

UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

ROZPRAWA DOKTORSKA

EKSPRESJA I POLIMORFIZMY GENÓW

RUNX1, RUNX3 i CEBPA

W OSTREJ BIAŁACZCE LIMFOBLASTYCZNEJ

Dagmara Szmaida-Krygier

Praca wykonana
w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Pracowni oraz Promotor pracy:
prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

Promotor pomocniczy:
dr n. farm. Marta Żebrowska-Nawrocka



Łódź 2020

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania prof. Ewie Balcerczak,
dr Marcie Żebrowskiej-Nawrockiej oraz prof. Markowi Mirowskiemu
za pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej,
cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację do
krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą

Niniejsza praca została zrealizowana z wykorzystaniem środków przeznaczonych na Zadanie Badawcze Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr 502-03/3-015-02/502-34-089)

Wykaz skrótów

ALL	ang. acute lymphoblastic leukemia; ostra białaczka limfoblastyczna
AML	ang. acute myeloid leukemia; ostra białaczka szpikowa
AML1	ang. Acute Myeloid Leukemia 1 gene; gen ostrej białaczki szpikowej 1
ARID1A	ang. AT-rich interactive domain-containing protein 1A; bogate w AT białko 1A zawierające interaktywną domenę
BAX	ang. BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator; regulator apoptozy związany z BCL2
BIM	ang. Bcl2-Interacting Mediator Of Cell Death; mediator śmierci komórek związany z Bcl2
bZIP	ang. basic-leucine zipper motif; motyw suwaka zasadowo-leucynowego
CBC	ang. complete blood count; całkowita liczba komórek krwi
CBFa2	ang. Core-Binding Factor Subunit Alpha-2; podjednostka alfa-2 czynnika wiążącego rdzeń
CBF-beta	ang. Core-Binding Factor Subunit Beta; podjednostka beta czynnika wiążącego rdzeń
CEBP	ang. CCAAT Enhancer Binding Proteins; białka CCAAT wiążące wzmacniacz
CHD5	ang. Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 5; chromodomenowe białko wiążące helikazę DNA 5
CR	ang. complete remission; całkowita remisja
ECOG	ang. Eastern Cooperative Oncology Group; skala sprawności według Eastern Cooperative Oncology Group
EGIL	ang. European Group for Immunophenotypic characterization of Leukemias; Europejska Grupa ds. Immunofenotypizacji Białaczek
ESMO	ang. European Society for Medical Oncology; Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej
ETO	ang. Eight Twenty One protein; dosłownie białko osiem-dwadzieścia-jeden

FAB	ang. French-American-British group; Francusko-amerykańsko-brytyjski system klasyfikacji
FISH	ang. fluorescence in situ hybridization; fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
GAPDH	ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa
GKS	glikokortykosteroidy
HCT	ang. hematopoietic cell transplantation; przeszczepienie komórek krwiotwórczych
ID	ang. inhibitory domain; domena hamująca
LDH	ang. lactate dehydrogenase; dehydrogenaza mleczanowa
MLL	ang. mixed lineage leukemia; białaczka o mieszanym fenotypie
MolCR	całkowita molekularna remisja
MolFail	niepowodzenie molekularne
MolR	remisja molekularna
MolRel	wznowa molekularna
MPO	mieloperoksydaza
MRD	ang. minimal residual disease; minimalna choroba resztkowa
MYC	ang. Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; homolog onkogenu wirusa ptasiej mielocytozozy
NMTS	ang. nuclear matrix targeting sequence; sekwencja namierzania matrycy jądrowej
NOS	ang. not otherwise specified; bez innej specyfikacji
PCR	ang. Polymerase chain reaction; reakcja łańcuchowa polimerazy
PEBP2aB	ang. Polyomavirus Enhancer-Binding Protein 2 Alpha B Subunit; podjednostka beta białka alfa 2 poliomawirusa wiążącego wzmacniacz
RFLP	ang. restriction fragment length polymorphism; polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
RHD	ang. Runt Homology Domain; domena homologii Runt

RT-qPCR	ang. real-time quantitative polymerase chain reaction; reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RUNX 1-3	ang. Runt Related Transcription Factor members 1-3; czynniki transkrypcyjne związane z domeną runt 1-3
SCC	ang. squamous cell carcinoma; rak płaskonabłonkowy
TD	ang. transactivation domain; domena transaktywacyjna
TF	ang. transcription factors; czynniki transkrypcyjne
TKI	inhibitory kinaz tyrozynowych
TLS	ang. tumour lysis syndrome; zespół rozpadu nowotworu
VWRPY	walina-tryptofan-arginina-prolina-tyrozyna
WHO	ang. World Health Organization; Światowa Organizacja Zdrowia

Spis treści

Wykaz skrótów	1
Spis treści	4
Rozdział I	8
Informacje o jednostce chorobowej	8
1.1 Epidemiologia ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL)	8
1.2 Patogeneza ostrej białaczki limfoblastycznej.....	8
1.3 Klasyfikacja ostrej białaczki limfoblastycznej.....	9
1.4 Rozpoznanie ostrej białaczki limfoblastycznej.....	11
1.4.1 Badania krwi obwodowej.....	12
1.4.2 Badania szpiku.....	12
1.4.3 Immunofenotypowanie	13
1.4.4 Badania cytogenetyczne i molekularne	13
1.4.5 Badania obrazowe.....	14
1.4.6 Nakłucie lędźwiowe	14
1.5 Obraz kliniczny ostrej białaczki limfoblastycznej	14
1.6 Czynniki prognostyczne ostrej białaczki limfoblastycznej	15
1.6.1 Wyjściowe wskaźniki niekorzystnego rokowania	15
1.6.2 Wyjściowe wskaźniki korzystnego rokowania	16
1.6.3 Niekorzystne czynniki związane z odpowiedzią na leczenie.....	17
1.6.4 Korzystne czynniki związane z odpowiedzią na leczenie.....	17
1.7 Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej	18
1.7.1 Leczenie wstępne (przedleczenie)	18
1.7.2 Indukcja remisji	18
1.7.3 Konsolidacja remisji	19
1.7.4 Terapia podtrzymująca	19

1.7.5 Ocena odpowiedzi na leczenie i monitorowanie choroby.....	20
1.8 Różnice w przebiegu ALL związane z wiekiem	22
Rozdział II	23
Rodzina genów <i>RUNX</i> i ich produktów białkowych	23
2.1 Charakterystyka ogólna rodziny genów i białek <i>RUNX</i>	23
2.2 Charakterystyka genu <i>RUNX1</i> i jego produktu białkowego	25
2.3 Charakterystyka genu <i>RUNX3</i> i jego produktu białkowego	29
2.4 Gen fuzyjny <i>RUNX1/RUNX1T1</i> oraz jego produkt białkowy	32
Rozdział III	34
Rodzina genów <i>CEBP</i> i ich produktów białkowych	34
3.1 Charakterystyka ogólna rodziny genów i białek C/EBP	34
3.2 Charakterystyka genu <i>CEBPA</i> i jego produktu białkowego	35
Rozdział IV	37
Założenia i cele pracy	37
Rozdział V	39
Materiały i metody	39
5.1 Materiał do badań	39
5.2 Badanie polimorfizmów wybranych genów	39
5.2.1 Izolowanie DNA	39
5.2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy dla badanych polimorfizmów	41
5.2.3 Trawienie enzymami restrykcyjnymi	43
5.2.4 Elektroforeza	45
5.3 Ocena ekspresji wybranych genów	49
5.3.1 Izolowanie RNA	49
5.3.2 Określenie czystości i stężenia preparatów RNA	51
5.3.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji	51

5.3.4 Ocena obecności ekspresji genów techniką PCR	53
5.3.5 Elektroforeza	55
5.3.6 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym	56
5.4 Badanie obecności ekspresji genu fuzyjnego <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	60
5.5 Analiza statystyczna	61
Rozdział VI	63
Wyniki.....	63
6.1 Charakterystyka grupy badanej	63
6.2 Ocena polimorfizmu rs2268277 oraz poziomu ekspresji genu <i>RUNX1</i>	65
6.2.1 Wyniki genotypowania rs2268277 G>C genu <i>RUNX1</i>	65
6.2.2 Analiza względnego poziomu ekspresji <i>RUNX1</i>	69
6.2.3 Analiza zależności między genotypem rs2268277 a względnym poziomem ekspresji <i>RUNX1</i>	77
6.3 Ocena polimorfizmu rs6672420 oraz poziomu ekspresji genu <i>RUNX3</i>	78
6.3.1 Wyniki genotypowania rs6672420 A>T genu <i>RUNX3</i>	78
6.3.2 Analiza względnego poziomu ekspresji <i>RUNX3</i>	84
6.2.3 Analiza zależności między genotypem rs6672420 a względnym poziomem ekspresji <i>RUNX3</i>	92
6.4 Ocena obecności mRNA genu <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	94
6.5 Analiza względnego poziomu ekspresji <i>CEBPA</i>	95
Rozdział VII	103
Dyskusja	103
Rozdział VIII	114
Wnioski.....	114
Rozdział IX	116
Streszczenie.....	116

Rozdział X	118
Summary	118
Rozdział XI	120
Piśmiennictwo	120
Rozdział XII	135
Spis tabel	135
Rozdział XIII	138
Spis rycin	138
Rozdział XIV	141
Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych	141
OŚWIADCZENIE	146

ROZDZIAŁ I

Informacje o jednostce chorobowej

1.1 Epidemiologia ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL)

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL – *ang. acute lymphoblastic leukemia*) dotyka najczęściej dzieci (przeważnie między 2. a 7. rż.), stanowi nawet 25% wszystkich rozpoznań nowotworów złośliwych i prawie 75% wszystkich białaczek u pacjentów poniżej 15. roku życia [Szczeklik, 2018; Grenda, 2018].

Wśród dorosłych choroba ta stanowi do 20% wszystkich białaczek, a szacowana całkowita częstość jej występowania w Europie wynosi 1,28 na 100 000 osób rocznie, ze znacznymi zmianami częstości związanymi z wiekiem (0,53 na wiek między 45-54 lata, ~1,0 na wiek między 55-74 lata i 1,45 na 75-99 lat) [Hoelzer i wsp., 2016].

1.2 Patogeneza ostrej białaczki limfoblastycznej

Patogeneza ALL obejmuje nieprawidłową proliferację i różnicowanie klonalnej populacji komórek limfoidalnych. Dokładne mechanizmy pozostają nieustalone. W badaniach na populacji pediatrycznej zidentyfikowano zespoły genetyczne predysponujące do wystąpienia ALL, takie jak: zespół Downa, niedokrwistość Fanconiego, zespół Blooma, ataksja teleangiektazja i zespół Nijmegen. Zespoły te wykazują mniejsze znaczenie wśród zachorowań na tę białaczkę wśród dorosłych. Inne czynniki predysponujące obejmują narażenie na mutageny: promieniowanie jonizujące, pestycydy, niektóre rozpuszczalniki lub wirusy, takie jak: wirus Epsteina-Barr i wirus ludzkiego niedoboru odporności (HIV). Jednak w większości przypadków jest to nowotwór powstały *de novo* u wcześniej zdrowych osób. Aberracje chromosomowe są cechą charakterystyczną ALL, ale same nie są wystarczające do wywołania białaczki [Terwiliger i wsp., 2017].

1.3 Klasyfikacja ostrej białaczki limfoblastycznej

Pierwszą próbą klasyfikacji ostrej białaczki limfoblastycznej były kryteria morfologiczne według grupy FAB (*ang. French-American-British group*), które dzieliły ALL na 3 podtypy (L1, L2, L3) w oparciu o wielkość komórek, zawartości cytoplazmy, obecność jąder, wakuolizację oraz zasadochłonność [Bennett i wsp., 1976]. Klasyfikacja wg FAB ma obecnie małe znaczenie praktyczne [Szczeklik, 2018].

W 1997 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO – *ang. World Health Organization*) zaproponowała kompleksową klasyfikację, która brała pod uwagę zarówno morfologię, jak i profil cytogenetyczny komórek białaczkowych. Początkowo wyodrębniono trzy podtypy ALL: białaczkę B-komórkową, białaczkę T-komórkową oraz białaczkę z komórek Burkitta [Harris i wsp., 1997]. W 2008 roku WHO zrewidowało swoją klasyfikację, usunięto białaczkę z komórek Burkitta, ponieważ zaprzestano postrzegać ją jako osobną jednostkę chorobową poza chłoniakiem Burkitta. Natomiast białaczka B-komórkowa została dalej podzielona na dwa podtypy: B-ALL z powtarzalnymi zmianami genetycznymi oraz B-ALL bez innej specyfikacji (*ang. NOS - not otherwise specified*) [Vardiman i wsp., 2009]. Dokładny podział zaprezentowano w Tabeli 1.1.

Wprowadzenie badań immunofenotypowych blastów, w oparciu o przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw antygenom CD, pozwoliło na szersze zróżnicowanie komórek białaczkowych i stworzenie klasyfikacji według EGIL (Europejskiej Grupy ds. Immunofenotypizacji Białaczek). Klasyfikacja immunofenotypowa ma zasadniczą wartość praktyczną i jest stale doskonała, podtypy immunofenotypowe ujęto szerzej w Tabeli 1.2 [Szczeklik, 2018].

Tabela 1.1 Klasyfikacja ostrych białaczek / chłoniaków limfoblastycznych wg WHO 2016r. [opracowano na podstawie: Szczeklik, 2018].

Klasyfikacja ostrych białaczek / chłoniaków limfoblastycznych wg wytycznych WHO z 2016 roku	
Ostra białaczka / chłoniak limfoblastyczny z linii B	nieokreślone
Ostre białaczki / chłoniaki limfoblastyczne z linii B	z powtarzalnymi zmianami genetycznymi: • z t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> • z t(v;11q23.3); z rearanżacjami <i>KMT2A</i> (MLL) • z t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i> • z hiperdiploidią • z hipodiploidią • z t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i> • z t(1;19)(q23;1332); <i>TCF3-PBX1</i> • podobna do <i>BCR-ABL1</i> (uwzględniona prowizorycznie) • z wewnątrzchromosomową amplifikacją chromosomu 21 (uwzględniona prowizorycznie)
Ostra białaczka / chłoniak limfoblastyczny z linii T	uwzględniona prowizorycznie
Ostra białaczka / chłoniak limfoblastyczny z wczesnych prekursorów komórek T	
Ostra białaczka / chłoniak limfoblastyczny z linii NK	uwzględniona prowizorycznie

*MLL – *mixed lineage leukemia*, białaczka o mieszanym fenotypie

Tabela 1.2 Podtypy immunofenotypowe w ostrej białaczce limfoblastycznej

[opracowano na podstawie: Szczeklik, 2018]

Podtyp ALL	Immunofenotyp	Częstość występowania
ALL z linii B		74%
• pre-pre B ALL	CD10 ⁻ , CD19 ⁺ , CD79a ⁺ , CD22 ⁺ , HLA-Dr ⁺ , TdT ⁺	11%
• common ALL	CD10 ⁺ , CD19 ⁺ , CD79a ⁺ , CD22 ⁺ , HLA-Dr ⁺ , TdT ⁺	50%
• pre-B ALL	CyIgM ⁺ , CD10 [±] , CD19 ⁺ , CD79a ⁺ , CD22 ⁺ , HLA-Dr ⁺ , TdT ⁺	9%
ALL z linii T		26%
• pro-T ALL	CD1a ⁻ , cyCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 ⁻ , CD34 [±] , CD4 ⁻ , CD8 ⁻	6%
• pre-T ALL	CD1a ⁻ , cyCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 [±] , CD34 [±] , CD4 ⁻ , CD8 ⁻	-
• tymocytowa ALL (korowa)	CD1a ⁺ , sCD3 [±] , CD7 ⁺ , CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , cyCD3 ⁺ , CD34 ⁻ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺	13%
• ALL z dojrzałych komórek T	CD1a ⁻ , sCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , cyCD3 ⁺ , CD34 ⁻ , CD4 ⁺ /CD8 ⁻ lub CD4 ⁻ /CD8 ⁺	7%

cy – ekspresja w cytoplazmie, s – ekspresja na powierzchni,

1.4 Rozpoznanie ostrej białaczki limfoblastycznej

Kompleksowe podejście diagnostyczne wymaga wielu specjalistycznych badań, w tym: ocenę morfologii komórek, immunofenotypowanie, ocenę zmian genetycznych/cytogenetycznych i badań molekularnych, zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 r. [Hoelzer i wsp., 2016]. Najważniejsze jest, aby wyniki badań pozwoliły na szybkie: zróznicowanie pochodzenia ALL – z linii B lub T, wykrycie obecności chromosomu Philadelphia, potwierdzenie podtypu Burkitta. Te informacje są niezbędne, aby wyznaczyć grupę ryzyka, w której znajdują się chorzy i zaplanować leczenie [Szczeklik, 2018].

Podstawą do rozpoznania jest wykrycie limfoblastów białaczkowych we krwi lub szpiku w odsetku przekraczającym 20-25%. W wyjątkowych przypadkach niezbędne jest badanie węzłów chłonnych (gdy przeważają cechy chłoniaka limfoblastycznego, a odsetek blastów w szpiku wynosi poniżej 20-25%) [Szczeklik, 2018].

1.4.1 Badania krwi obwodowej

Najbardziej przydatnym badaniem wstępnym jest ocena całkowitej liczby komórek krwi (CBC – *ang. complete blood count*) wraz z oceną rozmazu. Ponad 95% chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną wykazuje regresję przynajmniej jednego typu komórek, tj. neutropenię, trombocytopenię lub niedokrwistość. U większość dochodzi do cytopenii przynajmniej dwóch linii komórkowych, nierzadko zdarzają się także przypadki całkowitej pancytopenii (świadczącej o silnym wyparciu prawidłowych komórek ze szpiku przez blasty). W rozmazie krwi obwodowej można spotkać komórki blastyczne oraz erytrocyty w kształcie łez [Hay i wsp., 2011].

Ze względu na rozpad komórek, w badaniach biochemicznych obserwuje się podwyższony poziom kwasu moczowego i dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Aby monitorować ryzyko pojawienia się u chorych zespołu rozpadu nowotworu (TLS – *ang. tumour lysis syndrome*) regularnie oznacza się stężenie kwasu moczowego, dehydrogenazy wapniowej, fosforanowej i mleczanowej [Szczeklik, 2018; Terwiliger i wsp., 2017].

1.4.2 Badania szpiku

Podstawą postawienia rozpoznania choroby jest ocena preparatu szpiku kostnego, w rozmazie można zaobserwować homogenne nacieczenie limfoblastów przy jednoczesnym wyparciu elementów prawidłowych. Komórki blastyczne wykazują charakterystyczny wygląd, pozwalający zazwyczaj na odróżnienie tej białaczki od ostrej białaczki szpikowej (AML – *ang. acute myeloid leukemia*). Cechują się małym rozmiarem, ich średnicę można porównać do średnicy dwóch erytrocytów, mają skąpą zasadochłonną cytoplazmę, w której brak jest ziarnistości. Jądra limfoblastów mają zwartą budowę, zwykle nie posiadają jąderka lub występuje tylko jedno, dwa niewyraźne jąderka [Hay i wsp., 2011; Szczeklik, 2018].

1.4.3 Immunofenotypowanie

Standardową procedurą w diagnostyce ostrej białaczki limfoblastycznej jest immunofenotypowanie, przeprowadzane za pomocą wielokanałowej cytometrii przepływowej. Badanie to stanowi podstawę dla różnicowania ALL od innego typu białaczek, jest niezbędne do wyznaczenia podtypu immunofenotypowego choroby, który służy do wstępnej oceny rokowania, a także jako narzędzie do monitorowania choroby resztkowej (MRD – ang. *minimal residual disease*) w trakcie terapii [Szczeklik, 2018; Chiaretti i wsp., 2014]. Charakterystyczne dla ALL antygeny przedstawiono w Tabeli 1.2 (Podrozdział 1.3). Aby móc wykazać pozytywną reakcję komórek blastycznych na dane przeciwciało monoklonalne, grupa EGIL zaleca aby co najmniej 20% komórek wykazywało obecność danego markera. Wyjątkiem jest: MPO (mieloperoksydaza), CD3, CD79a i TdT, które są uważane za dodatnie przy 10% reakcji pozytywnych [Chiaretti i wsp., 2014]. Do ustalenia podtypu wymagana jest obecność co najmniej dwóch antygenów specyficznych liniowo w cytoplazmie lub błonie komórkowej. Dla ALL z komórek B kluczowe jest stwierdzenie obecności markerów CD19 i CD20, które potencjalnie wskazują na możliwość wykorzystania immunoterapii, natomiast w T-ALL wykrycie obecności antygenu CD1a, który wskazuje na postać korową, w odróżnieniu od innych postaci CD1a ujemnych, które rokują gorzej [Szczeklik, 2018].

1.4.4 Badania cytogenetyczne i molekularne

Badanie cytogenetyczne stanowią ważny etap w diagnostyce ALL. Z dużym powodzeniem stosowana jest tutaj technika fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH – ang. *fluorescence in situ hybridization*), która umożliwia wykrycie oraz wizualizację praktycznie wszystkich nieprawidłowości chromosomowych w ostrej białaczce limfoblastycznej, z czułością dochodzącą do 99%. Zmiany kariotypowe u chorych na ALL obejmują zarówno zmiany liczbowe, jak i strukturalne chromosomów (translokacje, inwersje, delecje). Niektóre z nich, określane jako powtarzalne zmiany genetyczne, są ściśle związane z klasyfikacją WHO (Tabela 1.1, podrozdział 1.3) i mogą korelować z cechami klinicznymi i stanowić podstawę wstępnej oceny rokowania. Badania molekularne, w tym reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

(RT-qPCR – *ang. real-time quantitative polymerase chain reaction*), są niezbędne do oceny poziomu choroby resztkowej oraz zmian genetycznych niewykrywalnych metodą FISH [Szczeklik, 2018; Chiaretti i wsp., 2014].

1.4.5 Badania obrazowe

Badanie rentgenowskie klatki piersiowej może ukazać powiększenie górnego śródpiersia, spowodowane powiększeniem grasicy i/lub węzłów chłonnych. Zjawisko to jest najczęściej spotykane w białaczce wywodzącej się z linii T, pojawia się u około połowy pacjentów. W obrębie jamy brzusznej badanie ultrasonograficzne jest pomocne w wykryciu powiększenia nerek, spowodowanego naciekaniem przez limfoblasty lub w wyniku nefropatii moczanowej. USG pozwala także na określenie wielkości śledziony i węzłów chłonnych, znajdujących się w obrębie jamy brzusznej [Szczeklik, 2018; Hay i wsp., 2011].

1.4.6 Nakłucie lędźwiowe

Wykonywane w przypadku podejrzenia zajęcia ośrodkowego układu nerwowego, w badaniach płynu mózgowo-rdzeniowego stwierdza się wysoką cytozę, a badanie cytologiczne wskazuje na obecność komórek blastycznych [Szczeklik, 2018].

1.5 Obraz kliniczny ostrej białaczki limfoblastycznej

Większość objawów klinicznych ALL jest odzwierciedleniem gromadzenia się złośliwych, słabo zróżnicowanych komórek limfoidalnych w szpiku kostnym, krwi obwodowej i miejscach pozaszpikowych. Mało charakterystyczne objawy przedmiotowe pojawiają się od 2 do 6 tygodni przed ustaleniem rozpoznania [Terwilliger i wsp., 2017; Szczeklik, 2018; Grenda i wsp., 2018]. Przyczynami zgłoszenia się do lekarza są głównie:

- Ogólne osłabienie
- Brak łaknienia
- Bładość powłok skórnych

- Podatność na infekcje
- Gorączka
- Zmiany zapalne w obrębie gardła/jamy nosowej

Za obraz kliniczny w głównej mierze odpowiedzialne jest upośledzenie prawidłowej funkcji szpiku, które prowadzi do niedokrwistości (odpowiedzialnej za osłabienie, brak łaknienia, bladość), neutropenii (odpowiedzialnej za wysoką temperaturę ciała oraz skłonność do zakażeń). Często dochodzi także do małopłytkowości, która jest manifestowana przez łatwe siniaczenie, wybroczyny i/lub krwotoki. U 50% pacjentów występuje limfadenopatia z zajęciem węzłów obwodowych i śródpiersiowych (najczęściej w podtypie T), hepato- i splenomegalia. Około 25% chorych zgłasza bóle kostno-stawowe, które wynikają z nacieku blastów [Szczeklik, 2018; Grenda i wsp., 2018].

1.6 Czynniki prognostyczne ostrej białaczki limfoblastycznej

1.6.1 Wyjściowe wskaźniki niekorzystnego rokowania

Wyjściowe wskaźniki niekorzystnego rokowania uwzględniają cechy kliniczne pacjenta, masę komórek białaczkowych oraz biologiczną charakterystykę choroby. Według kryteriów Europejskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (ESMO – ang. *European Society for Medical Oncology*) z 2016 roku, są to:

- Wiek pacjenta – ryzyko wzrasta wraz z wiekiem, można wyróżnić przedziały 40-55 lat, 55-65 lat, powyżej 65. roku życia
- Stan sprawności ogólnej >1 według skali ECOG (ang. *Eastern Cooperative Oncology Group*; sześciostopniowa skala sprawności, pozwalająca na ocenę stanu ogólnego i jakość życia pacjentów z chorobą nowotworową; 0 – pełna sprawność, 5 - zgon)
- Liczba leukocytów przy rozpoznaniu: powyżej 30 000/ μ l w podtypie B-ALL oraz powyżej 100 000/ μ l w podtypie T-ALL

- Wynik immunofenotypowania wskazujący na pro-B oraz T-ALL z wczesnych (pro-T, pre-T) i dojrzałych komórek T
- Zmiany cytogenetyczne obejmujące: translokacje t(4;11), t(1;19), hipodiploidia, obecność chromosomu Philadelphia, delecje del(17p), -7, a także złożone zmiany w kariotypie (>5)
- Zmiany molekularne, obejmujące w B-ALL: delecje genu *IKZF1*, nadekspresja *CRLF2*, mutacje *JAK2*, *EPOR*, *ABL1/2*, *PDGFRB*, rearanżacje *KMT2A*
- Zmiany molekularne, obejmujące w T-ALL: niezmutowany gen *NOTCH1*, występowanie mutacji typowych dla nowotworów z linii mieloidalnych, tj. *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *DNMT3A*, *IDH 1/2* [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]

1.6.2 Wyjściowe wskaźniki korzystnego rokowania

Wśród wyjściowych czynników wskazujących na korzystne rokowanie pacjentów z ALL wymienić można:

- Wiek: poniżej 35 roku życia
- Leukocytoza przy rozpoznaniu: poniżej 30 000/ μ l
- Wynik badania immunologicznego wskazujący na podtyp ALL common, pre-B ALL, korowy T-ALL
- Pełna sprawność (wynik 0 według skali ECOG)
- Zmiany cytogenetyczne: brak chromosomu Ph; trisomia chromosomów 4, 10 i 17; del (9p) [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016; Krawczyk-Kuliś i wsp., 2011]

1.6.3 Niekorzystne czynniki związane z odpowiedzią na leczenie

Niekorzystnymi wskaźnikami związanymi z odpowiedzią na leczenie, które mają największy wpływ na praktyczną ocenę rokowania, są:

- Niska wrażliwość komórek białaczkowych na glikokortykosteroidy (GKS), określana jako obecność we krwi obwodowej powyżej 1000 blastów na μl po fazie przedleczenia
- Po 8-15 dniach leczenia indukcyjnego wykrycie powyżej 5% blastów w mielogramie
- Uzyskanie całkowitej remisji (CR *ang. complete remission*) po więcej niż jednym cyklu indukcji
- Utrzymywanie się choroby resztkowej (MRD) na poziomie powyżej 10^{-3} po fazie indukcji remisji oraz powyżej 10^{-4} po fazie leczenia konsolidacyjnego [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]

1.6.4 Korzystne czynniki związane z odpowiedzią na leczenie

Wśród korzystnych wskaźników odpowiedzi na leczenie, które najbardziej wpływają na ocenę rokowania pacjenta możemy wyróżnić

- Wysoka wrażliwość komórek białaczkowych na glikokortykosteroidy, tj. spadek ich liczby poniżej 1000/ μl po fazie przedleczenia
- Odsetek blastów w mielogramie $< 5\%$ w trakcie fazy indukcji
- Uzyskanie całkowitej remisji po jednym cyklu indukcyjnym
- Brak wykrywania MRD po leczeniu indukcyjnym, w trakcie i po konsolidacji (przy poziomie czułości 10^{-3} – 10^{-4}) [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]

1.7 Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej

Leczenie składa się z czterech faz:

- Leczenie wstępne
- Indukcja remisji
- Konsolidacja
- Leczenie podtrzymujące remisję

1.7.1 Leczenie wstępne (przedleczenie)

Głównym celem leczenia wstępnego jest bezpieczne zredukowanie masy nowotworu, zmniejszając tym samym ryzyko pojawienia się u chorych zespołu rozpadu nowotworu (TLS). W zależności od wieku chorego podaje się glikokortykosteroidy:

- Prednizon w dawce 40-60 mg/m²/d doustnie przez 7 dni u osób poniżej 55. roku życia
- Deksametazon w dawce 10 mg/m²/d doustnie przez 5 dni u osób powyżej 55. roku życia

W przypadku braku efektywności lub spadku leukocytozy poniżej 1000 na μ l przedleczenie kończy się po upływie trzech dni [Szczeklik, 2018]. Podczas leczenia wstępnego uzupełnia się diagnostykę pacjenta o badania cytogenetyczne i molekularne, sprawdza dostępność dawcy szpiku, ustala się wrażliwość komórek białaczkowych na leczenie samymi GKS. Równocześnie z prowadzeniem fazy przedleczenia należy przeciwdziałać powikłaniom infekcyjnym i krwotocznym występującymi u pacjentów [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016].

1.7.2 Indukcja remisji

Indukcja remisji trwa zwykle 4 tygodnie i jest oparta na połączeniu czterech leków: winkrystyny, daunorubicyny (lub innej antracykliny: doksorubicyny, rubidazonu, idarubicyny), glikokortykosteroidów (prednizonu lub deksametazonu), asparaginazy lub pegaspargazy [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]. Jej celem jest wyeliminowanie

ponad 99% początkowej masy komórek białaczkowych (całkowita remisja) oraz przywrócenie prawidłowej hematopoezy [Pui i wsp., 2008]. U chorych, u których został wykryty chromosom Philadelphia (Ph+), od początku trwania terapii stosuje się inhibitory kinaz tyrozynowych (TKI, imatynib lub nowszy) przy jednoczesnym ograniczeniu liczby i dawek cytostatyków. W tej fazie konieczne jest włączenie leczenia wspomagającego, mającego na celu przeciwdziałanie objawom immunosupresji, wywołanej w równej mierze przez samą chorobę, jak i przez działanie leków [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]. Stan remisji ocenia się na podstawie wyniku mielogramu, funkcjonowania hematopoezy oraz poziomu minimalnej choroby resztkowej (MRD) określanej przy pomocy cytometrii przepływowej lub RQ-PCR (docelowo poniżej 10^{-3}) [Szczeklik, 2018].

1.7.3 Konsolidacja remisji

Konsolidacja remisji jest prowadzona u chorych, którzy uzyskali stan całkowitej remisji, w celu wyeliminowania minimalnej choroby resztkowej. Przetrwałe komórki białaczkowe mogą wykazywać się opornością na leczenie, bądź znajdować się w trudno dostępnych miejscach. Zaprzeszanie terapii po uzyskaniu CR wiąże się z dużym ryzykiem nawrotu choroby, stąd konieczne jest prowadzenie dalszego leczenia, poprzez sekwencyjne podawanie przez 6-8 miesięcy średnich lub wysokich dawek leków przeciwnowotworowych. Niezalecane jest zmniejszanie dawek i/lub skracanie czasu trwania terapii, nawet wśród starszych pacjentów z chorobami towarzyszącymi, gdyż wiąże się to z gorszym rokowaniem. W razie potrzeby leczenie przeprowadzane jest w pomieszczeniach izolowanych wraz z terapią wspomagającą, zamiast ograniczania czasu trwania i dawek chemioterapeutyków. U pacjentów Ph+ nadal kluczową rolę w tej fazie terapii stanowi podawanie TKI [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016].

1.7.4 Terapia podtrzymująca

Leczenie pokonsolidacyjne zwykle składa się z codziennego stosowania 6-merkaptopuryny i cotygodniowo metotreksatu. W niektórych schematach leczenia podaje się w powtarzanych cyklach winkrystynę, deksametazon lub inne leki

w odstępach miesięcznych lub dłuższych. Optymalny i zalecany czas trwania tej fazy to 2,5-3 lata [Hoelzer i wsp., 2016]. Szczegółowe zalecenia obejmują:

- Podawanie merkaptopuryny i metoktreksatu wśród chorych z grupy standardowego ryzyka z ciągłym monitorowaniem choroby resztkowej. Ta opcja jest również stosowana u pacjentów z grupy dużego ryzyka, u których przeszczepienie komórek krwiotwórczych (HCT – *ang. hematopoietic cell transplantation*) jest niemożliwe w wyniku złego stanu zdrowia i/lub chorób współistniejących [Szczeklik, 2018].
- Przeprowadzenie allogenicznego HCT (allo-HCT) od zgodnego w zakresie HLA rodzeństwa, dawcy niespokrewnionego lub haploidentycznego. Opcja ta jest zalecana w przypadku chorych na ALL z grupy zwiększonego ryzyka, która obejmuje prawie 80% wszystkich przypadków tej białaczki wśród dorosłych [Szczeklik, 2018].
- Dalsze podawanie inhibitorów kinazy tyrozynowej (w tym: imatynib, dazatynib) wśród chorych z chromosomem Philadelphia. Zaleca się także monitorowanie ilości genu fuzyjnego *BCR-ABL1* oraz, jeśli to możliwe, allogeniczny przeszczep komórek krwiotwórczych [Szczeklik, 2018].

1.7.5 Ocena odpowiedzi na leczenie i monitorowanie choroby

Klasyczne kryteria remisji nie są wystarczające, aby dokładnie ocenić odpowiedź pacjenta z ALL na zastosowane leczenie. Aby jak najpełniej odzwierciedlić stan choroby, ocena leczenia musi być oparta o parametr MRD, oceniany po indukcji, po konsolidacji i w późniejszych etapach. Oznaczenia prowadzi się przy pomocy techniki cytometrii przepływowej, bądź metodą PCR (czułość odpowiednio 10^{-3} - 10^{-4} oraz do 10^{-5}). Badania te mają bezpośredni wpływ na decyzje terapeutyczne i powinny być wykonywane w certyfikowanych laboratoriach [Szczeklik, 2018].

O dobrym efekcie leczenia po pierwszym cyklu indukcyjnym mówimy, gdy minimalna choroba resztkowa w szpiku osiąga wartości poniżej 10^{-3} , natomiast po konsolidacji poniżej 10^{-4} [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016].

W czasie trwania i po leczeniu możemy wyróżnić następujące parametry odpowiedzi na terapię, z uwzględnieniem minimalnej choroby resztkowej:

- Kompletna remisja hematologiczna (CR) – komórki białaczkowe niewykrywalne za pomocą mikroskopii świetlnej we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, w szpiku odsetek blastów powinien wynosić poniżej 5% [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]
- Całkowita molekularna remisja (MoCR) – występuje w przypadku, gdy u pacjenta znajdującego się w CR minimalna choroba resztkowa jest niewykrywalna metodami molekularnymi o czułości powyżej 10^{-4} [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]
- Molekularna remisja (MoR) – stan pomiędzy CR a MoCR; pacjent znajduje się w całkowitej remisji, a poziom MRD jest niski, niepodlegający ocenie ilościowej (liczba komórek poniżej 10^{-4} , tj. mniej niż 1 komórka białaczkowa na 10 000) oznaczany przy pomocy wieloparametrowej cytometrii przepływowej (czułość rzędu 10^{-3} – 10^{-4}) [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]
- Niepowodzenie molekularne (MoFail) – wykrywalny poziom MRD; pacjent znajduje się w całkowitej remisji, ale nie osiąga statusu MoCR/MoR, oznaczalny poziom MRD (liczba komórek powyżej 10^{-4} , czyli 0,01%, tj. więcej niż 1 komórka białaczkowa na 10 000) przy pomocy wieloparametrowej cytometrii przepływowej (czułość rzędu 10^{-3} – 10^{-4}) [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]
- Wznowa molekularna (MoRel) – utrata statusu MoR lub MoCR; pacjent dalej znajduje się w CR, ale obserwuje się wznowę w postaci wykrywalnego poziomu MRD (liczba komórek powyżej 10^{-4} , tj. więcej niż 1 komórka białaczkowa na 10 000) oznaczany przy pomocy wieloparametrowej cytometrii przepływowej (czułość rzędu 10^{-3} – 10^{-4}) [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]
- Wznowa hematologiczna lub pozaszpikowa – utrata statusu całkowitej remisji; odsetek komórek blastycznych powyżej 5% w szpiku kostnym,

lub wznowa pozaszpikowa (ośrodkowy układ nerwowy, inne) [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016]

Osiągnięcie stanu całkowitej molekularnej remisji (MoCR), bądź molekularnej remisji (MoLR) jest najbardziej istotnym niezależnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia wolnego od choroby i całkowitego przeżycia pacjentów [Hoelzer i wsp., 2016; Hołowiecki i wsp., 2008; Patel i wsp., 2010; Beldjord i wsp. 2014; Brüggemann i wsp. 2006].

Podczas trwającego leczenia u pacjentów regularnie monitoruje się morfologię krwi oraz szpiku, stan odporności organizmu (stężenie immunoglobulin), parametry układu krążenia, bada się także funkcje wątroby, nerek i płuc [Szczeklik, 2018]. W związku z częstym zajęciem ośrodkowego układu nerwowego przez chorobę, wykonuje się okresowe badania neurologiczne oraz ocenę płynu mózgowo-rdzeniowego. Po zakończeniu terapii pokonsolidacyjnej zalecane jest badanie szpiku w odstępach czasowych 3-6 miesięcy przez kolejne 2 lata [Szczeklik, 2018; Hoelzer i wsp., 2016].

1.8 Różnice w przebiegu ALL związane z wiekiem

Do 95% dzieci chorujących na ALL uzyskuje remisję choroby w trakcie indukcji leczenia, z tego około 75-80% nigdy nie ma nawrotu i można je uznać za całkowicie wyleczone [Schultz i wsp., 2007]. Wśród dorosłych wskaźniki nie są tak zadowalające, co prawda około 85% chorych uzyskuje pierwszą remisję, jednak szacuje się, że nawet połowa z nich będzie miała wczesny nawrót białaczki. Zaobserwowano także różnice w odpowiedziach na zastosowane leczenie w zależności od wieku pacjenta. Stąd potrzeba wyodrębnienia grup wiekowych i dostosowania indywidualnego schematu leczenia, które pozwoli starszym pacjentom na osiągnięcie lepszych rezultatów i skuteczności terapii [Hoelzer i wsp., 2016].

ROZDZIAŁ II

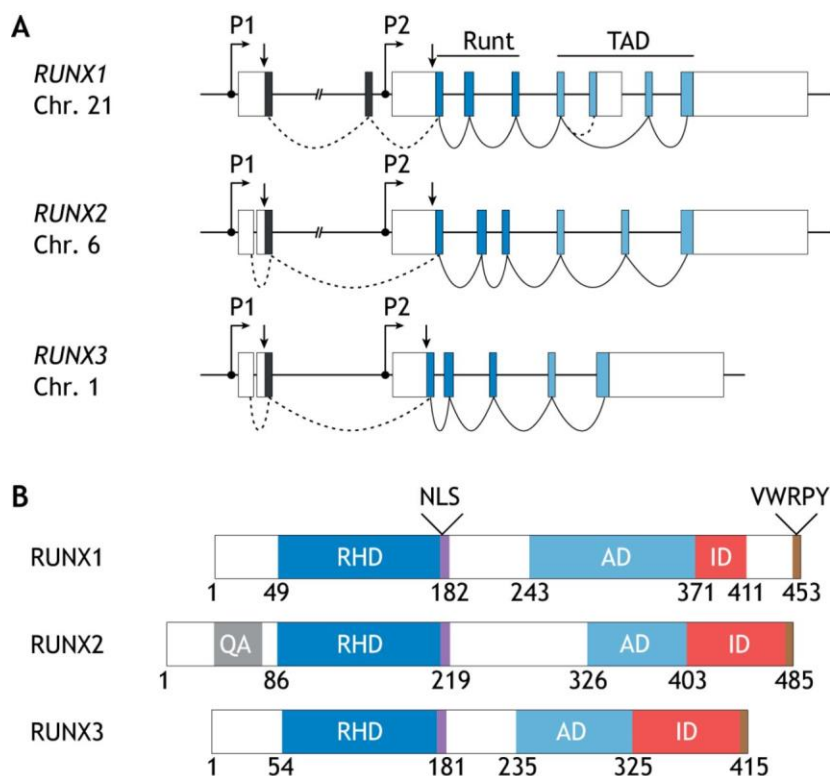
Rodzina genów RUNX i ich produktów białkowych

2.1 Charakterystyka ogólna rodziny genów i białek RUNX

Rodzina genów RUNX (*ang. Runt Related Transcription Factor*) jest reprezentowana przez trzech członków (RUNX1, RUNX2 oraz RUNX3), kodujących czynniki transkrypcyjne (TF, *ang. Transcription factors*). Posiadają one podobną strukturę genomową, ich wspólną cechą jest wysoce konserwatywny region zwany domeną Runt (RHD, *ang. Runt Homology Domain*). Geny RUNX posiadają dwie różne sekwencje promotorowe, tj. P1 (promotor dystalny) i P2 (promotor proksymalny), co w rezultacie doprowadza do powstania dwóch głównych splicewariantów z odrębnymi sekwencjami 5'-UTR (Rycina 2.1 A) [Levanon i wsp., 2004; Mevel i wsp., 2019].

Produkty białkowe genów RUNX mają średnią wielkość 50 KDa i zawierają kilka konserwatywnych regionów. Na N-końcu znajduje się wysoce konserwatywna domena Runt, która jest wspólna dla wszystkich członków rodziny RUNX o stopniu homologii bliskim 90%. Białka RUNX wiążą się przez ich domeny Runt do konserwatywnej sekwencji nukleotydowej (R/TACCRCA). Oprócz domeny Runt, niezbędnej do zdolności wiązania białko-DNA, czynniki RUNX mają inne wspólne cechy. Wszystkie mają dużą C-kończową domenę transaktywacyjną i C-kończową domenę hamującą (ID – *ang. inhibitory domain*), która obniża aktywność białka [Mevel i wsp., 2019; van der Kouwe i wsp., 2019]. Inne domeny, zlokalizowane w regionie C-kończowym, dodatkowo przyczyniają się do zdolności regulacyjnych rodziny RUNX: sekwencja NMTS (*ang. nuclear matrix-targeting signal*), wymagana do jądrowego namierzania sygnału aktywowanych białek RUNX [Zaidi i wsp. 2001], sekwencja VWRPY (walina-tryptofan-arginina-prolina-tyrozyna), która wiąże się z ko-represorem Groucho/TLE [Imai i wsp., 1998] i sekwencja PY, motyw bogaty w prolinę wymagany do interakcji białkowych (Rycina 2.1 B) [Terry i wsp., 2004]. Podczas procesu transkrypcji wiązanie DNA najczęściej następuje razem z heterodimerskim partnerem CBF-β (CBF-beta *ang. Core-Binding Factor Subunit Beta*). CBF zwiększa powinowactwo członków RUNX do

DNA oraz stabilizuje cały kompleks [van der Kouwe i wsp., 2019; Otálora-Otálora i wsp., 2019].



Rycina 2.1 Struktura genów z rodziny *RUNX* i ich produktów białkowych. (A) Struktury genowe. (B) Struktury i domeny białkowe [Mevell i wsp., 2019].

Czynniki transkrypcyjne RUNX odpowiadają za regulację cyklu komórkowego, globalną kontrolę syntezy białek oraz genetyczną i epigenetyczną regulację docelowych genów (mogą zarówno wzmacniać, jak i zmniejszać ich transkrypcję) oraz są zaangażowane w różnicowanie komórek macierzystych i ich dalszą specyfikację. Oprócz regulacji wzrostu i proliferacji komórek czynniki RUNX mogą wpływać także na rozwój nowotworów poprzez kontrolę procesów apoptozy i starzenia. W szczególności poprzez indukcję białek proapoptotycznych, takich jak BAX i BIM [Eliseev i wsp., 2008] lub hamowanie śmierci komórek indukowanej przez MYC lub zależnej od p53 [Blyth i wsp., 2006; Ozaki i wsp., 2013; Otálora-Otálora i wsp., 2019].

Geny z rodziny *RUNX* są zaangażowane w różne procesy chorobowe, w tym także w nowotworzenie. Interesujące jest to, że poszczególne geny *RUNX* wykazują

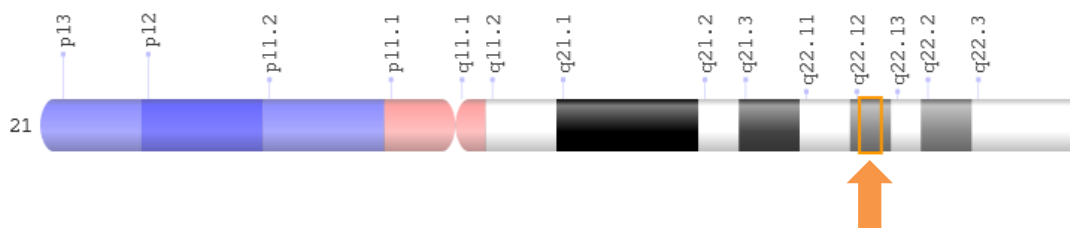
przeciwstawne działanie, w zależności od typu nowotworu potrafią wykazywać cechy onkogenne jak i supresorowe [Otálora-Otálora i wsp., 2019].

2.2 Charakterystyka genu *RUNX1* i jego produktu białkowego

Gen *RUNX1* został odkryty w 1991 roku u pacjenta z ostrą białaczką szpikową z translokacją t(8;21). Zespół badaczy zlokalizował punkty przerwania w dotychczas nieznanym genie, początkowo został on nazwany *AML1* (ang. *Acute Myeloid Leukemia 1 gene*) [Miyoshi i wsp., 1991]. Sklonowany gen nie odpowiadał pełnej długości *RUNX1*, był jednym z jego krótszych splicewariantów [Mikhail i wsp., 2006]. Równolegle gen ten został scharakteryzowany przez inne grupy naukowców, nadano mu nazwy *CBFa2* (ang. *Core-Binding Factor Subunit Alpha-2*) oraz *PEBP2aB* (ang. *Polyomavirus Enhancer-Binding Protein 2 Alpha B Subunit*) [Wang i wsp., 1993; Bae i wsp., 1993; Ogawa i wsp., 1993]. Nazwa została ujednolicona po ustaleniu, że gen ten jest ssaczym homologiem genu *runt* *Drosophili*, który został scharakteryzowany w latach 80 XX wieku przez Petera Gergena [Gergen i wsp., 1985; Gergen i wsp., 1988]. Od tej pory dla ludzkiego genu przyjęto nazwę *RUNX1*, która jest stosowana do dzisiaj [van Wijnen i wsp., 2004].

Gen *RUNX1* posiada długość ~260 kb, znajduje się na długim ramieniu chromosomu 21 (locus q22.12, Rycina 2.2), posiada 12 egzonów [Levanon i wsp., 2001]. Ekspresja tego genu jest regulowana poprzez dwa regiony promotorowe, dystalny (P1) i proksymalny (P2), oddalone od siebie o 160 kb. Z tego względu do tej pory scharakteryzowano 12 różnych wersji cDNA, będących wynikiem alternatywnego splicingu. Trzy splicewarianty wykazują największe znaczenie: *RUNX1a*, *RUNX1b* oraz *RUNX1c* [van der Kouwe i wsp., 2019]. Wszystkie z nich zawierają w regionie N-końcowym domenę Runt. Forma a, która koduje białko składające się z 250 aminokwasów, i b, kodująca izoformę składającą się z 453 aminokwasów, powstają w wyniku alternatywnego splicingu i są transkrybowane z promotora proksymalnego, posiadają identyczny fragment N-końcowy. *RUNX1a* jest najkrótszą formą, ponieważ nie posiada domen regulatorowych w regionie C-końcowym. Najdłuższym wariantem jest *RUNX1c*, koduje białko składające się z 480 aminokwasów, w przeciwieństwie do dwóch poprzednich form, jego transkrypcja rozpoczyna się od promotora dystalnego.

RUNX1b i *RUNX1c* charakteryzują się tym samym regionem C-końcowym [Levanon i wsp., 2001; Lam i wsp., 2012; Mikhail i wsp., 2006; van der Kouwe i wsp., 2019]. Analizy wykonane za pomocą techniki Northern Blot wykazały ekspresję genu *RUNX1* w niemalże wszystkich tkankach, za wyjątkiem serca i mózgu [Miyoshi i wsp., 1995].



Rycina 2.2 Lokalizacja chromosomowa genu *RUNX1* [opracowanie własne na podstawie narzędzia <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>]

Prawidłowa funkcja genu *RUNX1* obejmuje m.in. kontrolę procesu hematopoezy w rozwoju zarodkowym. Gen ten bierze udział w powstawaniu oraz dojrzewaniu krwiotwórczych komórek progenitorowych oraz komórek macierzystych. Zdolność do modulacji komórek krwiotwórczych nabywa poprzez wiązanie się z receptorem trombopoetyny (TPO) oraz promotorem c-Mpl. Proces ten prowadzi do zainicjowania transkrypcji i powstawania hematopoetycznych komórek macierzystych ze śródbłónka [Tracey i wsp., 2000]. U dorosłych *RUNX1* odgrywa rolę w dojrzewaniu limfocytów i megakariocytów [Otálora-Otálora i wsp., 2019].

Poprzez interakcje z wieloma białkami za pomocą domen, *RUNX1* kontroluje ekspresję innych genów zaangażowanych w różnicowanie hematopoetyczne, biogenezę rybosomów, regulację cyklu komórkowego oraz szlaki sygnalizacji czynnika wzrostu β (TGF β) [Sood i wsp., 2017; Otálora-Otálora i wsp., 2019].

Białko *RUNX1* jest białkiem jądrowym z dwiema dużymi domenami funkcjonalnymi, charakterystycznymi dla całej rodziny, tj. proksymalnie położonym regionem wiążącym DNA, znanym jako domena homologii Runt, kodowanym przez

część egzonu 3, egzon 4 i 5 oraz dystalnie położoną domenę transaktywacyjną (TD – ang. *transactivation domain*), kodowaną przez egzony 7B i 8 [Miyoshi i wsp., 1995]. Tak jak u wszystkich członków rodziny, domena Runt białka *RUNX1* składa się ze 128 aminokwasów i znajduje się w regionie N-końcowym, pośredniczy w wiązaniu z DNA poprzez interakcję z partnerem heterodimeryzacji, czynnikiem CBF- β , który sam nie wykazuje takiej zdolności. Heterodimeryzacja *RUNX1* i CBF- β zwiększa powinowactwo wiązania DNA. Badania struktury krystalicznej tego kompleksu wykazały, że CBF- β oddziałuje allosterycznie z *RUNX1* w celu stabilizacji zdolności wiązania DNA oraz że mutacje w *RUNX1* związane z chorobami występują w obrębie domeny wiążącej DNA [Lam i wsp., 2012].

Oprócz tego, białko *RUNX1* zawiera sekwencję NMTS, 31-aminokwasowy region w rejonie C-końcowym, który pomaga w aktywacji transkrypcji. W regionie C-końcowym znajduje się również motyw aminokwasowy VWRPY (walina-tryptofan-arginina-prolina-tyrozyna), region pośredniczący w represji transkrypcji zależnej od ko-represora Groucho/TLE. Motywy NMTS i VWRPY odgrywają rolę w pośredniczeniu w rozwoju komórek T [Lam i wsp., 2012; Otálora-Otálora i wsp., 2019]. Oprócz dimeryzacji z partnerem CBF- β , *RUNX1* jest bardzo wszechstronny w interakcji z różnymi innymi czynnikami transkrypcyjnymi i współregulatorami transkrypcji [Lam i wsp., 2012].

Czynnik transkrypcyjny *RUNX1* jest uważany za regulatora epigenetycznego, który na skutek mutacji może powodować związane z nowotworzeniem aberracje epigenetyczne. Mutacje są także wykrywane w różnych nowotworach: mutacje z utratą funkcji w ostrej białaczce limfoblastycznej z limfocytów T sugerują rolę *RUNX1* jako supresora w transformacji komórek T; mutacje somatyczne wykryto ponadto w raku piersi [Ito i wsp., 2015; Mevel i wsp., 2019]. Ekspresja *RUNX1* jest zmniejszona w guzach litych podatnych na przerzuty, co wskazuje na jego rolę w powstrzymywaniu postępowania nowotworów [Ito i wsp., 2015; Mevel i wsp., 2019].

Jednak zwiększona ekspresja *RUNX1* może być również onkogenna: amplifikacja regionu chromosomu 21q, który zawiera gen *RUNX1* (na przykład w trisomii chromosomu 21 w zespole Downa) zaobserwowano w ALL z prekursorów linii B oraz

AML; wysokie poziomy ekspresji *RUNX1* wykryto również w różnych nowotworach nabłonkowych (m.in. rak skóry, rak endometrioidalny) [Ito i wsp., 2015].

Jednymi z kluczowych czynników wpływających na zmianę (wzrost/obniżenie) w poziomie ekspresji genów, a w konsekwencji mogących przełożyć się na ilość powstającego białka, są mutacje oraz polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphisms*). Kiedy SNP występują w obrębie genu lub w regionie regulacyjnym w pobliżu genu, mogą odgrywać bardziej bezpośrednią rolę w powstawaniu chorób, wpływając na samą jego funkcję [Shastry, 2009].

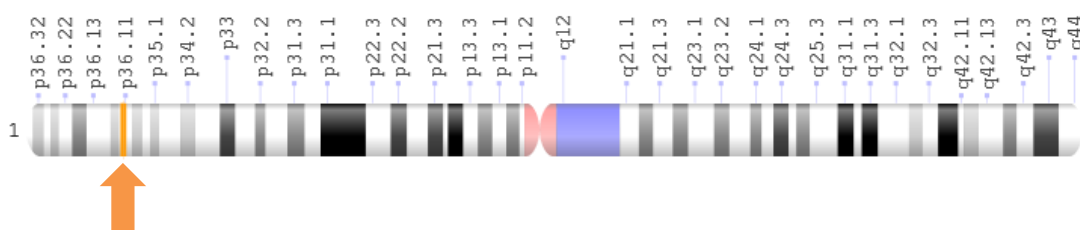
Gen *RUNX1* jest wysoce polimorficzny, do tej pory opisano ponad 100 zmian potencjalnie związanych z chorobotwórczością. Polimorfizmy tego genu były wcześniej badane w szeregu chorób nowotworowych, m.in. w raku jelita grubego, gdzie warianty CT/TT rs7279123 C>T były związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju tego nowotworu [Slattery i wsp., 2011]. Także badania w raku prostaty wykazały związek między występowaniem zmutowanego allele T i genotypu TT rs2253319 z wyższym zaawansowaniem klinicznym nowotworu i kilkukrotnie wyższym ryzykiem wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych [Huang i wsp., 2011]. Dwa polimorfizmy genu *RUNX1* (rs8130963 A>G, rs17227210 C>T) są także związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka piersi, zarówno heterozygoty AG i CT jak i homozygoty zmutowane GG i TT były obserwowane częściej w grupie chorych na raka piersi w porównaniu do grupy kontrolnej [Marouf i wsp., 2016]. Dane te sugerują, że występowanie wariantów polimorficznych tego genu może być czynnikiem związanym ze zwiększoną zapadalnością na choroby nowotworowe.

Jednym z takich czynników wydaje się być polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1*, znajduje się on w regionie niekodującym, powoduje zamianę guaniny na cytozynę w pozycji 34809752. Jest to mutacja cicha synonimiczna, która nie wpływa na zmianę w kodowanym aminokwasie. Dane dostępne w piśmiennictwie opisują wpływ takich mutacji na szybkość formowania mRNA oraz na jego okres półtrwania, co w konsekwencji może przyczynić się do zmiany w ilości lub konformacji powstającego białka oraz zmienić jego działanie docelowe, zaburzając prawidłowe funkcje [Shastry, 2009]. W przypadku takich zmian w genach kodujących czynniki transkrypcyjne, jakim

jest *RUNX1*, może się to przełożyć na deregulację także wszystkich docelowych genów, na które wywiera działanie. Co w wyniku może doprowadzić do akumulacji nieprawidłowych sygnałów i zaburzyć proces prawidłowego dojrzewania komórek macierzystych, a w konsekwencji potencjalnie przyczynić się do promowania proliferacji niedojrzałych komórek krwiotwórczych i doprowadzić do rozwoju białaczek, w tym także ostrej białaczki limfoblastycznej [Mevel i wsp., 2019; Otálora-Otálora i wsp., 2019]. Polimorfizm ten był wcześniej badany wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) [Wesoly i wsp., 2005, Tokuhiro i wsp., 2003] i toczeniem rumieniowatym układowym [Orozco i wsp., 2006], nie znaleziono doniesień w piśmiennictwie odnośnie jego związku z chorobami hematologicznymi.

2.3 Charakterystyka genu *RUNX3* i jego produktu białkowego

Gen *RUNX3*, znajdujący się na chromosomie 1p36.11 (Rycina 2.3), jest najmniejszy spośród rodziny, obejmuje długość 67 kb i zawiera sześć egzonów. Gen ten posiada wszystkie cechy strukturalne wspólne dla rodziny. Podobnie do pozostałych czynników *RUNX*, proces transkrypcji genu *RUNX3* jest regulowany przez dwa różne regiony promotorowe [Bangsow i wsp., 2001].



Rycina 2.3 Lokalizacja chromosomowa genu *RUNX3* [opracowanie własne na podstawie narzędzia <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>]

Gen *RUNX3* jest najmniej zbadanym i najłabiej scharakteryzowanym ze wszystkich członków rodziny *RUNX* [Steponaitis i wsp., 2019]. Podczas prawidłowego rozwoju stwierdzono, że *RUNX3* ulega ekspresji w układzie krwiotwórczym, w osteoblastach i chondrocytach oraz w neuronach w zwojach korzenia grzbietowego [Wu i wsp., 2014], co wskazuje na jego rolę w rozwoju układu nerwowego [Illendula i wsp., 2016]. W dorosłym organizmie ekspresja *RUNX3* utrzymuje się w układzie krwiotwórczym [Wu i wsp., 2014]; jest niezbędny w procesie tymopoezy i różnicowaniu się komórek T i prawidłowej ekspresji antygenów CD4 i CD8, jego wysoką ekspresję zaobserwowano we wszystkich hematopoetycznych komórkach macierzystych [Krygier i wsp., 2018; Haider i wsp., 2016]. Jednak jego funkcja biologiczna jest w dużej mierze niezbadana. Zauważono również, że *RUNX3* jest zaangażowany w zdarzenia onkologiczne. Gen *RUNX3* był opisywany zarówno jako supresor, jak i promotor nowotworów, czasami ze sprzecznym wynikiem w tym samym typie nowotworu, odzwierciedla to najprawdopodobniej złożoną rolę genu *RUNX3* oraz kodowanego przez niego czynnika w onkogenezie [Whittle i wsp., 2017].

Białko *RUNX3* o masie 44kDa składa się z 415 aminokwasów, posiada wszystkie charakterystyczne dla rodziny domeny: domenę Runt, przez którą łączy się ze swoim partnerem CBF- β tworząc heterodimery; także domenę transaktywacyjną i domenę hamującą [Mevel i wsp., 2019].

Gen *RUNX3* znajduje się w obrębie regionu chromosomalnego, który często ulega delecji w różnych typach nowotworów, w tym w: raku jelita grubego, pęcherza, piersi, płuc i żołądka, a także w raku wątrobowokomórkowym i nerwiaku zarodkowym [Jeong i wsp. 2018]. W tym regionie znajduje się kilka domniemyanych genów supresorowych, takich jak: *CHD5* (kodujący chromodomenowe białko wiążące helikazę DNA 5), *ARID1A* (kodujący bogate w AT interaktywne białko zawierające domenę 1A) i *TP73* (który koduje p73), co prawdopodobnie wskazuje, że fragment 1p36 jest dużym centrum, w którym współistnieją geny supresorowe [Choi et al., 2015; da Silva Almeida et al., 2015]. *RUNX3* jest często inaktywowany przez mechanizmy epigenetyczne w nowotworach litych: hipermetylacja wyspy CpG w promotorze P2 *RUNX3* została wykryta w różnych typach raka, np. metylacja *RUNX3* jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego [Kim i wsp., 2008]. Inaktywacja *RUNX3* jest

wykrywana także w nowotworach płuc [Lee i wsp., 2013; Lee i wsp., 2010]. Nie wszystkie badania potwierdzają rolę *RUNX3* jako supresora, gen ten ulega nadekspresji w nabłonkowym raku jajnika i raku podstawnokomórkowym, co sugeruje działania onkogenne w tych tkankach. W raku jajnika obniżenie ekspresji *RUNX3* doprowadziło do obniżenia wskaźników proliferacji. Jego działanie onkogenne zostało wykazane w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi (SCC), w którym ekspresja *RUNX3* koreluje ze stopniem złośliwości [Tsunematsu i wsp., 2009; Barghout i wsp., 2015].

Dane w piśmiennictwie opisują zarówno supresorową, jak i onkogeną potencjalną funkcję genu *RUNX3*. W tym kontekście szczególnie istotne wydają się zmiany w poziomie ekspresji genu. W przypadku ostrej białaczki szpikowej wyższa ekspresja tego genu została uznana jako niekorzystny czynnik prognostyczny, istnieją także dane na temat związku między wyższą śmiertelnością a poziomem mRNA tego genu [Krygier i wsp., 2018; Cheng i wsp., 2008].

Na poziom ekspresji genu mogą wpływać m.in. SNPs. Polimorfizmy genu *RUNX3* były do tej pory badane w szeregu nowotworów narządów, m.in. w raku żołądka, gdzie w analizie pojedynczego *locus* zaobserwowano trzy intronowe SNP związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka żołądka (rs11249206, genotyp CC w porównaniu z genotypem TT; rs760805 genotyp AA, w porównaniu z genotypem TT; i rs2236852 genotyp GG, w porównaniu z genotypem AA) [Wu i wsp., 2009]. Wykryto także zależność między występowaniem szeregu wariantów polimorficznych a zwiększonym ryzykiem rozwoju raka pęcherza moczowego, w analizie pojedynczego *locus* genotyp AA rs760805 występował częściej w grupie chorych na nowotwór w porównaniu z genotypami AT/TT [Zhang i wsp., 2008]. W niniejszej pracy oceniano polimorfizm rs6672420, umiejscowiony jest w eksonie 1 genu *RUNX3*, powoduje zamianę adeniny na tyminę w pozycji 24964519, w konsekwencji zmienia kodowany aminokwas w pozycji 18 z Asn (asparagina) do Ile (izoleucyna). W wyniku tej zmiany może powstać białko o nieprawidłowej konformacji, a w konsekwencji wpływać na wiązanie czynników transkrypcyjnych [Shastry, 2009]. Polimorfizm ten był wcześniej badany u pacjentów z zespołem Sézary'ego [Haider i wsp., 2016], z rakiem żołądka typu jelitowego [Lim i wsp., 2011] oraz z rakiem jelita grubego [Slattery i wsp., 2011].

2.4 Gen fuzyjny *RUNX1/RUNX1T1* oraz jego produkt białkowy

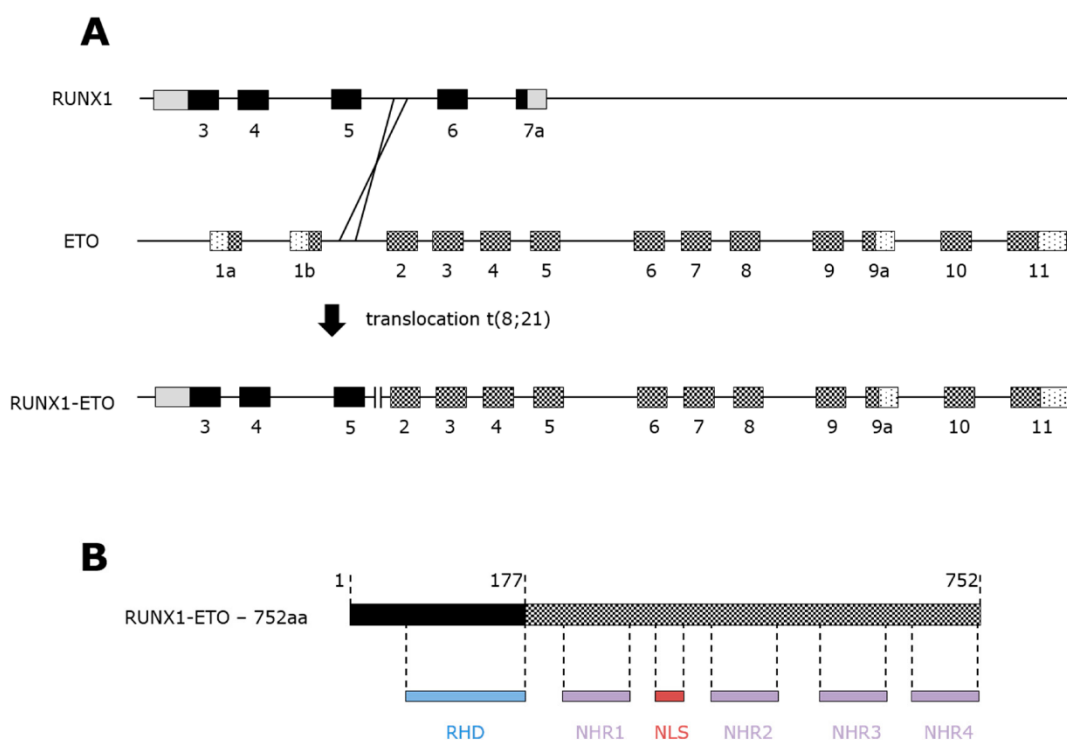
Gen fuzyjny *RUNX1/RUNX1T1* powstaje w wyniku translokacji (czyli przeniesienia fragmentu jednego chromosomu na drugi) t (8; 21)(q22;q22), która jest jedną z najczęstszych rearanżacji chromosomowych w ostrej białaczkę szpikowej u dorosłych [Rubnitz i wsp., 1998]. Translokacja łączy ze sobą *locus* genu *RUNX1* na chromosomie 21 oraz *locus* genu *ETO* na chromosomie 8. Punkty złamania obejmują intron 5 genu *RUNX1* oraz intron 1a lub 1b genu *ETO* (Rycina 2.4 A). Translokacja t(8;21)(q22;q22) jest trzecią najczęstszą zmianą genetyczną i najczęstszą aberracją chromosomalną w AML *de novo* [Grimwade i wsp., 2010] i występuje z częstością 7% u dorosłych i 12% u dzieci i młodzieży [Müller i wsp., 2008; van der Kouwe i wsp., 2019]. Dotychczas obecność tej translokacji nie była oceniana wśród pacjentów z ALL.

RUNX1-RUNX1T1 (lub *RUNX1-ETO*, *AML1-ETO*) to białko chimeryczne, które powstaje w wyniku translokacji, składa się z 752 aminokwasów i zawiera prawie całe białko *ETO* oraz N-końcową część białka *RUNX1* wraz z domeną Runt (Rycina 2.4 B) [Miyoshi i wsp., 1993; Tighe i wsp., 1994; Zhang i wsp., 2002; Tighe i wsp., 1995; van der Kouwe i wsp., 2019].

Według wytycznych European Leukemia Net (ELN) z 2017 roku obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową jest związana z korzystnym rokowaniem: u takich chorych obserwuje się lepsze wskaźniki całkowitej remisji, mniejsze ryzyko nawrotu, dłuższy czas przeżycia oraz wrażliwość na leczenie cytarabiną i antracykliną. Mechanizm dla którego ci pacjenci wykazują lepsze rokowanie jak do tej pory nie został dokładnie poznany [van der Kouwe i wsp., 2019; Döhner i wsp., 2017].

Inne doniesienia wiążą obecność białka fuzyjnego *RUNX1-ETO* z osłabieniem mechanizmów naprawy DNA, które zagrażają stabilności genomowej i sprzyjają fenotypowi mutatorowemu [van der Kouwe, 2019]. Coraz więcej dowodów sugeruje, że wczesna pojawienie się translokacji *RUNX1-ETO* może sprzyjać mutagenezie. Kilka badań wykazało, że *RUNX1-ETO* reguluje ujemnie geny zaangażowane w mechanizm naprawy przez wycinanie zasad [Forster i wsp., 2016].

Komórki zawierające białko RUNX1-ETO wykazują wysoki poziom ekspresji *P53* i powiązanych genów (m.in. *MDM2*, *FAS*, *BAX*), co może prowadzić do indukcji apoptozy. Chociaż wydaje się paradoksalne, że onkogen *RUNX1/RUNX1T1* jest zdolny do indukcji apoptozy, mechanizm ten może chronić klony białaczkowe przed dalszą akumulacją uszkodzeń DNA, co w przeciwnym razie mogłoby doprowadzić do zniszczenia komórek [van der Kouwe 2019].



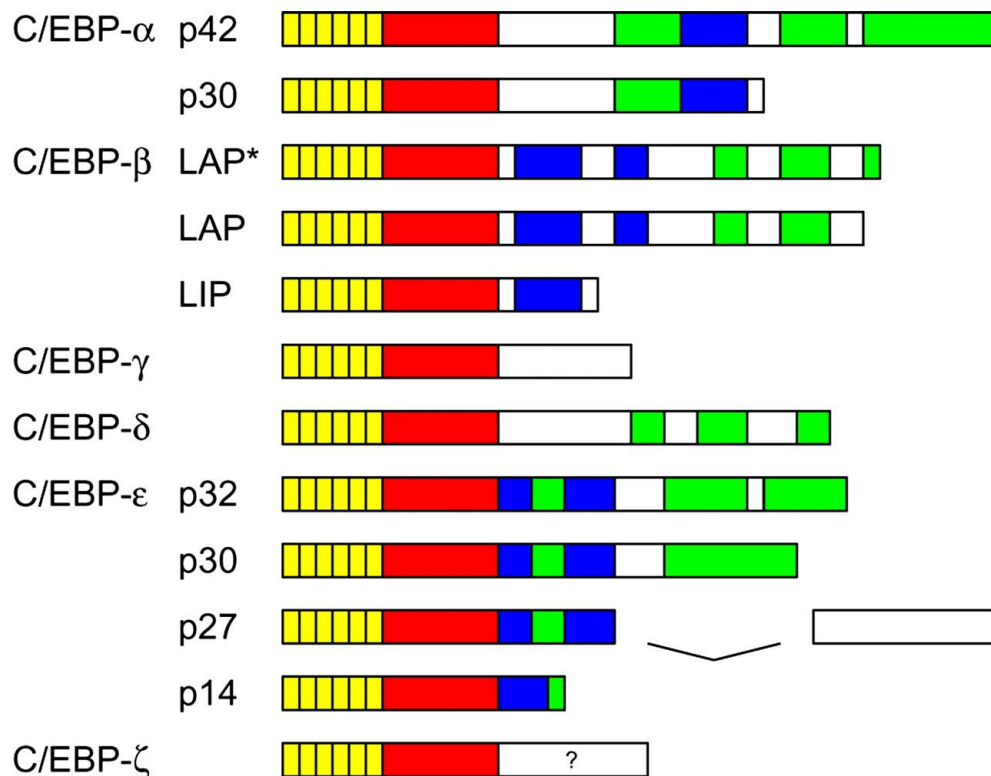
Rycina 2.4 Budowa genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* i jego produktu białkowego. (A) Schemat translokacji t(8; 21) między intronem 5 *RUNX1* a intronem 1 *ETO*. (B) Schemat pełnej długości białka RUNX1-ETO z uwzględnieniem budowy domenowej [van der Kouwe i wsp., 2019].

ROZDZIAŁ III

Rodzina genów *CEBP* i ich produktów białkowych

3.1 Charakterystyka ogólna rodziny genów i białek C/EBP

CEBP (ang. *CCAAT/enhancer binding proteins*) to rodzina genów, kodujących czynniki transkrypcyjne, które zawierają wysoce konserwatywną domenę na C-końcu, tzw. motyw bZIP (ang. *basic-leucine zipper motif*), która bierze udział w dimeryzacji i wiązaniu cząsteczek DNA. Ich regiony N-końcowe są bardziej zróżnicowane i zawierają domeny aktywacji transkrypcji (TAD) [Wedel i wsp., 1995]. Do tej pory co najmniej sześciu członków rodziny zostało wyizolowanych i scharakteryzowanych (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ and C/EBP ζ) (Rycina 3.1).

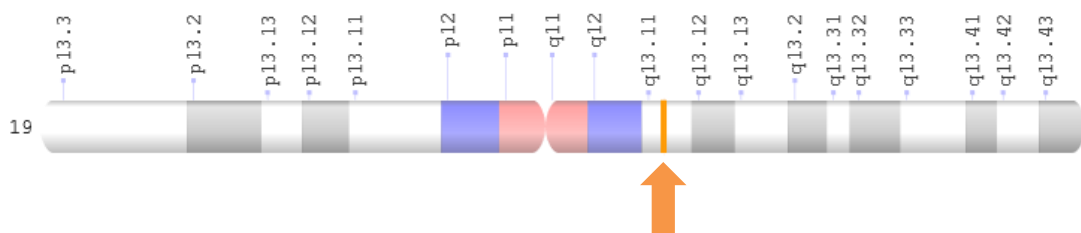


Rycina 3.1 Schematyczny model budowy białek rodziny C/EBP. Motyw bZIP jest przedstawiony kolorem żółtym oraz czerwonym. Położenie domen aktywacyjnych (TAD) i domen regulacyjnych (RD) pokazano odpowiednio w kolorze zielonym i niebieskim [Schrem i wsp., 2004].

Białka C/EBP są zaangażowane w różne funkcje fizjologiczne, takie jak: metabolizm energetyczny, wrodzoną i adaptacyjną odporność, procesy zapalne, hematopoezę, adipogenezę, osteoklastogenezę, biorą udział w regulacji cyklu komórkowego, proliferacji i różnicowania [Wang i wsp., 2003; Porse i wsp., 2001; Pabst i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2004].

3.2 Charakterystyka genu *CEBPA* i jego produktu białkowego

Gen *CEBPA* (ang. CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha) i kodowane przez niego białko, zaliczany jest do rodziny czynników transkrypcyjnych C/EBP oraz znajduje się na chromosomie 19, locus q13.11 (Rycina 3.2). Zbudowany jest z 2 631 zasad [CEBPA, *genecards.org*], w swojej strukturze posiada region kodujący bogaty w zasady GC. Jego cechą charakterystyczną jest to, że nie zawiera intronów [Swart i wsp., 1997; Fasan i wsp., 2014]. Składa się z czterech domen funkcjonalnych: wysoce homologicznego C-końcowego regionu podstawowego odpowiedzialnego za wiązanie DNA, regionu dimeryzacji oraz dwóch mniej zróżnicowanych N-końcowych regionów odpowiedzialnych za aktywację transkrypcji (tzw. TAD1 i TAD2) [Wedel i wsp., 1995; Fasan i wsp., 2014; Pieronkiewicz i wsp., 2010]. Wszystkie z domen łączą się w jedną funkcjonalną domenę bZIP [Pieronkiewicz i wsp., 2010].



Rycina 3.2 Lokalizacja chromosomowa genu *CEBPA* [opracowanie własne na podstawie narzędzia <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>]

Gen *CEBPA* reguluje i wpływa na ekspresję innych genów poprzez rozpoznanie sekwencji motywu CCAAT (cytozyna-cytozyna-adenozyna-adenozyna-tymidyna) znajdującej się w promotorach genów docelowych [Wedel i wsp., 1995; Fasan i wsp., 2014].

Produktami genu *CEBPA* są dwa białka o następujących masach cząsteczkowych: 42 kDa oraz 30 kDa. Warto zaznaczyć, że białko CEBP/A wykazuje pełną aktywność jedynie w formie dimeru. Może to być zarówno homodimer izoformy o masie 42 kDa jak i heterodimer białek o masie 42 i 30 kDa. Białko CEBP/A może także tworzyć heterodimery z innymi czynnikami rodziny CEB/P [Pieronkiewicz i wsp., 2010; Parkin i wsp., 2002; Ranjan i wsp., 2009].

Gen *CEBPA* odpowiada za regulację ekspresji różnych genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego czy homeostazę masy ciała [Wang i wsp., 2003; Porse i wsp., 2001; Pabst i wsp., 2009]. Odpowiada również za regulację tworzenia się nowych komórek tłuszczowych, dystrybucję lipidów w komórkach oraz ma znaczenie w kontroli metabolizmu glukozy i lipidów w wątrobie [Olofsson i wsp., 2008]. Badania wykazały, że gen *CEBPA* reguluje proliferację oraz różnicowanie się komórek progenitorowych szpiku kostnego, adipocytów, komórek łożyska, płuc czy hepatocytów [Koschmieder i wsp., 2009]. Wykazano również, że gen *CEBPA* jest niezbędny do rozwoju i różnicowania się komórek linii szpikowej, w szczególności granulocytów [Pabst i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2004] oraz może działać jako supresor nowotworowy w nowotworach hematologicznych (w tym w ostrej białaczce szpikowej) jak i nowotworach niehematologicznych [Pabst i wsp., 2009]. Pojawiły się również badania, które wskazują na onkogeną rolę genu *CEBPA* w nowotworach limfoidalnych w przeciwieństwie do jego roli jako supresora w ostrych białaczkach szpikowych [Chapiro i wsp., 2006].

ROZDZIAŁ IV

Założenia i cele pracy

Poznanie dokładnego mechanizmu działania genów *RUNX*, jak i genu *CEBPA* w przypadkach ostrych białaczek jest wciąż dalekie od pełnego, a ich dualistyczna rola jako onkogenów i supresorów podkreśla ich związek z utrzymaniem homeostazy organizmu. Prawdopodobne jest, że każdy z ww. genów będzie odgrywać przeciwstawne role, w różnych podtypach białaczek.

Głównym założeniem rozprawy doktorskiej była ocena wybranych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne, zaangażowanych w procesy hematopoezy, apoptozy i proliferacji. Badania były prowadzone na poziomie DNA oraz RNA, w celu zapewnienia pełniejszego obrazu zaburzeń genetycznych mogących leżeć u podstaw leukemogenezy.

Cele szczegółowe obejmowały:

- Ocenę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu rs2268277 G>C oraz poziomu ekspresji genu *RUNX1* w grupie pacjentów z ALL
- Ocenę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu rs6672420 A>T oraz poziomu ekspresji genu *RUNX3* w grupie pacjentów z ALL
- Poszukiwanie zależności pomiędzy obserwowanymi genotypami a poziomem ekspresji
- Ocenę obecności ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* w grupie chorych na ALL
- Ocenę poziomu ekspresji genu *CEBPA* u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną
- Analizę statystyczną uzyskanych wyników oraz poszukiwanie związku z danymi demograficzno-klinicznymi pacjentów

Charakterystyka i poznanie funkcji genów z rodziny *RUNX* oraz *CEBPA* w grupie pacjentów chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną może przełożyć się w przyszłości na nowe strategie lecznicze i ich indywidualizację, może to pomóc chorym na ALL, szczególnie dorosłym oraz w wieku podeszłym, uzyskać większe szanse na całkowitą remisję choroby oraz zredukować ryzyko nawrotów.

ROZDZIAŁ V

Materiały i metody

5.1 Materiał do badań

Badaniami objęto 60 pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną, leczonych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Materiałem badanym była krew obwodowa pobrana na EDTA, z której następnie wyizolowano odpowiednio DNA oraz RNA. Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (numer RNN/88/16/KE). Wszyscy pacjenci udzieli świadomej pisemnej zgody na przeprowadzone działania.

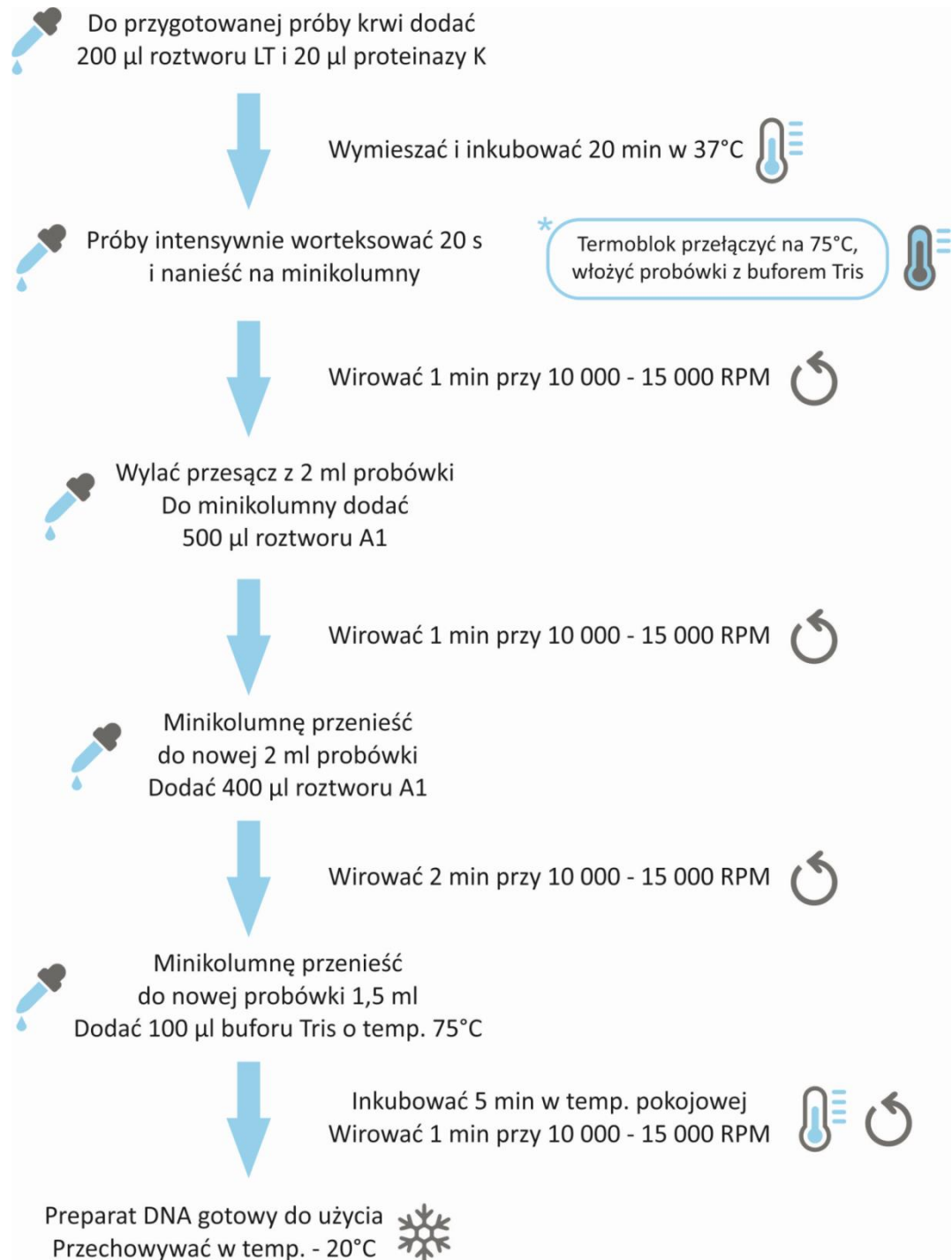
Dodatkowo jako grupę odniesienia do badanych polimorfizmów wykorzystano 60 prób DNA wyizolowanego od zdrowych osób, będących dobrowolnymi dawcami krwi w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi.

Materiał do badań był przekazywany w sposób anonimowy.

5.2 Badanie polimorfizmów wybranych genów

5.2.1 Izolowanie DNA

W celu oceny polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w wybranych genach, wykonano izolowanie DNA z krwi obwodowej pacjentów. W tym celu użyto zestawu *Blood Mini* firmy *A&A Biotechnology*, wykorzystującego metodę minikolumnową oraz proteinazę K, postępując zgodnie z protokołem producenta. Skrócony schemat działań przedstawiony jest na Rycinie 5.1.



Rycina 5.1 Protokół izolacji DNA [opracowanie własne na podstawie protokołu Blood Mini firmy A&A Biotechnology, <https://www.aabiot.com/izolacja-dna/blood-mini>]

5.2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy dla badanych polimorfizmów

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – *ang. polymerase chain reaction*) pozwala na specyficzne powielenie określonej sekwencji i w krótkim odstępie czasu uzyskanie jej w milionach kopii. Matrycą do przeprowadzenia reakcji może być wcześniej wyizolowane DNA lub RNA przepisane na cDNA. Powielanie jest możliwe dzięki zastosowaniu termostabilnej polimerazy DNA *Taq*. Aby rozpocząć proces syntezy nici niezbędne są także krótkie, miejscowo specyficzne oligonukleotydy, zwane starterami (*ang. primer*). Dwa primery otaczają (flankują) wybraną sekwencję, a każdy z nich jest komplementarny do jednego z końców powielanego fragmentu, wyróżniamy starter przedni (F – *ang. forward*) i wsteczny (R – *ang. reverse*). Sam proces reakcji PCR jest cykliczny i polega na powtarzaniu trzech etapów, tj. denaturacji, przyłączania starterów (annealingu) oraz wydłużania nici (inaczej elongacji) [Allison, 2009; Brown, 2018; Bal, 2013].

Reakcja PCR posłużyła do uzyskania kopii fragmentów zawierających badane miejsca polimorficzne genów: *RUNX1* (rs2268277, zamiana G>C), *RUNX3* (rs6672420, zamiana A>T). Startery zostały zaprojektowane przy pomocy narzędzi bioinformatycznych Primer-BLAST oraz Primer3, ich sekwencje są przedstawione w Tabeli 5.1, a protokół reakcji oparto o wytyczne producenta zestawu *AccuTaq™LA DNA Polymerase* firmy *Sigma-Aldrich*. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze *MJ Mini Personal Thermal Cycler* firmy *Bio-Rad*.

Tabela 5.1 Sekwencje starterów użyte do zbadania miejsc polimorficznych

Starter	Sekwencja
<i>RUNX1</i> SNP F	5'-TACAGCCAATCTCCACTGTGCT-3'
<i>RUNX1</i> SNP R	5'-CACCTGTGTGGAACAGATCTCC-3'
<i>RUNX3</i> SNP F	5'-GGGCTATTGTTACTACCGCGG-3'
<i>RUNX3</i> SNP R	5'-AACCCCCTGAAGGGCTGAAAAT-3'

Szczegółowe informacje odnośnie składu mieszaniny reakcyjnej oraz warunków prowadzenia amplifikacji zawierają odpowiednio Tabela 5.2 i Tabela 5.3. Do każdej serii reakcji PCR dołączano kontrolę negatywną, która zawierała wodę jałową wolną od nukleaz zamiast matrycy DNA.

Tabela 5.2 Skład mieszaniny reakcyjnej w przebiegu PCR dla badanych SNP

Odczynnik	Objętość (na 1 próbę)
Bufor 10xPCR Buffer, o pH 8,3 (1,5 mM)	3,5 µl
MgCl ₂ PCR Reagent (25 mM)	0,7 µl
Primer forward (10 µM)	0,7 µl
Primer reverse (10 µM)	0,7 µl
Mieszanina dNTP (0,2 mM)	0,4 µl
Enzym JumpStart® AccuTaq™ LA DNA Polymerase (0,5 U)	0,2 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	12,3 µl

Do tak sporządzonej mieszaniny dodawano 1,5 µl wyizolowanego wcześniej DNA, ostatecznie objętość reakcyjna wynosiła 20 µl. Profil termiczny reakcji ustalono następująco dla poszczególnych genów:

Tabela 5.3 Warunki amplifikacji w przebiegu PCR dla badanych SNP

SNP	Warunki reakcji			Liczba cykli	Wielkość produktu
<i>RUNX1</i> rs2268277	Denaturacja	95°C	30 s	35	311 pz
	Annealing	60°C	60 s		
	Elongacja	72°C	60 s		
<i>RUNX3</i> rs6672420	Denaturacja	95°C	30 s	35	120 pz
	Annealing	57°C	60 s		
	Elongacja	72°C	60 s		

Dodatkowo prowadzono denaturację wstępną w 95°C przez 2 minuty, a po ostatnim cyklu reakcji przeprowadzano elongację końcową w 72°C przez 5 minut.

5.2.3 Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Enzymy restrykcyjne to endonukleazy pochodzenia bakteryjnego, które rozpoznają charakterystyczne sekwencje nukleotydowe (tzw. miejsca restrykcyjne) i hydrolizują DNA poprzez zerwanie wiązania fosfodiesterowego, co w konsekwencji prowadzi do powstania określonych pod względem długości i struktury fragmentów [Bal, 2013]. Zastosowanie wybranego enzymu powinno teoretycznie zawsze prowadzić do powstania identycznych produktów, często jednak zdarza się, że dane miejsce restrykcyjne jest polimorficzne i występuje w postaci dwóch alleli. Wtedy jeden z alleli posiada prawidłową sekwencję, jest rozpoznawany i przecinany, natomiast drugi allel jest zmieniony, jego sekwencja pozostaje nierozpoznana i w konsekwencji niehydrolizowana. Występowanie takiego zjawiska nazywamy polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – ang. *restriction fragment length polymorphism*). Technikę tę w połączeniu z reakcją PCR można wykorzystać oceny SNPs w obrębie wybranego fragmentu genu. W tym celu przed trawieniem przeprowadza się reakcję PCR ze starterami, które flankują miejsce polimorficzne. Do hydrolizy wykorzystuje się odpowiednią objętość produktu PCR, a uzyskane fragmenty rozdziela elektroforetycznie uzyskując charakterystyczny wzór prążkowy, który po analizie pozwala na określenie genotypu [Bal, 2013; Brown, 2018; Słomski, 2011]

Trawienie enzymami restrykcyjnymi po przeprowadzonej reakcji PCR wykorzystano w celu określenia genotypów pacjentów dla badanych polimorfizmów genów *RUNX1* (rs2268277), *RUNX3* (rs6672420). Szczegółowe informacje dotyczące składu mieszaniny reakcyjnej oraz warunków hydrolizy zawiera Tabela 5.4. Inkubację prowadzono w termocyklerze *MJ Mini Personal Thermal Cycler* firmy *Bio-Rad*.

Tabela 5.4 Skład mieszaniny oraz warunki trawienia enzymami restrykcyjnymi

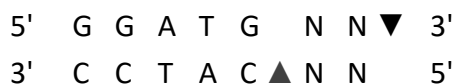
SNP	Skład mieszaniny reakcyjnej (na 1 próbę)				Parametry trawienia
	Produkt PCR	Enzym	Bufor	Woda jałowa	
<i>RUNX1</i> rs2268277	16 µl	0,3 µl	2 µl	1,7 µl	37°C 16 godzin
<i>RUNX3</i> rs6672420	16 µl	0,3 µl	2 µl	1,7 µl	55°C 16 godzin

W celu oceny wybranego SNP genu *RUNX1* zastosowano enzym *MvaI* (*BstNI*) (10 U/µL) wraz z odpowiednio dostosowanym buforem 10x *Buffer R* firmy *ThermoFisher Scientific*TM. Enzym *MvaI* rozpoznaje i przecina następującą sekwencję:



Produkt reakcji PCR posiadał dwa miejsca restrykcyjne, z czego jedno pojawiało się w wyniku mutacji. Inkubacja produktu PCR z enzymem restrykcyjnym *MvaI* (*BstNI*) (10 U/µL) prowadziła do powstania następujących fragmentów: 173, 138, 99 oraz 39 pz, na podstawie których określono odpowiedni genotyp pacjenta, po wykonaniu rozdzału elektroforetycznego.

W celu zbadania polimorfizmu genu *RUNX3* zastosowano enzym *BseGI* (*BtsCI*) (10 U/µL) wraz z odpowiednio dostosowanym buforem 10x *Buffer Tango* firmy *ThermoFisher Scientific*TM. Enzym *BseGI* rozpoznaje i przecina następującą sekwencję:



Produkt reakcji PCR posiadał jedno miejsce restrykcyjne, które zanikało w wyniku mutacji. Inkubacja produktu PCR z enzymem restrykcyjnym *BseGI* (*BtsCI*) (10 U/µL) prowadziła do powstania następujących fragmentów: 120, 93 i 27 pz, na

podstawie których, po wykonaniu rozdziału elektroforetycznego, określono genotyp pacjenta.

5.2.4 Elektroforeza

To zjawisko elektrokinetyczne, w którym cząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym migrują pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Technika ta jest powszechnie stosowana do rozdzielania cząsteczek pod względem długości, ładunku czy konformacji [Allison, 2009; Brown, 2018; Słomski, 2011].

Kwasy nukleinowe posiadają ujemnie naładowane reszty fosforanowe i przemieszczają się w polu elektrycznym do dodatnio naładowanej anody. Aby uszeregować fragmenty DNA pod względem ich długości stosuje się odpowiednie nośniki elektroforetyczne, w tym głównie żele agarozowe i poliakrylamidowe. Żele działają na zasadzie sita molekularnego, hamując poruszanie się cząsteczek dłuższych, podczas gdy mniejsze migrują swobodniej i szybciej. Wynik elektroforezy ujawnia charakterystyczny układ prążkowy rozdzielanych fragmentów DNA [Allison, 2009; Brown, 2018; Słomski, 2011].

W niniejszej pracy elektroforezę poziomą produktów uzyskanych po reakcji PCR przeprowadzono w 2% żelu agarozowym a do rozdziału produktów trawienia enzymami restrykcyjnymi wykorzystano żel 2,5%. Technika ta posłużyła do sprawdzenia obecności spodziewanego produktu o określonej wielkości przy jednoczesnym braku produktów niespecyficznych.

Do przygotowania 2% żelu agarozowego wykorzystano kolbę do której dodano 0,7 g agarozy (*Maximus*) oraz 35 ml 0,5X buforu TBE (Tris-Boran-EDTA). Roboczy bufor 0,5X powstał z rozcieńczenia roztworu podstawowego 10X TBE, który zawiera: 108 g Tris (pH 8.3) 55 g kwasu borowego, 9,3 g EDTA oraz wodę destylowaną do objętości 1 l. Kolbę z roztworem podgrzewano aż do całkowitego rozpuszczenia się agarozy. Po przestudzeniu do żelu dodano 2 µl bromku etydyny, a całość wylano na wcześniej przygotowane sanki, następnie umieszczono grzebień, aby utworzyć studzienki do nanoszenia produktów reakcji PCR. Zastosowanie bromku etydyny, który interkaluje

w cząsteczki DNA, umożliwia wizualizację produktów w świetle UV (fluorescencja kompleksu bromek-dsDNA jest 10-krotnie wyższa od fluorescencji bromku niezwiązanego). Tak przygotowany żel pozostawiono do całkowitego ostygnięcia i zestalenia. Następnie żel umieszczono w buforze roboczym 0,5X TBE a do utworzonych studzienek dodawano kolejno:

- 2 µl wzorca masy molekularnej *Marker DNA M100-500 (DNA Gdańsk)*
- 4 µl kontroli negatywnej wraz z 1 µl roztworu obciążającego
- 4 µl prób badanych wraz z 1 µl roztworu obciążającego

Roztwór obciążający zawierał błękit bromofenolowy, glicerol oraz wodę, zapobiegał samoistnemu dyfundowaniu prób ze studzienek.

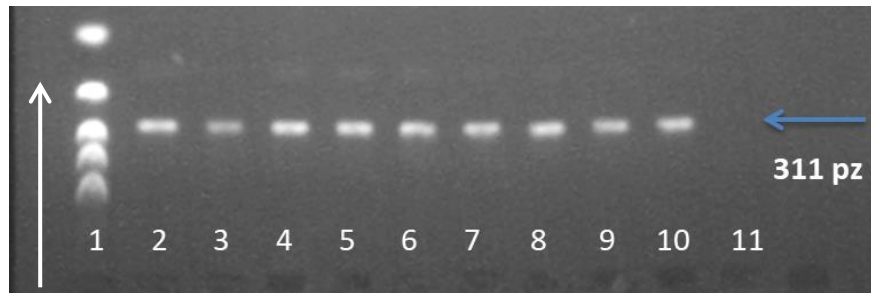
Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy użyciu zasilacza *PowerPac™ Universal* firmy *Bio-Rad* w następujących warunkach:

- Napięcie 110 V, czas rozdziału 5 minut
- Napięcie 130 V, czas rozdziału 10 minut

Do rozdziału produktów trawienia enzymami restrykcyjnymi wykorzystano 2,5% żel agarozowy (powstały z rozpuszczenia 0,875 g agarozy w 35 ml buforu 0,5X TBE), nanoszono 8 µl prób badanych wraz z 1 µl roztworu obciążającego, stosowano wzorzec masy molekularnej *DNA Marker pUC/Msp I* firmy *A&A Biotechnology*. Parametry rozdziału zmodyfikowano na następujące:

- Napięcie 110 V, czas rozdziału 5 minut
- Napięcie 130 V, czas rozdziału 25 minut

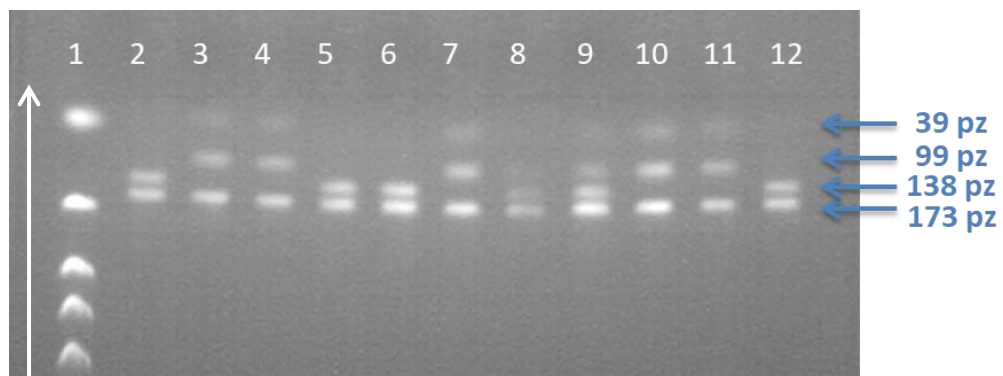
Po zakończeniu rozdziału dokonywano odczytu fluorescencji w aparacie *Mini Bis Pro UV* firmy *DNR Bio-Imaging System*, a uzyskany obraz rejestrowano za pomocą oprogramowania komputerowego *GelCapture* firmy *DNR Bio-Imaging System*. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów reakcji PCR oraz trawienia enzymami restrykcyjnymi dla polimorfizmu rs2268277 przedstawiono kolejno na Rycinach 5.2 i 5.3.



Rycina 5.2 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs2268277. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki 2-10 – próby badane, zawierające spodziewany produkt o wielkości 311 pz; studzienka nr 11 – kontrola ujemna.

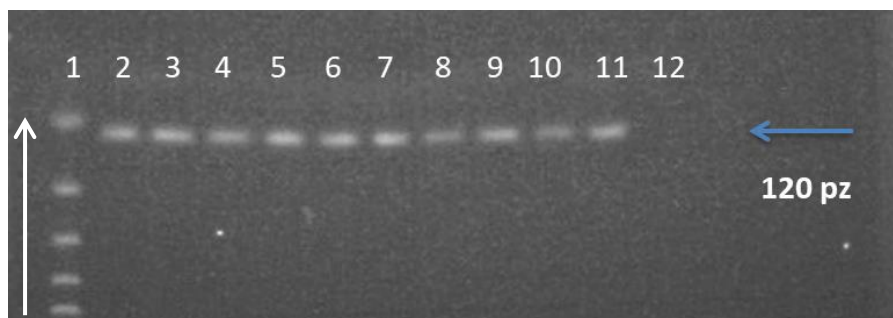
Na podstawie obrazu elektroforetycznego pacjentów kwalifikowano do jednego z trzech możliwych genotypów:

- homozygota dzika GG, zawierająca fragmenty o długości 173 oraz 138 pz
- heterozygota GC, zawierająca fragmenty o długości 173, 138, 99 oraz 39 pz
- homozygota zmutowana CC, zawierająca fragmenty o długości 173, 99 oraz 39 pz



Rycina 5.3 Przykładowy wynik elektroforezy produktów trawienia dla polimorfizmu rs2268277. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 50-500 pz; studzienki 2, 5, 6, 12 – próby badane, zawierające dwa prążki 138 oraz 173 pz, homozygoty dzikie GG; studzienki nr 3, 4, 7, 10, 11 – próby badane, zawierające prążki 173, 99 oraz 39 pz, homozygoty zmutowane CC; studzienki nr 8, 9 – próby badane, zawierające prążki 173, 138, 99 oraz 39 pz, heterozygoty GC.

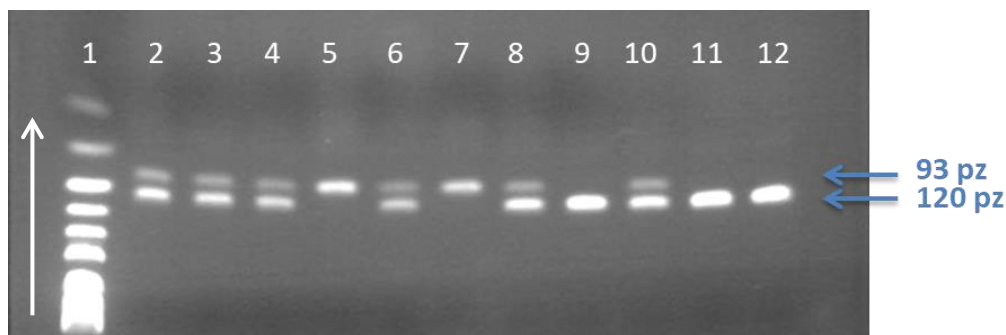
Drugim ocenionym SNP był polimorfizm rs6672420 genu *RUNX3*. Przykładowe wyniki rozdziałów elektroforetycznych produktów reakcji PCR oraz trawienia enzymami restrykcyjnymi przedstawiono kolejno na Rycinach 5.4 i 5.5.



Rycina 5.4 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs6672420. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki 2-11 – próby badane, zawierające spodziewany produkt o wielkości 120 pz; studzienka nr 12 – kontrola ujemna.

Na podstawie obrazu uzyskanego po elektroforezie pacjentów kwalifikowano do jednego z trzech możliwych genotypów:

- homozygota dzika AA, zawierająca fragmenty o długości 27 i 93 pz
- heterozygota AT, zawierająca fragmenty o długości 27, 93 i 120 pz
- homozygota zmutowana TT, zawierająca fragment o długości 120 pz



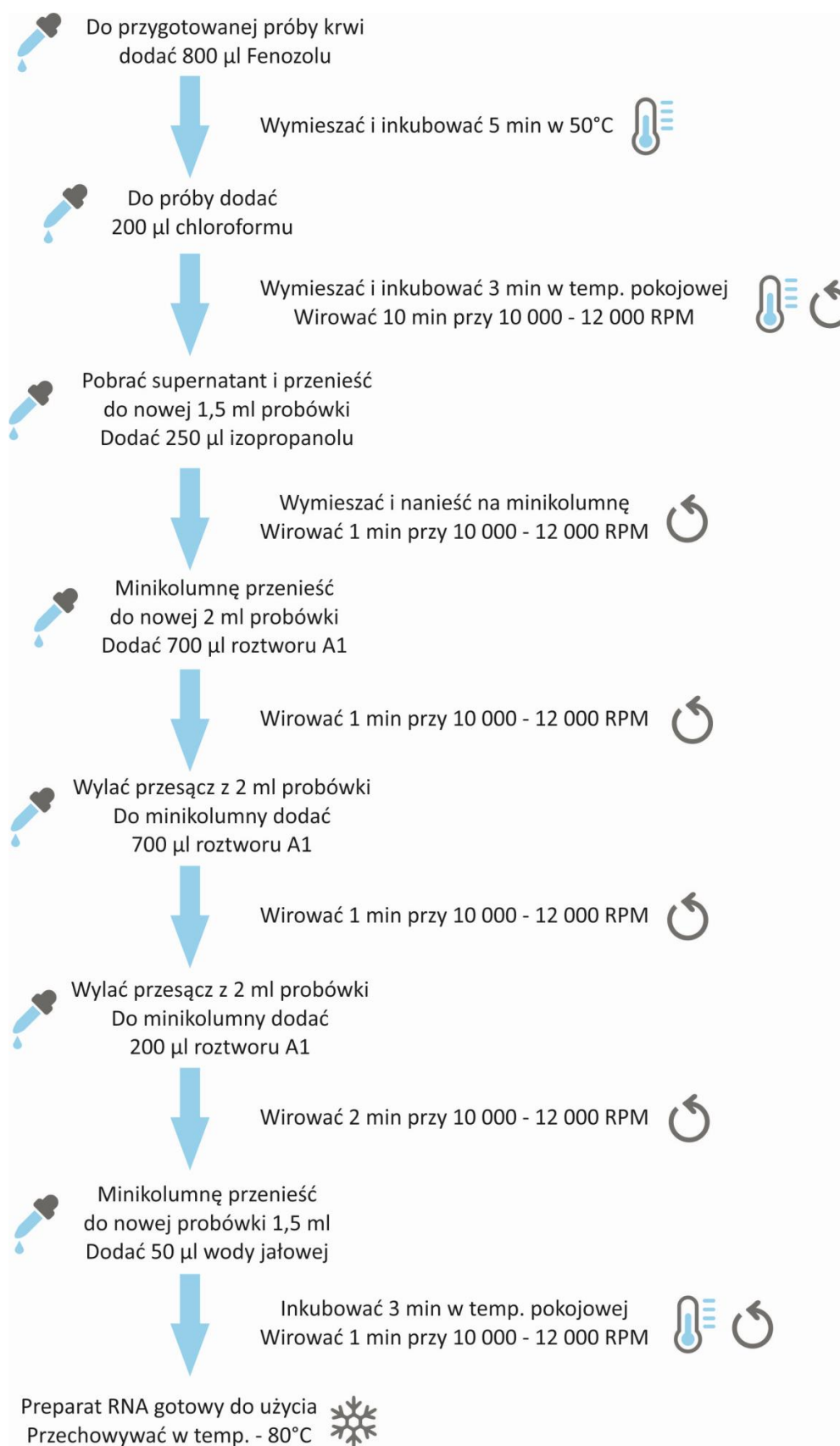
Rycina 5.5 Przykładowy wynik elektroforezy produktów trawienia dla polimorfizmu rs6672420. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej DNA Marker pUC/Msp I 34 – 501 pz; studzienki 2, 3, 4, 6, 8, 10 – próby badane, zawierające dwa prążki 93 oraz 120 pz, heterozygoty AT; studzienki nr 5, 7 – próby badane, zawierające tylko prążek 93 pz, homozygoty dzikie AA; studzienki nr 9, 11, 12 – próby badane, zawierające wyłącznie prążek 120 pz, homozygoty zmutowana TT. Prążek o wielkości 27 pz ma zbyt małą masę i nie jest uwidoczniiony na żelu.

5.3 Ocena ekspresji wybranych genów

5.3.1 Izolowanie RNA

W celu oceny obecności ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3* oraz *CEBPA*, wykonano izolację RNA z krwi obwodowej. Izolacja została przeprowadzona metodą minikolumnową z wykorzystaniem fenozeolu, przy użyciu zestawu *Total RNA mini* (A&A Biotechnology), zgodnie z protokołem producenta. Skrócony schemat działań przedstawia Rycina 5.6.

Uzyskane preparaty RNA przechowywano w -76°C do czasu dalszych analiz.



Rycina 5.6 Protokół izolowania RNA [opracowanie własne na podstawie Total RNA Mini firmy A&A Biotechnology, <https://www.aabiot.com/izolacja-rna/total-rna-mini>]

5.3.2 Określenie czystości i stężenia preparatów RNA

W celu określenia stężenia i oceny stopnia czystości kwasów nukleinowych wykorzystywane jest zjawisko selektywnego pochłaniania światła UV. Absorbancję uzyskanych preparatów oceniono przy następujących długościach fal:

- 260 nm – wartość charakterystyczna dla kwasów nukleinowych
- 270 nm – wartość charakterystyczna dla fenolu
- 280 nm – wartość charakterystyczna dla białek
- 320 nm – wartość charakterystyczna dla drobin komórkowych

Pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm jest wykorzystywany do określenia stężenia RNA w preparatach we wskazanych jednostkach. W celu określenia, czy uzyskane próby RNA są zanieczyszczone białkami ocenia się stosunek absorbancji A_{260} do A_{280} , gdzie wartość współczynnika od 1,8 do 2,0 świadczy o dobrej czystości wyizolowanych preparatów [Słomski, 2011; Brown, 2018].

W pracy ocenę czystości oraz określenie stężenia wyizolowanego RNA oceniano przy pomocy nanospektrofotometru *Implen NanoPhotometer®*. Aparat zerowano przy pomocy oczyszczonej wody destylowanej, następnie nanoszono po 1 μ l prób i dokonywano pomiarów absorbancji. Wszystkie próby wykazywały współczynnik A_{260}/A_{280} między 1,8-2,0.

5.3.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Wyizolowane RNA zostało przepisane na komplementarne DNA (cDNA) w reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu odczynników *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* firmy *Applied Biosystems™*. Synteza jest możliwa dzięki zastosowaniu enzymu odwrotnej transkryptazy oraz uniwersalnego startera oligo(dT), który rozpoznaje i przyłącza się do ogona *poliA* przy końcu 3' każdej prawidłowo zbudowanej cząsteczki mRNA [Bachman, 2013]. Reakcję prowadzono w oparciu o protokół producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji przedstawiono w Tabelach 5.5 i 5.6.

Tabela 5.5 Skład mieszaniny do reakcji odwrotnej transkrypcji

Odczynniki	Objętość (podana na 1 próbę)
Bufor 10X RT Buffer	2,0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
Starter oligo(dT) ₂₃ (7 mM)	2,0 µL
Odwrotna transkryptaza MultiScribe™ (50 U/µL)	1,0 µL
Inhibitor Rnaz (20 U/µL)	1,0 µL
Suma	6,8 µL

Do tak przygotowanej mieszaniny reakcyjnej dodawano oczyszczonej wody destylowanej oraz RNA w odpowiednich objętościach, tak aby w każdej próbce otrzymać jednakowe stężenie RNA. Na podstawie wyników absorbancji uzyskanych przy długości fali 260 nm dla wszystkich prób badanych, ostateczne stężenie RNA dla każdej próby ustalono na 0,01 µg/µl. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl, proces odwrotnej transkrypcji prowadzono w termocyklerze *MJ Mini Personal Thermal Cycler* firmy *Bio-Rad*, w następujących warunkach:

Tabela 5.6 Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji

	Etap 1	Etap 2	Etap 3
Temperatura	25°C	37°C	85°C
Czas	10 min	120 min	5 min

Do czasu dalszych analiz uzyskane preparaty cDNA przechowywano w -20°C.

5.3.4 Ocena obecności ekspresji genów techniką PCR

W pierwszym etapie reakcję PCR prowadzono ze starterami specyficznymi dla jednego z genów metabolizmu podstawowego (*GAPDH* – ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), w celu określenia poprawności przebiegu reakcji odwrotnej transkrypcji. Później wykonywano reakcje PCR wykorzystując startery specyficzne dla wybranych genów badanych, tj. *RUNX1*, *RUNX3* oraz *CEBPA*, w celu oceny obecności ich ekspresji. Startery zostały zaprojektowane przy pomocy narzędzi bioinformatycznych Primer-BLAST oraz Primer3, ich sekwencje przedstawiono w Tabeli 5.7.

Tabela 5.7 Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR oraz real-time PCR

Starter	Sekwencja
<i>GAPDH</i> F	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'
<i>GAPDH</i> R	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'
<i>RUNX1</i> F	5'-AGTGGAAGAGGGAAAAGC-3'
<i>RUNX1</i> R	5'-ATCCACTGTGATTTTGATGG-3'
<i>RUNX3</i> F	5'-ATGACGAGAACTACTCCG-3'
<i>RUNX3</i> R	5'-TCAGGGTGAACTCTTCC-3'
<i>CEBPA</i> F	5'-AGCCTTGTTGTACTGTATG-3'
<i>CEBPA</i> R	5'-AAAATGGTGGTTTAGCAGAG-3'

Amplifikacje przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta przy użyciu zestawu *AccuTaq™LA DNA Polymerase* firmy *Sigma-Aldrich*. Do każdej serii reakcji PCR dołączano kontrolę negatywną, która zawierała wodę jałową wolną od nukleaz zamiast matrycy cDNA. Wszystkie eksperymenty prowadzone były w termocyklerze *MJ Mini Personal Thermal Cycler* firmy *Bio-Rad*. Szczegółowe informacje dotyczące mieszaniny reakcyjnej oraz warunków prowadzenia amplifikacji zawierają odpowiednio Tabela 5.8 i Tabela 5.9.

Tabela 5.8 Skład mieszaniny reakcyjnej dla PCR

Odczynnik	Objętość (na 1 próbę)
Bufor 10xPCR Buffer, o pH 8,3 (1,5 mM)	3,5 µl
MgCl ₂ PCR Reagent (25 mM)	0,7 µl
Primer forward (10 µM)	0,7 µl
Primer reverse (10 µM)	0,7 µl
Mieszanina dNTP (0,2 mM)	0,4 µl
Enzym JumpStart® AccuTaq™ LA DNA Polymerase (0,5 U)	0,2 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	13,8 µl

Do tak sporządzonej mieszaniny dodawano 1 µl cDNA, ostateczna objętość reakcyjna wynosiła 21 µl. Profil termiczny reakcji dla badanych genów przedstawiał się następująco:

Tabela 5.9 Warunki amplifikacji dla PCR

Gen	Warunki reakcji			Liczba cykli	Wielkość produktu
<i>GAPDH</i>	Denaturacja	95°C	30 s	35	189 pz
	Annealing	58°C	30 s		
	Elongacja	72°C	60 s		
<i>RUNX1</i>	Denaturacja	95°C	60 s	35	96 pz
	Annealing	58°C	30 s		
	Elongacja	72°C	45 s		
<i>RUNX3</i>	Denaturacja	95°C	60 s	35	120 pz
	Annealing	56°C	30 s		
	Elongacja	72°C	45 s		
<i>CEBPA</i>	Denaturacja	95°C	60 s	35	199 pz
	Annealing	56°C	30 s		
	Elongacja	72°C	45 s		

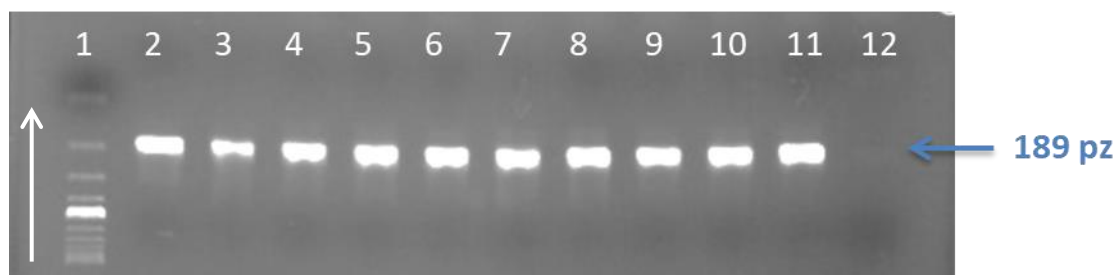
Dodatkowo na początku każdej reakcji PCR prowadzono denaturację wstępną w 95°C przez 2 minuty, po ostatnim cyklu reakcji wykonywano dodatkową elongację końcową w 72°C przez 5 minut.

5.3.5 Elektroforeza

Do rozdzielenia produktów reakcji PCR wykorzystano 2% żel agarozowy przy następujących warunkach rozdzielania:

- Napięcie 110 V, czas rozdzielania 5 minut
- Napięcie 130 V, czas rozdzielania 10 minut

Do przeprowadzenia elektroforezy użyto zasilacza *PowerPac™ Universal* firmy *Bio-Rad*, a po zakończeniu rozdzielania dokonywano odczytu fluorescencji w aparacie *Mini Bis Pro UV* firmy *DNR Bio-Imaging System*. Uzyskany obraz rejestrowano za pomocą oprogramowania komputerowego *GelCapture* firmy *DNR Bio-Imaging System*. Przykładowe zdjęcie rozdzielania elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* przedstawiono na Rycinie 5.7.



Rycina 5.7 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu *GAPDH*. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 100-1000 pz; studzienki 2-11 – próby badane, zawierające produkt o wielkości 189 pz; studzienka nr 12 – kontrola ujemna.

5.3.6 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (RT-qPCR ang. *real-time PCR*) stanowi modyfikację klasycznej reakcji PCR i jest narzędziem do ilościowego określania poziomu ekspresji analizowanych genów. Monitorowanie przyrostu produktu PCR w czasie jest możliwe dzięki pomiarowi fluorescencji, pojawiającej się dzięki zastosowaniu barwników (np. *SYBR Green*, *EvaGreen*) lub sond (np. *Taq Man*, *Molecular Beacons*, *Scorpions*) [Studzińska i wsp., 2008]. Natężenie sygnału fluorescencji jest mierzone po każdym cyklu reakcji i wzrasta wprost proporcjonalnie do ilości powstającego w danym czasie w mieszaninie reakcyjnej dsDNA. Na podstawie danych zebranych po każdym cyklu budowany jest wykres zależności natężenia sygnału od liczby cykli dla każdej próby. Przy prawidłowo przeprowadzonym doświadczeniu krzywe amplifikacji mają kształt sigmoidalny [Słomski, 2011]. Następnie ustala się położenie linii progowej (ang. *threshold line*) powyżej szumów fluorescencji tła w obrębie fazy wzrostu wykładniczego reakcji. Dla każdej z badanych prób wyznacza się cykl progowy (Ct) na styku przecięcia się krzywej z linią progową, wartość Ct zależy od początkowej ilości matrycy – im większa początkowa liczba kopii, tym potrzebna jest mniejsza ilość cykli, aby przekroczyć fluorescencję tła, tym samym mniejsza wartość Ct. Dane o liczbie kopii analizowanej sekwencji uzyskuje się między innymi poprzez porównanie wartości Ct prób badanych do wartości Ct uzyskanych dla zastosowanego genu referencyjnego, oszacowane wartości ekspresji mają wtedy charakter względny [Słomski, 2011; Tyburski i wsp., 2008; Studzińska i wsp., 2008].

Metodę real-time PCR wykorzystano do oceny względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3* oraz *CEBPA*. Oznaczenia dla genów badanych prowadzono równolegle z genem referencyjnym, w odrębnych probówkach. Jako gen referencyjny wybrano gen metabolizmu podstawowego, jakim jest *GAPDH*, którego ekspresja wykazuje stosunkowo stały poziom we wszystkich komórkach organizmu i jest często stosowana do normalizacji poziomów mRNA między próbami [Silver i wsp., 2006].

Reakcję real-time PCR prowadzono wykorzystując zestaw *RT HS-PCR Mix* firmy *A&A Biotechnology* w oparciu o protokół producenta. Oznaczenia dla każdej próby

zostały wykonane w trzykrotnym powtórzeniu, a uzyskane wyniki uśredniono. Do każdej serii doświadczeń dołączano kontrolę negatywną, niezawierającą matrycy, również w triplecie. Analizę prowadzono w aparacie *Rotor-GeneTM 6000* firmy *Corbett Life Science, Qiagen*. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano startery użyte w analizie jakościowej (Tabela 5.3, podrozdział 5.3.4). Szczegółowe dane odnośnie mieszaniny oraz warunków reakcji są zawarte odpowiednio w tabelach 5.10 i 5.11.

Tabela 5.10 Skład mieszaniny reakcyjnej dla real-time PCR

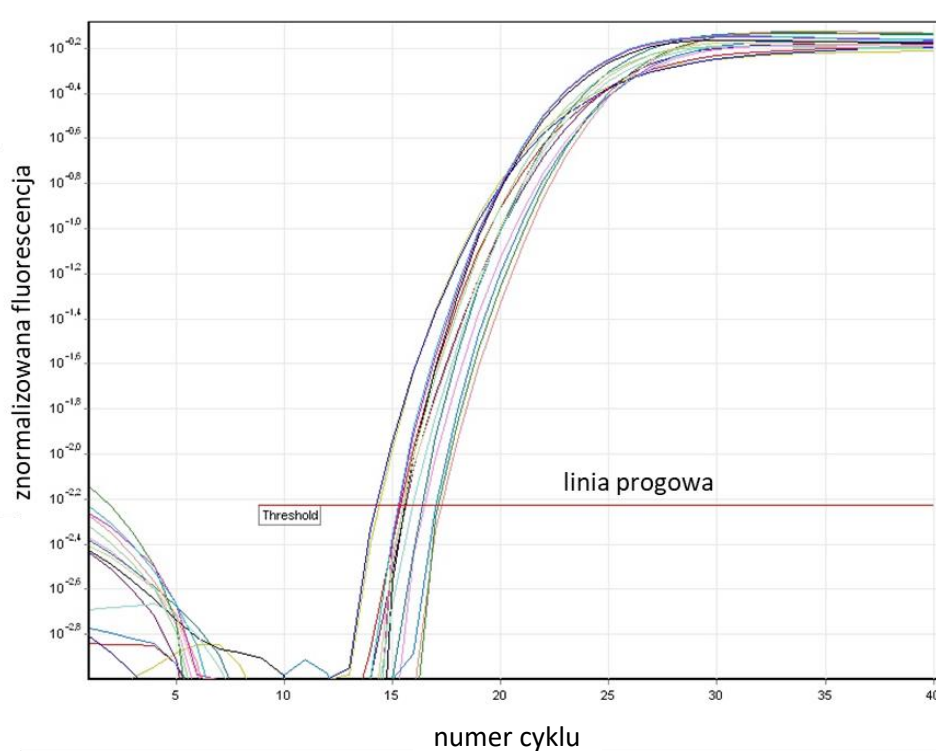
Odczynnik	Objętość (na 1 próbę)
RT HS-PCR Mix Sybr [®] B	5 µl
Primer forward (10 µM)	0,7 µl
Primer reverse (10 µM)	0,7 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	2,6 µl

Do tak sporządzonej mieszaniny dodawano po 1 µl cDNA, końcowa objętość reakcyjna wynosiła 10 µl. Doświadczenia dla genów badanych oraz genu referencyjnego przeprowadzano równolegle w osobnych probówkach. Profil termiczny reakcji przedstawiał się następująco:

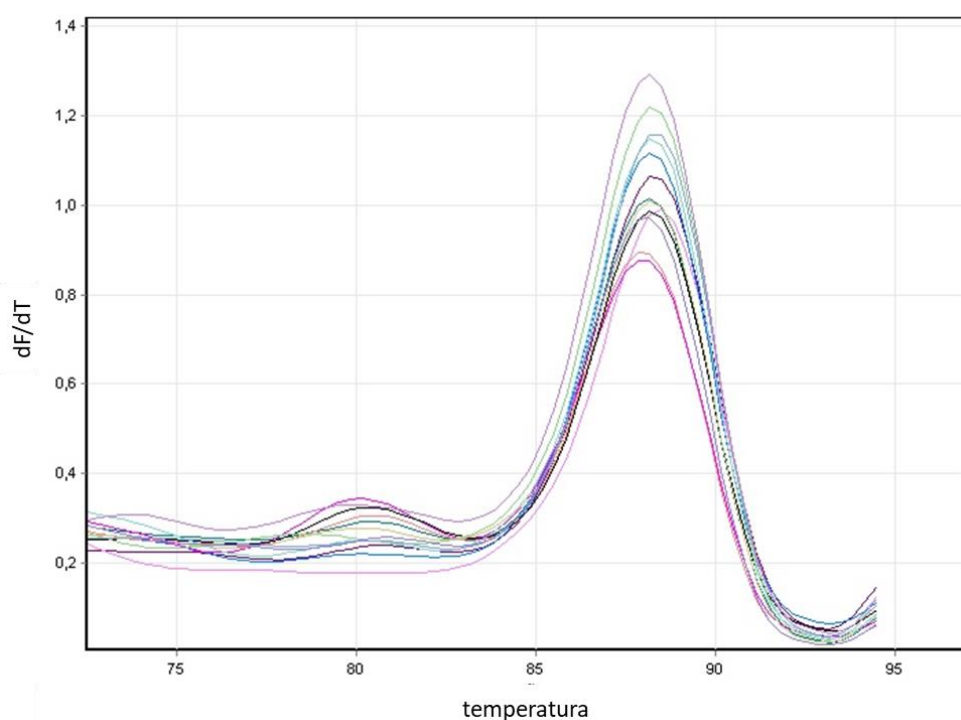
Tabela 5.11 Warunki amplifikacji dla real-time PCR

Gen	Warunki reakcji			Liczba cykli
RUNX1	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	55°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	
RUNX3	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	58°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	
CEBPA	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	56°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	

Na początku każdej reakcji real-time PCR była prowadzona wstępna denaturacja w 95°C przez 10 minut. Ze względu na użycie niespecyficznego barwnika fluorescencyjnego *SYBR Green*, w celu potwierdzenia specyficzności oraz prawidłowego przeprowadzenia doświadczenia, konieczna była analiza krzywych topnienia produktów. W tym celu po ostatnim cyklu reakcji wykonano dodatkowy etap topnienia (ang. *melt*), poprzez stopniowe podgrzewanie mieszaniny w zakresie 72 – 95°C, aż do denaturacji nici w zależności od składu nukleotydowego, uwolnienia fluorochromu oraz obserwacji gwałtownego spadku sygnału fluorescencji [Słomski, 2011; Studzińska i wsp., 2008]. Przykładowe krzywe amplifikacji oraz krzywe topnienia produktu reakcji przebiegającej dla genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* zaprezentowano na Rycinie 5.8 i 5.9.



Rycina 5.8 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu referencyjnego *GAPDH*



Rycina 5.9 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu referencyjnego *GAPDH*

Aby oszacować względne zmiany poziomu ekspresji badanych genów, w niniejszej pracy do obliczeń wykorzystano metodę podwójnej delty [Livak i wsp., 2001], wykorzystując wzór:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

gdzie:

I ΔCt (dla prób badanych): $Ct_{(gen\ badany)} - Ct_{(gen\ referencyjny)}$

II ΔCt (dla kalibratora): $\text{średnie } Ct_{(gen\ badany)} - \text{średnie } Ct_{(gen\ referencyjny)}$

$$\Delta\Delta Ct = I \Delta Ct - II \Delta Ct$$

2: wartość przy założonej wydajności reakcji obu genów równej 100%

R: względny poziom ekspresji genu; wartość współczynnika równa 1 oznacza, że poziom transkryptu w próbce kalibracyjnej i badanej są jednakowe, wartość >1 oznacza nadekspresję w próbach badanych, wartość <1 obniżoną wartość ekspresji w próbach badanych [Livak i wsp., 2001].

5.4 Badanie obecności ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*

Do zbadania obecności transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* wykorzystano wyizolowane RNA, przepisane na cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji. Proces izolacji RNA został opisany w podrozdziale 5.3.1, natomiast proces odwrotnej transkrypcji w podrozdziale 5.3.3. Analizę przeprowadzono metodą real-time (jej zasady opisano w podrozdziale 5.3.6), z wykorzystaniem zestawu *TaqMan® Gene Expression Assay* firmy *Applied Biosystems* (identyfikator testu: Hs03024752_ft, sonda MGB znakowana barwnikiem FAM™), postępując zgodnie z protokołem producenta.

Sondy TaqMan są specyficzne do amplikowanego fragmentu DNA. Sonda o długości około 20-40 nukleotydów na końcu 5' posiada cząsteczkę barwnika reporterowego (ang. *reporter*) (np. FAM, HEX, TET), natomiast na końcu 3' znajduje się wygaszacz (ang. *quencher*) (np. TAMRA, DABCYL) [Słomski, 2011]. Gdy sonda pozostaje niezhybrydyzowana, odstęp między barwnikiem a wygaszaczem jest mały i fluorescencja jest zablokowana. Podczas etapu annealingu sonda przyłącza się do specyficznego fragmentu DNA między starterami i następnie zostaje zdegradowana przez polimerazę Taq, posiadającą aktywność 5' → 3' egzonukleazy. Cząsteczki barwnika i wygaszacza zostają w ten sposób przestrzennie oddzielone, umożliwiając emisję fluorescencji, której sygnał jest wprost proporcjonalny do ilości powielanego fragmentu matrycy [Studzińska i wsp., 2008; Słomski, 2011].

Ocenę obecności transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* prowadzono w aparacie *Rotor-Gene™ 6000* firmy *Corbett Life Science, Qiagen*. W celu potwierdzenia prawidłowości otrzymanych wyników, do każdej serii pomiarowej została dołączona kontrola pozytywna, w postaci próby cDNA pochodzącej od pacjenta z AML, z potwierdzoną metodą FISH obecnością rearanżacji dla genu *RUNX1/RUNX1T1*. Dane szczegółowe dotyczące mieszaniny reakcyjnej oraz parametrów doświadczenia przedstawiają kolejno Tabela 5.12 i Tabela 5.13.

Tabela 5.12 Skład mieszaniny w reakcji z sondą TaqMan

Odczynnik	Objętość (na 1 próbę)
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl
Sonda <i>RUNX1/RUNX1T1</i> 20X TaqMan® Gene Expression Assay	1 µl
cDNA	4 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	5 µl

Tabela 5.13 Parametry amplifikacji w reakcji z sondą TaqMan

	Inkubacja	Denaturacja wstępna	Denaturacja	Annealing
			40 cykli	
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Czas	2 min	10 min	15 s	60 s

5.5 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą programu Statistica 13.1 (Statsoft Inc.).

Do oceny istotności różnic w cechach jakościowych oraz zgodności z prawem Hardy’ego Weinberga użyto testu χ^2 Pearsona. Zgodność badanych cech ilościowych z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu W Shapiro-Wilka. W przypadku rozkładów zgodnych z normalnym wyniki są prezentowane jako średnia wraz z odchyleniami standardowymi, w przypadku niezgodności z rozkładem normalnym wyniki są prezentowane jako mediana oraz rozstęp międzykwartyłowy. Jednorodność wariancji oceniano za pomocą testu Levene’a. Do oceny istotności różnic

w danych ilościowych między grupami stosowano: test t Studenta, test U Mann'a-Whitney'a, test Kruskala-Wallisa oraz analizę wariancji ANOVA. Do poszukiwania zależności między dwiema cechami ilościowymi wykorzystano ocenę korelacji r Pearsona.

We wszystkich obliczeniach wartość $p \leq 0,05$ uznawano za statystycznie istotną.

ROZDZIAŁ VI

Wyniki

6.1 Charakterystyka grupy badanej

W obrębie grupy badanej znalazło się 60 osób, w tym 22 mężczyzn (37%) oraz 38 kobiet (63%). Średnia wieku w badanej populacji wynosiła 58 lat (zakres 35-81 lat); dla kobiet średnia ta wynosiła 59 lat, dla mężczyzn 56,5 roku. Podgrupy nie różniły się między sobą istotnie statystycznie pod względem wieku ($p=0,360$).

Pacjenci zostali podzieleni na podgrupy pod względem typu białaczki. Białaczkę z linii B komórkowej rozpoznano u 47 chorych (78%), z linii T w 13 przypadkach (22%). W podgrupie B-ALL znalazło się 28 kobiet i 19 mężczyzn, natomiast w T-ALL 10 kobiet i 3 mężczyzn. Średnia wieku w przypadkach białaczki z linii B komórkowej wynosiła 57,5 roku, a z linii T komórkowej średnią wieku obliczono na 60 lat. Nie wykryto różnic istotnych statystycznie między podtypem białaczki a wiekiem ($p=0,390$).

Pacjenci zostali również scharakteryzowani pod względem szeregu parametrów, takich jak: liczba leukocytów (podanych w przeliczeniu na μl), zawartość procentowa blastów w szpiku kostnym. Oceniono u nich ponadto obecność chromosomu Philadelphia, a w podgrupie B-ALL: obecność HLA-DR i markera CD10. Pełniejsze dane pacjentów zaprezentowano w Tabeli 6.1.

Tabela 6.1 Dane demograficzno-kliniczne pacjentów

Cecha	Liczba przypadków (n=60)
Płeć	
Mężczyźni	22
Kobiety	38
Wiek (lata)	
Zakres (średnia)	35-81 (58)
Podtyp białaczki	
B-ALL	47
T-ALL	13
Leukocytoza (/μl)	
Zakres (średnia)	17000-31000 (23732)
Procentowa zawartość blastów	
Zakres (średnia)	67-99 (83)
Chromosom Philadelphia	
Obecny	4
Nieobecny	56
Marker CD10	B-ALL (n=47)
Obecny	41
Nieobecny	6
HLA-DR	B-ALL (n=47)
Obecny	44
Nieobecny	3

6.2 Ocena polimorfizmu rs2268277 oraz poziomu ekspresji genu *RUNX1*

6.2.1 Wyniki genotypowania rs2268277 G>C genu *RUNX1*

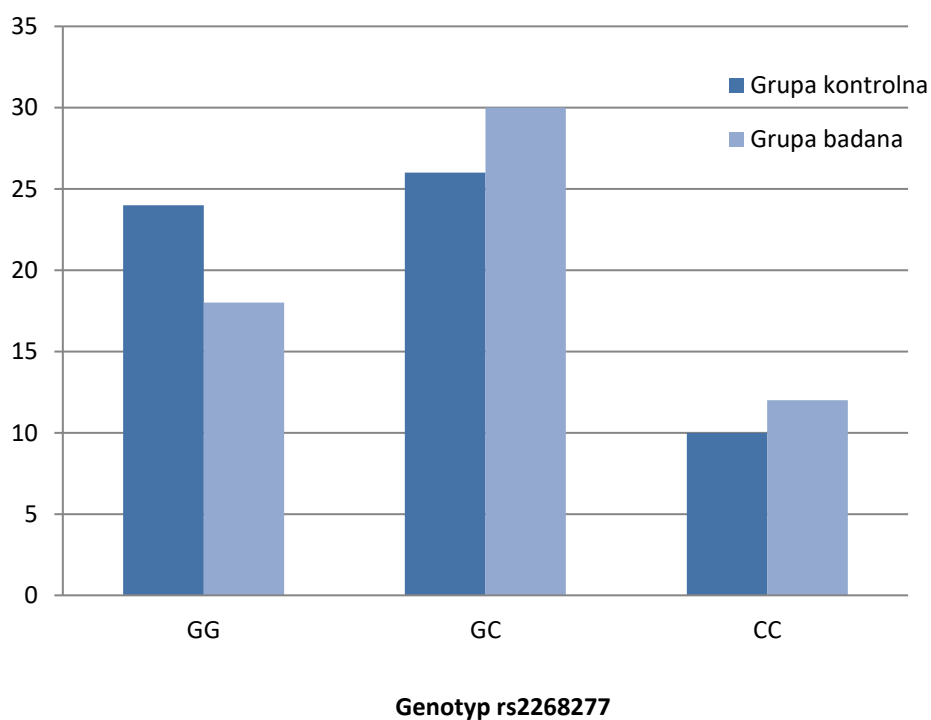
Genotypowanie pacjentów przeprowadzono z sukcesem dla wszystkich 60 prób DNA z grupy osób chorych na ALL. Badany polimorfizm oceniono również u 60 osób bez choroby nowotworowej, stanowiących grupę kontrolną, geograficznie i etnicznie zgodnych z grupą badaną.

Przeprowadzono porównanie obserwowanych częstości występowania poszczególnych genotypów z oczekiwanymi częstościami występowania zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. Obserwowane częstości występowania genotypów w obu grupach były zgodne z oczekiwanymi. Zatem obie grupy znajdują się w równowadze genetycznej wynikającej z prawa Hardy'ego Weinberga (odpowiednio $p=1,000$, $p=0,929$, test χ^2 Pearsona, Tabela 6.2). Świadczy to o prawidłowym doborze kohort oraz o ich reprezentatywności względem całej populacji.

Następnie dokonano analizy częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli. Można zaobserwować, że zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej dominującym genotypem był genotyp GC (odpowiednio 50% i 43% przypadków), homozygoty zmutowane CC występowały w obu grupach z najmniejszą liczebnością (odpowiednio 20% i 17% przypadków). Homozygoty dzikie GG częściej występowały wśród grupy kontrolnej (40% przypadków do 30% w grupie badanej). Następnie porównano liczebności alleli. Allelem dominującym w obu grupach był allel dziki G, występował on nieznacznie częściej w grupie kontrolnej (62% przypadków) niż w badanej (55% przypadków). Przeprowadzono analizę statystyczną, aby określić czy częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli między badanymi grupami różnią się między sobą. Analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic między pacjentami z ALL i zdrowymi osobami, w przypadku genotypów oraz alleli badanego SNP (odpowiednio $p=0,5154$, $p=0,2949$). Szczegółowe dane zaprezentowano w Tabeli 6.2 oraz na Rycinie 6.1.

Tabela 6.2 Rozkład częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu
RUNX1 rs2268277 dla grupy badanej i kontrolnej

Genotypy i allele		Grupa badana (%) N=60	Grupa kontrolna (%) N=60	Wartość p	OR
<i>RUNX1</i> rs2268277	GG	18 (30%)	24 (40%)	$p=0,5154$ (test χ^2 Pearsona)	1,00
	GC	30 (50%)	26 (43%)		1,54
	CC	12 (20%)	10 (17%)		1,60
	G	66 (55%)	74 (62%)	$p=0,2949$ (test χ^2 Pearsona)	1,32
	C	54 (45%)	46 (38%)		
HWE		$p=1,0000$ (test χ^2 Pearsona)	$p=0,9290$ (test χ^2 Pearsona)		



Rycina 6.1 Wykres częstości występowania poszczególnych genotypów rs2268277
w grupie badanej i grupie kontrolnej

Następnie analizie statystycznej poddano obserwowane genotypy oraz wybrane cechy demograficzne i kliniczne pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną. W pierwszej kolejności grupę badaną podzielono pod względem płci oraz podtypu białaczki. Wyniki analizy statystycznej wykazały brak istotnych różnic w częstości występowania obserwowanych genotypów między kobietami i mężczyznami ($p=0,2619$) jak również między podtypem białaczki B-ALL oraz T-ALL ($p=0,2745$). Wyniki zaprezentowano dokładniej w Tabeli 6.3.

Tabela 6.3 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX1* rs2268277 w zależności od płci oraz podtypu klinicznego białaczki w grupie badanej

Cecha / Genotyp rs2268277		GG	GC	CC	Wartość p
Płeć (n=60)	K	11 (18%)	17 (28%)	10 (17%)	$p=0,2619$ (test χ^2 Pearsona)
	M	7 (12%)	13 (22%)	2 (3%)	
Podtyp ALL (n=60)	B	13 (22%)	26 (43%)	8 (13%)	$p=0,2745$ (test χ^2 Pearsona)
	T	5 (8%)	4 (6%)	4 (6%)	

Kolejnym etapem była ocena związku między poszczególnymi genotypami oraz wiekiem w badanej grupie pacjentów. Wyniki analizy wykazały brak istotnych statystycznie różnic między genotypem a wiekiem ($p=0,3888$).

Następnie poszukiwano zależności między leukocytozą oraz odsetkiem blastów w szpiku kostnym u pacjentów z ALL a uzyskanym genotypem rs2268277. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w przypadku obu porównywanych parametrów (odpowiednio $p=0,6129$, $p=0,3053$). Wyniki podsumowano i zaprezentowano w Tabeli 6.4.

Tabela 6.4 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX1* rs2268277 w zależności od wieku, leukocytozy oraz odsetka blastów w grupie badanej

Cecha / Genotyp rs2268277		GG	GC	CC	Wartość p
Wiek (lata) n=60	Średnia	57,6	59,8	54,83	$p=0,3888$ (ANOVA)
Leukocytoza (/μl) n=60	Mediana	22 430	24 150	22 200	$p=0,6129$ (test Kruskala-Wallis)
Odsetek blastów (%) n=60	Średnia	85,78	82,10	82,92	$p=0,3053$ (ANOVA)

Wśród wszystkich badanych pacjentów określono również obecność chromosomu Philadelphia, został on wykryty u 4 osób z ALL. Przeprowadzona analiza nie wykazała istotnych statystycznie różnic w obserwowanych genotypach między osobami Ph-ujemnymi oraz Ph-dodatnimi ($p=0,4895$), wyniki podsumowano w Tabeli 6.5.

Tabela 6.5 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX1* rs2268277 w zależności od obecności chromosomu Philadelphia w grupie badanej

Cecha / Genotyp rs2268277		GG	GC	CC	Wartość p
Chromosom Ph (n=60)	Nieobecny	17 (28%)	27 (45%)	12 (20%)	$p=0,4895$ (test χ^2 Pearsona)
	Obecny	1 (2%)	3 (5%)	0 (0%)	

U 47 pacjentów z podtypem białaczki B-ALL była określona obecność markera CD10 oraz HLA-DR. U 6 osób nie wykryto markera CD10. Dominującym genotypem w tej podgrupie pacjentów był genotyp GC. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic w rozkładzie genotypów między osobami CD10-

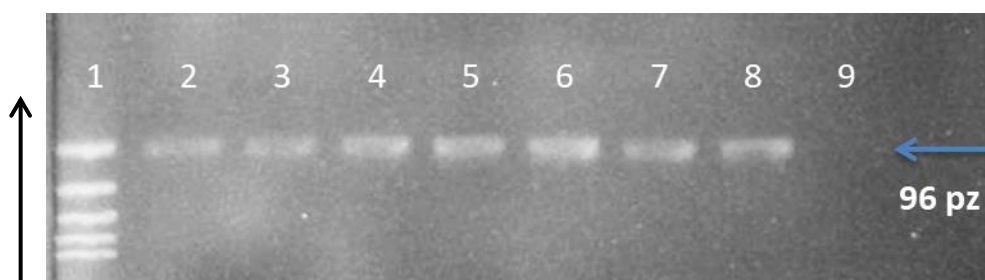
dodatnimi oraz CD10-ujemnymi ($p=0,7941$). Obecność HLA-DR nie została wykryta u 3 pacjentów, również w tym przypadku analiza nie wykazała istotności statystycznej ($p=0,7199$). Wyniki zostały podsumowane w Tabeli 6.6.

Tabela 6.6 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX1* rs2268277 w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL

Cecha / Genotyp rs2268277		GG	GC	CC	Wartość p
Marker CD10 (n=47)	Obecny	12 (26%)	22 (47%)	7 (15%)	$p=0,7941$ (test χ^2 Pearsona)
	Nieobecny	1 (2%)	4 (8%)	1 (2%)	
Ekspresja HLA-DR (n=47)	Obecna	12 (26%)	24 (51%)	8 (17%)	$p=0,7199$ (test χ^2 Pearsona)
	Nieobecna	1 (2%)	2 (4%)	0 (0%)	

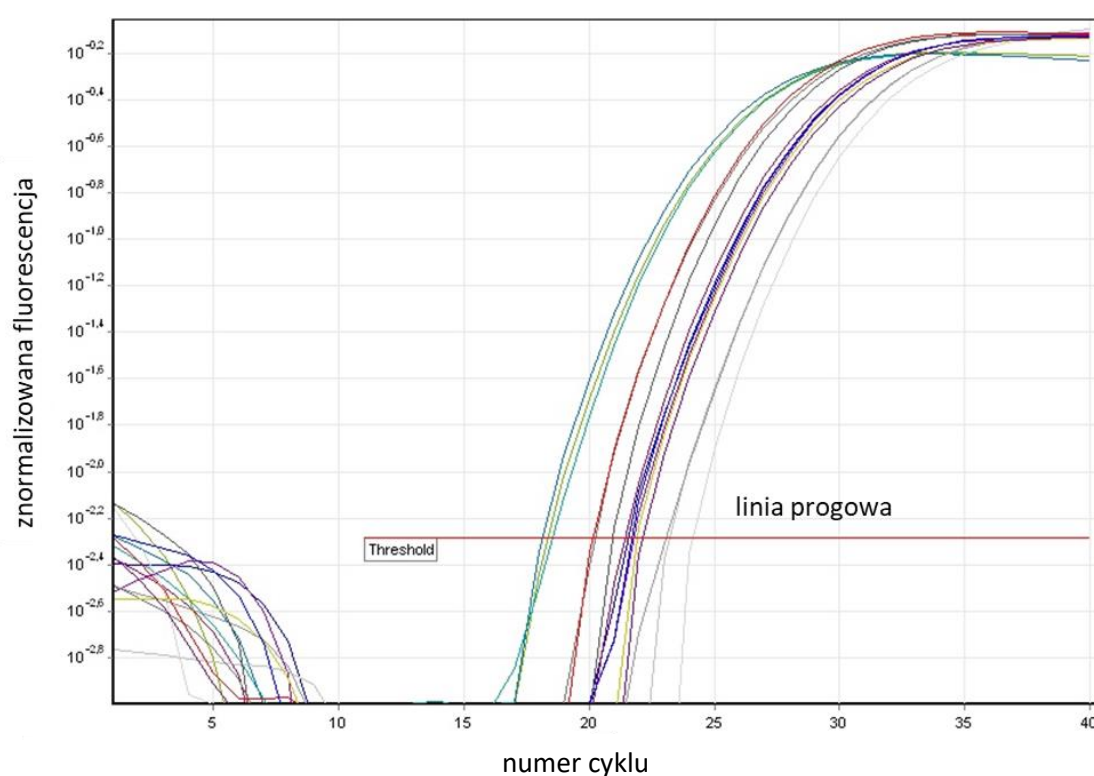
6.2.2 Analiza względnego poziomu ekspresji *RUNX1*

Po ocenie genotypowania rs2268277, przystąpiono do analizy ekspresji mRNA genu *RUNX1*. Wśród wszystkich 60 pacjentów chorych na ALL potwierdzono obecność ekspresji genu *RUNX1*, przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego przedstawiono na rycinie 6.2.

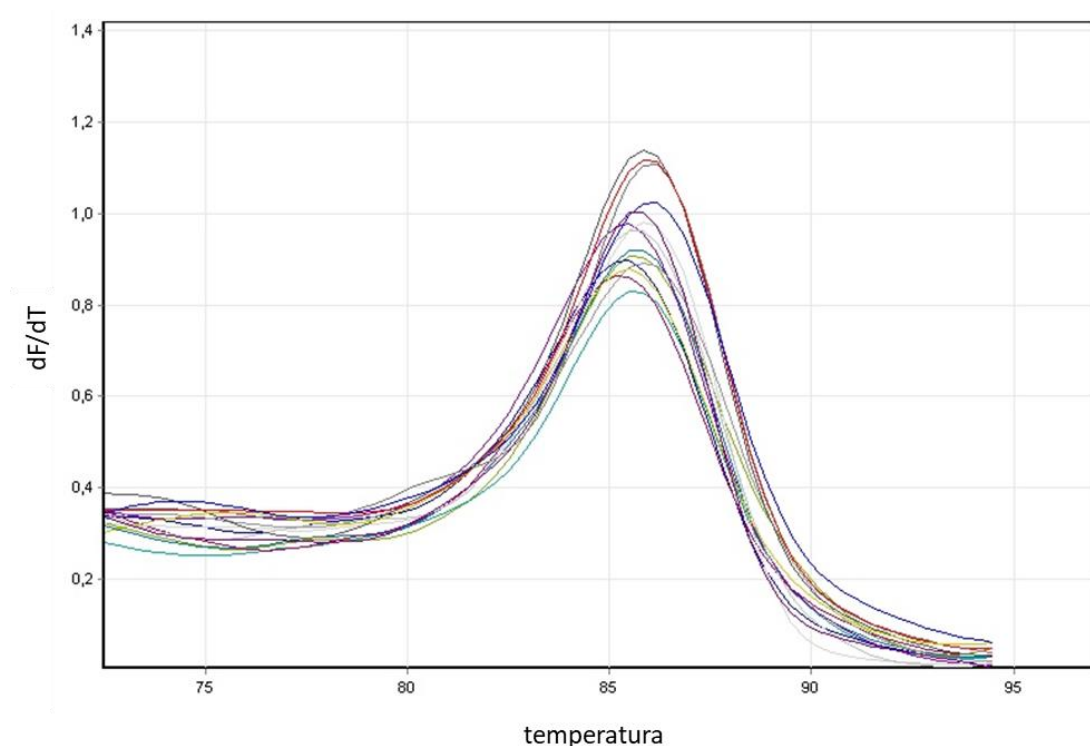


Rycina 6.2 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu *RUNX1*. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki 2-8 – próby badane, zawierające produkt o wielkości 96 pz; studzienka nr 9 – kontrola ujemna

Po analizie jakościowej przeprowadzono analizę ilościową oceny względnego poziomu ekspresji. Ekspresję genu *RUNX1* metodą ilościową real-time PCR określono u wszystkich 60 pacjentów chorych na ALL. Przykładowy wynik przeprowadzonego eksperymentu przedstawiają Ryciny 6.3 i 6.4, na których kolejno zaprezentowano krzywe amplifikacji oraz krzywe topnienia produktu reakcji.



Rycina 6.3 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu badanego *RUNX1*

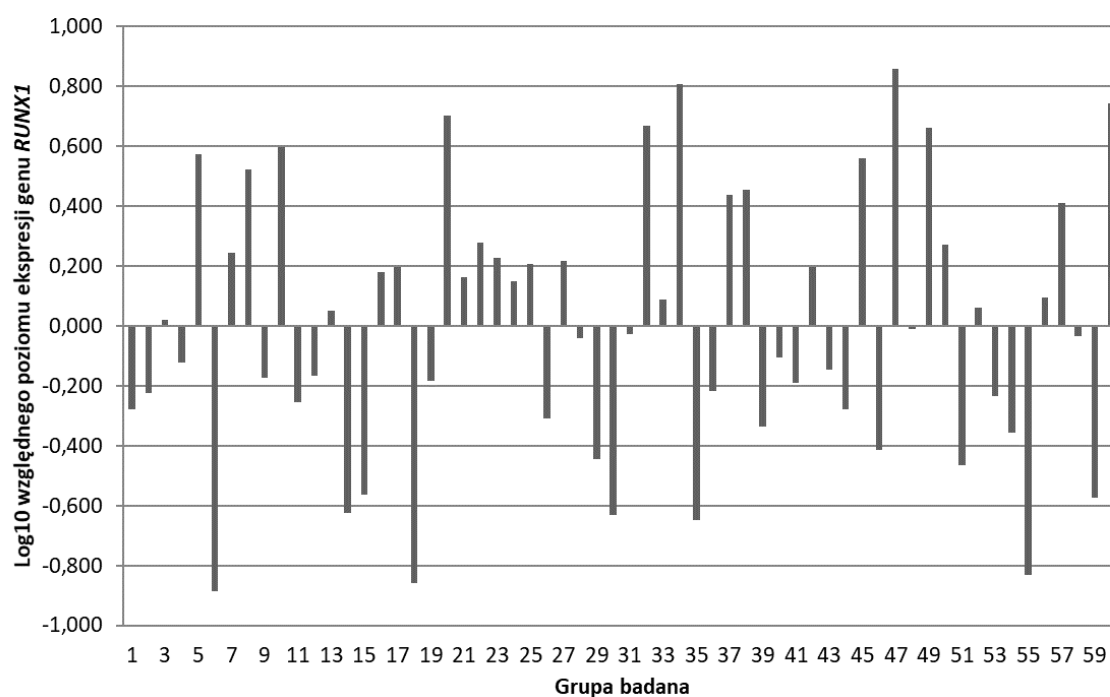


Rycina 6.4 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu badanego *RUNX1*

Po zebraniu danych eksperymentalnych wykazano, że względny poziom ekspresji był zróżnicowany w obrębie grupy badanej, wahał się od 0,13 do 7,18, z medianą o wartości 0,96. Szczegółowe wartości przedstawia Tabela 6.7 oraz Rycina 6.5, w celu przejrzystości danych wyniki na wykresie zaprezentowano jako $\log_{10}$ z wartości R określającej względny poziom ekspresji.

Tabela 6.7 Względny poziom ekspresji genu *RUNX1* w obrębie grupy badanej

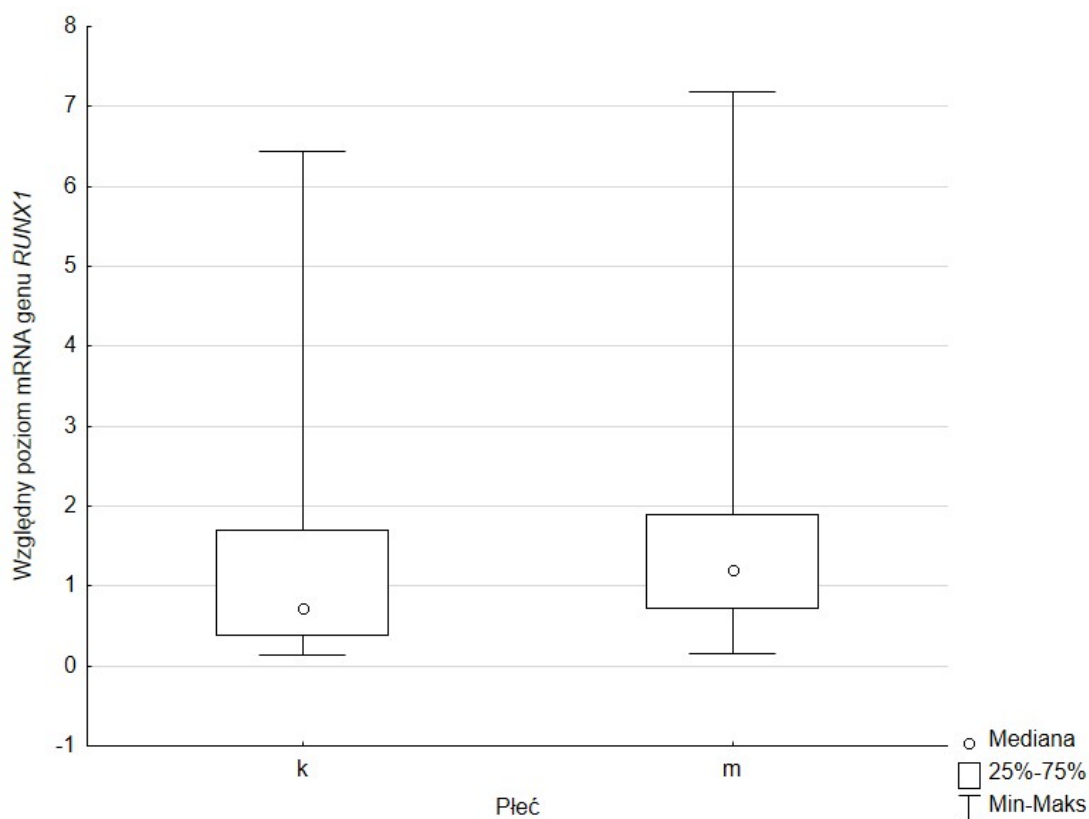
Względny poziom mRNA genu <i>RUNX1</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył
Wszystkie przypadki	60	0,957425	0,130263	7,18257	0,527107	1,813132

Rycina 6.5 Log10 względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1* wśród grupy badanej

Uzyskane wartości względnego poziomu ekspresji poddano analizie statystycznej. W pierwszym etapie oceniono względny poziom mRNA *RUNX1* w zależności od płci w badanej grupie (składającej się z 38 kobiet i 22 mężczyzn). Zaobserwowano tendencję do wyższych poziomów ekspresji w podgrupie mężczyzn (mediana 1,1938), nie wykazano jednak znaczącej różnicy, chociaż wartość p znajduje się na granicy istotności statystycznej ($p=0,0645$). (Rycina 6.6 i Tabela 6.8).

Tabela 6.8 Względny poziom ekspresji genu *RUNX1* w zależności od płci w grupie badanej

Względny poziom mRNA genu <i>RUNX1</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	Test U Manna-Whitneya
Mężczyźni	22	1,193843	0,147062	7,18257	0,715902	1,893646	$p=0,0645$
Kobiety	38	0,718663	0,130263	6,43601	0,386757	1,690949	



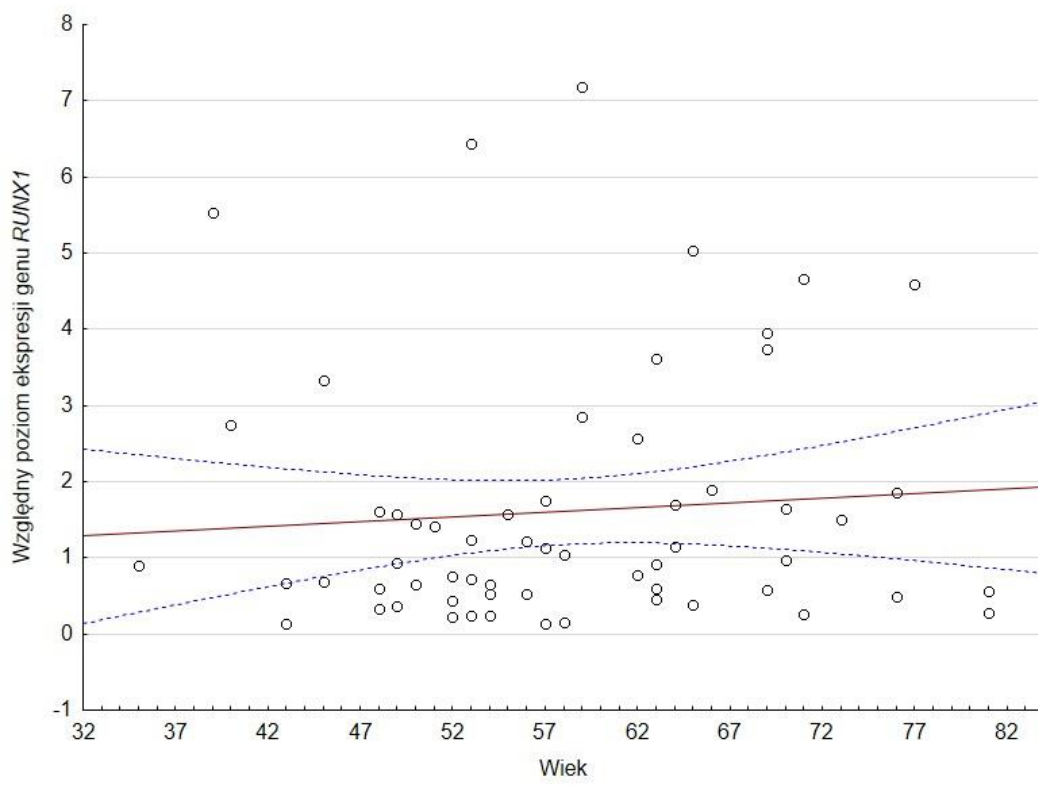
Rycina 6.6 Wykres zależności względnego poziomu ekspresji *RUNX1* od płci w grupie badanej ($p=0,0645$)

Pacjentów podzielono na podgrupy w zależności od podtypu białaczki, na: B-ALL i T-ALL. Analiza nie wykazała istotnej statystycznie różnicy między tymi dwiema podgrupami pacjentów ($p=0,2980$), jednakże mediana wartości względnego współczynnika ekspresji była nieco wyższa w przypadku podgrupy T-ALL (mediana 1,2236) (Tabela 6.9).

Tabela 6.9 Względny poziom mRNA *RUNX1* w zależności od podtypu białaczki w grupie badanej

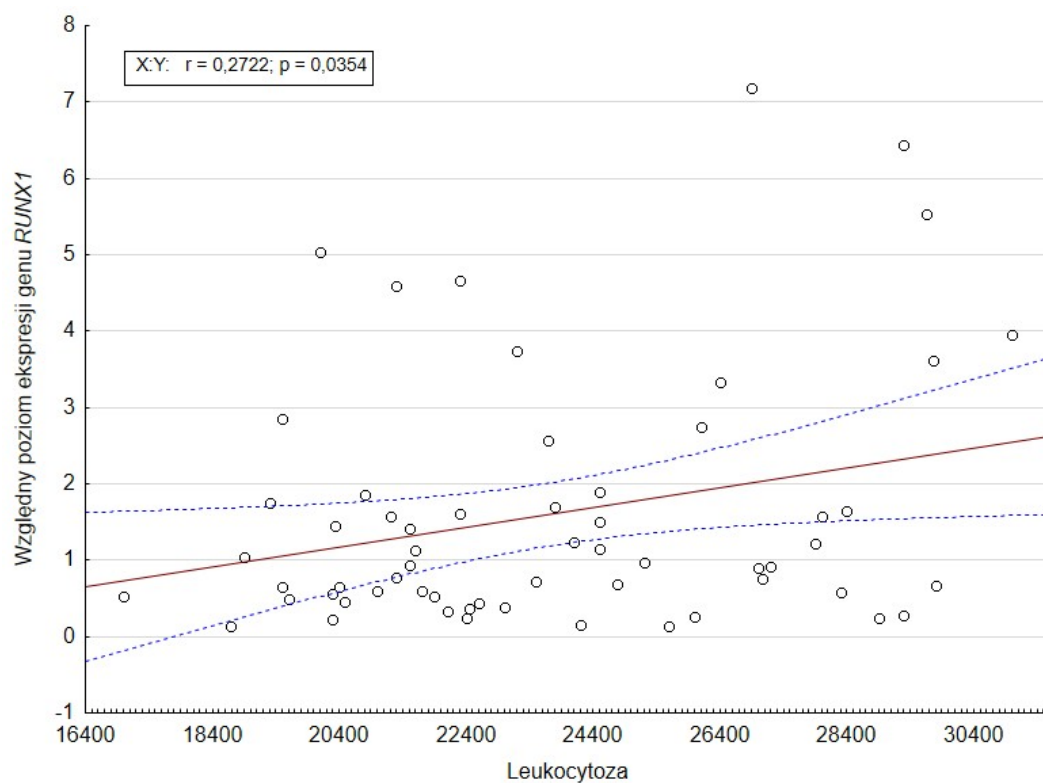
Względny poziom mRNA genu <i>RUNX1</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	Test U Manna-Whitneya
B-ALL	47	0,940283	0,130263	5,53212	0,488975	1,690949	$p=0,2980$
T-ALL	13	1,223629	0,234257	7,18257	0,655727	3,339194	

W kolejnym etapie analizy statystycznej poszukiwano związku między względnym poziomem ekspresji *RUNX1* a wiekiem grupy badanej. Ta zależność nie była istotna statystycznie ($p=0,547$), co zostało uwidocznione na Rycinie 6.7.

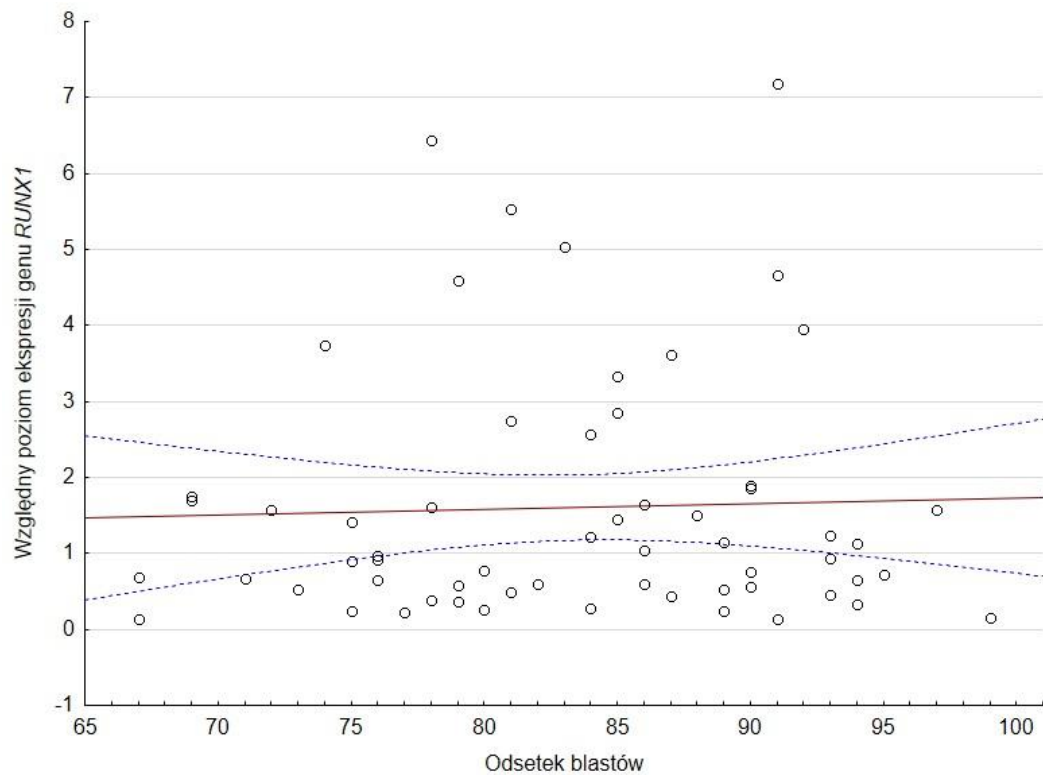


Rycina 6.7 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *RUNX1* a wiekiem w badanej grupie ($p=0,547$)

W następnym etapie poszukiwano zależności między leukocytozą oraz odsetkiem blastów w szpiku kostnym, a względnym poziomem transkryptu genu *RUNX1*. Analiza statystyczna wykazała istotną dodatnią korelację między poziomem mRNA *RUNX1* a leukocytozą ($p=0,0354$, $r=0,27$). Wyższe względne poziomy ekspresji transkryptu badanego genu stwierdzono u pacjentów z wyższą leukocytozą, co obrazuje Rycina 6.8. Z drugiej strony badanie nie ujawniło żadnej istotnej korelacji między genem *RUNX1* a odsetkiem blastów w szpiku ($p=0,786$), co zaprezentowano na Rycinie 6.9.



Rycina 6.8 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *RUNX1* a leukocytozą wśród grupy badanej ($p=0.0354$)



Rycina 6.9 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *RUNX1* a odsetkiem blastów w szpiku kostnym u pacjentów z ALL ($p=0,786$)

W następnym etapie analizy porównywano względne poziomy ekspresji genu *RUNX1* w zależności od obecności chromosomu Philadelphia w obrębie całej grupy badanej. Analiza nie wykazała istotnych statystycznie różnic w poziomie mRNA *RUNX1* między podgrupami Ph+ i Ph- ($p=0,3661$). Wyniki podsumowano w Tabeli 6.10.

Tabela 6.10 Względny poziom mRNA *RUNX1* w zależności od obecności chromosomu Ph w grupie badanej

Względny poziom mRNA genu <i>RUNX1</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	Test U Manna-Whitneya
Chromosom Ph -	56	0,931673	0,130263	6,43601	0,507737	1,813132	$p=0,3661$
Chromosom Ph +	4	1,083340	0,908253	7,182569	0,975781	4,152970	

Poszukiwano także zależności między względnym poziomem transkryptu genu *RUNX1* a obecnością antygenu CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów z B-ALL. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie różnic między podgrupami pacjentów CD10-dodatnimi i CD10-ujemnymi ($p=0,9873$) oraz między HLA-DR dodatnimi i ujemnymi ($p=0,5864$). Wyniki ujęto szerzej i podsumowano w Tabeli 6.11.

Tabela 6.11 Względny poziom mRNA *RUNX1* w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL

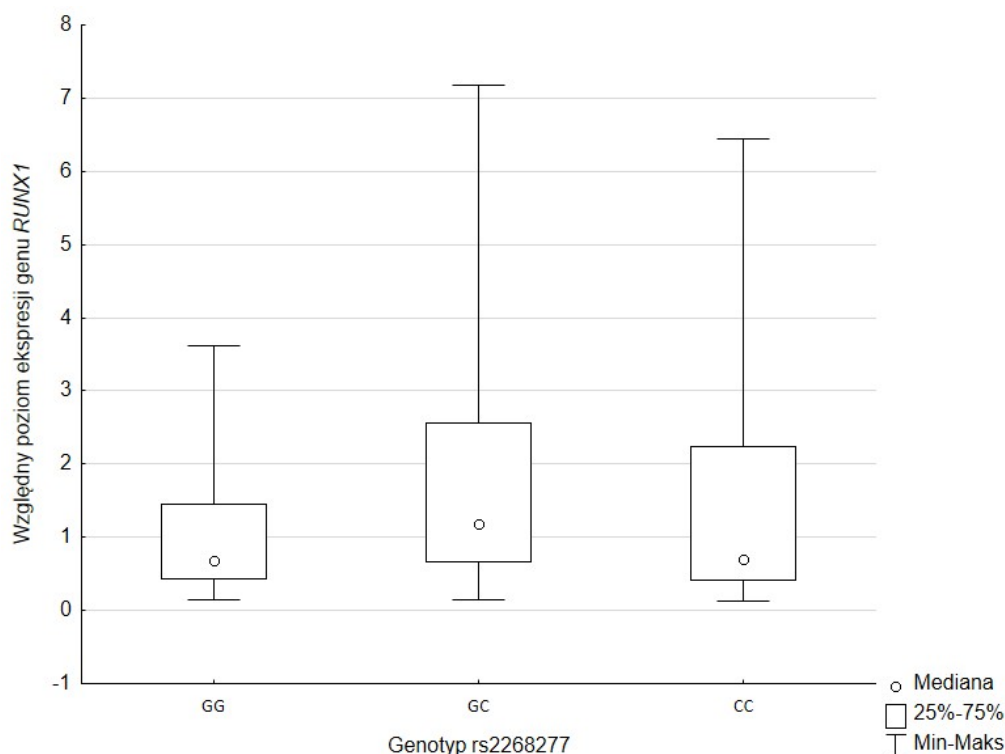
Względny poziom mRNA genu <i>RUNX1</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
Marker CD10 +	41	0,940283	0,130263	5,03212	0,526498	1,690949	$p=0,9873$
Marker CD10 -	6	1,144032	0,237253	5,532123	0,266924	1,572253	
HLA-DR +	44	0,924268	0,130263	5,03212	0,507737	1,652769	$p=0,5864$
HLA-DR -	3	1,572253	0,237253	5,532123	0,237253	5,532123	

6.2.3 Analiza zależności między genotypem rs2268277 a względnym poziomem ekspresji RUNX1

Poszukiwano następnie związku między genotypem rs2268277 a względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1*. Po wykonanej analizie statystycznej stwierdzono, że poszczególne genotypy dla badanego polimorfizmu nie mają istotnego statystycznie wpływu na względny poziom ekspresji genu *RUNX1* ($p=0,1926$, Tabela 6.12). Jakkolwiek warto zauważyć, iż ekspresja transkryptu genu była nieznacznie wyższa w przypadku genotypów GC (mediana 1,185, Rycina 6.10), może to świadczyć o potencjalnym wpływie heterozygot na regulację ekspresji.

Tabela 6.12 Zależność między genotypem polimorfizmu *RUNX1* rs2268277 a względnym poziomem ekspresji *RUNX1* w grupie badanej

Genotyp rs2268277		GG	GC	CC	Wartość p
Względny poziom ekspresji <i>RUNX1</i>	Mediana	0,686	1,185	0,695	$p=0,1926$ (test Kruskala-Wallis)



Rycina 6.10 Wykres zależności między genotypem polimorfizmu *RUNX1* rs2268277 a względnym poziomem ekspresji *RUNX1*, wśród pacjentów z ALL ($p=0,1926$)

6.3 Ocena polimorfizmu rs6672420 oraz poziomu ekspresji genu *RUNX3*

6.3.1 Wyniki genotypowania rs6672420 A>T genu *RUNX3*

Dla polimorfizmu rs6672420 genotypowanie przeprowadzono z sukcesem we wszystkich 60 próbach DNA z grupy osób chorych na ALL oraz w 60 próbach DNA pochodzących od osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną, geograficznie i etnicznie zgodnych z grupą badaną.

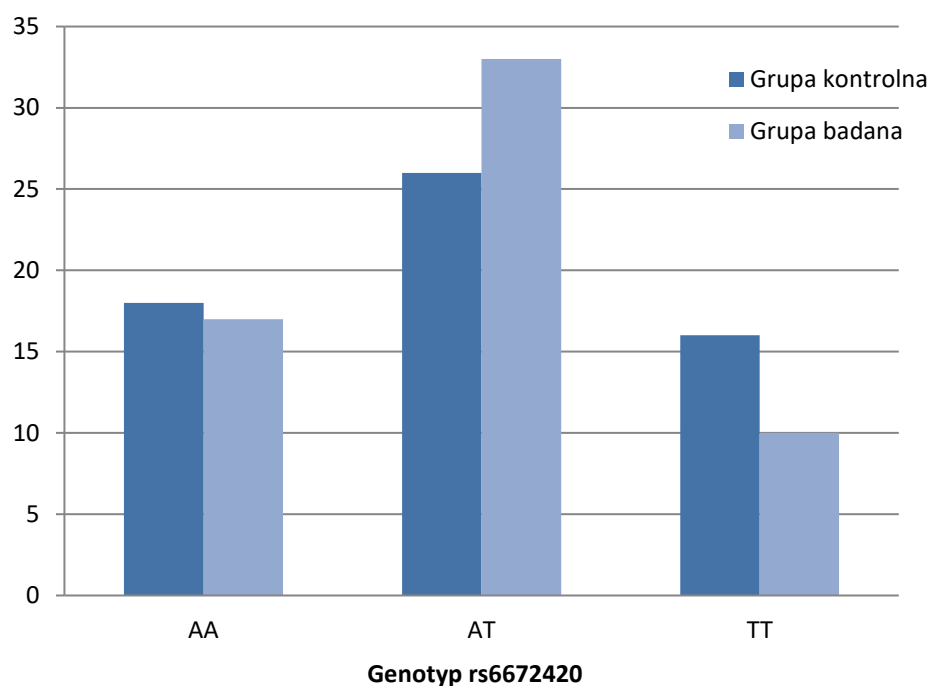
W pierwszej kolejności przeprowadzono porównanie obserwowanych częstości występowania genotypów z ich częstościami oczekiwanymi zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. Ponieważ zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej obserwowane częstości występowania genotypów były zgodne z częstościami oczekiwanymi, obie grupy znajdują się w równowadze genetycznej i są zgodne z prawem Hardy'ego

Weinberga (odpowiednio $p=0,759$ i $p=0,765$, test χ^2 Pearsona). Świadczy to o reprezentatywności grupy oraz prawidłowym doborze kohort.

Dokonano następnie analizy częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli. Można zaobserwować, że zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej dominującym genotypem był genotyp AT (odpowiednio 55% i 43% przypadków), homozygoty zmutowane TT występowały w obu grupach z najmniejszą licznością (odpowiednio 17% i 27% przypadków). Homozygoty dzikie AA występowały z niemal równą licznością wśród grupy badanej i kontrolnej (odpowiednio 28% i 30%). Następnie porównano licznosci alleli w obu grupach. Allelem dominującym w obu grupach był allel dziki A, występował on nieznacznie częściej w grupie badanej (56% przypadków) niż w kontrolnej (52% przypadków). Przeprowadzono analizę statystyczną, aby określić czy częstości występowania genotypów oraz alleli między wybranymi grupami różniły się między sobą istotnie statystycznie. Podczas analizy statystycznej, gdy porównano częstości rozkładów genotypów oraz alleli tego SNP, nie zaobserwowano znaczących różnic między pacjentami z ALL i zdrowymi osobami, (odpowiednio $p=0,3257$, $p=0,5174$). Wyniki podsumowano w Tabeli 6.13 oraz na Rycinie 6.11.

Tabela 6.13 Rozkład częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu *RUNX3* rs6672420 dla grupy badanej i kontrolnej

Genotypy i allele		Grupa badana (%) N=60	Grupa kontrolna (%) N=60	Wartość p	OR
<i>RUNX3</i> rs6672420	AA	17 (28%)	18 (30%)	$p=0,3257$ (test χ^2 Pearsona)	1,00
	AT	33 (55%)	26 (43%)		1.34
	TT	10 (17%)	16 (27%)		0,66
	A	67 (56%)	62 (52%)	$p=0,5174$ (test χ^2 Pearsona)	0,85
	T	53 (44%)	58 (48%)		
HWE		$p=0,759$ (test χ^2 Pearsona)	$p=0,765$ (test χ^2 Pearsona)		



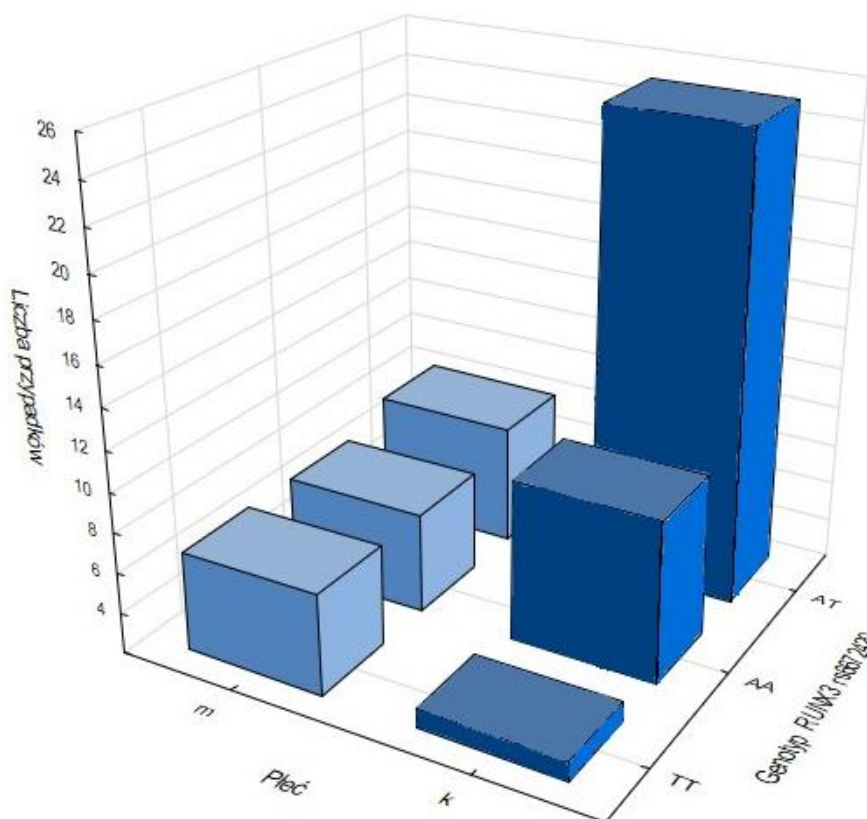
Rycina 6.11 Wykres obserwowanych liczności poszczególnych genotypów rs6672420 w grupie badanej i grupie kontrolnej

Następnie analizie statystycznej poddano zależności między obserwowanymi genotypami a wybranymi cechami demograficznymi i klinicznymi pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną. W pierwszej kolejności grupę badaną podzielono pod względem płci oraz podtypu białaczki. Wyniki analizy statystycznej wykazały istotną statystycznie zależność między płcią pacjentów a genotypem ($p=0,0283$, Rycina 6.12). Wśród kobiet zdecydowanie częściej występuje genotyp AT, jednak wydaje się nie mieć to zastosowania klinicznego, ponieważ nie obserwuje się różnic w przebiegu ALL w zależności od płci.

Po podziale pacjentów według podtypu białaczki, nie wykryto istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów obserwowanych wśród pacjentów B-ALL oraz T-ALL ($p=0,7501$). Wyniki podsumowano i zaprezentowano w Tabeli 6.14.

Tabela 6.14 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX3* rs6672420 w zależności od płci oraz podtypu klinicznego białaczki w grupie badanej

Cecha / Genotyp rs6672420		AA	AT	TT	Wartość p
Płeć (n=60)	K	10 (17%)	25 (42%)	3 (5%)	$p=0,0283$ (test χ^2 Pearsona)
	M	7 (12%)	8 (13%)	7 (12%)	
Podtyp ALL (n=60)	B	14 (23%)	26 (43%)	7 (12%)	$p=0,7501$ (test χ^2 Pearsona)
	T	3 (5%)	7 (12%)	3 (5%)	



Rycina 6.12 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu rs6672420 *RUNX3* w zależności od płci ($p=0,0283$)

Kolejnym etapem była ocena zależności między poszczególnymi genotypami oraz wiekiem w badanej grupie pacjentów. Wyniki analizy statystycznej wykazały brak istotnych różnic między genotypem a wiekiem ($p=0,2251$), aczkolwiek warto zauważyć, że wariant TT był obserwowany częściej wśród młodszych pacjentów (średnia wieku dla tego genotypu to 53 lata w porównaniu do średniego wieku całej grupy badanej wynoszącego 58 lat). Następnie poszukiwano zależności między leukocytozą oraz odsetkiem blastów w szpiku kostnym u pacjentów z ALL a uzyskanym genotypem rs6672420. Nie odnaleziono różnic istotnych statystycznie w przypadku obu porównywanych parametrów (odpowiednio $p=0,8836$, $p=0,4778$). Wyniki podsumowano i zaprezentowano dokładniej w Tabeli 6.15.

Tabela 6.15 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX1* rs6672420 w zależności od wieku, leukocytozy oraz odsetka blastów w grupie badanej

Cecha / Genotyp rs6672420		AA	AT	TT	Wartość p
Wiek (lata) n=60	Średnia	60,1	58,6	53,0	$p=0,2251$ (ANOVA)
Leukocytoza (/μl) n=60	Mediana	23 200	23 000	23 200	$p=0,8836$ (test Kruskala-Wallis)
Odsetek blastów (%) n=60	Średnia	83,00	82,70	86,20	$p=0,4778$ (ANOVA)

W następnym etapie analizy poszukiwano zależności między wystąpieniem danego wariantu polimorficznego a obecnością chromosomu Philadelphia. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy częstością występowania genotypów dla badanego SNP między osobami Ph-ujemnymi oraz Ph-dodatnimi ($p=0,1732$), aczkolwiek warto zauważyć, że wszystkie osoby z obecnym chromosomem Ph zakwalifikowano jako heterozygoty AT, jednakże cała ta podgrupa liczyła tylko 4 przypadki. Wyniki podsumowano w Tabeli 6.16.

Tabela 6.16 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX3* rs6672420 w zależności od obecności chromosomu Philadelphia w grupie badanej

Cecha / Genotyp rs6672420		AA	AT	TT	Wartość p
Chromosom Ph (n=60)	Nieobecny	17 (28%)	29 (48%)	10 (17%)	$p=0,1732$ (test χ^2 Pearsona)
	Obecny	0 (0%)	4 (7%)	0 (0%)	

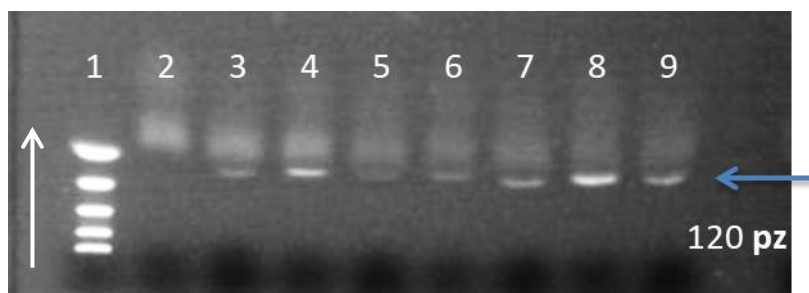
Poszukiwano także zależności między obserwowanym genotypem a obecnością antygeny CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów z B-ALL. Przeprowadzona analiza wykazała brak istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów między osobami CD10-dodatnimi oraz CD10-ujemnymi ($p=0,2188$). Również w przypadku analizy dotyczącej HLA-DR nie wykazano istotności statystycznej w częstości występowania obserwowanych genotypów ($p=0,4146$). Wyniki zostały podsumowane w Tabeli 6.17.

Tabela 6.17 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *RUNX3* rs6672420 w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL

Cecha / Genotyp rs6672420		AA	AT	TT	Wartość p
Marker CD10 (n=47)	Obecny	14 (30%)	21 (45%)	6 (13%)	$p=0,2188$ (test χ^2 Pearsona)
	Nieobecny	0 (0%)	5 (10%)	1 (2%)	
Ekspresja HLA-DR (n=47)	Obecna	14 (30%)	24 (51%)	6 (13%)	$p=0,4146$ (test χ^2 Pearsona)
	Nieobecna	0 (0%)	2 (4%)	1 (2%)	

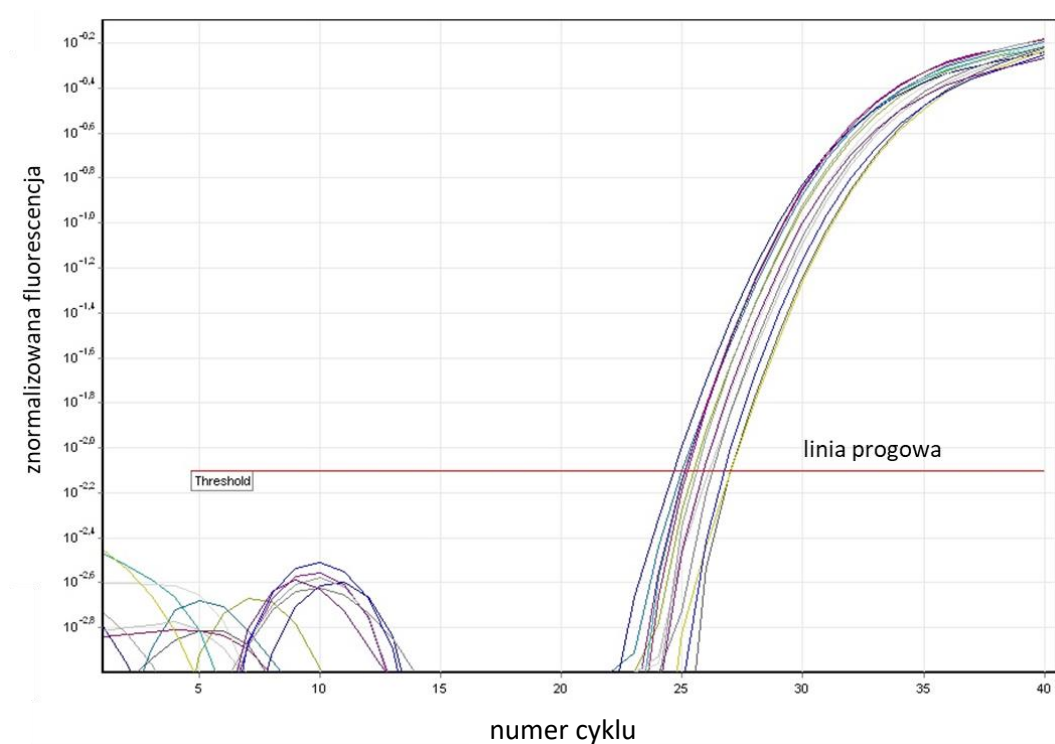
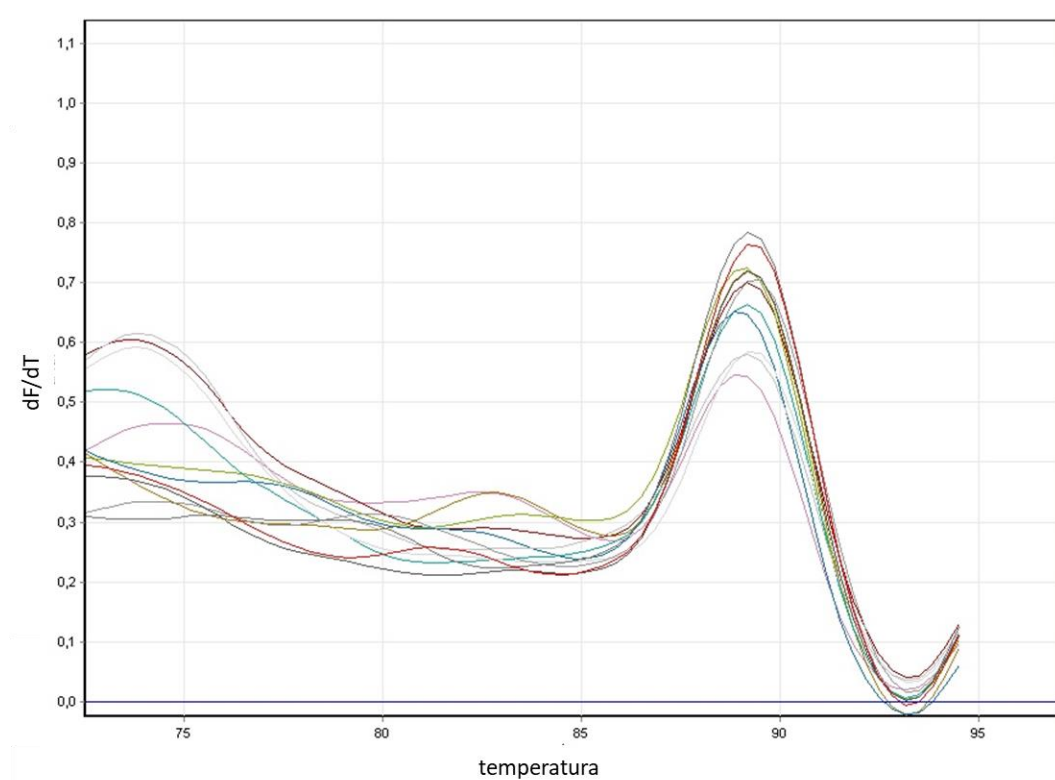
6.3.2 Analiza względnego poziomu ekspresji *RUNX3*

Po ocenie genotypowania rs6672420, przystąpiono do analizy poziomu mRNA genu *RUNX3*. Wśród wszystkich 60 pacjentów chorych na ALL wykryto jakościowo obecność ekspresji genu *RUNX3*, przykładowy wynik przedstawiono na rycinie 6.13.



Rycina 6.13 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu *RUNX3*. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienka nr 2 – kontrola ujemna; studzienki 2-9 – próby badane, zawierające produkt o wielkości 120 pz.

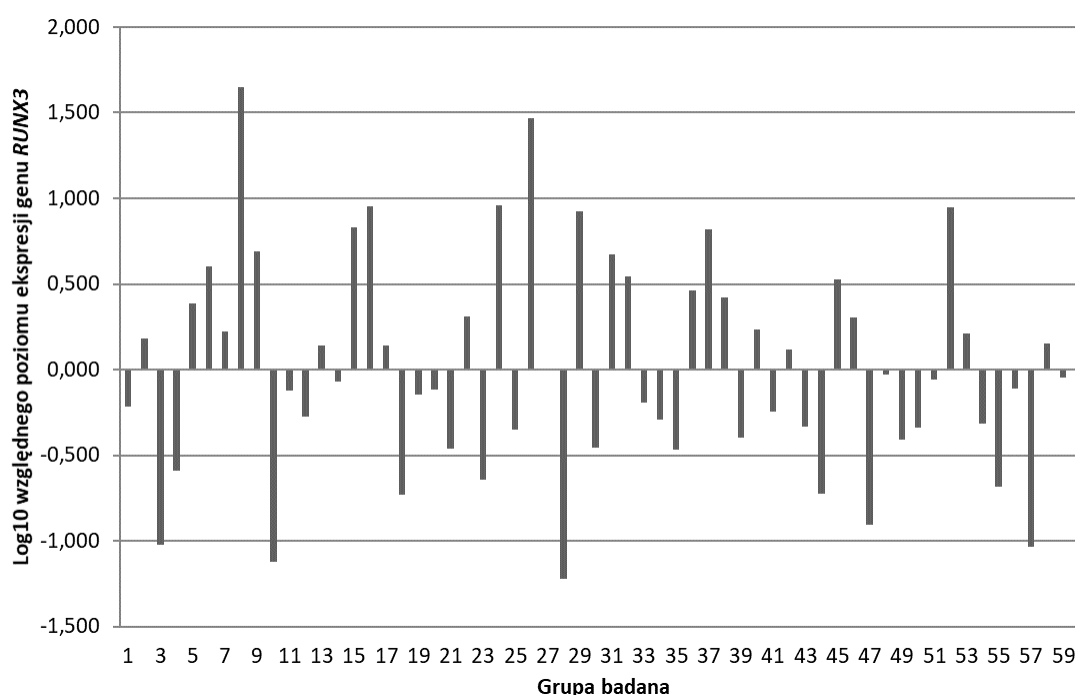
Po analizie jakościowej przeprowadzono analizę ilościową oceny względnego poziomu ekspresji. Poziom ekspresji genu *RUNX3* metodą ilościową real-time PCR określono u wszystkich 60 pacjentów chorych na ALL. Przykładowy wynik przeprowadzonego eksperymentu przedstawiają Ryciny 6.14 i 6.15, na których kolejno zaprezentowano krzywe amplifikacji oraz krzywe topnienia produktu.

Rycina 6.14 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu badanego *RUNX3*Rycina 6.15 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu badanego *RUNX3*

Uzyskane wyniki wykazały, że względny poziom ekspresji był zróżnicowany w obrębie grupy badanej i wahał się od 0,06 do 44,62, z medianą o wartości 0,86. Szczegółowe wartości przedstawia Tabela 6.18 oraz Rycina 6.16. W celu czytelności i przejrzystości danych na wykresie wyniki zaprezentowano jako $\log_{10}$ z wartości R określającej względny poziom ekspresji.

Tabela 6.18 Względny poziom ekspresji genu *RUNX3* w obrębie grupy badanej

Względny poziom mRNA genu <i>RUNX3</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl
Wszystkie przypadki	60	0,860400	0,059937	44,61891	0,394278	2,536959



Rycina 6.16 Log10 względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3* wśród grupy badanej

Następnie uzyskane wartości względnego poziomu ekspresji poddano analizie statystycznej. W pierwszej kolejności poszukiwano zależności między względnym poziomem ekspresji genu *RUNX3* a płcią pacjentów. Analiza wykazała brak statystycznie istotnych różnic w poziomie mRNA genu *RUNX3* w zależności od płci ($p=0,6181$) (Tabela 6.19).

Tabela 6.19 Względny poziom ekspresji genu *RUNX3* w zależności od płci w grupie badanej

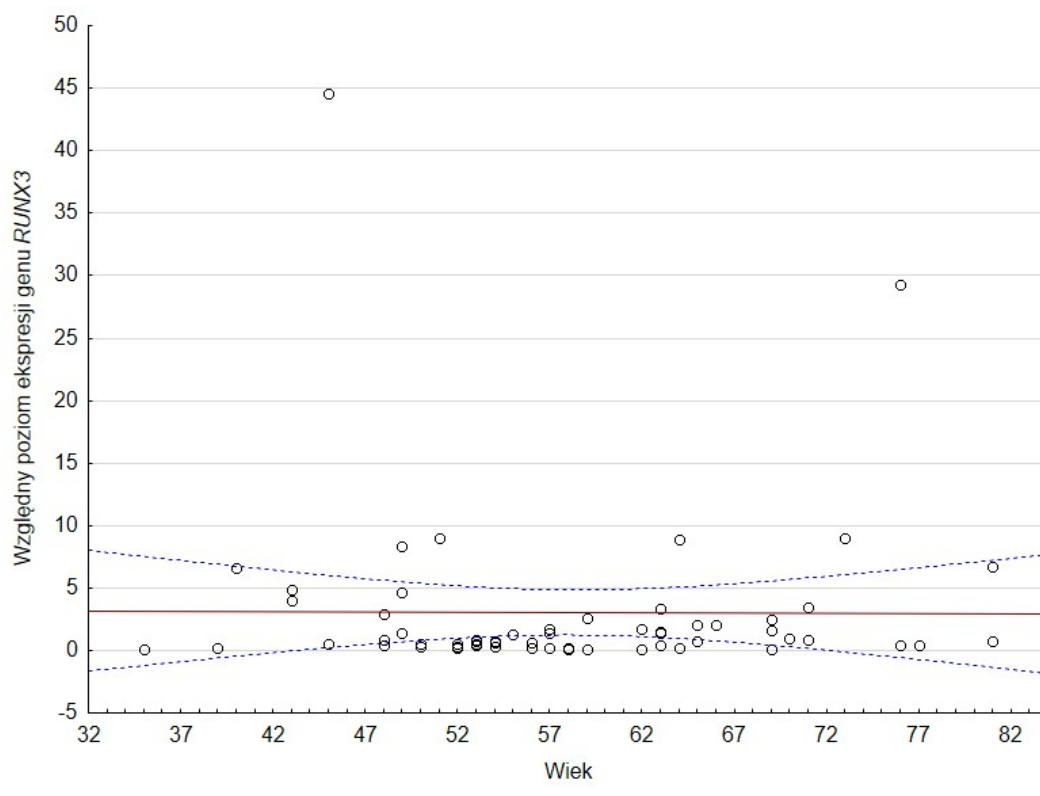
Względny poziom mRNA genu <i>RUNX3</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
Mężczyźni	22	0,770494	0,095364	8,85351	0,448418	1,677427	$p=0,6181$
Kobiety	38	0,888197	0,059937	44,61891	0,350605	2,910466	

Następnym etapem analizy była ocena względnego poziomu ekspresji *RUNX3* według podtypu białaczki, pacjenci zostali podzieleni na podgrupy B-ALL i T-ALL. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnej różnicy między tymi dwiema podgrupami pacjentów ($p=0,6798$) (Tabela 6.20).

Tabela 6.20 Względny poziom mRNA *RUNX3* w zależności od podtypu białaczki w grupie badanej

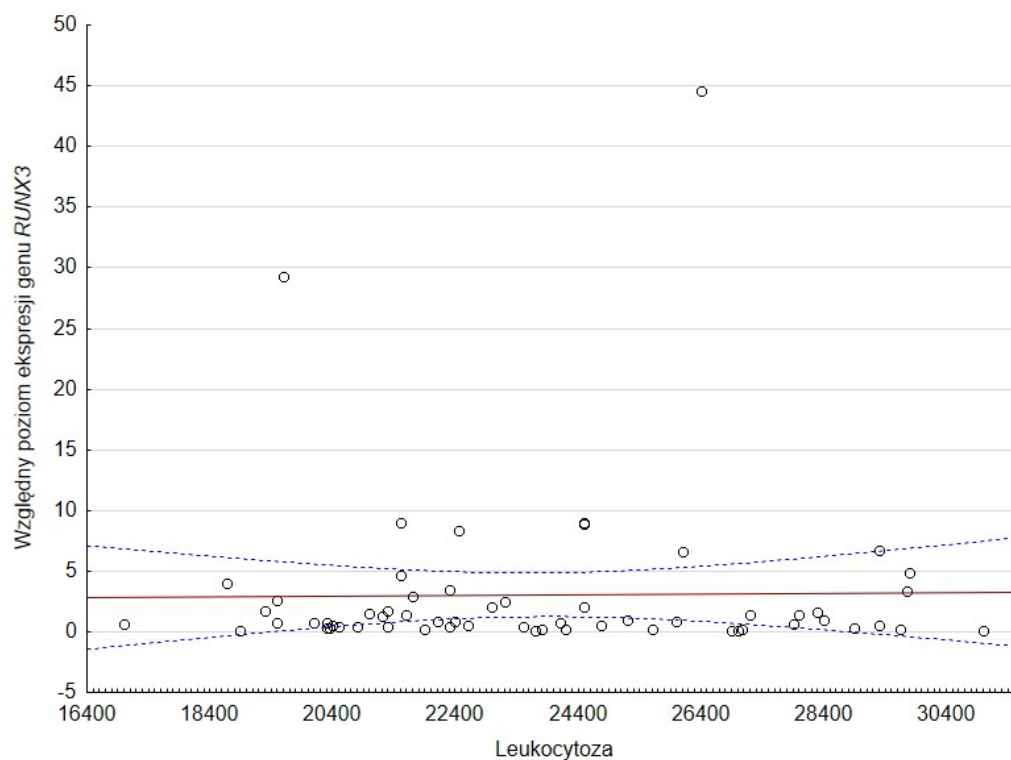
Względny poziom mRNA genu <i>RUNX3</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
B-ALL	47	0,847479	0,059937	29,30179	0,387674	2,632165	$p=0,6798$
T-ALL	13	0,992806	0,124101	44,61891	0,511539	2,032023	

Następnie oceniono względny poziom ekspresji *RUNX3* według wieku w badanej grupie. Korelacja ta nie była istotna statystycznie ($p=0,953$), co zilustrowano na Rycinie 6.17.

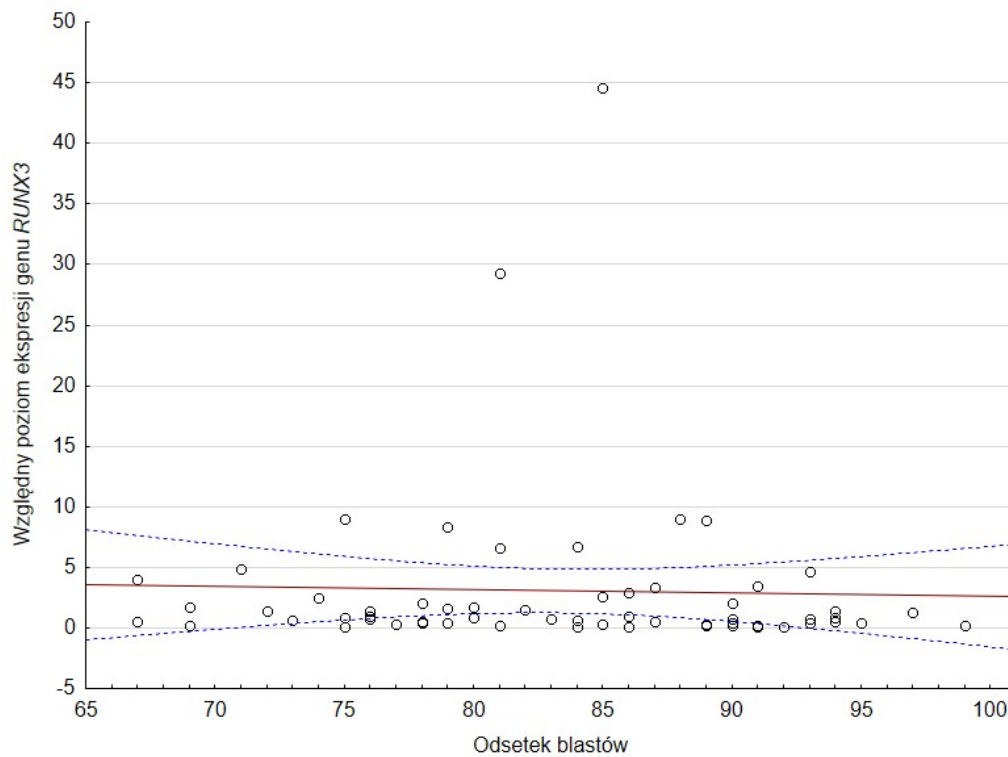


Rycina 6.17 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *RUNX3* a wiekiem w grupie badanej

Następnym etapem analizy statystycznej było poszukiwanie zależności między względnym poziomem transkryptu genu *RUNX3* a leukocytozą oraz procentową zawartością blastów w szpiku kostnym. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności między badanymi parametrami a względnym poziomem mRNA genu *RUNX3* (odpowiednio $p=0,910$, $p=0,808$), wyniki korelacji zaprezentowano na rycinach (Rycina 6.18 oraz Rycina 6.19).



Rycina 6.18 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *RUNX3* a leukocytozą w grupie badanej ($p=0,910$)

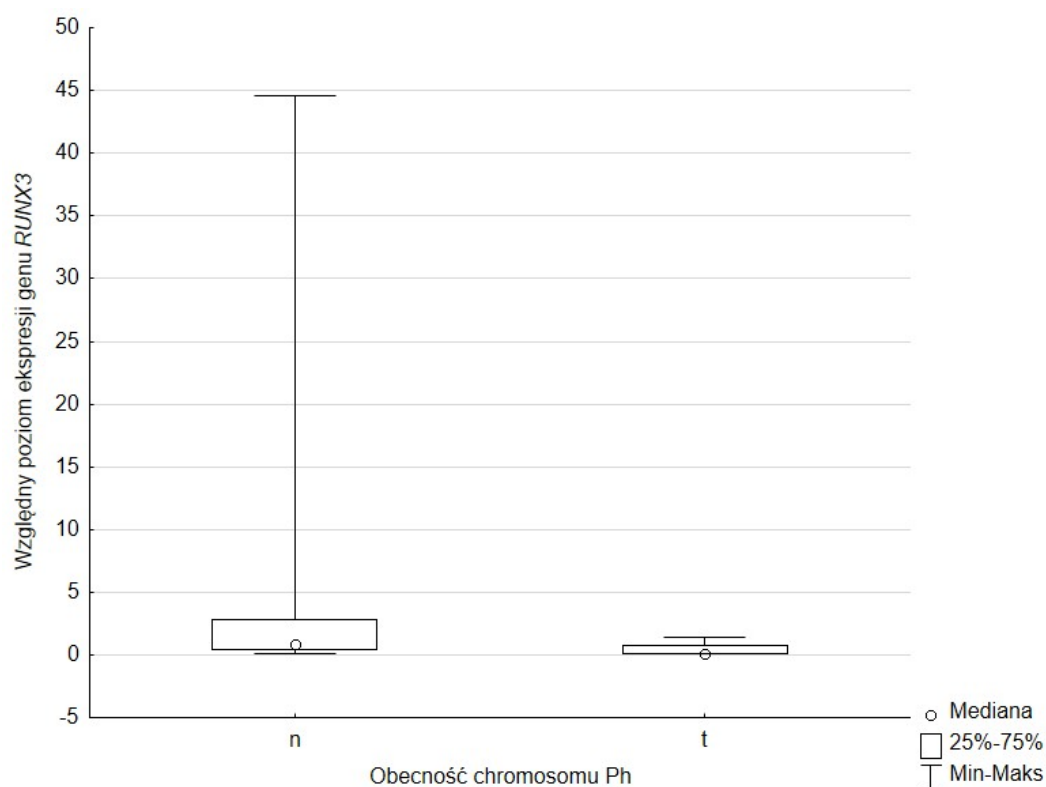


Rycina 6.19 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *RUNX3* a odsetkiem blastów w szpiku kostnym w grupie badanej ($p=0,808$)

W następnym etapie analizy oceniano związek względnych poziomów ekspresji genu *RUNX3* w zależności od obecności chromosomu Philadelphia w obrębie całej grupy badanej (Tabela 6.21). Osoby z obecnym chromosomem Philadelphia wykazywały niższy względny poziom ekspresji transkryptu genu *RUNX3*, co zaprezentowano na Rycinie 6.20, niż osoby u których nie wykryto obecności chromosomu Philadelphia, była to zależność istotna statystycznie ($p=0,0273$). Chromosom Ph wydaje się ujemnie regulować poziom transkryptu genu *RUNX3*, jednak występuje duża dysproporcja w liczności między dwiema podgrupami.

Tabela 6.21 Względny poziom mRNA *RUNX3* w zależności od obecności chromosomu Ph w grupie badanej

Względny poziom mRNA genu <i>RUNX3</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	Test U Manna-Whitneya
Chromosom Ph -	56	0,888197	0,075690	44,61891	0,453659	2,771315	$p=0,0273$
Chromosom Ph +	4	0,109732	0,059937	1,384709	0,077650	0,754405	



Rycina 6.20 Wykres zależności względnego poziomu ekspresji *RUNX3* od obecności chromosomu Philadelphia wśród grupy badanej

Następnie poszukiwano zależności między poziomem mRNA genu *RUNX3* a obecnością antygenu CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów z B-ALL. Przeprowadzona analiza nie wykazała istotnych statystycznie różnic między podgrupami pacjentów CD10-dodatnimi i CD10-ujemnymi ($p=0,5989$) oraz między HLA-DR dodatnimi i ujemnymi ($p=0,5280$) w podgrupie pacjentów z B-ALL. Wyniki ujęto szerzej i podsumowano w Tabeli 6.22.

Tabela 6.22 Względny poziom mRNA *RUNX3* w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL

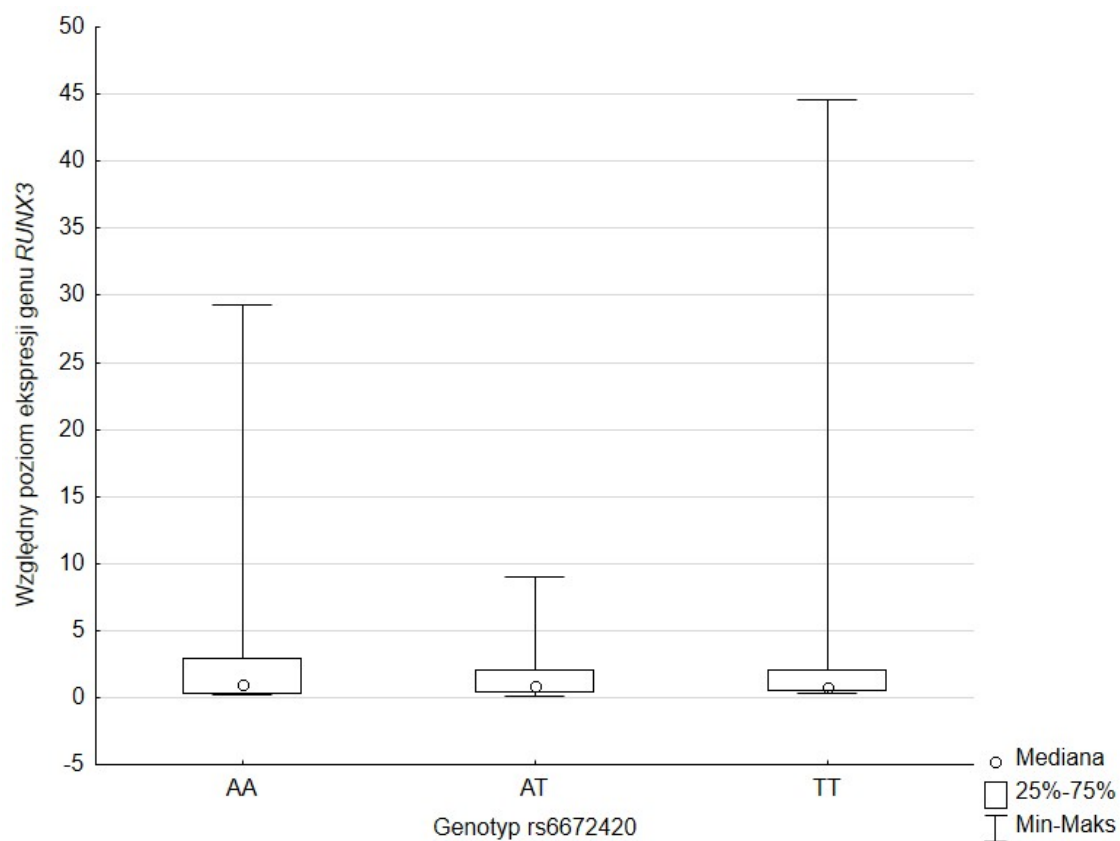
Względny poziom mRNA genu <i>RUNX3</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
Marker CD10 +	41	0,761149	0,059937	29,30179	0,387674	2,632165	$p=0,5989$
Marker CD10 -	6	1,108819	0,180439	9,039544	0,847479	1,712673	
HLA-DR +	44	0,826580	0,059937	29,30179	0,394278	2,771315	$p=0,5280$
HLA-DR -	3	0,847479	0,180439	1,314563	0,180439	1,314563	

6.2.3 Analiza zależności między genotypem rs6672420 a względnym poziomem ekspresji *RUNX3*

Poszukiwano następnie związku między genotypem rs6672520 a względnym poziomem ekspresji genu *RUNX3*. Analiza statystyczna pokazała, że genotyp badanego SNP nie ma istotnego wpływu na względny poziom ekspresji genu *RUNX3* ($p=0,8616$, Tabela 6.23). Jednakże warto zauważyć, że w przypadku genotypu AA obserwujemy najwyższe wartości poziomu mRNA *RUNX3* (mediana 0,933), co zaprezentowano na Rycinie 6.21. Być może obecność nieprawidłowego wariantu T wpływa na ilość powstającego mRNA.

Tabela 6.23 Zależność między genotypem polimorfizmu *RUNX3* rs6672420 a względnym poziomem ekspresji *RUNX3* w grupie badanej

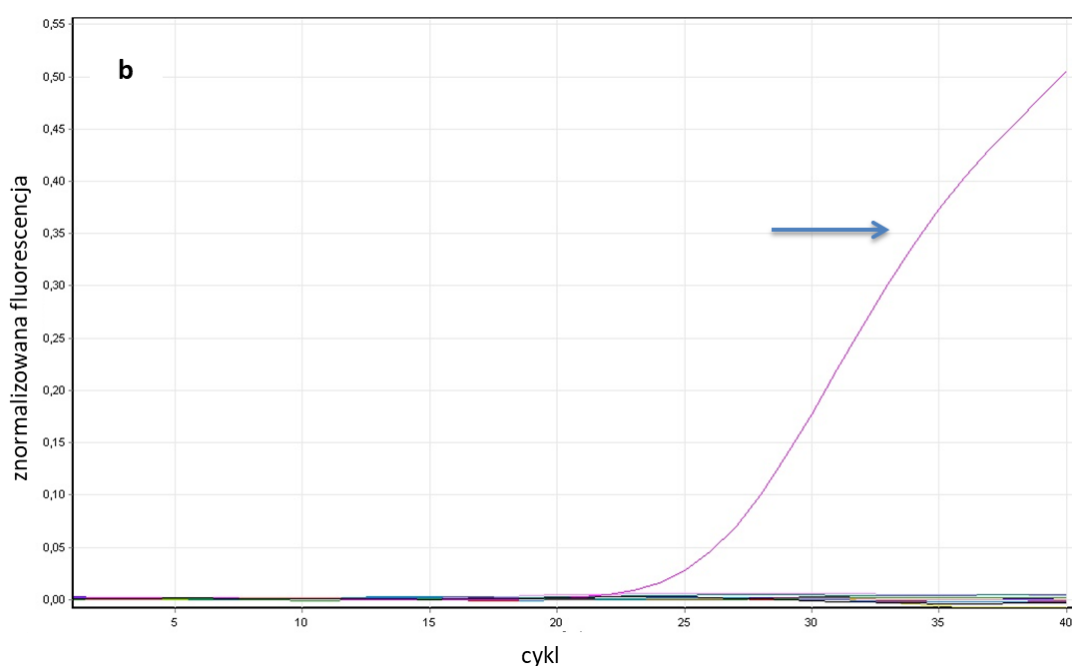
Genotyp rs6672420		AA	AT	TT	Wartość p
Względny poziom ekspresji <i>RUNX3</i>	Mediana	0,933	0,873	0,770	$p=0,8616$ (test Kruskala-Wallis)



Rycina 6.21 Wykres zależności między genotypem polimorfizmu *RUNX3* rs6672420 a względnym poziomem ekspresji *RUNX3* w grupie badanej

6.4 Ocena obecności mRNA genu *RUNX1/RUNX1T1*

W grupie pacjentów z ALL wykonano również ocenę obecności mRNA genu *RUNX1/RUNX1T1*, analizę przeprowadzono techniką real-time PCR wykorzystując sondę TaqMan. Przykładowy wynik doświadczenia przedstawia rycina 6.22.

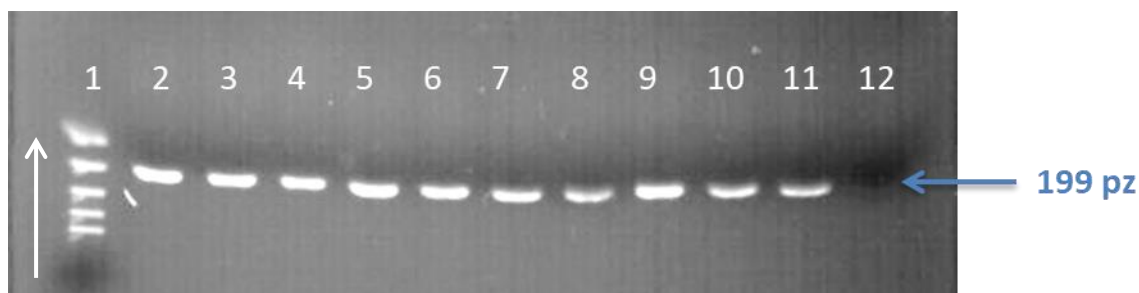


Rycina 6.22 Przykładowy wynik badania obecności mRNA genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*. Wyniki przedstawiono w skali linearnej. Strzałką zaznaczono krzywą amplifikacji dla kontroli pozytywnej.

Ponieważ poprawność przeprowadzonego eksperymentu oraz wyników analizy zostały zweryfikowane poprzez dodanie do każdej serii pomiarowej kontroli dodatniej, po obserwacji krzywych amplifikacji prób badanych można wnioskować, że otrzymane wyniki są prawdziwie ujemne – w żadnej z prób badanych odczyt fluorescencji nie przekroczył sygnału tła, a ich kształt znacznie odbiega od oczekiwanej krzywej przyrostu produktu reakcji, którą obserwujemy w próbie stanowiącej kontrolę pozytywną. Na tej podstawie stwierdzono, że u żadnego z 60 analizowanych pacjentów chorych na ALL ekspresja genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* nie została wykryta.

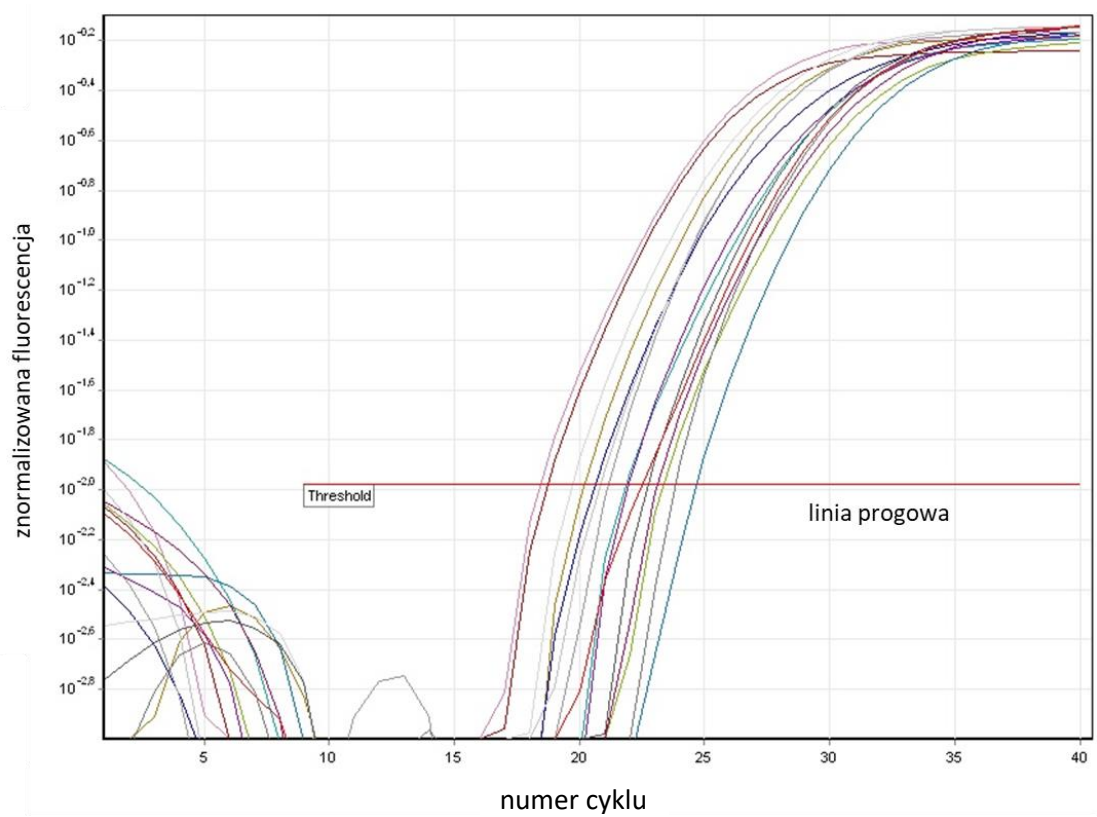
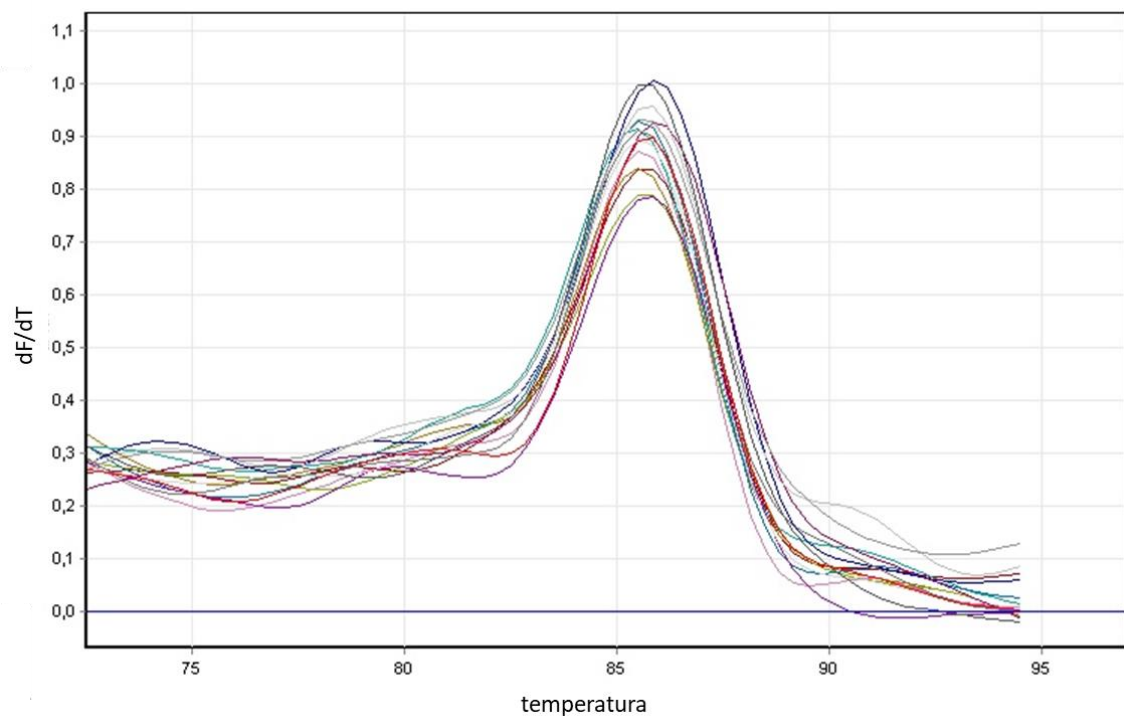
6.5 Analiza względnego poziomu ekspresji *CEBPA*

Ostatnim etapem badań była ocena poziomu transkryptu genu *CEBPA* w grupie badanej. Wśród wszystkich 60 pacjentów chorych na ALL wykryto jakościowo obecność ekspresji genu *CEBPA*, przykładowy wynik przedstawiono na rycinie 6.23



Rycina 6.23 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu *CEBPA*. Studzienka nr 1 – wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki 2-11 – próby badane, zawierające produkt o wielkości 199 pz; studzienka nr 12 – kontrola ujemna.

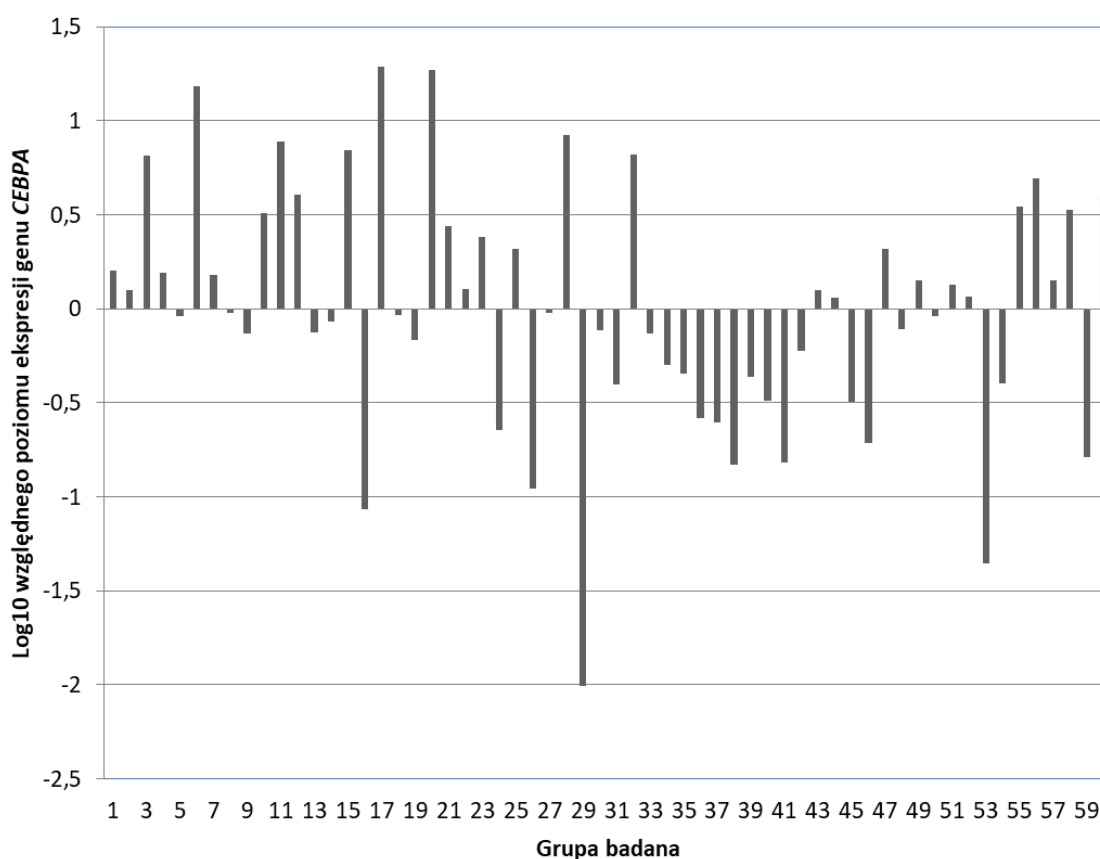
Po analizie jakościowej przeprowadzono analizę ilościową oceny względnego poziomu ekspresji. Poziom mRNA genu *CEBPA* został oceniony u 60 pacjentów za pomocą metody real-time PCR. Przykładowy wynik przeprowadzonego eksperymentu przedstawiają Ryciny 6.24 i 6.25, na których kolejno zaprezentowano krzywe amplifikacji oraz krzywe topnienia produktu.

Rycina 6.24 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu badanego *CEBPA*Rycina 6.25 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu badanego *CEBPA*

Po wykonanych eksperymentach oraz zebraniu danych stwierdzono, że poziom transkryptu genu *CEBPA* był zróżnicowany w grupie badanej, wahał się od 0,01 do 19,31 z medianą o wartości 0,96 (Tabela 6.24 oraz Rycina 6.26). W celu przejrzystości danych wyniki na Rycinie zaprezentowano jako $\log_{10}$ z wartości R określającej względny poziom ekspresji.

Tabela 6.24 Względny poziom ekspresji genu *CEBPA* w grupie badanej

Względny poziom mRNA genu <i>CEBPA</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl
Wszystkie przypadki	60	0,955320	0,009831	19,31374	0,418317	2,579563

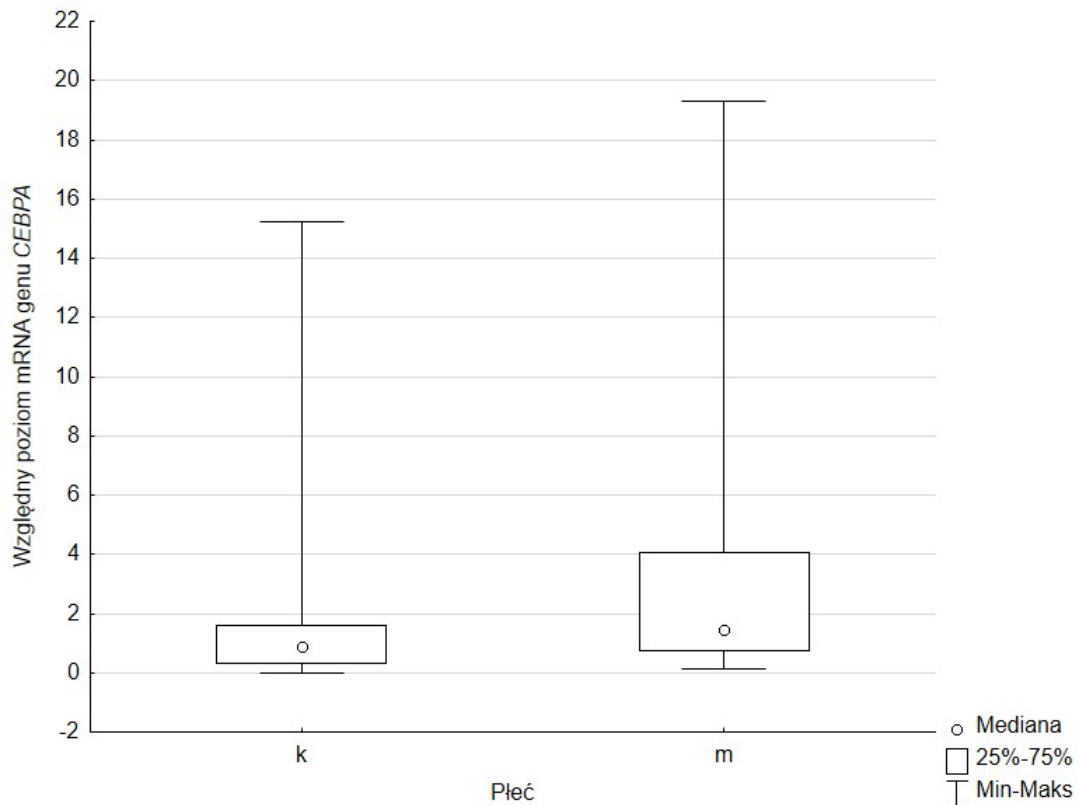


Rycina 6.26 $\log_{10}$ względnego poziomu ekspresji genu *CEBPA* wśród grupy badanej

Uzyskane wartości względnego poziomu mRNA poddano ocenie statystycznej. Pierwszym etapem analizy statystycznej było poszukiwanie zależności między płcią pacjenta a względnym poziomem ekspresji genu *CEBPA*. Analiza wykazała, że istnieje statystycznie istotna różnica w poziomie transkryptu wybranego genu ($p=0,0362$) w zależności od płci. W podgrupie mężczyzn wykazano wyższy względny poziom ekspresji *CEBPA*, niż w podgrupie kobiet (odpowiednio mediana 1,4655 oraz 0,8801) co zaprezentowano na Rycinie 6.27. Wyniki podsumowano w Tabeli 6.25).

Tabela 6.25 Względny poziom ekspresji genu *CEBPA* w zależności od płci w grupie badanej

Względny poziom mRNA genu <i>CEBPA</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
Mężczyźni	22	1,465505	0,151238	19,31374	0,743921	4,060213	$p=0,0363$
Kobiety	38	0,880145	0,009831	15,22344	0,318984	1,585446	



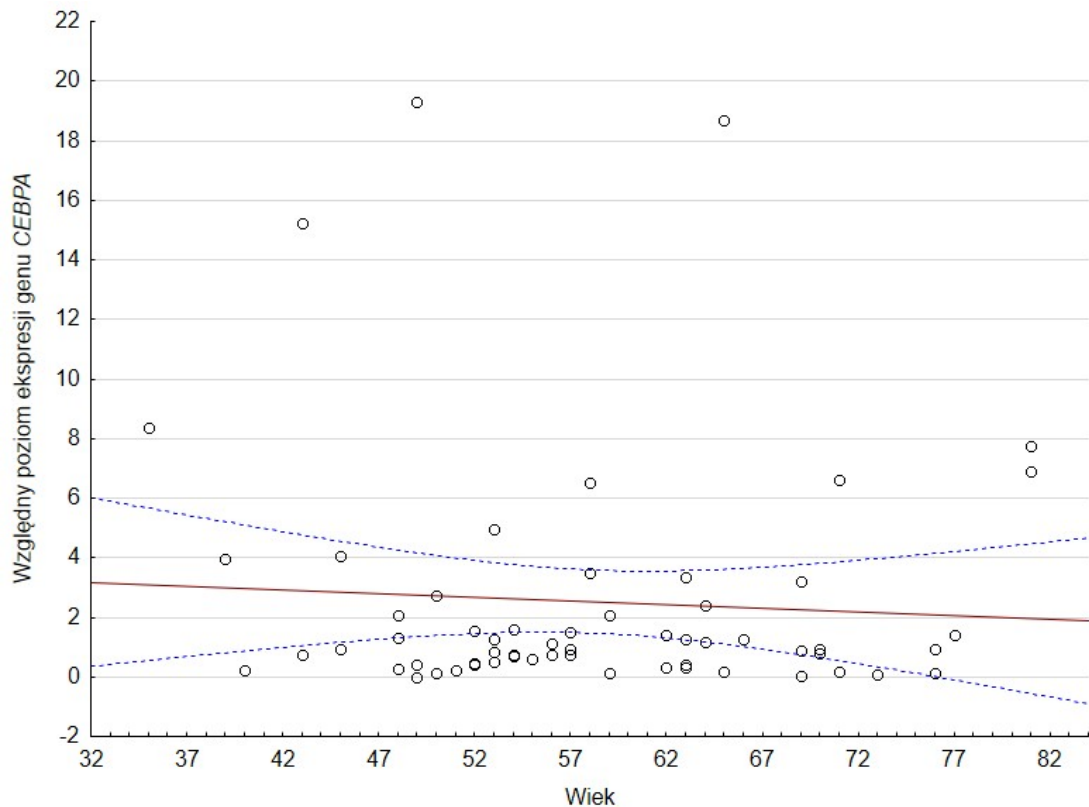
Rycina 6.27 Wykres zależności względnego poziomu ekspresji *CEBPA* od płci w grupie badanej ($p=0,0363$)

Następnie oceniano różnice we względnym poziomie transkryptu genu *CEBPA* w zależności od podtypu białaczki: B-ALL i T-ALL. Nie stwierdzono znaczącej różnicy między tymi dwiema podgrupami pacjentów ($p=0,8017$). Wyniki podsumowano w Tabeli 6.26.

Tabela 6.26 Względny poziom mRNA *CEBPA* w zależności od podtypu białaczki w grupie badanej

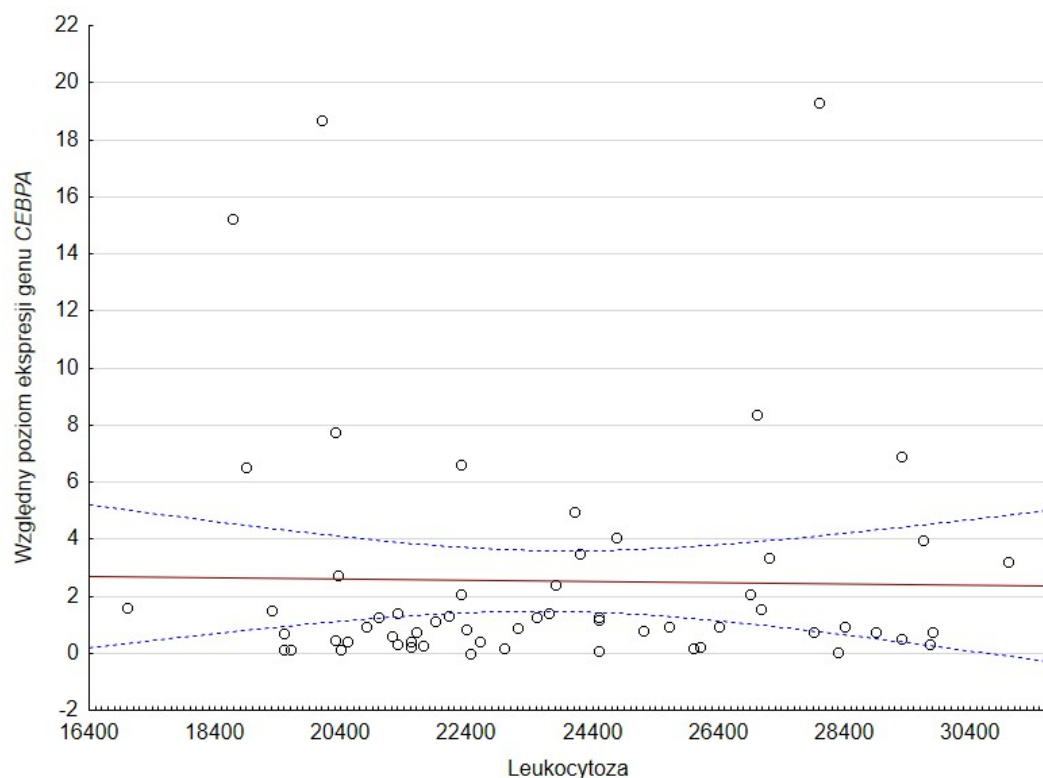
Względny poziom mRNA genu <i>CEBPA</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartył	Górny kwartył	Test U Manna-Whitneya
B-ALL	47	1,143314	0,009831	19,31374	0,397278	3,222594	$p=0,8017$
T-ALL	13	0,954768	0,044089	6,92376	0,684547	1,560010	

Kolejnym etapem analizy było poszukiwanie korelacji pomiędzy względnym poziomem transkryptu genu *CEBPA* a wiekiem w badanej grupie. Nie uzyskano statystycznie istotnej korelacji między tymi parametrami ($p=0,619$), co uwidocznione jest na Rycinie 6.28.

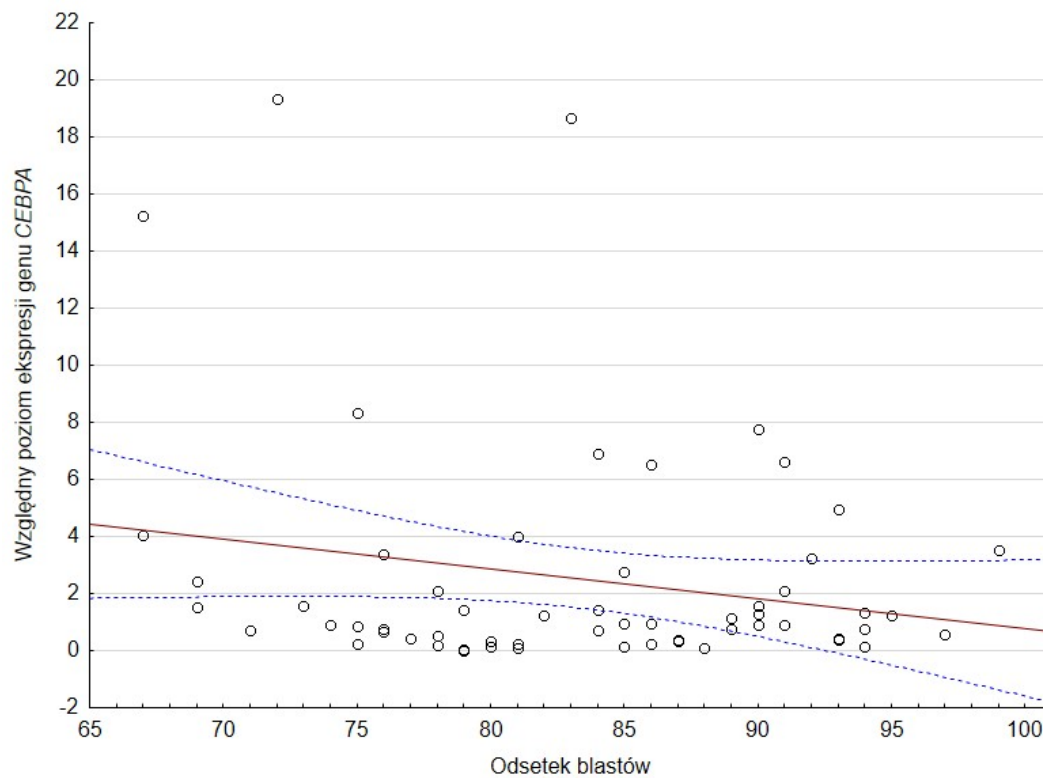


Rycina 6.28 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji *CEBPA* a wiekiem w grupie badanej ($p=0,619$)

Następnie oceniano związek między leukocytozą, procentową zawartością blastów w szpiku kostnym a poziomem transkryptu genu *CEBPA*. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych zależności między wybranymi parametrami a poziomem transkryptu *CEBPA* (odpowiednio $p=0,884$, Rycina 6.29; $p=0,115$, Rycina 6.30).



Rycina 6.29 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji $\hat{CEBPA}$ a leukocytozą w grupie badanej ($p=0,884$)



Rycina 6.30 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji $\hat{CEBPA}$ a odsetkiem blastów w szpiku kostnym w grupie badanej ($p=0,115$)

Dokonano również porównania między obecnością chromosomu Philadelphia a względnym poziomem ekspresji badanego genu, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między osobami Ph+ a osobami bez chromosomu Philadelphia ($p=0,1063$). Wyniki podsumowano w Tabeli 6.27.

Tabela 6.27 Względny poziom mRNA *CEBPA* w zależności od obecności chromosomu Ph w grupie badanej

Względny poziom mRNA genu <i>CEBPA</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
Chromosom Ph -	56	0,939573	0,009831	19,31374	0,399586	2,249305	$p=0,1063$
Chromosom Ph +	4	4,306043	0,743921	8,348723	1,417965	7,434400	

W kolejnym etapie poszukiwano zależności między poziomem mRNA genu *CEBPA* a obecnością antygenu CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów z B-ALL. Analiza nie wykazała istotnych różnic w poziomie mRNA *CEBPA* pomiędzy próbkami CD10-dodatnimi i CD10-ujemnymi ($p=0,1074$) oraz między HLA-DR dodatnimi i ujemnymi ($p=0,9480$). Wyniki ujęto szerzej i podsumowano w Tabeli 6.28.

Tabela 6.28 Względny poziom mRNA *CEBPA* w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL

Względny poziom mRNA genu <i>CEBPA</i>	N	Mediana	Min	Max	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Test U Manna-Whitneya
Marker CD10 +	41	1,252568	0,009831	19,31374	0,434739	3,222594	$p=0,1074$
Marker CD10 -	6	0,458997	0,086263	3,981252	0,162843	0,848639	
HLA-DR +	44	1,149957	0,009831	19,31374	0,360358	2,985145	$p=0,9480$
HLA-DR -	3	0,848639	0,594558	3,981252	0,594558	3,981252	

ROZDZIAŁ VII

Dyskusja

Przebieg dojrzewania limfoidalnego jest ściśle kontrolowany przez hierarchiczną aktywację czynników transkrypcyjnych i selekcję poprzez funkcjonalną transdukcję sygnału. Ostra białaczka limfoblastyczna reprezentuje grupę nowotworów limfoidalnych w stadium prekursorowym z linii B lub T, powstających w wyniku zmian genetycznych, które blokują różnicowanie limfoidalne i prowadzą do nieprawidłowej proliferacji i przeżycia komórek. Niejednorodność kliniczna przebiegu i wyniku choroby, szczególnie przy porównywaniu populacji pediatrycznych z przypadkami ALL wśród dorosłych, odzwierciedla możliwość istnienia różnych podtypów biologicznych tej choroby [Zuckerman i wsp., 2014].

Proces leukemogenezy może zostać wywołany przez niewielką zmianę w ekspresji lub funkcji niektórych czynników transkrypcyjnych [Chiaretti i wsp., 2014]. Czynniki transkrypcyjne to białka posiadające domeny, które wiążą się z DNA regionów promotora lub sekwencji wzmacniającej określonych genów. Posiadają również domenę, która wchodzi w interakcję z polimerazą RNA II lub innymi czynnikami transkrypcyjnymi i w konsekwencji regulują ilość informacyjnego RNA (mRNA) wytwarzanego przez gen, co w konsekwencji przekłada się na ilość powstającego produktu białkowego [Lambert i wsp., 2018].

Wiele rodzin białek działa jako czynniki transkrypcyjne. Niektóre TF to czynniki ogólne występujące praktycznie we wszystkich komórkach organizmu (m. in. białka Sp1, rodziny NF1, CCAAT). Inne są specyficzne tylko dla niektórych rodzajów komórek oraz etapów rozwoju, np. białka SOX2, OLIG1 i POU3F2 są obecne prawie wyłącznie w korze mózgowej, a GATA4 i TBX20 wykazują aktywność tylko w mięśniu sercowym [Lambert i wsp., 2018]. Grupy specyficznych czynników transkrypcyjnych działają w skoordynowany sposób, są niezbędne w inicjowaniu wzorców ekspresji genów docelowych, które powodują zasadnicze zmiany rozwojowe, np. kierując podziałem, wzrostem oraz apoptozą komórek organizmu, także migracją oraz organizacją komórek podczas rozwoju embrionalnego. Inicjują także zmiany w komórkach, w odpowiedzi na

hormony. Czynniki transkrypcyjne działają zazwyczaj na regiony promotorowe lub sekwencje wzmacniające w celu aktywacji lub represji transkrypcji określonych genów [Lambert i wsp., 2018]. Zmiany poziomu ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne i aktywności ich produktów białkowych mogą prowadzić do nieprawidłowej aktywacji szlaków biochemicznych i w konsekwencji doprowadzić do rozwoju nowotworów.

Jednymi z takich czynników są białka kodowane przez geny z rodziny *RUNX* oraz gen *CEBPA*, dlatego przedmiotem rozprawy doktorskiej była ocena względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3* i *CEBPA*, oraz obecności transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* w ostrej białaczce limfoblastycznej wśród osób dorosłych. Badania prowadzono w celu określenia potencjalnej roli wybranych genów w rozwoju tego rodzaju białaczki oraz ustalenia związku z danymi klinicznymi pacjentów. Oceniono również polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1* jak i rs6672420 genu *RUNX3* wśród pacjentów z ALL oraz w podgrupie osób bez choroby nowotworowej, w celu ustalenia czy polimorfizmy te mają wpływ na obserwowany poziom mRNA, czy są związane ze zwiększoną zapadalnością na ALL oraz czy mają związek z danymi demograficzno-klinicznymi pacjentów.

Pierwszym z badanych genów był gen *RUNX1*, odgrywa on ważną rolę w procesie hematopoezy [Medinger i wsp., 2016]. Jego nieprawidłową ekspresję wykryto w różnych nowotworach złośliwych, w tym w raku jajnika, cytogenetycznie prawidłowej AML (CN-AML) i raku piersi [Fu i wsp., 2016; Lam i wsp., 2012; Ge i wsp., 2014; Ferrari i wsp., 2014]. Jednak znaczenie genu *RUNX1* w rozwoju nowotworów, w szczególności hematologicznych, nie jest w pełni poznane. Badacze wykazali, że mutacje występujące w genie *RUNX1* są związane z rozwojem ostrej białaczki szpikowej [Miyoshi i wsp., 1991, ; Osato i wsp., 2004], a także stwierdzono je w ALL [Grossmann i wsp., 2011; Della Gatta i wsp. 2012; Zhang i wsp., 2012].

Jednymi ze zmian, które mogą być powiązane z występowaniem ALL są SNP, w tym polimorfizm rs2268277. Polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1* znajduje się w intronie 6, gdzie powoduje zamianę guaniny na cytozynę w pozycji 34809752, jest to mutacja, która nie wpływa na zmianę w kodowanym aminokwasie. Dane

w piśmiennictwie opisują jednak wpływ takich mutacji na szybkość formowania mRNA oraz na jego okres półtrwania, co może w konsekwencji powodować zmianę w ilości powstającego produktu białkowego. Częstość rozkładu genotypów oraz alleli w niniejszej pracy w grupie kontrolnej (odpowiednio GG – 40%, GC – 43%, CC – 17%, allel G – 62%, allel C – 38%) jest porównywalna z częstościami obserwowanymi w innych populacjach kaukaskich. W badaniu przeprowadzonym przez Wesoly i wsp. wśród duńskiej grupy kontrolnej genotyp GG stanowił 40%, najczęściej występował genotyp GC (47,5%), genotyp CC stanowił 12,5% grupy, jeśli spojrzymy na częstość występowania alleli to allel G wykryto u 64%, a allel C natomiast u 36% [Wesoly i wsp., 2005]. Podobne częstości obserwowano wśród grupy zdrowych osób pochodzenia hiszpańskiego w badaniu przeprowadzonym przez Orozco i wsp., gdzie homozygoty GG stanowiły 35,1%, heterozygoty GC 50%, a homozygoty zmutowane CC 14,9%, w przypadku częstości występowania alleli, allel G stanowił 60,1%, natomiast allel C 39,9% [Orozco i wsp., 2006]. Zgodne z danymi dostępnymi w piśmiennictwie jest to pierwsze badanie oceny polimorfizmu rs2268277 przeprowadzone w grupie chorych z ALL, brak jest dostępnych danych odnośnie częstości występowania genotypów i alleli tego polimorfizmu wśród chorych z nowotworami hematologicznymi. Dlatego wyniki uzyskane w niniejszej pracy zostaną porównane z innymi jednostkami chorobowymi. Polimorfizm ten był wcześniej badany wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) [Wesoly i wsp., 2005, Tokuhira i wsp., 2003] i toczeniem rumieniowatym układowym [Orozco i wsp., 2006]. Tokuhira i wsp. potwierdzili istotny związek między zmutowanym allelem C polimorfizmu rs2268277 i częstszym występowaniem reumatoidalnego zapalenia stawów w populacji japońskiej, sugerują także jego wpływ na poziom ekspresji samego genu [Tokuhira i wsp., 2003]. W przeciwieństwie do tych wyników, w badaniu przeprowadzonym przez Wesoly i wsp. nie zaobserwowano istotnej różnicy w częstościach występowania genotypów oraz alleli między pacjentami z RZS i grupą kontrolną [Wesoly i wsp., 2005]. Także badania przeprowadzone przez Orozco i wsp. wśród pacjentów pochodzenia hiszpańskiego z toczeniem rumieniowatym układowym wykazały brak różnic w obserwowanych częstościach genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną i kontrolną [Orozco i wsp., 2006]. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy, polimorfizm ten nie jest związany z rozwojem ostrej białaczki limfoblastycznej, ponieważ rozkład częstości genotypów i alleli nie różni się między

grupą badaną i kontrolną (odpowiednio $p=0,5154$, $p=0,2949$). Nie ma również związku z wybranymi cechami demograficzno-klinicznymi. Zmiana pojedynczego nukleotydu w pozycji 34809752 G>C nie wpływa także istotnie statystycznie na obserwowany względny poziom ekspresji tego genu ($p=0,1926$). Wydaje się, że polimorfizm ten nie wpływa na zwiększoną zapadalnością oraz rozwój ALL, aczkolwiek jest to pierwsze doniesienie oceniające ten SNP wśród pacjentów z chorobą hematologiczną, dlatego w celu potwierdzenia uzyskanych wyników, badania będą prowadzone dalej na większej populacji pacjentów.

U pacjentów z ALL oceniono także względny poziom ekspresji genu *RUNX1*, aby określić jego rolę w rozwoju oraz progresji tej choroby. Pierwsze badania dotyczące funkcji genu *RUNX1* sugerowały, że działa jako supresor nowotworowy w AML [Silva i wsp., 2003], a utrata jego ekspresji może prowadzić do słabego różnicowania i rozwoju białaczki [Osato, 2004]. Badanie przeprowadzone przez Fu i wsp., wykazało, że prawidłowy poziom ekspresji genu *RUNX1* hamuje proliferację komórek i promuje różnicowanie hematopoetycznych komórek progenitorowych [Fu i wsp., 2016]. Natomiast brak transkrypcji genu *RUNX1* może spowodować namnożenie komórek progenitorowych szpiku i dalszy rozwój białaczki. Badanie przeprowadzone przez Silva i wsp. [2003] wykazało, że gen *RUNX1* działa jako klasyczny gen supresorowy; jednak inne badania sugerują, że działa jako onkogen, powodując leukemogenezę ze względu na jego rolę w przeżywaniu i proliferacji komórek białaczkowych [Ben-Ami i wsp., 2013; Goyama i wsp., 2013; Goyama i wsp., 2015; Wilkinson i wsp., 2013]. Wyniki tych badań sugerują również rolę *RUNX1* w prognozowaniu przebiegu choroby w CN-AML. Wysokie poziomy ekspresji wydają się być negatywnym czynnikiem prognostycznym [Fu i wsp., 2016]. Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez Goyama i wsp. [2013] otrzymano wyniki przeciwne: nadekspresja genu *RUNX1* hamuje wzrost regularnych komórek krwi pępowinowej poprzez indukowanie różnicowania szpiku. Zasugerowano, że gen *RUNX1* może być cennym nowym markerem do stratyfikacji ryzyka u pacjentów z AML i że jest potencjalnym kandydatem do terapii przeciwnowotworowej ze względu na modulację jego modyfikacji potranslacyjnych [Goyama i wsp., 2015].

Obecnie wysunięto hipotezę, że ze względu na różny poziom ekspresji gen *RUNX1* może odgrywać rolę onkogenną lub supresorową w zależności od rodzaju

nowotworu złośliwego narządów litych oraz w nowotworach hematologicznych [Fu i wsp., 2016; Otálora-Otálora i wsp., 2019]. Fu i wsp. opisali, że w CN-AML wyższy poziom ekspresji *RUNX1* jest związany z gorszym rokowaniem, pacjenci z wysoką wartością ekspresji cechowali się krótszym całkowitym czasem przeżycia (OS) i krótszym czasem przeżycia wolnym od objawów (EFS) [Fu i wsp., 2016]. Ponadto Wilkinson i wsp. odkryli, że wysoki poziom ekspresji *RUNX1* jest związany z wykrywalnym poziomem MRD w 29 dniu terapii u pacjentów z ALL posiadających geny fuzyjne MLL, a co za tym idzie z gorszym przebiegiem klinicznym i ryzykiem wczesnego nawrotu choroby [Wilkinson i wsp., 2013]. Wyniki te są podobne do uzyskanych w niniejszej pracy, w których wykazano, że wysokie poziomy ekspresji genu *RUNX1* korelują z większą leukocytozą u pacjentów ($p=0,0354$), co może sugerować i potwierdzać potencjał onkogenny tego genu. Wysoka leukocytoza jest uznanym negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z ALL, co może sugerować bardziej agresywny przebieg choroby. W niniejszej pracy nie wykazano innych statystycznie istotnych różnic w obserwowanych poziomach ekspresji w zależności od wybranych cech demograficzno-klinicznych. Poziom mRNA genu *RUNX1* nie jest zależny od płci i wieku pacjentów, podobne wyniki w AML uzyskał zespół prowadzony przez Fu [Fu i wsp., 2016].

Kolejnym badaniem w pracy genem był gen *RUNX3*. Pierwsze badania sugerujące jego działanie supresorowe były przeprowadzone w raku żołądka, gdzie utrata aktywności białka *RUNX3* prowadziła do transformacji prawidłowego nabłonka żołądka w inwazyjną postać raka, wykazano także obniżony poziom mRNA tego genu wśród osób z rakiem w porównaniu do prawidłowego nabłonka żołądka [Chen i wsp., 2016]. Wiele innych badań potwierdza te wyniki, jego rolę jako supresora opisano w innych nowotworach narządów litych, takich jak: rak okrężnicy [Goel i wsp., 2004], rak płuca [Lee i wsp., 2010; Lee i wsp., 2013], rak sutki [Huang i wsp., 2012], glejak [Mueller i wsp., 2007], rak nerki [Chen i wsp., 2013], chrząstniakomięsak [Jin i wsp., 2013] itp. Inne badania prowadzone nad zjawiskiem nowotworzenia oparte na epigenetyce sugerują, że obniżenie poziomu ekspresji *RUNX3* w nowotworach może być wynikiem hipermetylacji regionu promotorowego tego genu [Kurklu i wsp., 2015; Kim i wsp., 2005; Subramaniam i wsp., 2009]. Hipermetylację promotora *RUNX3*

zaobserwowano również w liniach komórek glejaka wielopostaciowego i pierwotnej tkance tego nowotworu w porównaniu z ludzką tkanką mózgową bez cech nowotworowych [Mueller i wsp., 2007; Saraiva-Esperón i wsp., 2014]. Metylację genu *RUNX3* uznano za potencjalny biomarker agresywności glejaków [Majchrzak-Celińska i wsp., 2015]. W dostępnym piśmiennictwie brak jest doniesień o supresorowej roli genu *RUNX3* w nowotworach hematologicznych.

Inne badania wykazały przeciwne wyniki i sugerowały rolę onkogeną *RUNX3* oraz jego produktu białkowego. Zwiększoną aktywność białka *RUNX3* wykryto między innymi w badaniach prowadzonych na liniach komórkowych raka jajnika, w porównaniu do prawidłowych komórek nabłonkowych tego narządu. Badano także ekspresję genu *RUNX3* w związku z opornością na stosowane chemioterapeutyki. Wysoki poziom mRNA genu *RUNX3* był związany z opornością komórek nowotworowych raka jajnika na stosowanie cisplatyny oraz karboplatyny [Barghout i wsp., 2015]. Badania prowadzone na poziomie mRNA oraz produktu białkowego tego genu wykazały, że wysoki poziom ekspresji genu oraz aktywność białka *RUNX3* jest związana ze słabym różnicowaniem histologicznym, zdolnością tworzenia przerzutów i inwazyjnością w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi, wykazaną w testach czynnościowych na liniach komórkowych [Tsunematsu i wsp., 2009]. Wysoka aktywność białka *RUNX3* i jego potencjał onkogeny został także wskazany w szeregu innych nowotworów, m. in. w gruczolakoraku przewodowym trzustki [Whittle i wsp., 2015] i rakach podstawnokomórkowych [Salto-Tellez i wsp., 2006]. Wysoki poziom ekspresji genu *RUNX3* wykryto wśród pacjentów z zapalnymi nowotworami piersi [Robertson i wsp., 2012] i żołądka [Carvalho i wsp., 2005; Wen i wsp., 2017]. Podobnie, jak w przypadku genu *RUNX1*, sprzeczne wyniki odnośnie potencjalnego charakteru supresora lub onkogenu *RUNX3* wydają się zależeć od rodzaju nowotworu złośliwego.

Zbadany polimorfizm rs6672420, umiejscowiony w eksonie 1 genu *RUNX3*, należy do mutacji punktowych zmiany sensu, powoduje zamianę adeniny na tyminę w pozycji 24964519, a w konsekwencji zmienia kodowany aminokwas w pozycji 18 z Asn do Ile. Uzyskana w niniejszej pracy częstość rozkładu genotypów oraz alleli w grupie kontrolnej (AA – 30%, AT – 43%, TT – 27%, allel A – 52%, allel T – 48%) jest porównywalna z częstościami obserwowanymi w innych populacjach europejskich

(allel A – 48%, allel T – 52%), różni się natomiast od częstości obserwowanych w populacjach azjatyckich (allel A – 32%, allel T – 68%) oraz amerykańskich (allel A – 28%, allel T – 72%) [Cunningham i wsp., 2019]. Polimorfizm ten był wcześniej badany przez Haider i wsp. [2016] wśród pacjentów z zespołem Sézary'ego (agresywny wariant skórny chłoniaka z komórek T). Haider i wsp. w swojej pracy wykryli nieprawidłowy wariant u 9 pacjentów z 25 badanych chorych [Haider i wsp., 2016]. Ponadto allel T rs6672420 był związany ze zwiększoną podatnością na raka żołądka typu jelitowego [Lim i wsp., 2011], z kolei przeciwne wyniki uzyskano w raku jelita grubego, gdzie genotyp AA był związany z częstszym występowaniem choroby w porównaniu do osób zdrowych [Slattery i wsp., 2011]. W niniejszej pracy nie wykryto istotnie statystycznej różnicy w obserwowanych częstościach występowania genotypów i alleli między grupą badaną i kontrolną (odpowiednio $p=0,3257$, $p=0,5174$). Badany polimorfizm nie ma związku z cechami kliniczno-demograficznymi, za wyjątkiem różnicy w obserwowanych częstościach genotypów w zależności od płci – u kobiet częściej obserwowano genotyp AT. Wydaje się to potwierdzać założenie, że funkcja czynników z rodziny RUNX jest najprawdopodobniej odmienna w nowotworach litych oraz hematologicznych. Dane z piśmiennictwa sugerują, że obecność allela T może prowadzić do wzrostu poziomu ekspresji nieaktywnego transkrypcyjnie splicewariantu *RUNX3* potencjalnie konkurującego z transkrypcyjnym podstawowym [Lim i wsp., 2011, Puig-Kröger i wsp., 2010]. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano żadnego związku między poziomem ekspresji, a częstością występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs6672420. Poziomy ekspresji ustalono na podstawie oceny całkowitego mRNA, bez podziału na poszczególne splicewarianty, powstałe z dwóch regionów promotorowych, co może wpływać na wnioskowanie. Kontynuacja tych badań pozwoli określić czy także w przypadku ALL pojawia się nieprawidłowy wariant transkrypcyjny, który może wpływać na prawidłową funkcję czynnika RUNX3.

Dotychczas poziomy ekspresji genu *RUNX3* były oceniane w szeregu różnych chorób nowotworowych, w tym w AML. Krygier i wsp. opisali, że *RUNX3* może służyć jako czynnik prognostyczny w ostrej białaczce szpikowej, ponieważ wyższe poziomy ekspresji tego genu wiązały się z wyższą śmiertelnością wśród grupy badanej. Wydaje się to potwierdzać onkogenny charakter tego genu w AML [Krygier i wsp., 2018]. Cheng

i wsp. jak również Lacayo i wsp. zgłaszali podobne obserwacje wśród pacjentów z AML [Cheng i wsp., 2008; Lacayo i wsp., 2004], gdzie pacjenci pediatryczni z wysoką wartością ekspresji cechowali się krótszym wskaźnikiem OS i EFS. W niniejszym badaniu obniżone poziomy ekspresji genu *RUNX3* korelowały z występowaniem chromosomu Ph u pacjentów z ALL, co sugeruje potencjalną supresorową rolę tego genu. Podobne wyniki uzyskali Haider i wsp., którzy w swojej pracy przedstawili dowody na charakter supresorowy genu *RUNX3* w ludzkich nowotworach z komórek T, w szczególności u pacjentów cierpiących na zespół Sézary'ego, gdzie ektopowe wydzielanie białka *RUNX3*, będące efektem zwiększonego poziomu ekspresji, zmniejsza żywotność i indukuje apoptozę komórek nowotworowych [Haider i wsp., 2016]. Może się zatem wydawać, że *RUNX3* działa inaczej w różnych podtypach białaczki i zarówno wzrost, jak i zmniejszenie poziomu ekspresji genu może przyczynić się do rozwoju i progresji choroby nowotworowej. Cheng i wsp., jak również Krygier i wsp. opisali ponadto brak zależności między obserwowanym poziomem ekspresji genu *RUNX3* a danymi demograficzno-klinicznymi wśród pacjentów z AML, takimi jak: płeć, wiek w momencie diagnozy, klasyfikacja FAB [Cheng i wsp., 2008; Krygier i wsp., 2018]. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu są podobne, ponieważ nie zidentyfikowano związku między płcią ani wiekiem lub podtypem ALL a względnym poziomem mRNA genu *RUNX3*.

Przedmiotem badań w niniejszej rozprawie była także obecność transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* wśród chorych na ALL. Wśród grupy badanej nie wykryto obecności ekspresji tego genu fuzyjnego, nie jest on najprawdopodobniej związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju ALL. Jest to pierwsze doniesienie, określające obecność transkryptu *RUNX1/RUNX1T1* w tej chorobie. Dotychczas gen fuzyjny był badany w ostrej białaczce szpikowej, według wytycznych European Leukemia Net z 2017 roku jego obecność jest związana z korzystnym rokowaniem: u takich chorych obserwuje się lepsze wskaźniki całkowitej remisji, mniejsze ryzyko nawrotu, dłuższy czas przeżycia oraz wrażliwość na leczenie cytarabiną i antracykliną. Mechanizm dla którego ci pacjenci wykazują lepsze rokowanie jak do tej pory nie został dokładnie poznany [van der Kouwe i wsp., 2019; Döhner i wsp., 2017]. Z drugiej strony obecność translokacji t (8; 21) powiązano także z zaburzonym mechanizmem naprawy

DNA, który zagraża integralności genomowej, sprzyjając w ten sposób fenotypowi mutatorowemu [van der Kouwe i wsp., 2019]. Potrzebne są dalsze badania, w celu wyjaśnienia roli oraz mechanizmów działania genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* w ostrych białaczkach.

Ostatnim badanym genem był gen *CEBPA*. Koduje on czynnik transkrypcyjny odgrywający rolę w regulacji cyklu komórkowego, różnicowaniu granulocytów i wielu innych komórek. Wybrane dane z piśmiennictwa sugerują jego potencjalne działanie onkogenne. Gen ten ulega częstym mutacjom, wykryto je w 7–15% przypadków ostrej białaczki szpikowej [Pabst i wsp., 2009; Lin i wsp., 2005], w około 4% przypadków zespołów mielodysplastycznych (MDS) i przewlekłej białaczki szpikowej (CML) [Shih i wsp., 2005]. Inne badania udowodniły, że ektopowe wydzielania białka C/EBPa w liniach komórkowych raka płuc powoduje znaczne zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych, co może sugerować jednak działanie supresorowe tego genu [Halmos i wsp., 2002; Costa i wsp., 2007]. Stosując model raka płuca indukowany uretanem, wykazano, że aktywność C/EBPa jest hamowana przez inaktywację kinazy p38alfa MAP, co prowadzi do progresji nowotworu [Sato i wsp., 2013], potwierdzając rolę supresorową genu *CEBPA* w rak płuc. Chociaż aktywność białka C/EBPa stwierdzono w ludzkich przedrakowych zmianach skórnych (rogowacenie słoneczne) i prawidłowym naskórku, jego ekspresja jest niewykrywalna w próbkach inwazyjnego raka płaskonabłonkowego [Thompson i wsp., 2011]. Wyniki tych badań sugerują możliwą rolę supresorową w nowotworach skóry, a utratę prawidłowej aktywności ustalić jako przyczynę prowadzącą do rozwoju nowotworu. Obniżony poziom ekspresji genu *CEBPA* obserwowano w większości przypadków raka wątrobowokomórkowego. Próby z wyższym poziomem ekspresji w przypadkach tego nowotworu wykazywały odwrotną korelację z wielkością guza i stadium klinicznym nowotworu (mała średnica zmiany i niskie zaawansowanie kliniczne) [Tomizawa i wsp., 2003]. Potencjalna rola genu *CEBPA* jako onkogenu lub supresora w rozwoju nowotworów litych i hematologicznych nie została do tej pory całkowicie wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

Dotychczasowe prace badawcze dotyczące poziomu transkryptu genu *CEBPA* w nowotworach hematologicznych nie wskazują jednoznacznie roli tego genu

w patomechanizmie rozwoju tych chorób. Gholami i wsp. w swojej pracy opisali, że podwyższony poziom ekspresji *CEBPA* zaobserwowano u dorosłych mężczyzn chorych na AML [Gholami i wsp., 2019]. To odkrycie jest zgodne z niniejszym badaniem, w którym mężczyźni prezentowali statystycznie istotnie wyższe poziomy mRNA *CEBPA* ($p=0,0362$). Chapiro i wsp. stwierdzili, że *CEBPA* ulega nadekspresji u pacjentów z translokacją chromosomalną (14;19) (q32; q13), cierpiących na ostrą białaczkę limfoblastyczną z prekursorów komórek B [Chapiro i wsp., 2006]. Ta translokacja nie była oceniana w niniejszej pracy u chorych z ALL, ponadto grupa badana obejmowała zarówno przypadki T-ALL, jak i B-ALL. Nie stwierdzono także istotnej statystycznie różnicy w poziomach mRNA *CEBPA* między tymi podgrupami pacjentów ($p=0,8017$). Perrotti i wsp. stwierdzili, że u pacjentów z Ph-dodatnią przewlekłą białaczką szpikową aktywność białka C/EBPa w przebiegu przełomu blastycznego jest obniżona, podczas gdy utrzymany jest fizjologiczny poziom mRNA tego genu [Perrotti i wsp., 2002]. W niniejszym badaniu nie wykryto statystycznie istotnej różnicy w poziomach mRNA *CEBPA* wśród pacjentów z obecnym genem fuzyjnym BCR-ABL i bez niego. Grupa pacjentów Ph+ jest nieliczna, w celu potwierdzenia uzyskanego wyniku, badanie powinno być kontynuowane oraz potwierdzone na większej liczbie przypadków.

Podsumowując, polimorfizmy rs2268277 i rs6672420 badane w pracy nie mają związku z obserwowanymi poziomami ekspresji oraz przebiegiem procesu chorobowego wśród pacjentów z ALL. W przypadku oceny poziomów transkryptów, przeprowadzone doświadczenia wydają się potwierdzać dotychczasowe hipotezy badaczy, że zarówno obniżenie, jak i wzrost poziomu mRNA genów z rodziny *RUNX* może być zaangażowane w patogenezę ostrych białaczek. Ponadto wyniki uzyskane w pracy wskazują na dualistyczną naturę czynników transkrypcyjnych *RUNX* – wykazują działanie zarówno onkogenne, jak i supresorowe, w zależności od rodzaju choroby oraz typu nowotworu złośliwego. Warto podkreślić, że gen *RUNX1* w przypadkach ALL wykazuje cechy onkogenu, natomiast gen *RUNX3* zdaje się pełnić rolę supresorową. Brak zależności poziomów ekspresji z cechami demograficznymi pacjentów, takimi jak płeć i wiek, sugeruje możliwości wykorzystania oceny genów *RUNX1* oraz *RUNX3* jako potencjalne tarcze w terapii celowanej. Aby potwierdzić tę hipotezę wymagane są jednak dalsze badania z udziałem innych grup badanych. Gen fuzyjny *RUNX1/RUNX1T1*

nie ma związku ze zwiększoną zachorowalnością na ALL, ponieważ jego obecność nie została stwierdzona u żadnego z badanych pacjentów. Poziom ekspresji genu *CEBPA* nie ma prawdopodobnie związku z rozwojem i postępem przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej.

ROZDZIAŁ VIII

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można przedstawić następujące wnioski:

- Brak istotnych statystycznie różnic między częstościami występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu genu *RUNX1* rs2268277 w grupie badanej i kontrolnej oraz brak istotnych statystycznie zależności między wybranymi danymi demograficzno-klinicznymi u chorych na ALL wskazują na brak wpływu badanego polimorfizmu na zwiększoną zapadalność oraz patomechanizm tej choroby;
- Brak istotnych statystycznie różnic między częstościami występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu genu *RUNX3* rs6672420 w grupie badanej i kontrolnej oraz brak istotnych statystycznie zależności między wybranymi danymi demograficzno-klinicznymi u chorych na ALL wskazują na brak wpływu badanego polimorfizmu na zwiększoną zapadalność oraz patomechanizm tej choroby;
- Nie zaobserwowano istotnego statystycznie związku między wybranymi polimorfizmami a obserwowanymi poziomami ekspresji genów *RUNX1* oraz *RUNX3*;
- Wyniki uzyskane w pracy wskazują na dualistyczną naturę czynników transkrypcyjnych RUNX: gen *RUNX1* w ALL wykazuje cechy onkogenu, ponieważ zwiększony poziom jego ekspresji koreluje z wyższą leukocytozą w grupie badanej; natomiast gen *RUNX3* zdaje się pełnić rolę supresorową, ze względu na korelację między obniżonymi poziomami ekspresji a występowaniem chromosomu Ph;
- Obecność ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* nie została stwierdzona u żadnego z badanych pacjentów, w związku z tym translokacja ta nie ma związku ze zwiększoną zachorowalnością oraz patomechanizmem ALL;

- Brak istotnych statystycznie zależności między wybranymi cechami demograficzno-klinicznymi oraz względnym poziomem ekspresji genu *CEBPA* wskazuje na fakt, iż gen ten nie ma prawdopodobnie związku z rozwojem i postępem przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej.

ROZDZIAŁ IX

Streszczenie

Ostra białaczka limfoblastyczna reprezentuje grupę nowotworów limfoidalnych w stadium prekursorowym z linii B lub T, powstających w wyniku zmian genetycznych, które blokują różnicowanie limfoidalne i prowadzą do nieprawidłowej proliferacji i przeżycia komórek. Dokładne mechanizmy rozwoju tej choroby pozostają jednak nieustalone. Najprawdopodobniej proces leukemogenezy może zostać wywołany przez niewielką zmianę w ekspresji lub funkcji niektórych czynników transkrypcyjnych. Jednymi z takich czynników są białka kodowane przez geny z rodziny *RUNX* oraz gen *CEBPA*.

Głównym założeniem rozprawy doktorskiej była ocena wybranych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne, zaangażowanych w procesy hematopoezy, apoptozy i proliferacji. Wykorzystując technikę PCR-RFLP oceniono polimorfizmy genu *RUNX1* rs2268277 i *RUNX3* rs6672420. Za pomocą techniki RT-qPCR zbadano względne poziomy ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3* oraz *CEBPA*. Oceniono także obecność ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* za pomocą sondy typu TaqMan. Badaniami objęto 60 pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką limfoblastyczną, leczonych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Materiałem badanym była krew obwodowa pobrana na EDTA, z której następnie wyizolowano odpowiednio DNA oraz RNA. Dodatkowo jako grupę odniesienia do badanych polimorfizmów wykorzystano 60 prób DNA wyizolowanego od zdrowych osób.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na określenie ostatecznych wniosków. Polimorfizmy rs2268277 i rs6672420 badane w pracy nie mają związku z obserwowanymi poziomami ekspresji oraz przebiegiem procesu chorobowego wśród pacjentów z ALL. W przypadku oceny poziomów transkryptów, przeprowadzone doświadczenia wydają się potwierdzać dotychczasowe hipotezy badaczy, że zarówno obniżenie, jak i wzrost poziomu mRNA genów z rodziny *RUNX* może być zaangażowane w patogenezę ostrych białaczek. Gen *RUNX1* w przypadkach ALL wykazuje cechy onkogenu, natomiast gen *RUNX3* zdaje się pełnić rolę supresorową. Brak zależności

poziomów ekspresji z cechami demograficznymi pacjentów, takimi jak płeć i wiek, sugeruje możliwości wykorzystania oceny genów *RUNX1* oraz *RUNX3* jako potencjalne tarcze w terapii celowanej. Aby potwierdzić tę hipotezę wymagane są jednak dalsze badania z udziałem większych grup pacjentów. Gen fuzyjny *RUNX1/RUNX1T1* nie ma związku ze zwiększoną zachorowalnością na ALL, ponieważ jego obecność nie została stwierdzona u żadnego z badanych pacjentów. Poziom ekspresji genu *CEBPA* nie ma prawdopodobnie związku z rozwojem i postępem przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej.

Charakterystyka i poznanie funkcji genów z rodziny *RUNX* oraz *CEBPA* w grupie pacjentów chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną może przełożyć się w przyszłości na nowe strategie lecznicze i ich indywidualizację, może to pomóc chorym na ALL, szczególnie dorosłym oraz w wieku podeszłym, uzyskać większe szanse na całkowitą remisję choroby oraz zredukować ryzyko nawrotów.

ROZDZIAŁ X

Summary

Acute lymphoblastic leukemia represents a group of lymphoid neoplasms at the precursor stage of the B or T line, resulting from genetic changes that block lymphoid differentiation and lead to abnormal cell proliferation and survival. However, the exact pathomechanisms behind this disease remain unknown. Most likely, the process of leukemogenesis can be triggered by a small change in the expression or function of some transcription factors. Such factors are the proteins encoded by the *RUNX* family genes and the *CEBPA* gene.

The main assumption of the doctoral dissertation was the assessment of selected genes encoding transcription factors involved in hematopoiesis, apoptosis and proliferation. Using the PCR-RFLP technique, polymorphisms of the *RUNX1* rs2268277 and *RUNX3* rs6672420 genes were evaluated. Relative expression levels of the *RUNX1*, *RUNX3* and *CEBPA* genes were examined using RT-qPCR. The presence of *RUNX1/RUNX1T1* fusion gene expression was assessed using a TaqMan probe. The study included 60 patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia, treated at the Institute of Hematology and Transfusion Medicine in Warsaw. Investigated material comprised peripheral blood collected on EDTA, from which DNA and RNA were isolated, respectively. In addition, 60 samples of DNA collected from healthy people were used as a reference group for the tested polymorphisms.

Conducted analysis allowed to define final conclusions. The rs2268277 and rs6672420 polymorphisms evaluated in the study are not related to the observed levels of expression and the course of the disease process among patients with ALL. When assessing transcript levels, the performed experiments seem to confirm the previous hypotheses of researchers that both the reduction and increase of mRNA levels of the *RUNX* family genes may be involved in the pathogenesis of acute leukemias. The *RUNX1* gene in ALL cases exhibits oncogene traits, while the *RUNX3* gene appears to play a suppressor role. The lack of correlation between expression levels and patient demographic characteristics, such as gender and age, suggests that

assessment of *RUNX1* and *RUNX3* genes can be used as potential targets in targeted therapy. However, to confirm this hypothesis, further studies are required with larger investigated groups. The *RUNX1/RUNX1T1* fusion gene is not associated with an increased incidence of ALL since its presence was not found in any of the studied patients. The level of *CEBPA* gene expression is probably not related to the development and progression of acute lymphoblastic leukemia.

Characteristics and understanding of the *RUNX* and *CEBPA* genes function in the group of patients with acute lymphoblastic leukemia may translate into new therapeutic strategies and their individualization. Which in the future may help patients with ALL, especially adults and the elderly, obtain a greater chance of complete disease remission and reduce the risk of recurrence.

ROZDZIAŁ XI

Piśmiennictwo

Allison LA. Podstawy Biologii Molekularnej. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, wyd. 1, 2009, ISBN: 9788323505273.

Bachman J. Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 2013; 530:67-74.

Bae SC, Yamaguchi-Iwai Y, Ogawa E, Maruyama M, Inuzuka M, Kagoshima H, et al. Isolation of PEBP2 alpha B cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene, AML1. *Oncogene* 1993; 8(3):809-814.

Bal J. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, wyd. 3, 2013, ISBN: 978-83-01-16665-6.

Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, et al. The RUNX3 gene – sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279(2): 221–232.

Barghout SH, Zepeda N, Vincent K, Azad AK, Xu Z, Yang C, et al. RUNX3 contributes to carboplatin resistance in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2015; 138(3):647-55.

Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, Huguet F, Boulland ML, Leguay T, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2014; 123: 3739–3749.

Ben-Ami O, Friedman D, Leshkowitz D, Goldenberg D, Orlovsky K, Pencovich N, et al. Addition of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1. *Cell Rep* 2013; 4:1131–1143.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33: 451–458.

Blyth K, Vaillant F, Hanlon L, Mackay N, Bell M, Jenkins A, et al. Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways in vivo. *Cancer Res* 2006; 66(4):2195-201.

Brown TA. *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, wyd. 2, 2018, ISBN: 9788301156343.

Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 1116–1123.

Carvalho R, Milne AN, Polak M, Corver WE, Offerhaus GJ, Weterman MA. Exclusion of RUNX3 as a tumour-suppressor gene in early-onset gastric carcinomas. *Oncogene* 2005; 24(56):8252-8.

CEBPA gene, strona internetowa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEBPA> dostęp on-line 20.12.2019.

Chapiro E, Russell L, Radford-Weiss I, Bastard C, Lessard M, Struski S, et al. Overexpression of CEBPA resulting from the translocation t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 108(10):3560-3.

Chen F, Bai J, Li W, Mei P, Liu H, Li L, et al. RUNX3 suppresses migration, invasion and angiogenesis of human renal cell carcinoma. *PLoS One* 2013; 8(2):e56241.

Chen F, Liu X, Bai J, Pei D, Zheng J. The emerging role of RUNX3 in cancer metastasis (Review). *Oncol Rep* 2016; 35(3):1227–1236.

Cheng CK, Li L, Cheng SH, Lau KM, Chan NP, Wong RS, et al. Transcriptional repression of the RUNX3/AML2 gene by the t(8;21) and inv(16) fusion proteins in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 112(8):3391-402.

Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6(1):e2014073.

Choi J, Goh G, Walradt T, Hong BS, Bunick CG, Chen K, et al. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet* 2015; 47(9):1011–1019.

Costa DB, Li S, Kocher O, Feins RH, Keller SM, Schiller JH, et al. Immunohistochemical analysis of C/EBPalpha in non-small cell lung cancer reveals frequent down-regulation in stage II and IIIA tumors: a correlative study of E3590. *Lung Cancer* 2007; 56(1):97-103.

Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(D1):D745-D751.

da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, Martinez-Escala E, Guitart J, Tensen CP, et al. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Genet* 2015; 47(12):1465–1470.

Della Gatta G, Palomero T, Perez-Garcia A, Ambesi-Impiombato A, Bansal M, Carpenter ZW, et al. Reverse engineering of TLX oncogenic transcriptional networks identifies RUNX1 as tumor suppressor in T-ALL. *Nat Med* 2012; 18(3):436-40.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4):424-447.

Eliseev RA, Dong YF, Sampson E, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. Runx2-mediated activation of the Bax gene increases osteosarcoma cell sensitivity to apoptosis. *Oncogene* 2008; 27(25):3605-14.

Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia* 2014; 28(4):794-803.

Ferrari N, Mohammed ZM, Nixon C, Mason SM, Mallon E, McMillan DC, et al. Expression of RUNX1 correlates with poor patient prognosis in triple negative breast cancer. *PLoS One* 2014; 9:e100759.

Forster VJ, Nahari MH, Martinez-Soria N, Bradburn AK, Ptasinska A, Assi SA, et al. The leukemia-associated RUNX1/ETO oncoprotein confers a mutator phenotype. *Leukemia* 2016; 30(1):250-3.

Fu L, Fu H, Tian L, Xu K, Hu K, Wang J, et al. High expression of RUNX1 is associated with poorer outcomes in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2016;7:15828–15839.

Ge T, Yin M, Yang M, Liu T, Lou G. MicroRNA-302b suppresses human epithelial ovarian cancer cell growth by targeting RUNX1. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34:2209–2220.

Gergen JP, Butler BA. Isolation of the *Drosophila* segmentation gene *runt* and analysis of its expression during embryogenesis. *Genes Dev* 1988; 2(9):1179-1193.

Gergen JP, Wieschaus EF. The localized requirements for a gene affecting segmentation in *Drosophila*: analysis of larvae mosaic for *runt*. *Dev Biol* 1985; 109(2):321-335.

Gholami M, Bayat S, Manoochehrabadi S, Pashaiefar H, Omrani MD, Jalaeikhoo H, et al. Investigation of CEBPA and CEBPA-AS Genes Expression in Acute Myeloid Leukemia. *Rep Biochem Mol Biol* 2019; 7(2):136-141.

Goel A, Arnold CN, Tassone P, Chang DK, Niedzwiecki D, Dowell JM, et al. Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer* 2004; 10;112(5):754-9.

Goyama S, Huang G, Kurokawa M, Mulloy JC. Posttranslational modifications of RUNX1 as potential anticancer targets. *Oncogene* 2015; 34:3483–3492.

Goyama S, Schibler J, Cunningham L, Zhang Y, Rao Y, Nishimoto N, et al. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *J Clin Invest* 2013; 123:3876–3888.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al.; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116(3):354-65.

Grossmann V, Kern W, Harbich S, Alpermann T, Jeromin S, Schnittger S, et al. Prognostic relevance of RUNX1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2011; 96(12):1874-7.

Haider A, Steininger A, Ullmann R, Hummel M, Dimitrova L, Beyer M, et al. Inactivation of RUNX3/p46 Promotes Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2016 Nov;136(11):2287-2296.

Halmos B, Huettner CS, Kocher O, Ferenczi K, Karp DD, Tenen DG. Down-regulation and antiproliferative role of C/EBPalpha in lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62(2):528–534.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835–3849.

Hay WW, Levin MJ, Deterding RR, Sondheimer JM, Jackowska T. *Pediatrics. Diagnostyka i leczenie*. Tom 1-2. Czelej, Lublin, 2011, wyd.1, ISBN: 978-83-7563-132-6.

Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27(suppl 5):v69-v82.

Hołowiecki J, Krawczyk-Kuliś M, Giebel S, Jagoda K, Stella-Hołowiecka B, Piątkowska-Jakubas B, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Phnegative adult acute lymphoblastic leukaemia: the Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study. *Br J Haematol* 2008; 142: 227–237.

Huang B, Qu Z, Ong CW, Tsang YH, Xiao G, Shapiro D, et al. RUNX3 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting estrogen receptor α . *Oncogene* 2012; 31(4):527-34.

Huang SP, Lan YH, Lu TL, Pao JB, Chang TY, Lee HZ. Clinical significance of runt-related transcription factor 1 polymorphism in prostate cancer. *BJU Int* 2011; 107(3):486-92.

Illendula A, Gilmour J, Grembecka J, Tirumala VSS, Boulton A, Kuntimaddi A, et al. Small molecule inhibitor of CBF β -RUNX binding for runx transcription factor driven cancers. *EBioMedicine* 2016; 8:117–131.

Imai Y, Kurokawa M, Tanaka K, Friedman AD, Ogawa S, Mitani K, et al. TLE, the human homolog of groucho, interacts with AML1 and acts as a repressor of AML1-induced transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252(3):582-9.

Ito Y, Bae SC, Chuang LS. The RUNX family: Developmental regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:81–95.

Jeong D, Kim H, Ryu A, et al. Loss of RUNX3 is significantly associated with advanced tumor grade and stage in endometrial cancers. *Mol Med Rep* 2018; 17(6):8173–8179.

Jin Z, Han Y, Han X. Loss of RUNX3 expression may contribute to poor prognosis in patients with chondrosarcoma. *J Mol Histol* 2013; 44(6):645-52.

Kawalec W, Grenda R, Kulus M. *Pediatrics TOM I – II*. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2018, wyd. II, ISBN: 978-83-200-5661-7.

Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, Ha YS, Bae SC, Kim WJ. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008; 180(3):1141-5.

Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, et al. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005; 65(20):9347-54.

Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBP α differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* 2009 ;27(4):619–628.

Krawczyk-Kuliś M, Kyrz-Krzemień S. Ostra białaczka limfoblastyczna – postępy w diagnostyce i leczeniu u dorosłych. *Postępy Nauk Medycznych*, 2011;t. XXIV, nr 7.

Krygier A, Szmajda D, Żebrowska M, Jeleń A, Balcerczak E. Expression levels of the runt-related transcription factor 1 and 3 genes in the development of acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* 2018; 15(5):6733–6738.

Kurklu B, Whitehead RH, Ong EK, Minamoto T, Fox JG, Mann JR, et al. Lineage-specific RUNX3 hypomethylation marks the preneoplastic immune component of gastric cancer. *Oncogene* 2015; 34(22):2856-66.

Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM, et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004; 104(9):2646-54.

Lam K, Zhang DE. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17:1120-39.

Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. *Cell* 2018; 172(4):650-665.

Lee KS, Lee YS, Lee JM, Ito K, Cinghu S, Kim JH, et al. Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer. *Oncogene* 2010; 10;29(23):3349-61.

Lee YS, Lee JW, Jang JW, Chi XZ, Kim JH, Li YH, et al. Runx3 inactivation is a crucial early event in the development of lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2013; 24(5):603-16.

Levanon D, Glusman G, Bangsow T, Ben-Asher E, Male DA, Avidan N, et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/ AML1. *Gene* 2001; 262:23–33.

Levanon D, Groner Y. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 2004; 23(24):4211-9.

Lim B, Ju H, Kim M, Kang C. Increased genetic susceptibility to intestinal-type gastric cancer is associated with increased activity of the RUNX3 distal promoter. *Cancer* 2011; 117(22):5161–5171.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25: 402-408.

Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Szalata M, Barciszewska AM, Nowak S, Kleszcz R, et al. The methylation of a panel of genes differentiates low-grade from high-grade gliomas. *Tumour Biol* 2015; 36(5):3831-41.

Marouf C, Göhler S, Filho MI, Hajji O, Hemminki K, Nadifi S, Försti A. Analysis of functional germline variants in APOBEC3 and driver genes on breast cancer risk in Moroccan study population. *BMC Cancer* 2016, 26;16:165.

Medinger M, Lengerke C, Passweg J. Novel prognostic and therapeutic mutations in acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics Proteomics* 2016; 13:317–329.

Mevel R, Draper JE, Lie-A-Ling M, Kouskoff V, Lacaud G. RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development* 2019; 146(17).

Mikhail FM, Sinha KK, Sauntharajah Y, Nucifora G. Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *J Cell Physiol* 2006; 207(3):582-93.

Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, et al. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* 1993; 12(7):2715-21.

Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(14): 2762–2769.

Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(23):10431-10434.

Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, et al. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 2007; 26(4):583-93.

Müller AM, Duque J, Shizuru JA, Lübbert M. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene* 2008; 27(44):5759–5773.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, et al. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(14):6859-6863.

Olofsson LE, Orho-Melander M, William-Olsson L, Sjöholm K, Sjöström L, Groop L, et al. CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) in adipose tissue regulates genes in lipid and glucose metabolism and a genetic variation in C/EBPalpha is associated with serum levels of triglycerides. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(12):4880-6.

Orozco G, Sánchez E, Gómez LM, González-Gay MA, López-Nevot MA, Torres B, et al. Study of the role of functional variants of SLC22A4, RUNX1 and SUMO4 in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(6):791-5. doi: 10.1136/ard.2005.044891. Epub 2005 Oct 25. PMID: 16249223; PMCID: PMC1798171.

Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: Another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* 2004; 23:4284–4296.

Otálora-Otálora BA, Henríquez B, López-Kleine L, Rojas A. RUNX family: Oncogenes or tumor suppressors (Review). *Oncol Rep* 2019; 42(1):3-19.

Ozaki T, Nakagawara A, Nagase H. RUNX Family Participates in the Regulation of p53-Dependent DNA Damage Response. *Int J Genomics* 2013; 2013:271347.

Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15(17):5303–5307.

Parkin SE, Baer M, Copeland TD, Schwartz RC, Johnson PF. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (I κ B/EBP). *J Biol Chem* 2002; 277: 23563-72.

Patel B, Rai L, Buck G, Richards SM, Mortuza Y, Mitchell W, et al. Minimal residual disease is a significant predictor of treatment failure in non T-lineage adult acute lymphoblastic leukaemia: final results of the international trial UKALL XII/ECOG2993. *Br J Haematol* 2010; 148: 80–89.

Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 2002; 30(1):48-58.

Pieronkiewicz M, Lewandowski K. Prognostic significance of CEBPA gene mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia* 2010; 14(6):363-371.

Porse BT, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friis-Hansen L, et al. E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* 2001; 107(2):247-58.

Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1030–43.

Puig-Kröger A, Aguilera-Montilla N, Martínez-Nuñez R, Domínguez-Soto A, Sánchez-Cabo F, Martín-Gayo E, et al. The novel RUNX3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and downregulates IL-8 expression. *Immunobiology* 2010; 215(9-10):812-20.

Ranjan R, Thompson EA, Yoon K, Smart RC. C/EBPalpha expression is partially regulated by C/EBPbeta in response to DNA damage and C/EBPalpha-deficient fibroblasts display an impaired G1 checkpoint. *Oncogene* 2009; 28: 3235-45.

Robertson FM, Chu K, Fernandez SV, Mu Z, Zhang X, liu H, et al. Genomic profiling of pre-clinical models of inflammatory breast cancer identifies a signature of epithelial plasticity and suppression of TGF β signaling. *J Clin Exp Pathol* 2012; 2(5): 119.

Rubnitz JE, Look AT. Molecular basis of leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 1998; 5(4):264–270.

Salto-Tellez M, Peh BK, Ito K, Tan SH, Chong PY, Han HC, et al. RUNX3 protein is overexpressed in human basal cell carcinomas. *Oncogene* 2006; 25(58):7646-9.

Saraiva-Esperón U, Ruibal A, Herranz M. The contrasting epigenetic role of RUNX3 when compared with that of MGMT and TIMP3 in glioblastoma multiforme clinical outcomes. *J Neurol Sci.* 2014; 347(1-2):325-31.

Sato A, Yamada N, Ogawa Y, Ikegami M. CCAAT/enhancer-binding protein- α suppresses lung tumor development in mice through the p38 α MAP kinase pathway. *PLoS One* 2013; 8(2):e57013.

Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):291–330.

Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007; 109(3):926-35.

Shastri BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* 2009; 578:3–22.

Shih LY, Huang CF, Lin TL, Wu JH, Wang PN, Dunn P, et al. Heterogeneous patterns of CEBP α mutation status in the progression of myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia to acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5):1821-6.

Silva FP, Morolli B, Storlazzi CT, Anelli L, Wessels H, Bezrookove V, et al. Identification of RUNX1/AML1 as a classical tumor suppressor gene. *Oncogene* 2003; 22:538–547.

Silver N, Best S, Jiang J, Lay Thein S. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006; 7:33.

Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD, Wolff RK. Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF- β -signaling pathway. *Carcinogenesis* 2011; 32(3):318–326.

Słomski R. Analiza DNA: teoria i praktyka. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań, wyd. I, 2011, ISBN: 9788371606076.

Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* 2017; 129:2070–2082.

Steponaitis G, Kazlauskas A, Vaitkienė P, Deltuva VP, Mikuciunas M, Skiriutė D. Oncosuppressive Role of RUNX3 in Human Astrocytomas. *Journal of Oncology* 2019; Article ID 1232434, 10 pages.

Studzińska A, Tyburski J, Dąca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategię monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008; 1 (80) 71–85.

Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, Quek T, Ito K, Salto-Tellez M. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(2):315-31.

Swart GWM, van Groningen JJM, van Ruissen F, Bergers M, Schalkwijk J. Transcription factor C/EBP- α : novel sites of expression and cloning of the human gene. *Biol Chem* 1997; 378(5):373-9.

Szczeklik A, Gajewski P. Interna. Medycyna Praktyczna, Kraków, 2018, wyd. 9, ISBN: 978-83-7430-548-8.

Terry A, Kilbey A, Vaillant F, Stewart M, Jenkins A, Cameron E, et al. Conservation and expression of an alternative 3' exon of Runx2 encoding a novel proline-rich C-terminal domain. *Gene* 2004; 336(1):115-25.

Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017;7(6):e577.

Thompson EA, Zhu S, Hall JR, House JS, Ranjan R, Burr JA, et al. C/EBP α expression is downregulated in human nonmelanoma skin cancers and inactivation of C/EBP α confers susceptibility to UVB-induced skin squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 2011; 131(6):1339-46.

Tighe JE, Calabi F. Alternative, out-of-frame runt/MTG8 transcripts are encoded by the derivative (8) chromosome in the t(8;21) of acute myeloid leukemia M2. *Blood* 1994; 84(7):2115-21.

Tighe JE, Calabi F. t(8;21) breakpoints are clustered between alternatively spliced exons of MTG8. *Clin Sci (Lond)* 1995; 89:215–218.

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, et al. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 35(4):341-8.

Tomizawa M, Watanabe K, Saisho H, Nakagawara A, Tagawa M. Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein alpha and beta genes in human hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker. *Anticancer Res* 2003; 23(1A):351–354.

Tracey WD, Speck NA. Potential roles for RUNX1 and its orthologs in determining hematopoietic cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11:337–342.

Tsunematsu T, Kudo Y, Iizuka S, Ogawa I, Fujita T, Kurihara H, et al. RUNX3 has an oncogenic role in head and neck cancer. *PLoS One*. 2009; 4(6):e5892.

Tyburski J, Studzińska A, Dąca P, Tretyn A, PCR w czasie rzeczywistym. *Metody analizy danych. Biotechnologia* 2008; 1 (80) 86–96.

van der Kouwe E, Staber PB. RUNX1-ETO: Attacking the Epigenome for Genomic Instable Leukemia. *Int J Mol Sci* 2019; 20(2):350.

van Wijnen AJ, Stein GS, Gergen JP, Groner Y, Hiebert SW, Ito Y, et al. Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene* 2004; 23(24):4209-4210.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.

Wang QF, Cleaves R, Kummalue T, Nerlov C, Friedman AD. Cell cycle inhibition mediated by the outer surface of the C/EBPalpha basic region is required but not sufficient for granulopoiesis. *Oncogene* 2003; 22(17):2548-57.

Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol* 1993; 13(6):3324-3339.

Wedel A, Ziegler-Heitbrock HW. The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology* 1995; 193(2-4):171-85.

Wen J, Zheng T, Hu K, Zhu C, Guo L, Ye G. Promoter methylation of tumor-related genes as a potential biomarker using blood samples for gastric cancer detection. *Oncotarget* 2017; 8(44):77783–77793.

Wesoly J, Toes RE, Slagboom PE, Huizinga TW. RUNX1 intronic SNP is not associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Dutch Caucasians. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(9):1196.

Whittle MC, Hingorani SR. Runx3 and cell fate decisions in pancreas cancer. *Adv Exp Med Biol* 2017; 962:333-352.

Whittle MC, Izeradjene K, Rani PG, Feng L, Carlson MA, DelGiorno KE, et al. RUNX3 controls a metastatic switch in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell* 2015; 161(6):1345-60.

Wilkinson AC, Ballabio E, Geng H, North P, Tapia M, Kerry J, et al. RUNX1 is a key target in t(4;11) leukemias that contributes to gene activation through an AF4-MLL complex interaction. *Cell Rep* 2013; 3:116–127.

Wu D, Tian Y, Gong W, Zhu H, Zhang Z, Wang M, Wang S, Tan M, Wu H, Zhang Z. Genetic variants in the Runt-related transcription factor 3 gene contribute to gastric cancer risk in a Chinese population. *Cancer Sci* 2009; 100(9):1688-94.

Wu M, Li C, Zhu G, Wang Y, Jules J, Lu Y, et al. Deletion of core-binding factor β (Cbf β) in mesenchymal progenitor cells provides new insights into Cbf β /Runx complex function in cartilage and bone development. *Bone* 2014; 65: 49–59.

Zaidi SK, Javed A, Choi JY, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, et al. A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 17):3093-102.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012; 481(7380):157-63.

Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP α . *Immunity* 2004; 21(6):853-63.

Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, et al. Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5):3070-5.

Zhang Z, Wang S, Wang M, Tong N, Fu G, Zhang Z. Genetic variants in RUNX3 and risk of bladder cancer: a haplotype-based analysis. *Carcinogenesis* 2008; 29(10):1973-8.

Zuckerman T, Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep* 2014; 6:59.

ROZDZIAŁ XII

Spis tabel

1.1 Klasyfikacja ostrych białaczek / chłoniaków limfoblastycznych wg WHO 2016r	10
1.2 Podtypy immunofenotypowe w ostrej białaczce limfoblastycznej	11
5.1 Sekwencje starterów użyte do zbadania miejsc polimorficznych	41
5.2 Skład mieszaniny reakcyjnej w przebiegu PCR dla badanych SNP	42
5.3 Warunki amplifikacji w przebiegu PCR dla badanych SNP	42
5.4 Skład mieszaniny oraz warunki trawienia enzymami restrykcyjnymi	44
5.5 Skład mieszaniny do reakcji odwrotnej transkrypcji	52
5.6 Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji	52
5.7 Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR oraz real-time PCR	53
5.8 Skład mieszaniny reakcyjnej dla PCR	54
5.9 Warunki amplifikacji dla PCR	54
5.10 Skład mieszaniny reakcyjnej dla real-time PCR	57
5.11 Warunki amplifikacji dla real-time PCR	57
5.12 Skład mieszaniny w reakcji z sondą TaqMan	61
5.13 Parametry amplifikacji w reakcji z sondą TaqMan	61
6.1 Dane demograficzno-kliniczne pacjentów	64
6.2 Rozkład częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 dla grupy badanej i kontrolnej	66
6.3 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 w zależności od płci oraz podtypu klinicznego białaczki w grupie badanej	67
6.4 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 w zależności od wieku, leukocytozy oraz odsetka blastów w grupie badanej	68
6.5 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 w zależności od obecności chromosomu Philadelphia w grupie badanej	68

6.6 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL ...	69
6.7 Względny poziom ekspresji genu <i>RUNX1</i> w obrębie grupy badanej.....	71
6.8 Względny poziom ekspresji genu <i>RUNX1</i> w zależności od płci w grupie badanej ...	72
6.9 Względny poziom mRNA <i>RUNX1</i> w zależności od podtypu białaczki w grupie badanej	73
6.10 Względny poziom mRNA <i>RUNX1</i> w zależności od obecności chromosomu Ph w grupie badanej	76
6.11 Względny poziom mRNA <i>RUNX1</i> w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL.....	77
6.12 Zależność między genotypem polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 a względnym poziomem ekspresji <i>RUNX1</i> w grupie badanej.....	77
6.13 Rozkład częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu <i>RUNX3</i> rs6672420 dla grupy badanej i kontrolnej.....	79
6.14 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX3</i> rs6672420 w zależności od płci oraz podtypu klinicznego białaczki w grupie badanej	81
6.15 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs6672420 w zależności od wieku, leukocytozy oraz odsetka blastów w grupie badanej.....	82
6.16 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX3</i> rs6672420 w zależności od obecności chromosomu Philadelphia w grupie badanej	83
6.17 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu <i>RUNX3</i> rs6672420 w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL ...	83
6.18 Względny poziom ekspresji genu <i>RUNX3</i> w obrębie grupy badanej	86
6.19 Względny poziom ekspresji genu <i>RUNX3</i> w zależności od płci w grupie badanej .	87
6.20 Względny poziom mRNA <i>RUNX3</i> w zależności od podtypu białaczki w grupie badanej	87
6.21 Względny poziom mRNA <i>RUNX3</i> w zależności od obecności chromosomu Ph w grupie badanej	90

6.22 Względny poziom mRNA <i>RUNX3</i> w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL.....	92
6.23 Zależność między genotypem polimorfizmu <i>RUNX3</i> rs6672420 a względnym poziomem ekspresji <i>RUNX3</i> w grupie badanej.....	92
6.24 Względny poziom ekspresji genu <i>CEBPA</i> w grupie badanej	97
6.25 Względny poziom ekspresji genu <i>CEBPA</i> w zależności od płci w grupie badanej ..	98
6.26 Względny poziom mRNA <i>CEBPA</i> w zależności od podtypu białaczki w grupie badanej	99
6.27 Względny poziom mRNA <i>CEBPA</i> w zależności od obecności chromosomu Ph w grupie badanej	102
6.28 Względny poziom mRNA <i>CEBPA</i> w zależności od obecności markera CD10 oraz HLA-DR w podgrupie pacjentów B-ALL	102

ROZDZIAŁ XIII

Spis rycin

2.1 Struktura genów z rodziny <i>RUNX</i> i ich produktów białkowych	24
2.2 Lokalizacja chromosomowa genu <i>RUNX1</i>	26
2.3 Lokalizacja chromosomowa genu <i>RUNX3</i>	29
2.4 Budowa genu fuzyjnego <i>RUNX1/RUNX1T1</i> i jego produktu białkowego	33
3.1 Schematyczny model budowy białek rodziny C/EBP.....	34
3.2 Lokalizacja chromosomowa genu <i>CEBPA</i>	35
5.1 Protokół izolacji DNA	40
5.2 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs2268277	47
5.3 Przykładowy wynik elektroforezy produktów trawienia dla polimorfizmu rs2268277	47
5.4 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs6672420	48
5.5 Przykładowy wynik elektroforezy produktów trawienia dla polimorfizmu rs6672420	49
5.6 Protokół izolowania RNA	50
5.7 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu <i>GAPDH</i>	55
5.8 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu referencyjnego <i>GAPDH</i>	58
5.9 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu referencyjnego <i>GAPDH</i>	59
6.1 Wykres częstości występowania poszczególnych genotypów rs2268277 w grupie badanej i grupie kontrolnej.....	66
6.2 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu <i>RUNX1</i>	69
6.3 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu badanego <i>RUNX1</i>	70
6.4 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu badanego <i>RUNX1</i>	71
6.5 Log10 względnego poziomu ekspresji genu <i>RUNX1</i> wśród grupy badanej	72

6.6 Wykres zależności względnego poziomu ekspresji <i>RUNX1</i> od płci w grupie badanej ($p=0,0645$).....	73
6.7 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>RUNX1</i> a wiekiem w badanej grupie ($p=0,547$)	74
6.8 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>RUNX1</i> a leukocytozą wśród grupy badanej ($p=0.0354$)	75
6.9 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>RUNX1</i> a odsetkiem blastów w szpiku kostnym u pacjentów z ALL ($p=0,786$)	75
6.10 Wykres zależności między genotypem polimorfizmu <i>RUNX1</i> rs2268277 a względnym poziomem ekspresji <i>RUNX1</i> , wśród pacjentów z ALL ($p=0,1926$).....	78
6.11 Wykres obserwowanych licznosci poszczególnych genotypów rs6672420 w grupie badanej i grupie kontrolnej.....	80
6.12 Rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu rs6672420 <i>RUNX3</i> w zależności od płci ($p=0,0283$).....	81
6.13 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu <i>RUNX3</i>	84
6.14 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu badanego <i>RUNX3</i>	85
6.15 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu badanego <i>RUNX3</i>	85
6.16 Log10 względnego poziomu ekspresji genu <i>RUNX3</i> wśród grupy badanej.....	86
6.17 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>RUNX3</i> a wiekiem w grupie badanej.....	88
6.18 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>RUNX3</i> a leukocytozą w grupie badanej ($p=0,910$).....	89
6.19 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>RUNX3</i> a odsetkiem blastów w szpiku kostnym w grupie badanej ($p=0,808$).....	89
6.20 Wykres zależności względnego poziomu ekspresji <i>RUNX3</i> od obecności chromosomu Philadelphia wśród grupy badanej	91
6.21 Wykres zależności między genotypem polimorfizmu <i>RUNX3</i> rs6672420 a względnym poziomem ekspresji <i>RUNX3</i> w grupie badanej	93

6.22 Przykładowy wynik badania obecności mRNA genu fuzyjnego <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	94
6.23 Przykładowy wynik elektroforezy produktów PCR dla genu <i>CEBPA</i>	95
6.24 Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu badanego <i>CEBPA</i>	96
6.25 Przykładowe krzywe topnienia produktów reakcji dla genu badanego <i>CEBPA</i>	96
6.26 Log10 względnego poziomu ekspresji genu <i>CEBPA</i> wśród grupy badanej.....	97
6.27 Wykres zależności względnego poziomu ekspresji <i>CEBPA</i> od płci w grupie badanej ($p=0,0363$).....	99
6.28 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>CEBPA</i> a wiekiem w grupie badanej ($p=0,619$)	100
6.29 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>CEBPA</i> a leukocytozą w grupie badanej ($p=0,884$).....	101
6.30 Wykres korelacji r Pearsona między względnym poziomem ekspresji <i>CEBPA</i> a odsetkiem blastów w szpiku kostnym w grupie badanej ($p=0,115$).....	101

ROZDZIAŁ XIV

Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych

Publikacje:

1. **Szmajda Dagmara**, Krygier Adrian, Balcerczak Ewa, Żebrowska Marta „Wstępna ocena polimorfizmu T-129C w regionie promotorowym genu ABCB1 u pacjentów z rakiem żołądka” *Folia Medica Lodzensia*, 2015; 42/1: 19-32
2. Krygier Adrian, Żebrowska Marta, Balcerczak Ewa, **Szmajda Dagmara** „Markery nowotworowe w raku żołądka – podział I charakterystyka” *Folia Medica Lodzensia*, 2015; 42/1: 5-18
3. **Szmajda Dagmara**, Balcerczak Ewa, Krygier Adrian „Standardy diagnostyki oraz nowe trendy w leczeniu ostrej białaczki szpikowej” *Acta Haematologica Polonica*, 2017; DOI: 10.1016/j.achaem.2017.07.009
4. Krygier Adrian, **Szmajda Dagmara**, Żebrowska Marta, Jeleń Agnieszka, Balcerczak Ewa “Expression levels of the runt-related transcription factor 1 and 3 genes in the development of acute myeloid leukemia” *Oncology Letters*, 2018, 15, 6733-6738. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8143>
5. **Szmajda-Krygier Dagmara**, Krygier Adrian, Jamroziak Krzysztof, Żebrowska-Nawrocka Marta, Balcerczak Ewa “Expression level of CEBPA gene in acute lymphoblastic leukemia individuals” *Sci Rep* 9, 15640 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52104-w>
6. Żebrowska-Nawrocka Marta, Wosiak Agnieszka, Pietrzak Jacek, Agnieszka Jeleń, Krygier Adrian, **Szmajda-Krygier Dagmara**, Aleksandra Sałagacka-Kubiak, Ewa Balcerczak „NFKB2 gene expression in patients with peptic ulcer diseases and gastric cancer” *Mol Biol Rep*, 2020 [https://doi.org/10.1007/s11033-020-05299-](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05299-5)

Konferencje i kongresy:

1. **Szmajda Dagmara**, Krygier Adrian, Klatte Karolina, Kubera Lena, Jażdżyk Marcin „Determination Of ABCB1 Gene Expression Level In Biopsy Samples Taken From Patients Suffering From Gastric Ulcer”. 51st Polish and 9th International Annual Training & Scientific Medical Congress of Students’ Scientific Society and Junior Doctors “Juvenes Pro Medicina”, Lodz, Poland 25-27 April 2013
2. Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda** „Ustalenie Poziomów Ekspresji Genu ABCB1 w Biopsatach Błony Śluzowej Pochodzących od Pacjentów z Chorobą Wrzodową Żołądka.” I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studentów Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, 14-15 Października 2013
3. Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda** “ABCG2 gene, its expression level and a potential association with gastric ulcer disease” 52nd Polish and 10th International Annual Training & Scientific Medical Congress of Students’ Scientific Society and Junior Doctors “Juvenes Pro Medicina”, Lodz, Poland 8th-10th May 2014
4. Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda**, Karolina Klatte “The significance of T-129C polymorphism of the ABCB1 gene in patients with gastric ulcer.” 53rd Polish and 11th International Annual Training & Scientific Medical Congress of Students’ Scientific Society and Junior Doctors “Juvenes Pro Medicina, Lodz, Poland, 22nd-23rd May 2015
5. **Dagmara Szmajda**, Adrian Krygier, Karolina Klatte “Assessment of ABCB1 gene promoter region polymorphism in tissues obtained from gastric cancer patients.” 53rd Polish and 11th International Annual Training & Scientific Medical Congress of Students’ Scientific Society and Junior Doctors “Juvenes Pro Medicina, Lodz, Poland, 22nd-23rd May 2015
6. Marta Żebrowska, Aleksandra Sałagacka-Kubiak, Agnieszka Jeleń, **Dagmara Szmajda**, Adrian Krygier, Dorota Jesionek-Kupnicka, Marek Mirowski, Ewa Balcerczak “Assessment of T-129C polymorphism in the promoter region of ABCB1 gene in the group of patients with gastric cancer” The 42nd Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers “Oncology in the Biomarkers Era: Biology-Diagnostics-Therapy” Zakopane, Poland, 3-7.10.2015

7. Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda** "RUNX1 gene expression level in patients with acute myeloid leukemia" 54th Polish and 12th International Annual Training & Scientific Medical Congress of Students' Scientific Society and Junior Doctors "Juvenes Pro Medicina, Lodz, Poland 22nd-23rd April 2016
8. Janas Olga, Krygier Adrian, **Szmajda Dagmara**, Zdżalik Magdalena „Preliminary analysis of the ABCB1 gene expression in colorectal cancer." 54th Polish and 12th International Annual Training & Scientific Medical Congress of Students' Scientific Society and Junior Doctors "Juvenes Pro Medicina, Lodz, Poland 22nd-23rd April 2016
9. Karol Wtorek, Olga Jeziorska, Ewa Balcerczak, Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda** "Wstępna ocena ekspresji genu RUNX1 u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową." IV Ogólnopolska Konferencja Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów „Wschodząca Diagnostyka", Białystok, 8 kwietnia 2017
10. Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda** "Wstępna ocena ekspresji genów RUNX1 oraz RUNX3 u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową" Konferencja Naukowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Kosmetologii I Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – „ 150 Rocznica Urodzin Marii Skłodowskiej-Curie", Łódź, 22 kwietnia 2017
11. Karol Wtorek, Olga Jeziorska, **Dagmara Szmajda**, Adrian Krygier „Relative RUNX1 and RUNX3 gene expression level in patients with acute myeloid leukemia." The 55th Polish and 13th International Training & Scientific Conference of Students' Scientific Societies and Junior Doctors "Juvenes Pro Medicina", Lodz, Poland, 19th-20th May 2017
12. Marta Żebrowska, Sebastian Szulczewski, Magdalena Wiernicka, Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda**, Agnieszka Jeleń, Marek Mirowski, Ewa Balcerczak "NFKB gene expression in gastric cancer in Polish Population- Preliminary Research" XXIst Gliwice Scientific Meeting 2017, Gliwice, Poland, 17th-18th November 2017
13. **Dagmara Szmajda**, Adrian Krygier, Marta Żebrowska, Agnieszka Jeleń, Ewa Balcerczak "RUNX1 AND RUNX3 GENES IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA DEVELOPMENT" XXI Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, Poland, 17-18.11.2017

14. Adrian Krygier **Dagmara Szmajda**, Marta Żebrowska, Agnieszka Jeleń, Ewa Balcerczak "Ocena ekspresji genu CEBPA u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową" 8 Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, Polska, 16-17.12.2017
15. Wiśnik Aneta, Dąbrowska Magdalena, **Szmajda Dagmara**, Krygier Adrian "Preliminary analysis of CEBPA gene expression level in patients with acute lymphoblastic leukemia" The 56th Polish and 14th International Juvenes Pro Medicina Conference, Lodz, Poland, 25th-26th May 2018
16. **Szmajda Dagmara**, Krygier Adrian, Żebrowska-Nawrocka Marta, Balcerczak Ewa "Ekspresja genu RUNX1 wśród pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę limfoblastyczną". IX Ogólnopolska Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, 01-02.12.2018 Warszawa

Nagrody i wyróżnienia:

1. **III miejsce** w LI Ogólnopolskiej i IX Międzynarodowej Konferencji Studenckich Towarzystw Naukowych i Młodych Lekarzy „Juvenes Pro Medicina 2013” za pracę: **Szmajda Dagmara**, Krygier Adrian, Klatte Karolina, Kubera Lena, Jażdżyk Marcin „Determination Of ABCB1 Gene Expression Level In Biopsy Samples Taken From Patients Suffering From Gastric Ulcer”. 25-27 Kwietnia 2013r.
2. **I miejsce** w Konkursie na najlepsze doniesienie ustne sympozjum naukowego „I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studentów Medycyny Laboratoryjnej” w Sosnowcu za pracę: Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda** „Ustalenie Poziomów Ekspresji Genu ABCB1 w Biopsatach Błony Śluzowej Pochodzących od Pacjentów z Chorobą Wrzodową Żołądka”. 14-15 Października 2013
3. **III miejsce** w 53. Ogólnopolskiej i 11. Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Studentów i Młodych Lekarzy „Juvenes Pro Medicina” za pracę: Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda**, Karolina Klatte „Assessment of ABCB1 gene promoter region polymorphism in tissues obtained from gastric cancer patients” 22-23 Maj 2015r.

4. **I miejsce** oraz nagroda ufundowana przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych w Konkursie Prac Magisterskich, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za pracę „Ocena wybranego polimorfizmu genu ABCB1 u pacjentów z rakiem żołądka” 13.11.2015r.
5. **Wyróżnienie** w 8 Konferencji Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, Polska, 16-17.12.2017 za pracę: 12. Adrian Krygier, **Dagmara Szmajda**, Marta Żebrowska, Agnieszka Jeleń, Ewa Balcerczak “Ocena ekspresji genu CEBPA u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową”

Łódź, dn. 20. 02. 2020r.

Dagmara Szmajda-Krygier

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

al. Tadeusza Kościuszki 4, 90-419 Łódź,

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

i Diagnostyki Molekularnej

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem wyłącznym twórcą, w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim (Dz. U. z 1994 r. Nr 24, poz. 83), rozprawy doktorskiej pt: „Ekspresja i Polimorfizmy Genów *RUNX1*, *RUNX3* i *CEBPA* w Ostrej Białaczce Limfoblastycznej”

Równocześnie wyrażam zgodę na nieodpłatne udostępnienie wymienionej pracy Bibliotece Głównej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W tym celu zobowiązuję się przekazać pracę w formie pisemnej oraz w formie elektronicznej (plik formatu PDF na oznaczonej zgodnie z wymogami Rektora Uniwersytetu płycie CD) dla celów archiwizacyjnych.

Podpis