute myeloid leukemia not otherwise categorized. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (red. Jaffe E. S., Harris N. L. Stein H., Vardiman J. W.). IARC Press 2001; 91-105.
- **24.** Bushel P., Kim J. H., Chang W., Catino J. J., Ruley H. E., Kumar C. C.: Two serum response elements mediate transcriptional repression of human smooth muscle alpha-actin promoter in ras-transformed cells. Oncogene 1995; 10(7): 1361-70.
- 25. Bushmeyer S., Park K., Atchison M. L..: Characterization of functional domains within the multifunctional transcription factor, YY1. J Biol Chem. 1995; 270(50): 30213-20.
- 26. Caligiuri M. A., Strout M. P., Lawrence D., Arthur D. C., Baer M. R., Yu F., Knuutila S., Mrózek K., Oberkircher A. R., Marcucci G., de la Chapelle A., Elonen E., Block A. W., Rao P. N., Herzig G. P., Powell B. L., Ruutu T., Schiffer C. A., Bloomfield C. D.: Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. Cancer Res. 1998; 58: 55-9.
- 27. Call K. M., Glaser T., Ito C. Y., Buckler A. J., Pelletier J., Haber D. A., Rose E. A., Kral A., Yeger H., Lewis W. H.: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell 1990; 60(3): 509-20.
- 28. Caricasole A., Duarte A., Larsson S. H., Hastie N. D., Little M., Holmes G., Todorov I., Ward A.: RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(15): 7562-6.
- 29. Chan N. P. H., Wong W. S., Ng M. H. L., Tsang K. S., Lau T. T., Leung Y., Chik K. W., Shing M. M. K., Li C. K.: Childhood acute myeloid leukaemia with CBFβ-MYH11 rearrangement: study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong. Am J Hematology 2004; 76: 300-3.

- 30. Chang M., Raimondi S. C., Ravingranath Y., Carroll A. J., Camitta B., Gresik M. V., Steuber C. P., Weinstein H.: Prognostic factors in children and adolescents with acute myeloid leukaemia (excluding children with Down syndrome and acute promyelocytic leukaemia): univariate and recursive partitioning analysis of patients treated on Pediatric Oncology Group (POG) Study 8821. Leukemia 2000; 14: 1201-7.
- **31.** Chiang C. M., Roeder R. G.: Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. Science 1995; 267(5197): 531-6.
- 32. Chomczynski P.: Solubilization in formamide protects RNA from degradation. Nucleic Acids Res. 1992; 25, 20(14): 3791-2.
- **33.** Chowdhury T., Brady H. J.: Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukaemia. Blood Cells Mol Dis. 2008; 40: 192-9.
- 34. Cilloni D., Gottardi E., De Micheli D., Serra A., Volpe G., Messa F., Rege -Cambrin G., Guerrasio A., Divona M., Lo Coco F., Saglio G.: Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. Leukemia 2002; 16(10): 2115-21.
- 35. Coebergh J. W., Reedijk A. M., de Vries E., Martos C., Jakab Z., Steliarova-Foucher E., Kamps W. A.: Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. Eur J Cancer 2006; 42(13): 2019-36.
- **36.** Cohen H. T., Bossone S. A., Zhu G., Mc Donald G. A., Sukhatme V. P.: Sp1 is a critical regulator of the Wilms' tumor 1 gene. J Biol Chem. 1997; 272(5): 2901-13.
- **37.** Creutzig U., Reinhardt D., Lehrnbecher T., Zimmermann M.: Patterns of failures related to intensive chemotherapy in childhood AML: analysis of the AML-BFM clinical trials. Blood 2002; 100: 258b-258b.
- 38. Creutzig U., Ritter J., Vormoor J., Ludwig W. D., Niemeyer C., Reinisch I., Stollmann - Gibbels B., Zimmermann M., Harbott J.: Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome: a report of 40 children of the AML-BFM Study Group. Leukemia 1996; 10: 1677-86.
- **39.** Creutzig U., Ritter J., Zimmermann M., Reinhardt D., Hermann J., Berthold F., Henze G., Jürgens H., Kabisch H., Havers W., Reiter A., Kluba U., Niggli F., Gadner H.: Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of study

acute myeloid leukemia Berlin-Frankfurt-Munster 93. Clin Oncol. 2001; 19: 2705-13.

- 40. Creutzig U., Ritter J., Zimmermann M., Schellong G.: Does cranial irradiation reduce the risk for bone marrow relapse in acute myelogenous leukemia? Unexpected results of the Childhood Acute Myelogenous Leukemia Study BFM-87. J Clin Oncol. 1993; 11: 279-86.
- 41. Creutzig U., Zimmermann M., Ritter J., Reinhardt D., Hermann J., Henze G., Jürgens H., Kabisch H., Reiter A., Riehm H., Gadner H., Schellong G.: Treatment strategy and long term results in pediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. Leukemia 2005; 19: 2030-42.
- 42. Damm F., Heuser M., Morgan M., Yun H., Grosshennig A., Göhring G., Schlegelberger B., Döhner K., Ottmann O., Lübbert M., Heit W., Kanz L., Schlimok G., Raghavachar A., Fiedler W., Kirchner H., Döhner H., Heil G., Ganser A., Krauter J.: Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts a favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2010; 1, 28(4): 578-85.
- 43. Da Silva N., Hu Z. B., Ma W., Rosnet O., Birnbaum D., Drexler H. G.: Expression of the FLT3 gene in human leukemia - lymphoma cell lines. Leukemia 1994; 8(5): 885-8.
- 44. Dehbi M., Ghahremani M., Lechner M., Dressler G., Pelletier J.: The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). Oncogene 1996; 13(3): 447-53.
- **45.** Dehbi M., Pelletier J.: PAX8-mediated activation of the WT1 tumor suppressor gene. Embo J. 1996; 15(16): 4297-306.
- 46. Dehmel U., Quentmeier H., Drexler H. G.: Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. II. Agonistic and antagonistic effects of other cytokines. Leukemia 1996; 10(2): 271-8.
- 47. Dehmel U., Zaborski M., Meierhoff G., Rosnet O., Birnbaum D., Ludwig W. D., Quentmeier H., Drexler H. G.: Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. Leukemia 1996; 10(2): 261-70.
- **48.** Deschler B., Lübbert M.: Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer 2006; 107(9): 2099-107.

- **49.** Discenza M. T., Dehbi M., Pelletier J.: Overlapping DNA recognition motifs between Sp1 and a novel trans-acting factor within the WT1 tumor suppressor gene promoter. Nucleic Acids Res. 1997; 25(21): 4314-22.
- **50.** Diviero D., Rossi V., Avvisati G., De Santis S., Pistilli A., Pane F., Saglio G., Martinelli G., Petti M. C., Santoro A., Pelicci P. G., Mandelli F., Biondi A., Lo Coco F.: Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RAR alpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. Blood 1998; 92: 784-9.
- 51. Dłużniewska A., Balwierz W., Balcerska A.: Skuteczność idarubicyny w leczeniu dziecięcej białaczki nielimfoblastycznej: raport Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków. Przegl Lek. 2003; 60(5): 17-21.
- 52. Dłużniewska A., Balwierz W., Moryl-Bujakowska A.: Pośrednie dawki cytarabiny w leczeniu ostrej białaczki nielimfoblastycznej u dzieci. Med Wieku Rozw. 2000; 4(2): 33-41.
- **53.** Dohner K., Schlenk R. F., Habdank M., Scholl C., Rücker F. G., Corbacioglu A., Bullinger L., Fröhling S., Döhner H.: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood 2005; 106: 3740-6.
- **54.** Drexler H. G.: Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. Leukemia 1996; 10(4): 588-99.
- **55.** Drexler H. G., Meyer C., Quentmeier H.: Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. Leuk Lymphoma 1999; 33(1-2): 83-91.
- 56. Eden T.: Aetiology of childhood leukaemia. Cancer Treat Rev. 2010; 36(4): 286-97.
- **57.** Elliott P., Peakman T. C.: The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. Int J Epidemiol. 2008; 37(2): 234-44.
- **58.** Ellisen L. W., Carlesso N., Cheng T., Scadden D. T., Haber D. A.: The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. Embo J. 2001; 20: 1897-909.
- 59. Entz-Werle N., Suciu S., van der Werff ten Bosch J., Vilmer E., Bertrand Y., Benoit Y., Margueritte G., Plouvier E., Boutard P., Vandecruys E., Ferster A., Lutz P., Uyttebroeck A., Hoyoux C., Thyss A., Rialland X., Norton L., Pages M. P., Philippe N., Otten J., Behar C.: Results of 58872 and 58921 trials in acute myeloblastic

leukemia and relative value of chemotherapy vs allogeneic bone marrow transplantation in first complete remission: the EORTC Children Leukemia Group report. Leukemia 2005; 19: 2072-81.

- **60.** Estey E., Thall P., Andreeff M., Beran M., Kantarjian H., O' Brien S., Escudier S., Robertson L. E., Koller C., Kornblau S.: Use of granulocyte colony-stimulating factor before, during, and after fl udarabine plus cytarabine induction therapy of newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes: comparison with fludarabine plus cytarabine without granulocyte colony stimulating factor. J Clin Oncol. 1994 ; 12: 671-8.
- **61.** Fathi A., Levis M.: FLT3 inhibitors: a story of the old and the new. Curr Opin Hematol. 2011; 18(2): 71-6.
- 62. Feldman E. J., Brandwein J., Stone R., Kalaycio M., Moore J., O'Connor J., Wedel N., Roboz G. J., Miller C., Chopra R., Jurcic J. C., Brown R., Ehmann W. C., Schulman P., Frankel S. R., De Angelo D., Scheinberg D.: Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2005 20; 23(18): 4110-6.
- 63. Flanagan J. R., Becker K. G., Ennist D. L., Gleason S. L., Driggers P. H., Levi B. Z., Appella E., Ozato K.: Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. Mol Cell Biol. 1992; 12(1): 38-44.
- 64. Forestier E., Heim S., Blennow E., Borgström G., Holmgren G., Heinonen K., Johannsson J., Kerndrup G., Andersen M. K., Lundin C., Nordgren A., Rosenquist R., Swolin B., Johansson B.: Cytogenetic abnormalities in childhood acute myeloid leukaemia: a Nordic series comprising all children enrolled in the NOPHO-93-AML trial between 1993 and 2001. Br J Haematol. 2003; 121: 566-77.
- **65.** Forestier E., Schmiegelow K.: The incidence peaks of the childhood acute leukemias reflect specific cytogenetic aberrations. J Pediatr Hematol Oncol. 2006; 28: 486-95.
- 66. Fraizer G. C., Wu Y. J., Hewitt S. M., Maity T., Ton C. C., Huff V., Saunders G. F.: Transcriptional regulation of the human Wilms' tumor gene (WT1). Cell typespecific enhancer and promiscuous promoter. J Biol Chem. 1994; 269(12): 8892-900.

- 67. Fröhling S., Schlenk R. F., Breitruck J., Benner A., Kreitmeier S., Tobis K., Döhner H., Döhner K.: Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood 2002; 100(13): 4372-80.
- **68.** Frost B. M., Gustafsson G., Larsson R., Nygren P., Lönnerholm G.: Cellular cytotoxic drug sensitivity in children with acute leukemia and Down's syndrome: an explanation to differences in clinical outcome? Leukemia 2000; 14: 943-4.
- 69. Gabert J., Beillard E., van der Velden V. H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J. M., Cavé H., Pane F., Aerts J. L., De Micheli D., Thirion X., Pradel V., González M., Viehmann S., Malec M., Saglio G., van Dongen J. J.: Standarization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcript for residual disease detection in leukemia a Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003, 17, 2318.
- 70. Gaidzik V. I., Schlenk R. F., Moschny S., Becker A., Bullinger L., Corbacioglu A., Krauter J., Schlegelberger B., Ganser A., Döhner H., Döhner K.: Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. Blood 2009; 113(19): 4505-11.
- 71. Gale R. E., Hills R., Kottaridis P. D., Srirangan S., Wheatley K., Burnett A. K., Linch D.C.: No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. Blood 2005; 106(10): 3658-65.
- 72. Galvin K. M., Shi Y.: Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. Mol Cell Biol. 1997; 17(7): 3723-32.
- 73. Gilliand D. G.: FLT3 activating mutations in acute promyelocytic leukaemia: a rationale for risk-adapted therapy with FLT3 inhibitors. Best Pract & Reaserch Clin Haematol. 2003; 16(3): 409-17.
- 74. Golub T. R., Arceci R. J.: Acute myelogenus leukemia. Principles and practice of pediatric oncology (red. Pizzo P. A., Poplack D. G.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2006; 547-89.
- 75. Gordon S., Akopyan G., Garban H., Bonavida B.: Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. Oncogene 2006; 25(8): 1125-42.

- 76. Gregory J. Jr, Feusner J.: Acute promyelocytic leukaemia in children. Best Pract Res Clin Haematol. 2003; 16: 483-94.
- 77. Grimwade D., Moorman A. V., Holt M. P.: Refinement of cytogenetic classification in AML: Determination of prognosis significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst patients entered into the UK MRC AML 10 and 12 trials. Blood 2001; 80: 417-22.
- 78. Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood 1998; 92: 2322-33.
- 79. Gu W., Hu S., Chen Z., Qiu G., Cen J., He B., He J., Wu W.: High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemias with more predominant WT1+17AA isoforms at relapse. Leuk Res. 2010; 34(1): 46-9.
- 80. Haber D. A., Sohn R.L., Buckler A. J., Pelletier J., Call K. M., Housman D. E.: Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(21): 9618-22.
- 81. Hall G. W.: Childhood myeloid leukemias. Best Pract Res Clin Haematol. 2001; 14: 573-91.
- 82. Hämäläinen M. M., Kairisto V., Juvonen V., Johansson J., Aurén J., Kohonen K., Remes K., Salmi T. T., Helenius H., Pelliniemi T. T.: Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. Eur J Haematol. 2008; 80(3): 201-7.
- 83. Hariharan N., Kelley D. E., Perry R. P.: Delta, a transcription factor that binds to downstream elements in several polymerase II promoters, is a functionally versatile zinc finger protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(21): 9799-803.
- 84. Hasle H.: Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. Lancet Oncol. 2001; 62: 429-36.
- **85.** Hasle H., Clemmensen I. H., Mikkelsen M.: Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. Lancet 2000; 355: 165-9.
- 86. Henderson R., Spence L.: Down syndrome with myelodysplasia of megakaryoblastic lineage. Clin Lab Sci. 2006; 19(3): 161-4.
- 87. Ho P. A., Kuhn J., Gerbing R. B., Pollard J. A., Zeng R., Miller K. L., Heerema N. A., Raimondi S. C., Hirsch B. A., Franklin J. L., Lange B., Gamis A. S., Alonzo T.

A., Meshinchi S.: WT1 synonymous single nucleotide polymorphism rs16754 correlates with higher mRNA expression and predicts significantly improved outcome in favorable-risk pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol. 2011; 20, 29(6): 704-11.

- 88. Hofmann W., Royer H. D., Drechsler M., Schneider S., Royer Pokora B.: Characterization of the transcriptional regulatory region of the human WT1 gene. Oncogene 1993; 8(11): 3 123-32.
- 89. Hollink I. H., van den Heuvel-Eibrink M. M., Zimmermann M., Balgobind B. V., Arentsen-Peters S. T., Alders M., Willasch A., Kaspers G. J., Trka J., Baruchel A., Creutzig U., Pieters R., Reinhardt D., Zwaan C. M.: No prognostic impact of the WT1 gene single nucleotide polymorphism rs16754 in pediatric acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2010; 1, 28(28): e 523-6.
- 90. Hollink I. H., van den Heuvel-Eibrink M. M., Zimmermann M., Balgobind B. V., Arentsen-Peters S. T., Alders M., Willasch A., Kaspers G. J., Trka J., Baruchel A., de Graaf S. S., Creutzig U., Pieters R., Reinhardt D., Zwaan C. M.: Clinical relevance of Wilms tumor 1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia. Blood 2009; 113: 5951-60.
- 91. Hosen N., Sonoda Y., Oji Y., Kimura T., Minamiguchi H., Tamaki H., Kawakami M., Asada M., Kanato K., Motomura M., Murakami M., Fujioka T., Masuda T., Kim E. H., Tsuboi A., Oka Y., Soma T., Ogawa H., Sugiyama H.: Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. Br J Haematol. 2002; 116: 409-20.
- 92. Hosen N., Yanagihara M., Nakazawa T., Kanato K., Nishida S., Shirakata T., Asada M., Masuda T., Taniguchi Y., Kawakami M., Tsuboi A., Ikegame K., Oka Y., Ogawa H., Kawase I., Oji Y., Sugiyama H.: Identification of a gene element essential for leukemia-specific expression of transgenes. Leukemia 2004; 18(3): 415-9.
- **93.** Hossain A., Saunders G. F.: The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. J Biol Chem. 2001; 276, 16817-23.
- **94.** Hyde-De Ruyscher R. P., Jennings E., Shenk T.: DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. Nucleic Acids Res. 1995; 23(21): 4457-65.
- **95.** Inoue K., Sugiyama H., Ogawa H., Nakagawa M., Yamagami T., Miwa H., Kita K., Hiraoka A., Masaoka T., Nasu K.: WT1 as a new prognostic factor and a new

marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood 1994; 84(9): 3071-9.

- 96. Inoue K., Tamaki H., Ogawa H., Oka Y., Soma T., Tatekawa T., Oji Y., Tsuboi A., Kim E. H., Kawakami M., Akiyama T., Kishimoto T., Sugiyama H.: Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation - inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood 1998; 91, 2969-76.
- 97. Iwai T., Yokota S., Nakao M., Okamoto T., Taniwaki M., Onodera N., Watanabe A., Kikuta A., Tanaka A., Asami K., Sekine I., Mugishima H., Nishimura Y., Koizumi S., Horikoshi Y., Mimaya J., Ohta S., Nishikawa K., Iwai A., Shimokawa T., Nakayama M., Kawakami K., Gushiken T., Hyakuna N., Fujimoto T.: Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. Leukemia 1999; 13(1): 38-43.
- **98.** Jaeger U., Kainz B.: Monitoring of minimal residual disease in AML: the right time for real time. Ann. Hematol. 2003; 82, 139-47.
- 99. Kaatsch P., Mergenthaler A.: Incidence, time trends and regional variation of childhood leukaemia in Germany and Europe. Radiat Prot Dosimetry 2008; 132(2): 107-13.
- 100. Kalwinsky D. K., Raimondi S. C., Schell M. J., Mirro Jr J., Santana V. M., Behm F., Dahl G. V., Williams D.: Prognostic importance of cytogenetic subgroups in de novo pediatric acute nonlymphocytic leukemia. J Clin Onkol. 1990; 8: (1) 75-83.
- 101. Kang H. J., Hong S. H., Kim I. H., Park B. K., Han K. S., Cho H. I., Shin H. Y., Ahn H. S.: Prognostic significance of FLT3 mutations in pediatric nonpromyelocytic acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2005; 29(6): 617-23.
- 102. Kang J. E., Hwang S. H., Lee J. H., Park do Y., Kim H. H.: Effects of RBC removal and TRIzol of peripheral blood samples on RNA stability. Clin Chim Acta. 2011 18; 412(19-20): 1883-5.
- 103. Kean L. S., Arceci R. J., Woods W. G.: Acute myeloid leukemia. Pediatric hematology (red. Arceci R. J., Hann I. M., Smith O. P.). Blackwell Publishing, Malden 2006; 360-84.
- 104. Kell W. J., Burnett A. K., Chopra R., Yin J. A., Clark R. E., Rohatiner A., Culligan D., Hunter A., Prentice A. G., Milligan D. W.: A feasibility study of simultaneous administration of gemtuzumab ozogamicin with intensive

chemotherapy in induction and consolidation in younger patients with acute myeloid leukemia. Blood 2003; 102: 4277-83.

- 105. King-Underwood L., Pritchard Jones K.: Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. Blood 1998; 91: 2961-8.
- **106.** King-Underwood L., Renshaw J., Pritchard-Jones K.: Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. Blood 1996; 87: 2171-9.
- 107. Kiyoi H., Naoe T., Nakano Y., Yokota S., Minami S., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Jinnai I., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Oh H., Motoji T., Omoto E., Saito H., Ohno R., Ueda R.: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood 1999; 93: 3074-80.
- **108.** Kletzel M., Olzewski M., Huang W., Chou P. M.: Utility of WT1 as a reliable tool for the detection of minimal residual disease in children with leukemia. Pediatr Dev Pathol. 2002; 5(3): 269-75.
- 109. Kondo M., Horibe K., Takahashi Y., Matsumoto K., Fukuda M., Inaba J., Kato K., Kojima S., Matsuyama T.: Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. Med Pediatr Oncol. 1999; 33(6): 525-9.
- 110. Kottaridis P. D., Gale R. E., Frew M. E., Harrison G., Langabeer S. E., Belton A. A., Walker H., Wheatley K., Bowen D. T., Burnett A. K., Goldstone A. H., Linch D. C.: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood 2001; 98(6), 1752-9.
- **111.** Kreidberg J. A., Sariola H., Loring J. M., Maeda M., Pelletier J., Housman D., Jaenisch R.: WT-1 is required for early kidney development. Cell 1993; 74, 679-91.
- 112. Krstovski N., Tosic N., Janic D., Dokmanovic L., Kuzmanovic M., Spasovski V., Pavlovic S.: Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. Med Oncol. 2010; 27(3): 640-5.
- 113. Laity J. H., Dyson H. J., Wright P. E.: Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(22): 11932-5.

- **114.** Lange B., Gibson B.: Acute myeloid leukemia. Education Book. 37 Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Vancouver 2005: 79-84.
- 115. Lange B. J., Kobrinsky N., Barnard D. R., Arthur D. C., Buckley J. D., Howells W. B., Gold S., Sanders J., Neudorf S., Smith F. O., Woods W. G.: Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. Blood 1998; 91: 608-15.
- 116. Lange B. J., Smith F. O., Feusner J., Barnard D. R, Dinndorf P., Feig S., Heerema N. A., Arndt C., Arceci R. J., Seibel N., Weiman M., Dusenbery K., Shannon K., Luna-Fineman S., Gerbing R. B., Alonzo T. A.: Outcomes in CCG-2961, a Children's Oncology Group Phase 3 trial for untreated pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. Blood 2008; 111: 1044-53.
- **117.** Langebrake C, Günther K, Lauber J, Reinhardt D.: Preanalytical mRNA stabilization of whole bone marrow samples. Clin Chem. 2007; 53(4): 587-93.
- **118.** Lanzkowsky P.: Manual of pediatric hematology and oncology. Elsevier Academic Press, New York 2005.
- 119. Lapillonne H., Renneville A., Auvrignon A., Flamant C., Blaise A., Perot C., Lai J., Ballerini P., Mazingue F., Fasola S., Dehee A., Bellman F., Adam M., Labopin M., Douay L., Leverger G., Preudhomme C., Landman-Parker J.; High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2006; 24, 1507-15.
- 120. Lasa A., Carricondo M., Estivill C., Bussaglia E., Gich I., Brunet S., Aventin A., Sierra J., Nomdedéu J. F.: WT1 monitoring in core binding factor AML: comparison with specific chimeric products. Leuk Res. 2009; 33(12): 1643-9.
- 121. Lauhakirti D., Sritana N., Boonthimat C., Promsuwicha O., Auewarakul C. U.: WT1 mutations and polymorphisms in Southeast Asian acute myeloid leukemia. Exp Mol Pathol. 2011; 91(3): 682-6.
- **122.** Leblanc T., Berger R.: Molecular cytogenetics of childhood acute myelogenous leukemias. Eur J Haematol. 1997; 59: 1-13.
- 123. Lee J. S., Galvin K. M., See R. H., Eckner R., Livingston D., Moran E., Shi Y.: Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1Aassociated protein p300. Genes Dev. 1995; 9(10): 1188-98.

- **124.** Lee J. S., Galvin K. M., Shi Y.: Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(13): 6145-9.
- 125. Lee T. C., Shi Y., Schwartz R. J.: Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89(20): 9814-8.
- 126. Liang D. C., Shih L. Y., Hung I. J., Yang C. P., Chen S. H., Jaing T. H., Liu H. C., Chang W. H.: Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. Cancer 2002; 94(12): 3292-8.
- 127. Lie S. O., Jonmundsson G., Mellander L., Siimes M. A., Yssing M., Gustafsson G.: A population-based study of 272 children with acute myeloid leukaemia treated on two consecutive protocols with different intensity: best outcome in girls, infants, and children with Down's syndrome: Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Br J Haematol. 1996; 94: 82-8.
- 128. Liesveld J. L., Lichtman M. A.: Acute myelogenous leukemia. Williams Hematology. Red. Lichtman M. A., Beutler E., Kipps T. J., McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York 2006: 1183-211.
- 129. Linnekin D.: Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. Int J Biochem Cell Biol. 1999; 31(10): 1053-74.
- 130. Loeb D. M., Summers J. L., Burwell E. A., Korz D., Friedman A. D., Sukumar S.: An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. Leukemia 2003; 17, 965-71.
- Lorsbach R. B., Downing J. R.: Molecular genetics of acute myeloid leukemia. Childhood leukemias (red. Pui C. H.). Cambridge University Press, Cambridge 2006; 298-338.
- 132. Mann G., Reinhardt D., Ritter J., Hermann J., Schmitt K., Gadner H., Creutzig U.: Treatment with all trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia reduces early deaths in children. Ann Hematol. 2001; 80: 417-22.
- **133.** Mantadakis E., Samonis G., Kalmanti M.: A comprehensive review of acute promyelocytic leukemia in children. Acta Haematol. 2008; 119: 73-82.
- 134. Markus M. A., Heinrich B., Raitskin O., Adams D. J., Mangs H., Goy C., Ladomery M., Sperling R., Stamm S., Morris B. J.: WT1 interacts with the splicing protein RBM4 and regulates its ability to modulate alternative splicing in vivo. Exp Cell Res. 2006; 312(17): 3379-88.

- 135. Maroc N., Rottapel R., Rosnet O., Marchetto S., Lavezzi C., Mannoni P., Birnbaum D., Dubreuil P.: Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. Oncogene 1993; 8(4): 909-18.
- **136.** Martinez-Climent J. A.: Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. Leukemia 1997; 11: 1999-2021.
- 137. Martinez-Climent J. A., Lane N. J., Rubin C. M., Morgan E., Johnstone H. S., Mick R., Murphy S. B., Vardiman J. W., Larson R. A., Le Beau M. M.: Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo. Leukemia 1995; 9: 95-101.
- **138.** Matthews W., Jordan C. T., Wiegand G. W., Pardoll D., Lemischka I. R.: A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. Cell 1991; 65(7): 1143-52.
- **139.** Matysiak M.: Hematologia w praktyce pediatrycznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 2002; 9: 93-113.
- 140. Mayer R. J., Davis R. B., Schiffer C. A., Berg D. T., Powell B. L., Schulman P., Omura G. A., Moore J. O., McIntyre O. R., Frei E.: Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. N Engl J Med. 1994; 331: 896-903.
- **141.** Menke A. L., van der Eb A. J., Jochemsen A.G.: The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? Int Rev Cytol. 1998; 181: 151-212.
- 142. Menssen H. D., Renkl H. J., Rodeck U., Maurer J., Notter M., Schwartz S., Reinhardt R., Thiel E.: Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. Leukemia 1995; 9(6): 1060-7.
- 143. Meshinchi S., Alonzo T. A., Stirewalt D. L., Zwaan M., Zimmerman M., Reinhardt D., Kaspers G. J., Heerema N. A., Gerbing R., Lange B. J., Radich J. P.: Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. Blood 2006; 108(12): 3654-61.
- **144.** Meshinchi S., Arceci R. J.: Prognostic factors and riskbased therapy in pediatric acute myeloid leukemia. The Oncologist 2007; 12: 341-55.
- 145. Meshinchi S., Stirewalt D. L., Alonzo T. A., Boggon T. J., Gerbing R. B., Rocnik J. L., Lange B. J., Gilliland D. G., Radich J. P.: Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. Blood 2008; 111(10): 4930-3.

- 146. Meshinchi S., Woods W. G., Stirewalt D. L., Sweetser D. A., Buckley J. D., Tjoa T. K., Bernstein I. D., Radich J. P.: Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. Blood 2001; 97(1): 89-94.
- **147.** Michalek J., Smarda J.: Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Scripta Medica 2000; 73: 223-8.
- **148.** Miwa H., Beran M., Saunders G. F.: Expression of the Wilms' tumor gene (Wt1) in human leukemias. Leukemia 1992; 6, 405-9.
- 149. Miyagawa K., Hayashi Y., Fukuda T., Mitani K., Hirai H., Kamiya K.: Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies. Genes Chromosomes Cancer 1999; 25: 176-83.
- 150. Miyagawa K., Kent J., Moore A., Charlieu J-P., Little M. H., Williamson K. A., Kelsey A., Brown K. W., Hassam S., Briner J., Hayashi Y., Hirai H., Yazaki Y., van Heyningen V., Hastie N. D.: Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. (Letter) Nature Genet. 1998; 18, 15-7.
- 151. Mo J., Lampkin B., Perentesis J., Poole L., Bao L.: Translocation (8;18;16)(p11;q21;p13). A new variant of t(8;16)(p11;p13) in acute monoblastic leukemia: case report and review of the literature. Cancer Genet Cytogenet. 2006; 165: 75-8.
- 152. Moreno I., Martín G., Bolufer P., Barragán E., Rueda E., Román J., Fernández P., León P., Mena A., Cervera J., Torres A., Sanz M. A.: Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. Haematologica 2003; 88(1): 19-24.
- **153.** Mrózek K.: Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Semin Oncol. 2008; 35: 365-77.
- **154.** Mundlos S., Pelletier J., Darveau A., Bachmann M., Winterpacht A., Zabel B.: Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. Development 1993; 119, 1329-41.
- **155.** Natesan S., Gilman M.: YY1 facilitates the association of serum response factor with the c-fos serum response element. Mol Cell Biol. 1995; 15(11): 5975-82.
- **156.** Niegemann E., Wehner S., Kornhuber B., Schwabe D., Ebener U.: WT1 gene expression in childhood leukemias. Acta Haematol.1999; 102(2): 72-6.
- **157.** Nishida S., Hosen N., Shirakata T., Kanato K., Yanagihara M., Nakatsuka S., Hoshida Y., Nakazawa T., Harada Y., Tatsumi N., Tsuboi A., Kawakami M., Oka

Y., Oji Y., Aozasa K., Kawase I., Sugiyama H.: AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. Blood 2006; 107: 3303-12.

- **158.** Noguera N. I., Breccia M., Divona M., Diverio D., Costa V., De Santis S., Avvisati G., Pinazzi M. B., Petti M. C., Mandelli F., Lo Coco F.: Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. Leukemia 2002; 16(11): 2185-9.
- **159.** Nowakowska-Kopera A., Sacha T., Florek I., Zawada M., Czekalska S., Skotnicki A. B.: Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. Leuk Lymphoma 2009; 50(8): 1326-32.
- 160. O'Connor M. J., Tan S. H., Tan C. H., Bernard H. U.: YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. J Virol. 1996; 70(10): 6529-39.
- 161. Ogawa H., Tamaki H., Ikegame K., Soma T., Kawakami M., Tsuboi A., Kim E. H., Hosen N., Murakami M., Fujioka T., Masuda T., Taniguchi Y., Nishida S., Oji Y., Oka Y., Sugiyama H.: The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. Blood 2003; 101(5): 1698-704.
- 162. Ommen H. B., Nyvold C. G., Braendstrup K., Andersen B. L., Ommen I. B., Hasle H., Hokland P., Ostergaard M.: Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. Br J Haematol. 2008; 141(6): 782-91.
- 163. Østergaard M., Olesen L. H., Hasle H., Kjeldsen E., Hokland P.: WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. Br J Haematol. 2004; 125(5): 590-600.
- 164. Ozeki K., Kiyoi H., Hirose Y., Iwai M., Ninomiya M., Kodera Y., Miyawaki S., Kuriyama K., Shimazaki C., Akiyama H., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Ueda R., Ohno R., Emi N., Naoe T.: Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. Blood 2004; 103(5): 1901-8.
- **165.** Paietta E.: Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition an concept? Bone Mar Transpl. 2002; 29, 459-65.
- 166. Park K., Atchison M. L.: Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy chain mu E1 site. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(21): 9804-8.
- 167. Paschka P., Marcucci G., Ruppert A. S., Whitman S. P., Mrózek K., Maharry K., Langer C., Baldus C. D., Zhao W., Powell B. L., Baer M. R., Carroll A. J., Caligiuri M. A., Kolitz J. E., Larson R. A., Bloomfield C. D.: Wilms tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol. 2008; 26: 4595-602.
- 168. Patmasiriwat P., Fraizer G., Kantarjian H., Saunders G. F.: WT1 and GATA1 expression in myelodysplastic syndrome and acute leukemia. Leukemia 1999; 13, 891-900.
- 169. Pelletier J., Schalling M., Buckler A. J., Rogers A., Haber D. A., Housman D.: Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. Genes Dev 1991; 5(8): 1345-56.
- Perea G., Lasa A., Aventín A., Domingo A., Villamor N., Queipo de Llano M.
 P., Llorente A., Juncà J., Palacios C., Fernández C., Gallart M., Font L., Tormo M., Florensa L., Bargay J., Martí J. M., Vivancos P., Torres P., Berlanga J. J., Badell I., Brunet S., Sierra J., Nomdedéu J. F.: Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. Leukemia 2006; 20: 87-94.
- 171. Perel Y., Auvrignon A., Leblanc T., Michel G., Reguerre Y., Vannier J. P., Dalle J. H., Gandemer V., Schmitt C., Méchinaud F., Lejars O., Piguet C., Couillaud G., Pautard B., Landman Parker J., Thuret I., Aladjidi N., Baruchel A., Leverger G.: Treatment of childhood acute myeloblasic leukaemia: dose intensification improves outcome and maintenance therapy is of no benefit multicenter studies of the French LAME (Leucémie Aiguë Myéloblastique Enfant) Cooperative Group. Leukemia 2005; 19: 2082-9.
- 172. Phelan S. A., Lindberg C., Call K. M. :Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. Cell Growth Differ. 1994; 5, 677-86.

- 173. Preudhomme C., Sagot C., Boissel N., Cayuela J. M., Tigaud I., de Botton S., Thomas X., Raffoux E., Lamandin C., Castaigne S., Fenaux P., Dombret H.: Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). Blood 2002; 100: 2717-23.
- 174. Pritchard-Jones K., Fleming S., Davidson D., Bickmore W., Porteous D., Gosden C., Bard J., Buckler A., Pelletier J., Housman D.: The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. Nature 1990; 346, 194-7.
- 175. Pui C. H., Behm F. G.: Pathology of acute myeloid leukemia. Pediatric hematology (red. Lilleyman J., Hann I., Blanchette V. Churchill Livingstone, London 1999; 369-85.
- 176. Pui C. H., Raimondi S. C., Srivastava D. K., Tong X., Behm F. G., Razzouk B., Rubnitz J.E., Sandlund J. T., Evans W. E., Ribeiro R.: Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. Leukemia 2000; 14: 684-7.
- **177.** Pui C. H., Schrappe M., Ribeiro R. C., Niemeyer Ch. M.: Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia. Hematology 2004; 118-34.
- **178.** Raimondi S. C., Chang M. N., Ravindranath Y., Behm F. G., Gresik M. V., Steuber C. P., Weinstein H. J., Carroll A. J.: Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukaemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study - POG 8821. Blood 1999; 94: 3707-16.
- 179. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V.: Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin Chem. 2002; 48(11): 1883-90.
- 180. Ravindranath Y.: Down syndrome and acute myeloid leukemia: the paradox of increased risk for leukemia and heightened sensitivity to chemotherapy. J Clin Oncol. 2003; 21: 3385-7.
- 181. Ravindranath Y., Abella E., Krischer J. P., Wiley J., Inoue S., Harris M., Chauvenet A., Alvarado C. S., Dubowy R., Ritchey A. K.: Acute myeloid leukemia (AML) in Down's syndrome is highly responsive to chemotherapy: experience on Pediatric Oncology Group AML Study 8498. Blood 1992; 80: 2210-4.
- 182. Ravindranath Y., Chang M., Steuber C. P., Becton D., Dahl G., Civin C., Camitta B., Carroll A., Raimondi S. C., Weinstein H. J.: Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive

childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. Leukemia 2005; 19: 2101-16.

- 183. Razzouk B. I., Raimondi S. C., Srivastava D. K., Pritchard M., Behm F. G., Tong X., Sandlund J. T., Rubnitz J. E., Pui C. H., Ribeiro R. C.: Impact of treatment on the outcome of acute myeloid leukemia with inversion 16: a single institution's experience. Leukemia 2001; 15: 1326-30.
- 184. Reilly J. T.: Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. Blood Rev. 2003; 17(4): 241-8.
- **185.** Renneville A., Roumier C., Biggio V., Nibourel O., Boissel N., Fenaux P., Preudhomme C.: Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. Leukemia 2008; 22: 915-31.
- **186.** Renshaw J., King- Underwood L., Pritchard Jones K.: Differential splicing of exon 5 of the Wilms Tumor (WT1) gene. Gen Chrom Cancer 1997; 19: 256-66.
- 187. Ribeiro R. C., Razzouk B. I., Pounds S., Hijiya N., Pui C. H., Rubnitz J. E.: Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. Leukemia 2005; 19: 2125-9.
- **188.** Rivera M. N., Haber D. A.: Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. Nat Rev Cancer 2005; 5: 699-712.
- 189. Rodeck U., Bossler A., Kari C., Humphreys C. W., Gyorfi T., Maurer J., Thiel E., Menssen H. D.: Expression of the Wt1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. Int J Cancer 1994; 59, 78-82.
- 190. Rosnet O., Buhring H. J., de Lapeyriere O., Beslu N., Lavagna C., Marchetto S., Rappold I., Drexler H. G., Birg F., Rottapel R., Hannum C., Dubreuil P., Birnbaum D.: Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. Acta Haematol. 1996; 95: 218-23.
- 191. Rosnet O., Schiff C., Pébusque M. J., Marchetto S., Tonnelle C., Toiron Y., Birg F., Birnbaum D.: Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. Blood. 1993; 82(4): 1110-9.
- 192. Rubnitz J. E., Raimondi S. C., Halbert A. R., Tong X., Srivastava D. K., Razzouk B. I., Pui C. H., Downing J. R., Ribeiro R. C., Behm F. G.: Characteristics and outcome of t(8;21) - positive childhood acute myeloid leukemia: a single institution's experience. Leukemia 2002; 16: 2072-7.
- 193. Rubnitz J. E., Raimondi S. C., Tong X., Srivastava D. K., Razzouk B. I., Shurtleff S. A., Downing J. R., Pui C. H., Ribeiro R. C., Behm F. G.: Favorable

impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2002; 20: 2302-9.

- **194.** Sakamoto Y., Mariya Y., Sasaki S., Teshiromori R., Oshikiri T., Segawa M., Ogura K., Akagi T., Kubo K., Kaimori M., Funato T.: WT1 mRNA level in peripheral blood is a sensitive biomarker for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Tohoku J Exp Med. 2009; 219(2): 169-76.
- 195. San-Miguel J. F., Vidriales M. B., Orfao A.: Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). Best Pract Res Cl Ha. 2002; 15(1): 105-18.
- 196. Schlenk R. F., Dohner K., Krauter J., Fröhling S., Corbacioglu A., Bullinger L., Habdank M., Späth D., Morgan M., Benner A., Schlegelberger B., Heil G., Ganser A., Döhner H.: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2008; 358: 1909-18.
- 197. Schmid D., Heinze G., Linnerth B., Tisljar K., Kusec R., Geissler K., Sillaber C., Laczika K., Mitterbauer M., Zöchbauer S., Mannhalter C., Haas O. A., Lechner K., Jäger U., Gaiger A.: Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. Leukemia 1997; 11(5): 639-43.
- **198.** Schnittger S., Schoch C., Dugas M., Kern W., Staib P., Wuchter C., Löffler H., Sauerland C. M., Serve H., Büchner T., Haferlach T., Hiddemann W.: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood 2002; 100(1): 59-66.
- 199. Schnittger S., Schoch C., Kern W., Mecucci C., Tschulik C., Martelli M. F., Haferlach T., Hiddemann W., Falini B.: Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood 2005; 106: 3733-9.
- 200. Sekiya M., Adachi M., Hinoda Y., Imai K., Yachi A.: Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. Blood 1994; 83, 1876-82.
- **201.** Seto E., Lewis B., Shenk T.: Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. Nature 1993; 365(6445): 462-4.
- **202.** Shah M., Agarwal B.: Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). Indian J Pediatr. 2008; 75(8): 831-7.

- **203.** Shi Y., Lee J. S., Galvin K. M.: Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. Biochim Biophys Acta 1997; 1332(2): 49-66.
- 204. Shih L. Y., Liang D. C., Fu J. F., Wu J. H., Wang P. N., Lin T. L., Dunn P., Kuo M. C., Tang T. C., Lin T. H., Lai C. L.: Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. Leukemia 2006; 20: 218-23.
- **205.** Shimada A., Taki T., Tabuchi K., Taketani T., Hanada R., Tawa A., Tsuchida M., Horibe K., Tsukimoto I., Hayashi Y.: Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Pediatr Blood Cancer 2008; 50: 264-9.
- **206.** Shimada A., Taki T., Tabuchi K., Tawa A., Horibe K., Tsuchida M., Hanada R., Tsukimoto I., Hayashi Y.: KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Blood 2006; 107: 1806-9.
- 207. Shrivastava A., Calame K.: An analysis of genes regulated by the multifunctional transcriptional regulator Yin Yang - 1. Nucleic Acids Res. 1994; 22(24): 5151-5.
- **208.** Siehl J. M., Reinwald M., Heufelder K., Menssen H. D., Keilholz U., Thiel E.: Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. Ann Hematol. 2004; 83, 745-50.
- **209.** Silberstein G. B., Van Horn K., Strickland P., Roberts C. T. Jr, Daniel C. W.: Altered expression of the WT1 Wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci. 1997; 94, 8132-7.
- 210. Slørdahl S. H., Smeland E. B., Holte H., Grønn M., Lie S. O., Seip M.: Leukemic blasts with markers of four cell lineages in Down's syndrome ("megakaryoblastic leukemia"). Med Pediatr Oncol. 1993; 21: 254-8.
- **211.** Smith F. O., Alonzo T. A., Gerbing R. B., Woods W. G., Arceci R. J.: Longterm result of children with acute myeloid leukemia: a report of three consecutive Phase III trials by the Children's Cancer Group: CCG 251, CCG 213 and CCG 2891. Leukemia 2005; 19: 2054-62.
- **212.** Smith M. A., Adamson P. C., Balis F. M., Feusner J., Aronson L., Murphy R. F., Horowitz M. E., Reaman G., Hammond G. D., Fenton R. M.: Phase I and

pharmacokinetic evaluation of all-trans retinoic acid in pediatric patients with cancer. J Clin Oncol. 1992; 10: 1666-73.

- 213. Stark B., Jeison M., Gabay L. G., Mardoukh J., Luria D., Bar-Am I., Avrahami G., Kapeliushnik Y., Sthoeger D., Herzel G., Steinberg D. M., Cohen I. J., Goshen Y., Stein J., Zaizov R., Yaniv I.: Classical and molecular cytogenetic abnormalities and outcome of childhood acute myeloid leukaemia: report from a referral centre in Israel. Br J Haematology 2004; 126: (3) 320-37.
- 214. Steinbach D., Schramm A., Eggert A., Onda M., Dawczynski K., Rump A., Pastan I., Witting S., Pfaffendorf N., Voigt A., Zintl F., Gruhn B.: Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res. 2006; 12(8), 2434-41.
- **215.** Stirewalt D. L., Kopecky K. J., Meshinchi S., Appelbaum F. R., Slovak M. L., Willman C. L., Radich J. P.: FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood 2001; 97(11): 3589-95.
- 216. Summers K., Stevens J., Kakkas I., Smith M., Smith L. L., Macdougall F., Cavenagh J., Bonnet D., Young B. D., Lister T. A., Fitzgibbon J.: Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. Leukemia 2007; 21: 550-1.
- 217. Svedberg H., Chylicki K., Baldetorp B., Rauscher F. J., Gullberg U.: Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. Oncogene 1998; 16, 925-32.
- 218. Svedberg H., Richter J., Gullberg U.: Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. Leukemia 2001; 15: 1914-22.
- **219.** Svensson E., Eriksson H., Gekas C., Olofsson T., Richter J., Gullberg U.: DNAbinding dependent and independent functions of WT1 protein during human hematopoiesis. Exp Cell Res. 2005; 308: 211-21.
- **220.** Tallman M. S., Nabhan C., Feusner J. H., Rowe J.M.: Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. Blood 2002; 99: 759-67.
- 221. Taub J. W., Huang X., Matherly L. H., Stout M. L., Buck S. A., Massey G. V., Becton D. L., Chang M. N., Weinstein H. J., Ravindranath Y.: Expression of chromosome 21 - localized genes in acute myeloid leukemia: differences between Down syndrome and non - Down syndrome blast cells and relationship to in vitro sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. Blood 1999; 94: 1393-1400.

- 222. Testi A. M., Biondi A., Lo Coco F., Moleti M. L., Giona F., Vignetti M., Menna G., Locatelli F., Pession A., Barisone E., De Rossi G., Diverio D., Micalizzi C., Aricò M., Basso G., Foa R., Mandelli F.: GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. Blood 2005; 106: 447-53.
- **223.** Thiede C., Illmer T., Soucek S., Schaich M., Ehninger G.: Mutations in the WT1 transcription factor are associated with inferior overall survival an analysis in 368 AML patients with normal karyotype under 60 years treated in the AML96 protocol of the DSIL. Haematologica 2008; 93: 62.
- **224.** Thiede C., Steudel C., Mohr B., Schaich M., Schäkel U., Platzbecker U., Wermke M., Bornhäuser M., Ritter M., Neubauer A., Ehninger G., Illmer T.: Analysis of FLT3 -activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 2002; 99(12): 4326-35.
- **225.** Thomas M. J., Seto E.: Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? Gene 1999; 236(2): 197-208.
- **226.** Tisljar K., Linnerth B., Priglinger S.: Detection of WT1 gene expression in patients with solid tumors. Br J Haematol. 1996; 93, 201.
- **227.** Trka J., Kalinová M., Hrusák O., Zuna J., Krejcí O., Madzo J., Sedlácek P., Vávra V., Michalová K., Jarosová M., Starý J.: Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. Leukemia 2002; 16, 1381-9.
- **228.** Usheva A., Shenk T.: TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. Cell 1994; 76(6): 1115-21.
- **229.** Vardiman J. W., Harris N. L., Brunning R. D.: Classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002; 100: 2292-302.
- 230. Vardiman J. W., Thiele J., Arber D. A., Brunning R. D., Borowitz M. J., Porwit A., Harris N. L., Le Beau M. M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C. D.: The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009; 114(5): 937-51.
- **231.** Verhaak R. G., Goudswaard C. S., van Putten W., Bijl M. A., Sanders M. A., Hugens W., Uitterlinden A. G., Erpelinck C. A., Delwel R., Löwenberg B., Valk P.

J.: Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood 2005; 106: 3747-54.

- **232.** Viehmann S., Teigler-Schlegel A., Bruch J., Langebrake C., Reinhardt D., Harbott J.: Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real-time quantitative reverse transcription PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO rearrangement. Leukemia 2003, 17, 1130.
- **233.** Vincent C. K., Gualberto A., Patel C. V., Walsh K.: Different regulatory sequences control creatine kinase-M gene expression in directly injected skeletal and cardiac muscle. Mol Cell Biol. 1993; 13(2): 1264-72.
- **234.** Virappane P., Gale R., Hills R., Kakkas I., Summers K., Stevens J., Allen C., Green C., Quentmeier H., Drexler H., Burnett A., Linch D., Bonnet D., Lister T. A., Fitzgibbon J.: Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. J Clin Oncol. 2008; 26: 5429-35.
- 235. Wagner K. D., Wagner N., Vidal V. P. I., Schley G., Wilhelm D., Schedl A., Englert C., Scholz H.: The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. Embo J. 2002; 21, 1398-1405.
- **236.** Weisberg E., Barrett R., Liu Q., Stone R., Gray N., Griffin J. D.: FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. Drug Resist Updat. 2009; 12(3): 81-9.
- 237. Weisser M., Kern W., Rauhut S., Schoch C., Hiddemann W., Haferlach T., Schnittger S.: Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. Leukemia 2005; 19(8): 1416-23.
- 238. Wells R. J., Arthur D. C., Srivastava A., Heerema N. A., Le Beau M., Alonzo T. A., Buxton A. B., Woods W. G., Howells W. B., Benjamin D. R., Betcher D. L., Buckley J. D., Feig S. A., Kim T., Odom L. F., Ruymann F. B., Smithson W. A., Tannous R., Whitt J. K., Wolff L., Tjoa T., Lampkin B. C.: Prognostic variables in newly diagnosed children and adolescents with acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 213. Leukemia 2002; 16: 601-7.

- 239. Whitney A. R., Diehn M., Popper S. J., Alizadeh A. A., Boldrick J. C., Relman D. A., Brown P. O.: Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 18; 100(4): 1896-901.
- **240.** Wiernik P. H.: FLT3 inhibitors for the treatment of acute myeloid leukemia. Clin Adv Hematol Oncol. 2010; 8(6): 429-36.
- **241.** Xu W. L., Shen H. L., Ao Z. F., Chen B. A., Xia W., Gao F., Zhang Y. N.: Combination of tetrandrine as a potential-reversing agent with daunorubicin, etoposide and cytarabine for the treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. Leuk Res. 2006; 30(4): 407-13.
- Xu W., Zhou H. F., Fan L., Qian S. X., Chen L. J., Qiu H. R., Zhang S. J., Li J. Y.: Trisomy 22 as the sole abnormality is an important marker for the diagnosis of acute myeloid leukemia with inversion 16. Oncologie 2008; 31: 440-4.
- 243. Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R., Naoe T.: Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001; 97(8): 2434-9.
- 244. Yanada M., Terakura S., Yokozawa T., Yamamoto K., Kiyoi H., Emi N., Kitamura K., Kohno A., Tanaka M., Tobita T., Takeo T., Sao H., Kataoka T., Kobayashi M., Takeshita A., Morishita Y., Naoe T., Sugiura I.: Multiplex real-time RT-PCR for prospective evaluation of WT1 and fusion gene transcripts in newly diagnosed de novo acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2004; 45(9): 1803-8.
- **245.** Yang C., Shapiro L. H., Rivera M., Kumar A., Brindle P. K.: A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions. Mol Cell Biol. 1998; 18(4): 2218-29.
- **246.** Yang C. P., Wu J. H., Hung I. J., Jaing T. H.: Cytogenetic pattern of childhood leukemia in Taiwan. J Formos Med Assoc. 2000; 99: 281-9.
- **247.** Yang W. M., Yao Y. L., Seto E.: The FK506-binding protein 25 functionally associates with histone deacetylases and with transcription factor YY1. Embo J. 2001; 20(17): 4814-25.
- 248. Yao Y. L., Dupont B. R., Ghosh S., Fang Y., Leach R. J., Seto E.: Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. Nucleic Acids Res. 1998; 26(16): 3776-83.

- **249.** Yao Y. L., Yang W. M., Seto E.: Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. Mol Cell Biol. 2001; 21(17): 5979-91.
- **250.** Zhang W., Bieker J. J.: Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(17): 9855-60.
- 251. Zheng R., Levis M., Piloto O., Brown P., Baldwin B. R., Gorin N. C., Beran M., Zhu Z., Ludwig D., Hicklin D., Witte L., Li Y., Small D.: FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. Blood 2004; 103(1): 267-74.
- 252. Zipursky A., Thorner P., De H. E., Christensen H., Doyle J.: Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome. Leuk Res. 1994; 18: 163-171.
- **253.** Zwaan C. M., Kaspers G. J., Pieters R., Hahlen K., Janka-Schaub G.E., Van Zantwijk C.H., Huismans D. R., de Vries E., Rots M. G., Peters G. J., Jansen G., Creutzig U., Veerman A. J.: Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome. Blood 2002; 99: 245-51.
- 254. Zwaan C. M., Meshinchi S., Radich J. P., Veerman A. J., Huismans D. R., Munske L., Podleschny M., Hählen K., Pieters R., Zimmermann M., Reinhardt D., Harbott J., Creutzig U., Kaspers G. J., Griesinger F.: FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. Blood 2003; 102: 2387-94.

11. Spis tabel

- Tabela 1.Występowanie antygenów powierzchniowych w określonym typie AML
(str. 14).
- **Tabela 2.**Główne nieprawidłowości chromosomalne i zaburzenia genowe
w dziecięcej AML (str. 17).
- **Tabela 3.**Rearanżacje chromosomowe i związane z nimi grupy ryzyka (str. 18)
- Tabela 4. Kryteria klasyfikacji pacjentów do określonej grupy ryzyka wg programu AML BFM Interim 2004. Program stosowany od 2005 r. w ośrodkach Polskiej Pediatrycznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBC) (str. 19).
- **Tabela 5.**Charakterystyka pacjentów (str. 29).
- **Tabela 6.**Charakterystyka zaburzeń chromosomalnych/kariotypu (str. 30).
- **Tabela 7.**Sprzęt laboratoryjny wykorzystywany podczas doświadczeń (str. 32).
- Tabela 8.Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla analizy powtórzeń FLT3-ITD
(str. 35).
- **Tabela 9.**Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji (RT PCR) (str. 38).
- Tabela 10.Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej podczas amplifikacji produktów
dla genów fuzyjnych i genu ABL z zastosowaniem systemu TaqMan
(str. 40).
- Tabela 11.Składmieszaninyreakcyjnejstosowanejpodczasamplifikacjiproduktów dla genu WT1 i genu ABL z zastosowaniem systemu TaqMan
(str. 42).
- **Tabela 12.**Skład mieszaniny reakcyjnej PCR dla amplifikacji badanych odcinkówpromotora i sekwencji wzmacniających genu WT1 (str. 47).
- **Tabela 13.**Zaburzenia molekularne: wybrane geny fuzyjne i inne zmiany
genetyczne oznaczone przed rozpoczęciem leczenia (str. 54).
- Tabela 14.Wewnętrzna tandemowa duplikacja genu FLT3. Częstość występowania
powtórzeń ITD w badanej grupie dzieci z AML a typy ostrej białaczki
szpikowej (str. 56).
- Tabela 15.Porównanie zdrowej grupy kontrolnej z grupą chorych na AML de novo
w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej
(str. 58).

- Tabela 16.Porównanie poziomu ekspresji WT1 w zależności od płci pacjenta
w szpiku w chwili rozpoznania (str. 60).
- **Tabela 17.**Poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w chwili rozpoznania w zależności
od typu AML wg FAB (str. 61).
- Tabela 18.Porównanie poziomu ekspresji WT1 w szpiku w chwili rozpoznania
w zależności od typu AML wg FAB. W tabeli podano wartości p dla
porównywanych podgrup (str. 62).
- Tabela 19.Porównanie grup pacjentów (SRG, HRG) w zależności od poziomu
ekspresji WT1 w szpiku w chwili rozpoznania (str. 63).
- **Tabela 20.**Porównanie grup pacjentów (SRG, HRG) w zależności od poziomu
ekspresji WT1 w krwi obwodowej w chwili rozpoznania (str. 64).
- Tabela 21. Wartości uzyskane dla liczby kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL w szpiku w zależności od obecności transkryptów fuzyjnych AML1-ETO, CBFβ-MYH11 i PML-RARα (str. 65).
- Tabela 22. Porównanie liczby leukocytów w krwi obwodowej w dwóch grupach różniących się ekspresją genu WT1 w krwi obwodowej (<1457 kopii i ≥1457 kopii na 10⁴ kopii genu ABL) (str. 67).
- Tabela 23. Porównanie liczby blastów w krwi obwodowej w chwili diagnozy AML w dwóch grupach pacjentów różniących się poziomem ekspresji genu WT1 (<1457 i ≥1457 kopii na 10⁴ kopii genu ABL) w dniu 0. (str. 68).
- Tabela 24. Porównanie odsetka blastów w szpiku kostnym w chwili rozpoznania w dwóch grupach pacjentów różniących się ekspresją genu WT1 oznaczoną w szpiku w dniu 0. (<2321 kopii i >2321 kopii na 10⁴ kopii genu ABL) (str. 69).
- Tabela 25. Porównanie wartości ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej (liczba kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL) pochodzących od wszystkich ocenianych pacjentów, od których uzyskano materiał w kolejnych wyznaczonych punktach czasowych tj. 0., 15., 30., 50., 75., 100., 150., >200. (str. 71).
- Tabela 26. Porównanie wartości ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej (liczba kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL) pochodzących od tych samych pacjentów w kolejnych wyznaczonych punktach czasowych tj. dni: 0., 15., 30., 50., 75., 100., 150., >200. (str. 72).

- Tabela 27. Porównanie odsetka blastów w szpiku kostnym w 15. dniu leczenia w dwóch grupach pacjentów różniących się ekspresją genu WT1 oznaczonego w szpiku w dniu 0. (<2321 kopii i >2321 kopii na 10⁴ kopii genu ABL) (str. 74).
- **Tabela 28.**Przeżycie całkowite a grupy ryzyka (SRG i HRG) (str. 76).
- **Tabela 29.** Porównanie grup pacjentów z poziomem ekspresji genu WT1 w szpiku ≤ 2339 kopii i >2339 kopii na 10^4 kopii genu ABL (str. 77).
- **Tabela 30.**Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku pomiędzy dniami 0.i 30., 15. i 30. oraz 0. i 30. dla tych samych pacjentów (str. 79).
- **Tabela 31.**Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej pomiędzy
dniami 0. i 30., 15. i 30. oraz 0. i 30. dla tych samych pacjentów (str. 80).
- Tabela 32.Różnice w poziomie ekspresji genu WT1 w szpiku i w krwi obwodowej
pomiędzy dniami 0. i 30., 15. i 30. oraz 0. i 30. dla wszystkich próbek
uzyskanych od pacjentów (str. 82).
- Tabela 33.Materiał w postaci RNA analizowany w kolejnych punktach terapii
(str. 99).
- **Tabela 34.**Przyczyny degradacji/braku RNA w próbkach (str. 100).

12. Spis wykresów

- **Wykres 1.** Wykres kołowy przedstawiający częstość (%) występowania wybranych genów fuzyjnych w populacji badanej (str. 55).
- Wykres 2. Wykres kołowy przedstawiający % występowania powtórzeń FLT3-ITD w populacji badanej (str. 55).
- Wykres 3. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 (liczba kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL) w krwi obwodowej u ludzi zdrowych i u chorych na AML (str. 57).
- Wykres 4. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w czasie rozpoznania, w zależności od płci (str. 59).
- Wykres 5. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w zależności od wieku dziecka w chwili rozpoznania choroby (str. 60).
- Wykres 6. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w zależności od typu AML wg FAB (str. 61).
- Wykres 7. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w czasie rozpoznania, w zależności od grupy ryzyka (str. 63).
- Wykres 8. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej w czasie rozpoznania w zależności od grupy ryzyka (str. 64).
- Wykres 9. Wykres logarytmiczny liczby kopii genu WT1 wyrażonej na 10⁴ kopii genu ABL w szpiku w zależności od obecności AML1-ETO, CBFβ-MYH11 i PML-RARα (str. 65).
- Wykres 10. Wykres logarytmiczny przedstawiający wstępną liczbę leukocytów w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej (str. 66).
- **Wykres 11.** Wykres przedstawiający liczbę blastów/mm³ w zależności od liczby kopii genu WT1 w krwi obwodowej w czasie rozpoznania (str. 68).
- **Wykres 12.** Wykres przedstawiający odsetek komórek blastycznych w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku w czasie rozpoznania (str. 69).
- **Wykres 13.** Wykres logarytmiczny liczby kopii genu WT1 wyrażonej na 10⁴ kopii genu ABL w szpiku i krwi obwodowej w dniu rozpoznania dla wszystkich próbek uzyskanych od pacjentów (str. 70).

- **Wykres 14.** Wykres logarytmiczny liczby kopii genu WT1 wyrażonej na 10⁴ kopii genu ABL w szpiku i krwi obwodowej w dniu rozpoznania dla tych samych pacjentów (str. 72).
- Wykres 15. Wykres logarytmiczny przedstawiający odsetek komórek blastycznych (%) w zależności od poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku w dniu 15. (str. 73).
- **Wykres 16.** Krzywa całkowitego przeżycia (OS) dla wszystkich badanych dzieci (str. 75).
- **Wykres 17.** Krzywa całkowitego przeżycia (OS) dla pacjentów zakwalifikowanych do SRG i HRG (str. 75).
- Wykres 18. Krzywa Kaplana-Meiera przedstawiająca prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów w zależności od wstępnego poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku (str. 76).
- Wykres 19. Wykres logarytmiczny poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej dla tych samych pacjentów, wyrażony w liczbie kopii genu WT1 na 10⁴ kopii genu ABL w kolejnych punktach leczenia (str. 78).
- Wykres 20. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w szpiku w dniu 0. i w 15. dniu leczenia, w dniu 15. i 30., w dniu 0. i w 30. dniu leczenia (str. 79).
- Wykres 21. Wykres logarytmiczny przedstawiający poziom ekspresji genu WT1 w krwi obwodowej w dniu 0. i w 15. dniu leczenia, w dniu 15. i 30., w dniu 0. i w 30. dniu leczenia (str. 80).
- Wykres 22. Wykres logarytmiczny poziomu ekspresji genu WT1 w szpiku i krwi obwodowej dla wszystkich pacjentów, w kolejnych etapach leczenia (str. 81).
- Wykres 23. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 1, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 82).
- Wykres 24. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 2, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 83).
- Wykres 25. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 3, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 83).

- Wykres 26. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 4, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 84).
- Wykres 27. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 5, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 84).
- Wykres 28. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 6, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 85).
- Wykres 29. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 7, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 85).
- Wykres 30. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 8, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 86).
- Wykres 31. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 9, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego AML1-ETO (str. 86).
- Wykres 32. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 10, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego PML-RARα (str. 87).
- Wykres 33. Wykres logarytmiczny kopii genu WT1 podczas monitorowania MRD u pacjenta 11, u którego stwierdzono obecność genu fuzyjnego CBFβ-MYH11 (str. 87).
- **Wykres 34.** Wykres przedstawiający rozkład próbek RNA uzyskanych ze szpiku w kolejnych punktach terapii (str. 98).
- **Wykres 35.** Wykres przedstawiający rozkład próbek RNA uzyskanych z krwi obwodowej w kolejnych punktach terapii (str. 98).

13. Spis rycin

- **Rycina 1.** Ogólny schemat leczenia AML BFM Interime 2004 (str. 22).
- **Rycina 2.** Warunki termiczne reakcji PCR dla analizy powtórzeń ITD w genie FLT3 (str. 36).
- **Rycina 3.** Wynik rozdziału elektroforetycznego dla analizy ITD w genie FLT3 (str. 36).
- Rycina 4. Warunki termiczne reakcji RT PCR (str. 37).
- **Rycina 5.** Warunki termiczne dla reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla wybranych genów fuzyjnych (str. 41).
- **Rycina 6a.** Przykładowa krzywa standardowa dla genu ABL wyliczona na podstawie poziomu fluorescencji odczytanej podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym (str. 41).
- **Rycina 6b.** Przykładowy poziom fluorescencji dla genu ABL odczytany podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym (str. 41).
- **Rycina 7a.** Przykładowa krzywa standardowa dla genu WT1 wyliczona na podstawie poziomu fluorescencji odczytanej podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym (str. 43).
- **Rycina 7b.** Przykładowy poziom fluorescencji dla genu WT1 odczytany podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym (str. 43).
- **Rycina 8.** Warunki termiczne reakcji RealTime PCR dla genu WT1 (str. 44).
- **Rycina 9.** Rycina przedstawia proksymalny odcinek regionu promotora genu WT1, który poddano amplifikacji (str. 45).
- **Rycina 10.** Rycina przedstawia sekwencję wzmacniającą w intronie 3 genu WT1 (str. 46).
- **Rycina 11.** Rycina przedstawia sekwencję wzmacniającą na końcu 3' genu WT1 (str. 46).
- **Rycina 12.** Warunki termiczne reakcji PCR dla analizy regionów promotora I i II genu WT1 (str. 47).
- **Rycina 13.** Warunki termiczne reakcji PCR dla analizy regionów wzmacniających intron 3 i koniec 3' genu WT1 (str. 48).
- Rycina 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu I promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F1-R1 (str. 48).

- **Rycina 15.** Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu II promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F2-R2 (str. 48).
- **Rycina 16.** Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu sekwencji wzmacniającej (intron 3) genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F3-R3 (str. 49).
- **Rycina 17.** Wynik rozdziału elektroforetycznego dla fragmentu sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F4-R4 (str. 49).
- Rycina 18. Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji odcinka I promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F1-R1. Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury (str. 50).
- Rycina 19. Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji odcinka II promotora genu WT1, amplifikowanego z zastosowaniem starterów F2-R2. Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury (str. 51).
- Rycina 20. Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji wzmacniającej genu WT1 w intronie 3, amplifikowanej z zastosowaniem starterów F3-R3. Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury (str. 52).
- Rycina 21. Krzywe temperatur przedstawiające topnienie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1, amplifikowanej z zastosowaniem starterów F4-R4. Chromatogram przedstawiający graficznie sposób opuszczania kolumny przez badaną sekwencję w zależności od temperatury (str. 53).
- **Rycina 22.** Przykładowy wynik reakcji sekwencjonowania z zastosowaniem automatycznego sekwenatora kapilarnego (str. 53).
- **Rycina 23.** Obraz elektroforetyczny analizy ITD w genie FLT3. Produkt PCR dla allelu z duplikacją o długości około 600 pz (str. 56).
- **Rycina 24.** Obraz elektroforetyczny analizy ITD w genie FLT3. Typowy obraz elektroforezy (str. 57).
- **Rycina 25.** Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka promotora 1 genu WT1 (str. 88).
- **Rycina 26.** Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka promotora 2 genu WT1 (str. 88).

- **Rycina 27.** Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka sekwencji wzmacniającej w intronie 3 genu WT1 (str. 89).
- **Rycina 28.** Chromatogram przedstawiający rozdział amplifikowanego odcinka sekwencji wzmacniającej na końcu 3' genu WT1 (str. 89).
- **Rycina 29.** Wariant: rs72893528 w regionie promotora (para starterów F1-R1) (str. 90).
- **Rycina 30.** Wariant: rs2234579 w regionie promotora (para starterów F1-R1) (str. 90).
- **Rycina 31.** Wariant: rs2234579 w regionie promotora (para starterów F1-R1) (str. 90).
- **Rycina 32.** Insercja A w pozycji pomiędzy 11: 32457352-11:32457351 w regionie promotora (para starterów F1-R1) (str. 91).
- **Rycina 33.** Wariant: rs2234580 w regionie promotora (para starterów F2-R2) (str. 91).
- **Rycina 34.** Wariant: rs5030133 w regionie promotora (para starterów F2-R2) (str. 91).
- **Rycina 35.** Wariant: rs5030177 w regionie sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (para starterów F3-R3) (str. 92).
- **Rycina 36.** Wariant: rs35925541 w regionie sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (para starterów F3-R3) (str. 92).
- **Rycina 37.** Wariant: rs5030178 w regionie sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (para starterów F3-R3) (str. 92).
- **Rycina 38.** Wariant: rs5030178 w regionie sekwencji wzmacniającej w intronie 3 (para starterów F3-R3) (str. 93).
- **Rycina 39.** Wariant: rs5030335 w regionie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) (str. 93).
- **Rycina 40.** Wariant: rs5030335 w regionie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) (str. 93).
- **Rycina 41.** Wariant: rs5030336 w regionie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) (str. 94).
- **Rycina 42.** Wariant: rs5030336 i rs5030337 w regionie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) (str. 94).
- **Rycina 43.** Wariant: rs5030338 w regionie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) (str. 94).

- **Rycina 44.** T/A w pozycji 11: 32408629 w regionie sekwencji wzmacniającej na końcu 3' (para starterów F4-R4) (str. 95).
- **Rycina 45.** Sekwencja części proksymalnej promotora poddana analizie sekwencyjnej (str. 110).
- **Rycina 46.** Modele przedstawiające potencjalne mechanizmy regulacji ekspresji genów na poziomie hamowania transkrypcji przez czynnik transkrypcyjny YY1 (str. 112).