

UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

ROZPRAWA DOKTORSKA

**„OCENA EKSPRESJI I POLIMORFIZMÓW GENÓW, KODOWANYCH PRZEZ NIE
CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH ORAZ TRANSKRYPTU GENU FUZYJNEGO
RUNX1-RUNX1T1 W OSTREJ BIAŁACZCE SZPIKOWEJ”**

ADRIAN KRYGIER

PRACA WYKONANA W:

Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

PROMOTOR PRACY:

prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr n. farm. Marta Żebrowska-Nawrocka



Łódź 2020

Podziękowania:

Pragnę bardzo serdecznie podziękować prof. Ewie Balcerczak, dr Marcie Żebrowskiej-Nawrockiej oraz prof. Markowi Mirowskiemu za nieocenioną pomoc udzieloną podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej, za cenne uwagi dotyczące problematyki badawczej oraz za wyrozumiałość, cierpliwość i motywację do dalszej pracy naukowej

Niniejsza rozprawa doktorska została finansowana ze środków statutowych Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej o numerze 503/3-015-02/503-31-001 oraz Nowego Zadania Badawczego Wydziału Farmaceutycznego o numerze 502-03/3-015-02/502-34-088 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Spis treści

Spis treści.....	3
Wykaz skrótów:.....	6
Rozdział I.....	11
Informacje o jednostce chorobowej	12
1.1 Definicja ostrej białaczki szpikowej	12
1.2 Epidemiologia ostrej białaczki szpikowej.....	15
1.3 Objawy oraz przebieg ostrej białaczki szpikowej	16
1.4 Etiopatogeneza ostrej białaczki szpikowej.....	17
1.4.1 Czynniki molekularne transformacji nowotworowej.....	18
1.4.2 Rola komórek macierzystych białaczki w patogenezie i nawrotach ostrej białaczki szpikowej.....	19
1.4.3 Mechanizmy powodujące nadmierną proliferację blastów	20
1.5 Podział i klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych	20
1.6 Standardy diagnostyki oraz rozpoznania ostrej białaczki szpikowej	24
1.6.1 Wykaz badań stosowanych i zalecanych w diagnostyce ostrej białaczki szpikowej	24
1.6.1.1 Badanie krwi obwodowej- morfologia oraz rozmaz	24
1.6.1.2 Badanie szpiku kostnego.....	25
1.6.1.3 Badanie immunofenotypowe.....	26
1.6.1.4 Badania cytogenetyczne	27
1.6.1.5 Badania molekularne.....	28
1.6.1.6 Badania laboratoryjne	29
1.6.1.7 Badania pomocnicze.....	30
1.6.2 Kryteria rozpoznania ostrej białaczki szpikowej	31
2. Ocena rokowania u pacjentów z ostrą białaczką szpikową	32
3. Leczenie pacjentów z ostrą białaczką szpikową	34
3.1 Leczenie indukcyjne.....	34
3.1.1 Ocena skuteczności leczenia indukcyjnego.....	36
3.1.2 Postępowanie w przypadku uzyskania częściowej remisji lub oporności na zastosowane leczenie.....	37
3.1.3 Powikłania leczenia indukcyjnego	37
3.2 Leczenie konsolidacyjne	38
3.3 Leczenie pokonsolidacyjne	39
3.4 Leczenie wspomagające	39
4. Przeszczep szpiku kostnego.....	40
4.1 Allogeniczny przeszczep szpiku kostnego (allo-HCT)	40

4.2 Autologiczny przeszczep szpiku kostnego (auto-HCT)	41
5. Postępowanie w przypadku nawrotu choroby	42
Charakterystyka wybranych czynników transkrypcyjnych.....	43
6. Rodzina genów <i>RUNX</i>	43
6.1 Gen <i>RUNX1</i>	46
6.1.1 Znaczenie genu <i>RUNX1</i> oraz białka <i>RUNX1</i> w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej.....	48
6.2 Gen <i>RUNX3</i>	50
6.2.1 Znaczenie genu <i>RUNX3</i> oraz białka <i>RUNX3</i> w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej.....	52
6.3 Gen fuzyjny <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	54
6.3.1 Znaczenie genu fuzyjnego <i>RUNX1-RUNX1T1</i> w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej.....	56
7. Gen <i>CEBPA</i>	56
7.1 Znaczenie genu <i>CEBPA</i> oraz białka <i>CEBPA</i> w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej.....	58
8. Gen <i>c-MYC</i>	60
8.1 Znaczenie genu <i>c-MYC</i> oraz białka <i>c-MYC</i> w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej.....	62
Rozdział II.....	64
9. Cel pracy	65
10. Materiały i metody.....	66
10.1 Materiał badany	66
10.2 Metody	67
10.2.1 Izolacja DNA	69
10.2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR (do oceny polimorfizmów pojedynczych nukleotydów).....	70
10.2.3 Elektroforeza w 2% żelu agarozowym	72
10.2.4 Reakcja trawienia enzymem restrykcyjnym.....	75
10.2.5 Izolacja całkowitego RNA	78
10.2.6 Ocena stężenia i czystości wyizolowanego RNA.....	79
10.2.7 Reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR.....	80
10.2.8 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR.....	82
10.2.9 Reakcja Real-Time PCR- PCR w czasie rzeczywistym	86
10.2.10 Ocena obecności genu fuzyjnego <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	91
10.2.11 Jakościowa ocena obecności białka <i>RUNX3</i> oraz białka <i>CEBPA</i> przy wykorzystaniu metody Western-Blot.....	93
11. Analiza statystyczna wyników	98

Rozdział III.....	99
12. Wyniki.....	100
12.1 Charakterystyka grupy badanej.....	100
12.2 Ocena wybranych genotypów i alleli polimorfizmu genu <i>RUNX1</i> oraz genu <i>RUNX3</i>	102
12.3 Wyniki genotypowania polimorfizmu rs2268277 genu <i>RUNX1</i> oraz polimorfizmu rs6672420 genu <i>RUNX3</i> , a dane demograficzne oraz kliniczno–patologiczne pacjentów z AML	104
12.4 Ocena poziomów ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych	115
12.5 Względny poziom ekspresji genów <i>RUNX1</i> , <i>RUNX3</i> , <i>CEBPA</i> oraz <i>c-MYC</i> w porównaniu do cech demograficznych oraz kliniczno-patologicznych pacjentów z AML	123
12.6 Ocena obecności ekspresji genu fuzyjnego <i>RUNX1/RUNX1T1</i> u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową	143
12.7 Ocena związku pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmów rs2268277 genu <i>RUNX1</i> oraz rs6672420 genu <i>RUNX3</i> a względnym poziomem ekspresji tych genów.....	145
12.8 Analiza oceny jakościowej białek <i>RUNX3</i> oraz <i>CEBPA</i> z zastosowaniem techniki Western Blot.....	147
Rozdział IV.....	150
Dyskusja.....	151
Wnioski	170
ROZDZIAŁ V	172
Streszczenie	173
Summary	175
ROZDZIAŁ VI.....	177
Piśmiennictwo	178
Spis Tabel	201
Spis Rycin	203
Spis Wykresów	205
Rozdział VII.....	208
Wykaz publikacji, komunikatów zjazdowych oraz nagród.....	209
Publikacje:	209
Konferencje i kongresy:	210
Nagrody i wyróżnienia:.....	213
OŚWIADCZENIE.....	214

Wykaz skrótów:

AML – ang. acute myeloid leukemia; ostra białaczka szpikowa

HSC – ang. hemapoietic stem cells; macierzyste komórki hematopoezy

GMP – ang. granulocyte and monocyte progenitor; komórki progenitorowe granulocytów i monocytów

MEP – ang. megakaryocyte/erythrocyte progenitors; komórki progenitorowe megakariocytów i erytrocytów

DIC – ang. disseminated intravascular coagulation; zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego

CEBPA – CCAAT Enhancer Binding Protein alpha; białko CCAAT wiążące wzmacniacz

RUNX 1-3 – ang. Runt Related Transcription Factor members 1-3; czynniki transkrypcyjne związane z domeną runt 1-3

ETV6 – ang. ETS Variant Transcription Factor 6; wariant transkrypcyjny czynnika ETS 6

GATA2 – ang. GATA Binding Protein 2, podjednostka białkowa GATA 2

PML-RARA – ang. Regulated Adaptor Molecule 1

CBF – ang. Core-Binding Factor; czynnik wiążący rdzeń

CBF-beta – ang. Core-Binding Factor Subunit Beta; podjednostka beta czynnika wiążącego rdzeń

RUNX1T1 – ang. *RUNX1* Partner Transcriptional co-repressor 1

AF10 (MLLT10) – ang. Histone Lysine Methyltransferase DOT1L Cofactor

NPM1 – ang. Nucleophosmin 1 gene

TP53 – ang. Tumor Protein P53

WT1 – ang. WT1 Transcription Factor; czynnik transkrypcyjny WT1

PHF6 – ang. PHD Finger Protein 6

DNMT – ang. DNA Methyltransferase 1; metylotransferaza DNA 1

TET2 – ang. TET Methylcytosine Dioxygenase 2

IDH1,2 – ang. Isocitrate Dehydrogenase 1-2

FLT3 – ang. Fms related Receptor Tyrosine Kinase 3

KIT – ang. KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase

KRAS – ang. KRAS Proto-Oncogene, GTPase

NRAS – ang. NRAS Proto-Oncogene, GTPase

PTPs – ang. 6-Pyruvoylterahydropterin
KMT2A (MLL) – ang. Lysine Methyltransferase 2A
NSD1 – ang. Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
ASXL1 – ang. AXSL transcriptional Regulator 1
EZH2 – ang. Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2
KDM6A – ang. Lysine Demethylase 6A
MYH11 – ang. Myosin Heavy Chain 11
IRF – ang. Interferon Regulatory Factors; czynniki regulatorowe interferonów 1
LSC – ang. leukemic stem cells; komórki macierzyste białaczki
MRD – ang. minimal residual disease; minimalna choroba resztkowa
BCL2 – ang. BCL2 Apoptosis Regulator; regulator apoptozy BCL2
FAS – ang. FAS cell surface death receptor
FAB – ang. French-American-British group
WHO – ang. World Health Organization; Światowa Organizacja Zdrowia
NOS – ang. not otherwise specified; bez innej specyfikacji
MPAL – ang. mixed phenotype acute leukemia, ostra białaczka szpikowa o mieszanym fenotypie
BCR – ang. BCR Activator of RhoGEF and GTPase
ABL1 – ang. ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase
BCR – ABL1- gen fuzyjny *BCR-ABL1*
MDS – ang. myelodysplastic syndrome; zespół mielodysplastyczny
MECOM (EVI1) – ang. MDS1 and EVI1 Complex Locus
RBM15 – ang. RNA Binding Motif Protein 15
DDX41 – ang. DEAD-Box Helicase 41
ANKRD26 – ang. Ankyrin Repeat Domain 26
SRP72 – ang. Signal Recognition Particle 72
ATG2B – ang. Autophagy Related 2B
GSKIP – ang. GSK3B Interacting Protein
CD – ang. cluster of differentiation; antygeny różnicowania komórkowego
HLA-DR – ang. Human Leukocyte Antigen-DR isotype; główny układ zgodności tkankowej

LDH – ang. lactate dehydrogenase; dehydrogenaza mleczanowa

FISH – ang. fluorescence in situ hybridization; fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

RQ-PCR/RT-qPCR – ang. real-time quantitative polymerase chain reaction; reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

HCT – ang. hematopoietic cell transplantation; przeszczepienie komórek

CR – ang. complete remission; całkowita remisja

ELN – ang. European Leukemia Net; rekomendacje Europejskie Towarzystwo Białaczkowego

U2AF1 – ang. U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1

SF3B1 – ang. Splicing Factor 3b Subunit 1

PALG – Polską Grupę ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych

NCCN – ang. National Comprehensive Cancer Network

Ara-C – cytarabina

NR – ang. no response, brak odpowiedzi na leczenie

hiDAC – ang. High-Dose Cytarabine; wysokie dawki cytarabiny

G0 – podział komórkowy w fazie G0 (faza spoczynku)

RUNT – ang. RUNT domain; domena RUNT

PEBP2aB – ang. Polyomavirus Enhancer-Binding Protein 2 Alpha B Subunit; podjednostka beta białka alfa 2 poliomawirusa wiążącego wzmacniacz

CBFa2 – ang. Core-Binding Factor Subunit Alpha-2; podjednostka alfa-2 czynnika wiążącego rdzeń

RHD – ang. Runt Homology Domain; domena homologii Runt

ID – ang. inhibitory domain; domena hamująca

TD – ang. transactivation domain; domena transaktywacyjna

P1/P2 – ang. distal/proximal promotor; dystalny i proksymalny promotor

TAD – tzw. domena transaktywacyjna- ekson 6

VWRPY – wysoce konserwatywna domena (walina-tryptofan-arginina-prolina-tyrozyna)

TLE – ang. transducin-like enhancer protein

NLS – ang. nuclear localization sequence; domena zwana sygnałem lokalizacji jądrowej

PY – tzw. motyw o sekwencji prolina-tyrozyna

NF-κB – ang. Nuclear Factor Kappa B Subunit 1; czynnik jądrowy podjednostki B

TPO – trombopoetyna

DBD – ang. runt DNA – binding domain; domena białkowa o funkcji wiązania DNA

TAF – ang. TATA-Box Binding Protein Associated Factors

BAL – ostra białaczka bifenotypowa

IL-3 – ang. Interleukin 3; interleukina 3

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

LCK – ang. LCK Proto-Onconege, Src Family Tyrosine Kinase

GM-CSF – ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

Notch-1 – ang. Notch Receptor 1

ETS1 – ang. ETS Proto-Oncogene1, Transcription Factor

ETO – ang. Eight Twenty One protein; dosłownie białko osiem-dwadzieścia-jeden

bZIP – ang. basic-leucine zipper motif; motyw suwaka zasadowo-leucynowego

MYC – ang. Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; homolog onkogenu

AML1 – ang. Acute Myeloid Leukemia 1 gene; gen ostrej białaczki szpikowej 1

MPO – mieloperoksydaza

SNP – ang. Single Nucleotide Polymorphism; polimorfizm pojedynczego nukelotydu

c-Myc – ang. MYC Proto-Oncogene BHLH Transcription Factor, *c-MYC*; *gen c-Myc*

będący protoonkogenem zaliczanym do czynników transkrypcyjnych

IRES – tzw. wewnętrzne miejsce wejścia rybosomu

bHLH – motyw umożliwiający białkom Myc wiązanie DNA

L-Z – tzw. „zamek leucynowy” umożliwiający dimeryzację z czynnikami transkrypcyjnymi

HAT – acetylazy histonowe

PCR – ang. Polymerase chain reaction; reakcja łańcuchowa polimerazy

GAPDH – ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa

RFLP – ang. restriction fragment lenght polymorphism; polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

NPM – nukleofosmina

dNTP – deoksynukleotydy

RT-PCR – ang. reverse transcription PCR; reakcja odwrotnej transkrypcji

ACT – gen β -aktyny

ALB – albumina

EF1A – ang. elongation factor 1 α

Ct – ang. threshold cycle; wartość *Ct*; linia progowa

Ft – ang. fluorescence threshold; wartość progowa

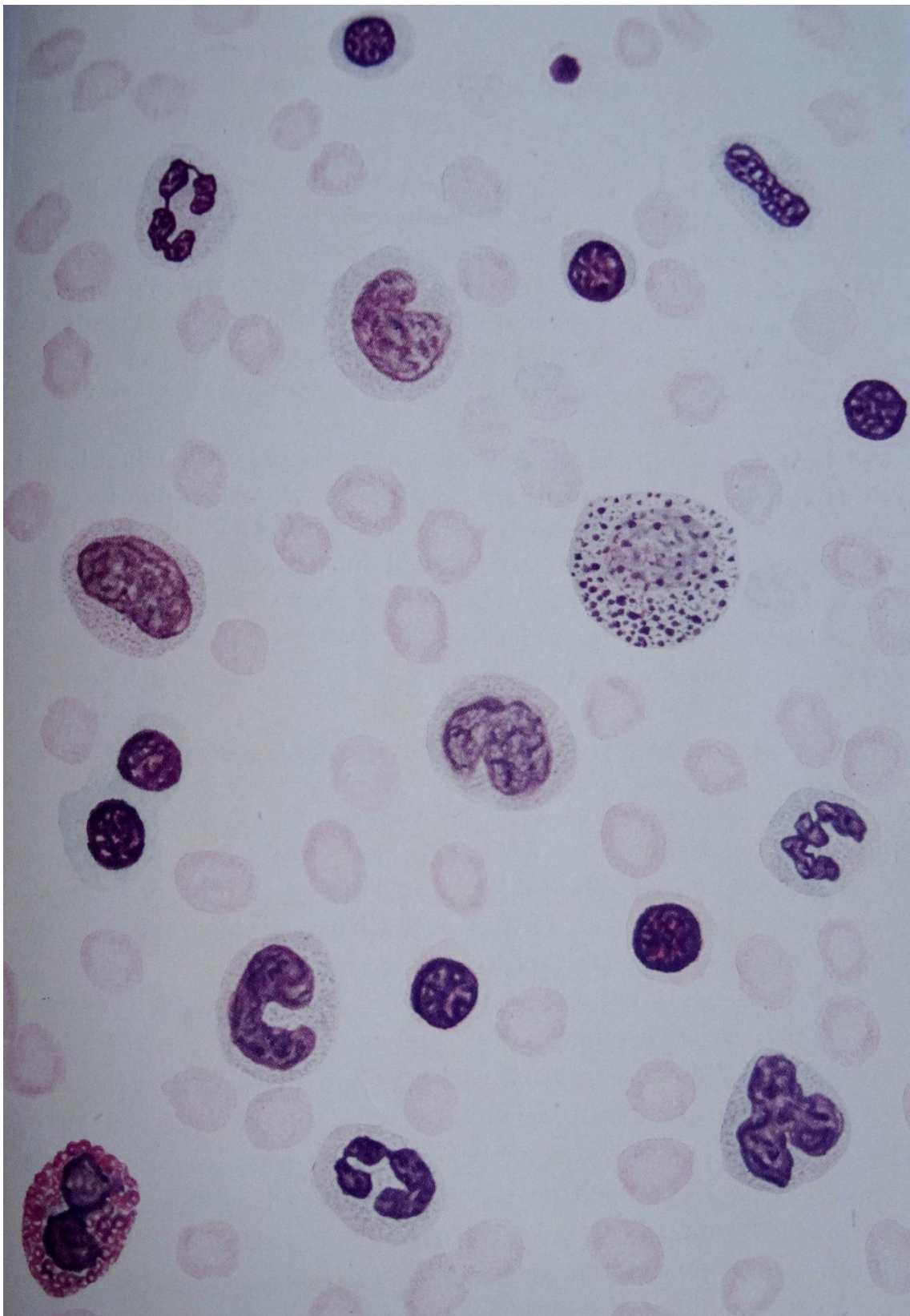
Rozdział I

Informacje o jednostce chorobowej

1.1 Definicja ostrej białaczki szpikowej

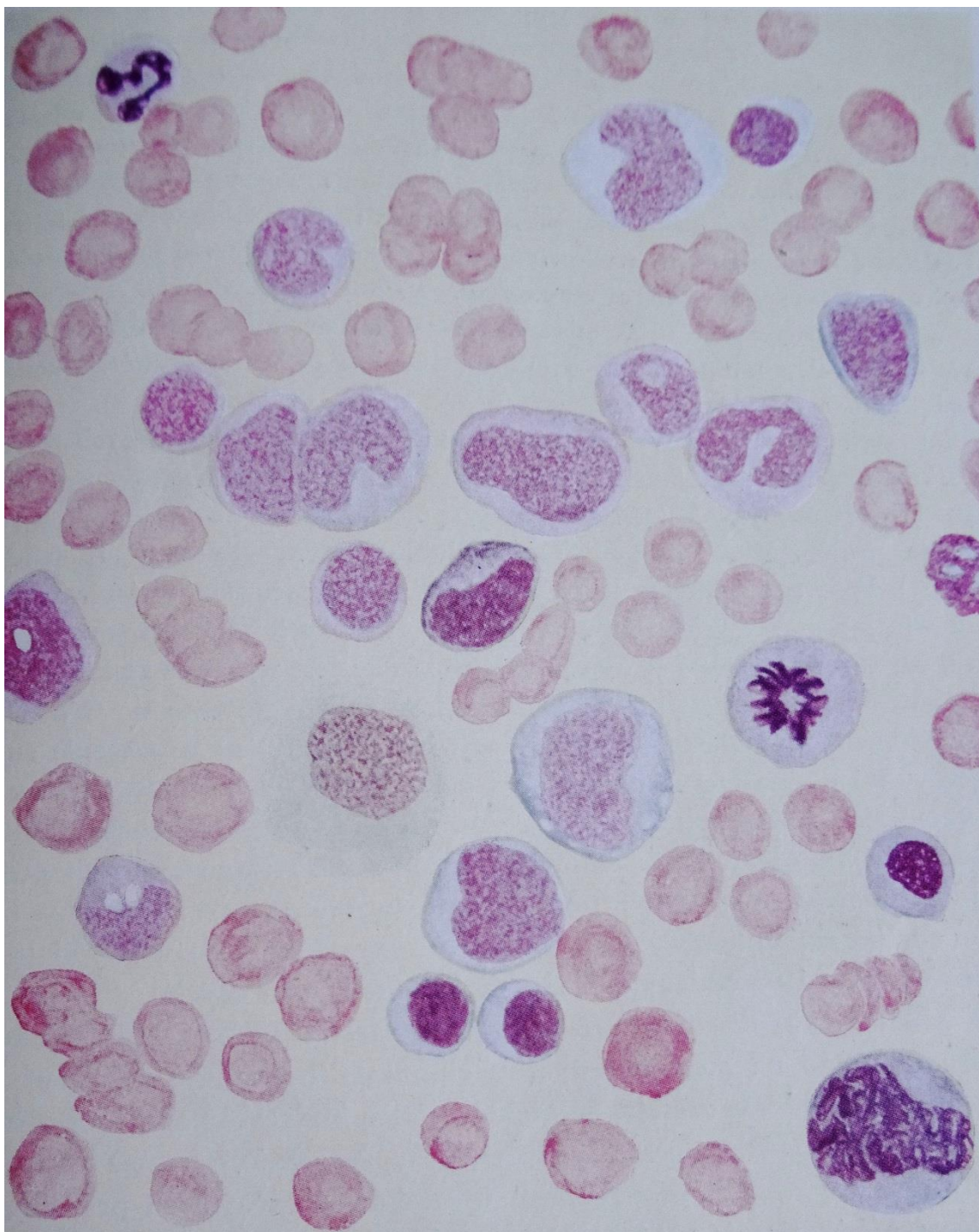
Ostra białaczka szpikowa (ang. *Acute Myleoid Leukemia*, AML) należy do grupy heterogennych chorób nowotworowych układu białokrwinkowego. Charakteryzuje się klonalną proliferacją (niepodlegającą fizjologicznym mechanizmom regulacji) oraz rozrostem w szpiku kostnym oraz we krwi, transformowanych nowotworowo komórek blastycznych wywodzących się z prekursorowej komórki mieloidalnej [Szczeklik, 2018; Saultz i wsp., 2016; Döhner i wsp., 2017]. Mieloidowe komórki progenitorowe są rodzajem tkankowo swoistych wielopotencjalnych komórek macierzystych szpiku kostnego wywodzących się w linii prostej od komórki macierzystej hemopoezy (ang. *hemapoietic stem cells*, HSC) [Szczeklik, 2018]. Dają one początek komórkom progenitorowym granulocytów i monocytów (ang. *granulocyte and monocyte progenitor*, GMP) oraz progenitorom megakariocytów i erytrocytów (ang. *megakaryocyte/erythrocyte progenitors*, MEP). Cechą charakterystyczną komórek mieloidalnych jest to, że są czynnościowo i morfologicznie niedojrzałe [Szczeklik, 2018; Hołowiecki, 2013].

Naciekając szpik kostny, krew oraz sąsiadujące tkanki i narządy prowadzą do niewydolności prawidłowej hematopoezy. Zaburzenie procesu krwiotworzenia prowadzi do uszkodzenia szpiku kostnego i często objawia się poprzez niedokrwistość, neutropenię czy małopłytkowość [Szczeklik, 2018; Wierzbowska, 2013].



Rycina 1. Rycina przedstawia rozmaz prawidłowego szpiku kostnego pacjenta.

[Ławkowicz i wsp., 1952]



Rycina 2. Rycina przedstawia rozmaz szpiku kostnego pacjenta z ostrą białaczką szpikową.

[Ławkowicz i wsp., 1952]

1.2 Epidemiologia ostrej białaczki szpikowej

Spośród wszystkich nowotworów układu białokrwinkowego ostra białaczka szpikowa jest najczęstszą wśród osób dorosłych. Szacuje się, że stanowi około 80% ostrych białaczek. W populacji dzieci jest stosunkowo rzadka i stanowi tylko 15% przypadków ostrych białaczek. Zapadalność na tę chorobę rośnie wraz z wiekiem pacjentów. Szczyt zachorowań przypada na szóstą dekadę życia. Mediana wieku w chwili rozpoznania choroby wynosi 65 lat [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017].

Według danych źródłowych zapadalność roczna na ostrą białaczkę szpikową wynosi 3-4 na 100 000 mieszkańców i rośnie wraz z wiekiem. Wśród osób z przedziału wiekowego 30-35 lat wynosi około 1/100 000 mieszkańców, a w populacji pacjentów powyżej 65. roku życia wzrasta niemal dwukrotnie i wynosi >10 na 100 000 mieszkańców. Szacuje się, że u osób powyżej 80. roku życia wzrasta nawet do 25 na 100 000 mieszkańców na rok. Mężczyźni chorują nieco częściej niż kobiety. Stosunek zapadalności na ostrą białaczkę szpikową mężczyzn do kobiet wynosi odpowiednio 4,56 do 3,0 na 100 000 mieszkańców na rok [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Wierzbowska, 2013].

Częstość występowania ostrej białaczki szpikowej również wzrasta wraz z wiekiem. U pacjentów poniżej 65. roku życia wynosi około 1,3 przypadków na 100 000 natomiast w grupie pacjentów powyżej 65. roku życia wynosi aż 12,2 przypadków na 100 000 [De Kouchkovsky i wsp., 2016].

Pomimo faktu, że postępy w leczeniu ostrej białaczki szpikowej doprowadziły do znacznego zwiększenia przeżywalności u osób młodych, to rokowanie u pacjentów powyżej 65. roku życia nadal pozostaje niezadowolające. Szacuje się, że wśród leczonych pacjentów w tej grupie wiekowej około 70% poniesie śmierć z powodu tej choroby w przeciągu roku od diagnozy [De Kouchkovsky i wsp., 2016; Szczeklik, 2018].

1.3 Objawy oraz przebieg ostrej białaczki szpikowej

Objawy kliniczne ostrej białaczki szpikowej mogą być niespecyficzne i są najczęściej związane z naciekaniem krwi, szpiku kostnego lub ościennych tkanek przez komórki białaczkowe. Objawy ostrej białaczki szpikowej można podzielić na kilka podgrup do których zaliczamy:

- ❖ współistniejące objawy ogólne (osłabienie, gorączka, bóle kości i stawów objawy skazy krwotocznej czy występujące cechy zakażenia np. płuc czy jamy ustnej) [Szczeklik, 2018],
- ❖ objawy związane z niedokrwistością będące efektem naciekania szpiku kostnego przez komórki białaczkowe (pogorszenie tolerancji wysiłku fizycznego, załabnięcia, nasilenie się objawów sarkoidalnych) [Szczeklik, 2018],
- ❖ objawy związane z upośledzeniem odporności i neutropenią (zmiany w obrębie jamy ustnej takie jak: bolesne afty, owrzodzenia czy zmiany około zębowe, zwiększona podatność na zakażenia grzybicze i bakteryjne) [Szczeklik, 2018],
- ❖ objawy skazy krwotocznej mogące wynikać z małopłytkowości (wybroczyny i plamica na skórze i błonach śluzowych, krwawienia z nosa, dziąseł, krwotoki z przewodu pokarmowego, ośrodkowego układu nerwowego lub dróg rodnych) [Szczeklik, 2018].

Silne krwawienia i krwotoki mogą być również następstwem rozwijającego się zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego DIC (ang. *disseminated intravascular coagulation*, DIC). Charakterystyczne objawy związane z leukostazą to: zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego, bóle głowy, zaburzenia widzenia czy objawy hipoksemii. Warto nadmienić, że objawy związane z leukostazą występują u około 5% chorych i są wynikiem zaburzeń przepływu w mikrokrążeniu, które jest związane z leukocytozą powyżej 100 000/ μ l [Szczeklik, 2018].

Wyróżniamy także objawy będące następstwem nacieczenia narządów przez komórki białaczkowe. Możemy do nich zaliczyć: płaskie lub guzkowate nacieki skórne, nacieki w dziąsłach, narządach chłonnych, narządach zmysłu (siatkówka, błona naczyniowa oka czy nerw wzrokowy), układzie oddechowym (nacieki śródmiąższowe, wysięki w jamie opłucnej skutkujące ciężką niewydolnością oddechową), nacieki w mięśniu sercowym, układzie moczowym, układzie kostno-stawowym czy układzie

nerwowym. Charakterystyczne może być także powiększenie śledziony oraz wątroby (występuje u około 30% chorych) [Hołowiecki, 2013; Wierzbowska, 2013; Szczeklik, 2018].

Wyróżniamy także objawy otrzewnowe oraz bóle brzucha. Często są one spowodowane wybroczynami w ścianie jelita czy niedrożnością jelit.

Do mniej specyficznych objawów ostrej białaczki szpikowej, które często skłaniają pacjentów do wizyty u specjalisty są: zmniejszenie masy ciała, zlewne poty oraz bóle kostne. W przeprowadzonym przez lekarza badaniu przedmiotowym stwierdza się objawy niedokrwistości (bładość skóry i błon śluzowych) oraz skazy krwotocznej (punktowe wybroczyny) [Szczeklik, 2018].

Przebieg ostrej białaczki szpikowej jest niezwykle ciężki: nieleczona, może w ciągu kilku tygodni doprowadzić do śmierci chorego z powodu powikłań głównie krwotocznych i infekcyjnych [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018].

1.4 Etiopatogeneza ostrej białaczki szpikowej

Etiopatogeneza ostrej białaczki szpikowej nie została jeszcze dokładnie poznana. Istnieje wiele czynników, które mogą prowadzić do rozwoju tej choroby. Do czynników ryzyka o udowodnionym związku z rozwojem AML należą:

- ❖ ekspozycja na promieniowanie - głównie jonizujące,
- ❖ narażenie zawodowe na benzen,
- ❖ przyjmowanie leków alkilujących czy inhibitorów topoizomerazy - stosowanych podczas wcześniejszych chemioterapii,
- ❖ współistniejące choroby wrodzone np.: zespół Downa, Schwachmana i Diamonda czy Fanconiego,
- ❖ choroby układu krwiotwórczego np.: choroby mieloproliferacyjne, zespoły mielodysplastyczne czy nocna napadowa hemoglobinuria,
- ❖ inne zmiany genetyczne predysponujące do rozwoju AML (w tym mutacje w genach *CEBPA*, *RUNX1*, *ETV6* czy *GATA2*) [Hołowiecki, 2013; Kata i wsp., 2011; Szczeklik, 2018].

Narażenie na inne czynniki środowiskowe takie jak pestycydy, rozpuszczalniki organiczne, herbicydy, czy palenie tytoniu zalicza się do prawdopodobnych czynników ryzyka rozwoju AML [Szczeklik, 2018].

1.4.1 Czynniki molekularne transformacji nowotworowej

Coraz większą uwagę przykładą się do oceny roli molekularnych czynników transformacji nowotworowej, które mogą prowadzić do powstania samoodtwarzającego się klonu komórek białaczkowych. Do takich czynników można zaliczyć: mutacje, fuzje, rearanżacje i amplifikacje w genach odpowiadających za regulację i przebieg hematopoezy [Kata i wsp., 2011; Szczeklik, 2018; Wierzbowska, 2013].

Można wśród nich wyróżnić:

- ❖ czynniki transkrypcyjne (*PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CALM-AF10*)
- ❖ *NPM1*
- ❖ geny supresorowe (*TP53*, *WT1*, *PHF6*)
- ❖ metylacje DNA (*DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT1*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*)
- ❖ zaktywowane szlaki sygnałowe proliferacji (*FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *PTPs*)
- ❖ mieloidalne czynniki transkrypcyjne (*RUNX1*, *CEBPA*)
- ❖ modyfikacje chromatyny (fuzje *KMT2A* (*MLL*), *KMT2a-PTD*(*MLL-PTD*), *NUP95-NSD1*, *ASXL1*, *EZH2*, *KDM6A*)
- ❖ kompleksy spliceosomowe
- ❖ kompleks kohezyny [De Kouchkovsky i wsp., 2016; Szczeklik, 2018].

Aby doszło do transformacji nowotworowej niezbędne jest wystąpienie więcej niż jednej zmiany genetycznej (najczęściej musi dojść do kilku lub kilkunastu zmian). Na przykład zmiany w genach kodujących kinazy tyrozynowe lub cząsteczki sygnałowe szlaków wewnątrzkomórkowych prowadzą do pobudzenia i proliferacji komórek nowotworowych. Zmiany w genach kodujących czynniki transkrypcyjne blokują procesy dojrzewania i różnicowania komórek. U podstaw mielodysplazji leży również blokada genów kodujących dojrzewanie np. rearanżacja genów *CBF* – ang. *core binding factor*, *CBF* [Szczeklik, 2018].

Udowodniono również, że jednoczesne współistnienie zmian, które pobudzają niekontrolowaną proliferację oraz procesów, które zaburzają lub blokują dojrzewanie komórek najpewniej prowadzi do rozwoju ostrej białaczki szpikowej [Szczeklik, 2018]. W procesie tym współuczestniczą również inne mechanizmy genetyczne związane

z apoptozą, procesami samoodtworzenia się komórek, angiogenezą, adhezją czy zmianami epigenetycznymi jak np. metylacja DNA i acetylacja histonów [Szczeklik, 2018].

Wykryto, że miejsca zmian w chromosomach, których obecność prowadzi do rozwoju ostrych białaczek pokrywają się z lokalizacją genów odpowiedzialnych za regulację hematopoezy i cyklu komórkowego czyli z tzw. protoonkogenami [De Kouchkovsky i wsp., 2016; Szczeklik, 2018].

Do powstania samoodtworzającego się klonu białaczkowego dochodzi ponadto przy udziale wewnętrznych czynników, które osłabiają immunologiczne lub wewnątrzkomórkowe mechanizmy kontroli proliferacji zapobiegające rozwinięciu się klonu nowotworowego. Do takich mechanizmów można zaliczyć działanie anty-onkogenów (np. białko p53, czy IRF- czynniki regulatorowe interferonów 1, ang. *interferon regulatory factors*, IRF), które mają działanie hamujące w stosunku do komórek zmieniających fenotyp na nowotworowy [Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017; Wierzbowska, 2013].

1.4.2 Rola komórek macierzystych białaczki w patogenezie i nawrotach ostrej białaczki szpikowej

Istotnym elementem zbadania patogenezy ostrej białaczki szpikowej oraz przyczyn nawrotu choroby jest dokładne poznanie tzw. komórek macierzystych białaczki (ang. *leukemic stem cells*, LSC). Komórki te stanowią jedynie od 0,1-1% blastów i cechują się własną charakterystyką biologiczną i immunofenotypową, małą aktywnością proliferacyjną oraz nieograniczoną zdolnością do odnawiania [Szczeklik, 2018]. Komórki te są źródłem ponownego nawrotu choroby ponieważ mogą przetrwać okres leczenia. W trakcie leukemogenezy w komórkach macierzystych białaczki dochodzi do wielu mutacji, prowadzących do heterogenności klonów u poszczególnych pacjentów. Początek białaczki daje tzw. klon założycielski-pierwotny. W fazie pełnoobjawowym choroby występuje więc dominacja tylko jednego z występujących klonów (pierwotnego) o danej charakterystyce. Stosowane leczenie może wyeliminować dominujący klon całkowicie lub do poziomu tzw. minimalnej choroby resztkowej MRD (ang. *minimal residual disease*, MRD). W przypadku nawrotu choroby nowy dominujący klon może:

- ❖ pochodzić z pierwotnego klonu założycielskiego,
- ❖ posiadać cechy innego współistniejącego na początku nieujawnionego klonu,
- ❖ być obciążony nowymi mutacjami powstającymi podczas leczenia [Szczeklik, 2018].

1.4.3 Mechanizmy powodujące nadmierną proliferację blastów

Do mechanizmów, które prowadzą do zwiększenia liczby blastów podczas progresji choroby można zaliczyć:

- ❖ zaburzenie zdolności do różnicowania i dojrzewania,
- ❖ upośledzenie wrażliwości na czynniki hamujące proliferację,
- ❖ zaburzoną zdolność wytwarzania w błonach komórkowych receptorów dla zrębu szpiku (przechodzenie komórek białaczkowych ze szpiku do krwi),
- ❖ dłuższy czas przeżycia spowodowany wzmożoną ekspresją genów związanych z hamowaniem apoptozy (gen *BCL-2*) lub osłabieniem ekspresji tych, które ją przyspieszają (gen *FAS*) [Szczeklik, 2018].

1.5 Podział i klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych

Pierwsza opracowana klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych powstała w 1976 roku i była to francusko-amerykańsko-brytyjska klasyfikacja morfologiczna FAB (ang. *French-American-British group*, FAB). Została ona oparta na cechach morfologicznych i cytochemicznych komórek białaczkowych. Obejmowała 8 podtypów białaczek (od M0 do M7) i była przez lata wielokrotnie modyfikowana [De Kouchkovsky i wsp., 2016; Szczeklik, 2018, Szczepanek i wsp., 2008][Tabela 1].

Typ FAB	Nazwa
M0	Ostra białaczka szpikowa o bardzo niskim stopniu zróżnicowania
M1	Ostra białaczka mieloblastyczna bez cech dojrzewania
M2	Ostra białaczka mieloblastyczna z cechami dojrzewania
M3	Ostra białaczka promielocytowa
M4	Ostra białaczka mielomonocytowa
M5a	Ostra białaczka monoblastyczna (monocytowa słabo zróżnicowana)
M5b	Ostra białaczka monocytowa (monocytowa dobrze zróżnicowana)
M6	Erytorleukemia
M7	Ostra białaczka megakariocytowa

Tabela 1. Tabela przedstawia klasyfikację ostrych białaczek szpikowych według FAB.

[Szczepanek i wsp., 2008].

W 2008 roku WHO (ang. *World Health Organization*, WHO) wprowadziło nową klasyfikację uzupełniając poprzednią o dane: immunofenotypowe, cytogenetyczne oraz informacje genetyczne i molekularne. Ostre białaczki szpikowe z powtarzalnymi zmianami cytogenetycznymi zostały zakwalifikowane do grupy na podstawie stwierdzonych nieprawidłowości cytogenetycznych [Szczeklik, 2018]. Zdefiniowano 6 głównych jednostek chorobowych: AML z nawracającymi genetycznymi nieprawidłowościami, AML związane ze zmianami mielodysplastycznymi, AML związane z zastosowaną terapią, AML bez specyfikacji innej niż morfologiczna (AML-NOS), mięsak mieloidalny, proliferacje mieloidalne związane z zespołem Downa oraz ostre białaczki o niejednoznacznym pochodzeniu liniowym [Szczeklik, 2018].

W roku 2016 klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych według WHO została uaktualniona [Tabela 2]. Aktualizacja WHO wprowadza kilka zmian do istniejących kategorii chorób [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Najważniejsze zmiany dotyczyły wprowadzenie dodatkowego podtypu ostrych białaczek o mieszanym fenotypie MPAL (ang. *mixed phenotype acute leukemia*, MPAL) takich jak: AML z *BCR-ABL1* oraz AML ze zmutowanym *RUNX1*. Dodatkowo w 2016 roku wprowadzono nową kategorię tzw. nowotworów szpiku z predyspozycjami do linii zarodkowej [Tabela 3][Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Ponadto według nowej klasyfikacji ostrych białaczek szpikowych, według WHO z 2016 roku za graniczną wartość blastocytozy w szpiku kostnym powyżej której rozpoznawana jest ostra białaczka, a poniżej której rozpoznaje się zespół mielodysplastyczny (ang. *myelodysplastic syndrome*, MDS) przyjęto 20% (a nie jak dotychczas 30%) [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018].

Nowotwory mieloidalne uwarunkowane predyspozycją genetyczną	
Ostre białaczki i nowotwory pokrewne	Ostre białaczki i nowotwory pokrewne (cd.)
Ostre białaczki z powtarzalnymi zmianami cytogenetycznymi	ostra białaczka mielomonocytoza (dawniej FAB M4)
AML z t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	ostra białaczka monoblastyczna i monocytoza (dawniej FAB M5)
AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	białaczka czystoczerwonościowa (mała część dawnej FAB M6)
ostra białaczka promielocytowa z <i>PML-RARA</i>	ostra białaczka megakarioblastyczna (dawniej FAB M7)
AML z t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>	ostra białaczka bazofilowa
AML z t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	ostra panmieloza z włóknieniem szpiku
AML z inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i>	Mięsak mieloidalny
AML (megakarioblastyczna) z t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>	Prolifracje mieloidalne związane z zespołem Downa
AML z <i>BCR-ABL1</i> (uwzględniona prowizorycznie)	
AML z mutacją <i>NPM1</i>	
AML z białeliczną mitacją <i>CEBPA</i>	Nowotwór z komórek dendrytycznych blastycznych plazmocytoidalnych
AML z mutacją <i>RUNX1</i> (uwzględniona prowizorycznie)	Ostre białaczki o niejednoznacznym pochodzeniu liniowym
AML związana ze zmianami mielodysplastycznymi	Ostra białaczka niezróżnicowana
Nowotwory mieloidalne związane z wcześniejszym leczeniem	Ostra białaczka o mieszanym fenotypie: MPAL z t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
AML, nieokreślona (NOS)	MPAL z t(v;11q23.3); z rearanżacjami <i>KMT2A</i>
AML z minimalnym różnicowaniem (dawnej FAB M0)	MPAL, B/mieloidalna, NOS
AML bez dojrzewania (dawniej FAB M1)	MPAL, T/mieloidalna, NOS
AML z dojrzewaniem (dawniej FAB M2)	

Tabela 2. Zaktualizowana w 2016 roku klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych według WHO.

[Döhner i wsp., 2017]

Klasyfikacja WHO
Klasyfikacja
Nowotwory szpikowe z predyspozycją do linii zarodkowej bez istniejącego wcześniej zaburzenia lub dysfunkcji narządowych
AML z mutacją <i>CEBPA</i> w linii zarodkowej
Nowotwory szpikowe z mutacją <i>DDX41</i> w lini zarodkowej
Nowotwory szpikowe z predyspozycjami linii zarodkowej i istniejącymi wcześniej zaburzeniami płytek krwi
Nowotwory szpikowe z mutacją <i>RUNX1</i> w linii zarodkowej
Nowotwory szpikowe z mutacją <i>ANKRD26</i> w linii zarodkowej
Nowotwory szpikowe z mutacją <i>ETV6</i> w linii zarodkowej
Nowotwory szpikowe z predyspozycjami linii zarodkowej i innymi zaburzeniami czynności narządów
Nowotwory szpikowe z mutacją <i>GATA2</i> w linii zarodkowej
Nowotwory szpikowe związane z zespołami niewydolności szpiku kostnego
Młodzięcza białaczka szpikowa związana z neurofibromatozą, zespołem Noonana lub zaburzeniami podobnymi do zespołu Noonana
Nowotwory szpikowe związane z zespołem Noonana
Nowotwory szpikowe związane z zespołem Downa
Molekularna diagnostyka genetyczna
Zespoły predyspozycji mielodysplastycznych/zespoły predyspozycji ostrej białaczki
<i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> , <i>RUNX1</i> , <i>ANKRD26</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>SRP72</i> , 14q32.2 duplikacja genomowa (<i>ATG2B/GSKIP</i>)

Tabela 3. Nowa zaktualizowana w 2016 roku klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych według WHO z uwzględnioną nową kategorią tzw. nowotworów szpiku z predyspozycjami do linii zarodkowej.

[Döhner i wsp., 2017].

1.6 Standardy diagnostyki oraz rozpoznania ostrej białaczki szpikowej

Podstawowe znaczenie przy rozpoznawaniu ostrej białaczki szpikowej ma badanie cytologiczne szpiku kostnego. W przypadku gdy badanie morfocytochemiczne jest niewystarczające do postawienia odpowiedniej diagnozy szpik kostny oraz krew poddawane są szeregom dodatkowych badań cytogenetycznych, immunofenotypowych oraz molekularnych [Szmajda i wsp., 2017]. W przypadku stwierdzenia u pacjenta zmian cytogenetycznych takich jak: t(15;17), inv (16), t(8;21) czy t(16;16) rozpoznaje się ostrą białaczkę szpikową bez względu na odsetek blastów we krwi oraz szpiku kostnym [Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017].

1.6.1 Wykaz badań stosowanych i zalecanych w diagnostyce ostrej białaczki szpikowej

- ❖ Badanie krwi obwodowej- rozmaz oraz morfologia
- ❖ Badanie szpiku kostnego
- ❖ Badania cytogenetyczne
- ❖ Badania molekularne
- ❖ Dodatkowe badania laboratoryjne [Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017].

1.6.1.1 Badanie krwi obwodowej- morfologia oraz rozmaz

W morfologii krwi obwodowej osób cierpiących z powodu ostrej białaczki szpikowej można stwierdzić niedokrwistość (obniżenie się ogólnej liczby krwinek czerwonych, hematokrytu oraz hemoglobiny poniżej dolnych wartości zakresów referencyjnych) [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018]. Proces ten może być szczególnie nasilony w przypadku wystąpienia krwotoków. Dodatkowym objawem może być także małopłytkowość [Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017]. Zwykle u chorych występuje podwyższenie ilości leukocytów (leukocytoza). Udowodniono, że wraz z postępem choroby liczba białych krwinek wzrasta. U 5%-20% pacjentów, wysoka leukocytoza $>100\ 000/\mu\text{l}$ może być jednym z pierwszych objawów choroby [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018, Wierzbowska, 2013]. Leukopenia (obniżenie ilości białych krwinek) jest stosunkowo rzadka i może być również wczesnym objawem choroby [Szczeklik, 2018]. U większości chorych mamy również do czynienia ze spadkiem $<1000/\mu\text{l}$ liczby neutrofili. U około 10% chorych stwierdza się erytroblastozę [Hołowiecki, 2013;

Szczeklik, 2018].

W preparacie rozmazu krwi obwodowej obecne są komórki blastyczne. Charakteryzują się one dużym jądrem o luźnej strukturze z szarobłękitną cytoplazmą i wyraźnymi jąderkami. U 30% chorych w cytoplazmie komórek blastycznych widoczne są tzw. pałeczki Auera. Są to fioletowoczerwone azurochłonne ziarnistości. Odpowiadają one ziarnistościom obojętnochłonnym zmienionym wskutek zaburzeń procesu dojrzewania [*Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018*]. Cechą charakterystyczną dla ostrej białaczki może być także wystąpienie tzw. przerwy białaczkowej. Polega ona na występowaniu bardzo wielu młodych komórek blastycznych oraz nielicznych dojrzałych granulocytów przy niewielkiej ilości form pośrednich (lub ich braku). W rozmazie krwi obwodowej odsetek blastów jest różny, waha się od 20% do 90% w chwili rozpoznania choroby. W trakcie oceny rozmazu krwi obwodowej zaleca się oglądanie 200 komórek jądrzastych [*Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017*].

1.6.1.2 Badanie szpiku kostnego

Szpik kostny do badań laboratoryjnych pobierany jest od pacjentów na drodze biopsji aspiracyjnej lub trepanobiopsji. Ocena szpiku kostnego pozwala na postawienie wstępnego rozpoznania, określenie postaci choroby bez zmian molekularnych, ocenę komórkowości szpiku czy wzoru dojrzewania komórek. Według zaleceń szpik kostny powinien być pobrany od pacjentów przed wdrożeniem leczenia [*Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018*].

Biopsja aspiracyjna polega na pobraniu próby krwi szpikowej. Zabieg wykonywany jest z miejscowym znieczuleniu. Jest metodą wykonywaną rutynowo i pozwala na wstępne oraz szybkie rozpoznanie białaczki (dominuje jeden typ komórek blastycznych oraz stanowi źródło materiału do dalszych badań molekularnych czy cytogenetycznych) [*Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018*].

Trepanobiosja polega na pobraniu próby krwi szpikowej wraz z fragmentem kości i jest wykonywana w szczególnych przypadkach, najczęściej wtedy gdy niemożliwe jest uzyskanie odpowiedniego materiału do badań metodą tzw. punkcji suchej. Pozwala na ocenę komórkowości szpiku i zmian w obrębie zrębu [*Döhner i wsp., 2017; Kata i wsp., 2011; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017*]. Uzyskane w ten sposób preparaty barwi się najczęściej metodą Maya Grunwalda- Giemsy lub Wrighta-Giemsy, ocenia pod

mikroskopem i poddaje ocenie morfologicznej. Podobnie jak w przypadku rozmazu krwi obwodowej ocenia się komórki jądrazte. W przypadku rozmazu szpiku kostnego ocenia się przynajmniej 500 komórek jądraztych [Hasserjian, 2013; Szmajda i wsp., 2017; Wierzbowska, 2013]. Obecność $\geq 20\%$ blastów (w tym monoblastów, mieloblastów, promonocytów i megakarioblastów) w szpiku kostnym pozwala na rozpoznanie ostrej białaczki szpikowej [Szczeklik, 2018; Wierzbowska, 2013].

Przeprowadzenie dodatkowych badań immunofenotypowych, cytogenetycznych oraz molekularnych jest istotne dla ustalenia dokładnego rozpoznania i rokowania u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Materiałem do przeprowadzenia klasycznych badań cytogenetycznych jest szpik kostny, a do badań z zastosowaniem metod biologii molekularnej krew oraz szpik [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018].

1.6.1.3 Badanie immunofenotypowe

Badania immunofenotypowe przeprowadza się w celu określenia podtypu nowotworu oraz postawienia ostatecznej diagnozy. Immunofenotypowanie wykonuje się w przypadku ustalenia rozpoznania ostrej białaczki szpikowej mało zróżnicowanej, ostrej białaczki megakarioblastycznej i ostrej białaczki o niejednoznacznym pochodzeniu liniowym i polega na oznaczaniu występowania pewnych antygenów w komórkach białaczkowych za pomocą metod immunochemicznych lub cytometrycznych takich jak np. cytometria przepływowa [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017]. Metoda ta pozwala na ocenę ilościową jak i jakościową właściwości biologicznych i fizycznych komórek [Szmajda i wsp., 2017]. Technika ta znalazła głównie zastosowanie w diagnostyce hematologicznej i jest uzupełnieniem metod patomorfologicznych [Szmajda i wsp., 2017].

Znany jest szeroki panel badań antygenów linii komórkowych, które mają znaczenie w diagnostyce ostrych białaczek szpikowych. Pozwala to na ocenę stopnia dojrzałości oraz zróżnicowanie komórek danych linii. Do najbardziej znanych antygenów linii komórkowych należą między innymi: markery prekursorowe, markery granulocytarne, markery monocytowe, markery megakariocytowe czy markery erytroidalne [Döhner i wsp., 2017; Hołowiecki, 2013; Wierzbowska, 2013]. Dokładny podział został przedstawiony w Tabeli 4.

Antygeny Linii Komórkowych	
Prekursorowe	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulocytarne	CD65, cytoplazmatyczna mieloperoksydaza (MPO)
Monocytove	CD14, CD36, CD64
Megakariocytove	CD41 (glikoproteina IIb/IIIa), CD61 (glikoproteina IIIa)
Erytroidlane	CD235a (glikoforyna A), CD36

Tabela 4. Ekspresja powierzchniowych i cytoplazmatycznych markerów komórkowych według ELN 2017.

[Döhner i wsp., 2017]

1.6.1.4 Badania cytogenetyczne

Materiałem stosowanym do przeprowadzenia klasycznych badań cytogenetycznych jest szpik kostny. Klasyczne metody cytogenetyczne przeprowadza się przy pomocy trawienia chromosomów trypsyną oraz wybarwiania ich barwnikiem Giemsy uwidaczniając regiony bogate w adeninę i tyminę (tzw. prążki G). Ta metoda nazywana jest metodą prążkową GTC, pozwala na określenie kariotypu komórek nowotworowych i dokładną analizę chromosomów w stadium metafazy. Warto nadmienić, że wraz z metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* stanowi złoty standard postępowania w klinikach hematologicznych [Macheta i wsp., 2015; Szmajda i wsp., 2017]. Technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) coraz częściej wykorzystuje się jako uzupełnienie klasycznej cytogenetyki [Wierzbowska, 2013]. FISH polega na wykrywaniu w materiale genetycznym danych sekwencji kwasów nukleinowych za pomocą hybrydyzacji ze specyficznymi sondami wyznakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi. Połączenie się markera z wyznakowaną sondą zachodzi na zasadzie komplementarności [Bishop, 2010; Szmajda i wsp., 2017].

U pacjentów z ostrą białaczką szpikową zastosowanie metody FISH pozwala na identyfikację chromosomów markerowych, aberracji liczbowych (hipodiploidię <46 chromosomów, występuje w 10-15% przypadków AML czy hiperdiploidię >46 chromosomów występująca w 2-3% przypadków) czy aberracji strukturalnych. Dotychczas opisano ponad 30 klonalnych zmian chromosomowych, które podzielono między innymi na: występujące powtarzalnie i będące podstawą rozpoznania danego typu ostrej białaczki szpikowej, wykazujące związek z określoną zmianą kliniczną czy

morfologiczną np. t(4;11), t(9;11) oraz del(11q) częstsze dla białaczki monocytowej czy inv/del(16) charakterystyczne dla białaczki mielomonocytowej z eozynofilią oraz występujące w białaczkach wtórnych bez wyraźnego związku z cechami morfologicznymi np. trisomia chromosomu 8 czy delecje -7, 7q- czy 5q- [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017].

W przypadku złej jakości morfologii chromosomów lub braku podejrzewanej zmiany cytogenetycznej typowej dla określonej morfologii komórek metoda FISH pozwala również na wykrycie rearanżacji i ocenę obecności np.:

- ❖ genu fuzyjnego *CBFB-MYH11*, będącego wynikiem inwersji chromosomu 16 (inv(16)(p13q22)),
- ❖ genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* będącego wynikiem translokacji chromosomalnej t(8;21)(q22;q22.1), która jest jedną z najczęstszych w ostrej białaczce szpikowej,
- ❖ zaburzeń w chromosomie 11, w locus q23, kodującym gen *KMT2A* [*MLL gene*] czy *EVI1* (inv(3)(q21.3q26.2).

Powyższe aberracje mają znaczenie w przypadku oceny rokowania u pacjentów z AML [Döhner i wsp., 2017; Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017].

Metoda FISH pozwala również na ocenę odpowiedzi na zastosowaną terapię oraz analizę zmian genetycznych, które mogą wpływać na przebieg choroby. Zgodnie z rekomendacjami ELN (ang. *European Leukemia Net*, ELN) z 2017 roku wynik badania cytogenetycznego powinien być wydany w ciągu od 5 do 7 dni od momentu rozpoznania choroby [Döhner i wsp., 2017].

1.6.1.5 Badania molekularne

Materiałem stosowanym do badań molekularnych może być zarówno krew obwodowa jak i szpik kostny [Hołowiecki, 2013]. Wiele aberracji genetycznych może mieć charakter wewnątrzgenowy dlatego można je wykryć tylko za pomocą technik biologii molekularnej [Szczeklik, 2018]. Według najnowszych wytycznych ELN krew obwodowa jak i szpik kostny muszą być odpowiednio zabezpieczone do dalszych badań molekularnych poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji wraz z reakcją łańcuchową polimerazy [Döhner i wsp., 2017, Wierzbowska, 2013]. Zastosowanie

technik biologii molekularnej w celu oceny zmian genetycznych klonu komórek białaczkowych jest jednym z najważniejszych elementów diagnostycznych oraz prognostycznych u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Ponadto może być również elementem pomocniczym w wyborze odpowiedniej terapii i schematu leczenia [Chi i wsp., 2015; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017; Wierzbowska, 2013].

Według zaleceń ELN z 2017 roku rekomenduje się wykonanie badań przesiewowych w kierunku mutacji w genach *NPM1*, *CEBPA* i *RUNX1* (dających informacje o rokowaniu pacjentów) oraz *FLT3*, *TP53*, *ASXL1* (związanych ze złą prognozą). Badanie obecności genów fuzyjnych: *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, *BCR-ABL1* za pomocą metod cytogenetyczno-molekularnych wykonuje się gdy niezbędne jest podjęcie szybkiej decyzji o wyborze odpowiedniej terapii lub gdy ocena morfologii chromosomów jest problematyczna. Istotny dla rokowania pacjenta jest także czas w którym lekarz otrzymuje wynik badania molekularnego. W przypadku oceny mutacji w genach *NPM1* i *FLT3* (świadczących o korzystnym lub pośrednim rokowaniu) wynik badania powinien być znany w przeciągu 48 do 72 godzin od momentu rozpoznania choroby, a wyniki pozostałych badań molekularnych powinny być znane w pierwszym cyklu leczenia [Döhner i wsp., 2017; Prochorec-Sobieszek, 2013; Szmajda i wsp., 2017; Wierzbowska, 2013].

1.6.1.6 Badania laboratoryjne

Dodatkowymi badaniami laboratoryjnymi (oprócz morfologii krwi obwodowej) wykonywanymi podczas diagnostyki ostrej białaczki szpikowej są między innymi:

- ❖ ocena zaburzeń krzepnięcia (w przypadku występujących cech DIC),
- ❖ aktywność dehydrogenazy mleczanowej LDH(ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) w surowicy krwi (zwykle podwyższona),
- ❖ stężenie kwasu moczowego we krwi (u pacjentów z OBS występuje zwiększone stężenie kwasu moczowego we krwi-hiperurykemia),
- ❖ stężenie potasu we krwi (hipokaliemia- u pacjentów z ostrą białaczką monocytową oraz mielomonocytową lub hiperkaliemia w przypadku dużej leukocytozy oraz w przypadku nasilonego rozpadu komórek białaczkowych),
- ❖ ocena stężenia glukozy oraz zawartości tlenu we krwi tętniczej (rzekoma hipoksemia i hipoglikemia przy dużej leukocytozie) [Szczeklik, 2018].

1.6.1.7 Badania pomocnicze

Wykaz badań zlecanych przez lekarza w celu rozpoznania, diagnostyki oraz oceny rokowania u pacjentów z podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej:

1) Podstawowe badania ogólne:

- ❖ badania przedmiotowe i podmiotowe,
- ❖ ocena sprawności chorego w skali Karnofsky'ego lub w skali WHO,
- ❖ badania biochemiczne krwi,
- ❖ badanie moczu,
- ❖ badania oceniające hemostazę (np. D-dimer, fibrynogen),
- ❖ badania określające wskaźnik chorób współistniejących (np. echokardiografia).

2) Badania niezbędne do ustalenia rozpoznania:

- ❖ badania morfologii krwi oraz ocena rozmazu,
- ❖ biopsja aspiracyjna szpiku kostnego,
- ❖ badania immunofenotypowe,
- ❖ ocena kariotypu (od 5 do 7 dni, ≥ 20 metafaz),
- ❖ badania molekularne mutacji genów *NMP1* i *FLT3* (w ciągu 48-72 godzin) *CEBPA*, *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1* (w przypadku zastosowania leczenia indukującego remisję)
- ❖ inne badania molekularne rearanżacji genów: *PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1/RUNX1T1*, *KMT2A*, *EVI1* czy *BRC-ABL1*.
- ❖ Opcjonalnie: trepanobiopsja i badania histologiczne szpiku kostnego.

3) Badania uzupełniające

- ❖ test ciążowy (u kobiet),
- ❖ testy w kierunku zakażenia wirusami: HBV, HCV, HIV-1, CMV, EBV, HAV,
- ❖ USG jam brzusznej, EKG, RTG klatki piersiowej,
- ❖ echokardiografia: w przypadku podejrzenia lub stwierdzenia ryzyka choroby serca,
- ❖ nakłucie lędźwiowe: w przypadku podejrzenia zajęcia ośrodkowego układu nerwowego (OUN),
- ❖ odpowiednie zabezpieczenie i zamrożenie uzyskanego materiału DNA do badań molekularnych.

4) **Badania zlecane w celu oceny rokowania**

- ❖ badania molekularne np.: *NMP1, CEBPA, FLT3, RUNX1, KIT*,
- ❖ ocena minimalnej choroby resztkowej (MDR) z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej lub technik biologii molekularnej (np. RQ-PCR),
- ❖ badania molekularne innych genów w razie dostępności terapii celowanej: mutacje genów regulatorów epigenetycznych (*KMT2A*), genów kompleksu porowego (*NUP98, NUP214*), genów splicingu (*RFS2, SF3B1, U2AF1*), genów regulujących chromatynę (*EZH2, ASXL1*) oraz innych (*TET2, IDH1, IDH2*) [Szczeklik, 2018].

1.6.2 Kryteria rozpoznania ostrej białaczki szpikowej

Według najnowszych wytycznych European Leukemia Net podstawą w rozpoznaniu ostrej białaczki szpikowej jest stwierdzenie obecności $\geq 20\%$ blastów w rozmazie krwi obwodowej (zliczając co najmniej 200 leukocytów) lub szpiku kostnym (zliczając co najmniej 500 komórek jądrzastych: mieloblastów, monoblastów, promielocytów czy megakariocytów) [Döhner i wsp., 2017].

Warto zaznaczyć, że w sytuacji kiedy u pacjenta stwierdzono obecność następujących zmian cytogenetycznych tzn.: *t(15;17)*, *inv (16)*, *t(8;21)* oraz *t(16;16)* ostra białaczka szpikowa jest rozpoznawana bez względu na odsetek blastów we krwi lub szpiku kostnym [Döhner i wsp., 2017, Hasserjian, 2013; Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018].

Do szczegółowego rozpoznania ostrej białaczki szpikowej oraz postawienia pełnej diagnozy i zróznicowania typu nowotworu niezbędne jest również przeprowadzenie badań dodatkowych takich jak: szeroki panel antygenów, ocena zmian genetycznych klonu białaczkowego z wykorzystaniem metody FISH, zastosowanie metod klasycznej cytogenetyki lub wielu metod biologii molekularnej. Badania te mogą być niezbędne do ustalenia rozpoznania ostrej białaczki szpikowej w około 1/3 przypadków. Istotne w procesie diagnozy, rozpoznania oraz podjęcia decyzji co do zastosowania odpowiedniego leczenia, przydatna może być również ocena czynników rokowniczych oraz określenie stanu ogólnego zdrowia pacjenta [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Wierzbowska, 2013].

2. Ocena rokowania u pacjentów z ostrą białaczką szpikową

Przed wdrożeniem odpowiedniego postępowania leczniczego dającego jak największą szansę na wyleczenie przy zachowaniu najmniejszego ryzyka oraz eliminację ewentualnych powikłań istotne jest określenie rokowania u pacjentów cierpiących z powodu ostrej białaczki szpikowej [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Ocenia się odpowiednio: ryzyko zgonu pacjenta, ryzyko oporności na zastosowane leczenie oraz ryzyko nawrotu choroby [Szczeklik, 2018].

W przypadku oceny ryzyka zgonu zależnego od toksyczności chemioterapii ważne jest aby określić ogólny stan zdrowia i sprawności chorego, a także stwierdzić lub wykluczyć obecność współistniejących chorób takich jak: cukrzyca, choroby wątroby i nerek, schorzenia układu oddechowego oraz układu krążenia, których częstość występowania oraz nasilenia wzrasta wraz z wiekiem [Szczeklik, 2018].

Przy ocenie ryzyka oporności na leczenie oraz nawrotu choroby istotne jest określenie charakterystyki cytogenetycznej i molekularnej. Na podstawie najnowszych zaleceń ELN z roku 2017 wyróżnia się grupy o ryzyku korzystnym, pośrednim i niekorzystnym (Tabela 5)[Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Ostra białaczka szpikowa z obecnością *FLT3-ITD* zaliczana jest do grupy ryzyka niekorzystnego natomiast postaci AML z t(8;21) lub inv(16) przy współistniejącej mutacji *KIT* do grupy ryzyka pośredniego [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018].

Warto nadmienić, że istnieje jeszcze jeden podział ryzyka opartego tylko i wyłącznie na zmianach molekularnych. Został on opracowany we względu na dużą czasochłonność badań cytogenetycznych. Wyróżnia się 5 grup z rokowaniem [Döhner i wsp., 2017]:

- 1) bardzo korzystnym: *PML-RARA* oraz podwójna mutacja *CEBPA*
- 2) korzystnym: *RUNX1-RUNX1T1* lub *CBFB-MYH11* lub *NPM1*, ale bez *FLT3-ITD*
- 3) pośrednim: mutacja inne niż w pozostałych grupach
- 4) niekorzystnym: *KMT2A-PTD* oraz mutacje *RUNX1* lub *ASXL1*
- 5) bardzo niekorzystnym: mutacje *TP53*

Ostre białaczki szpikowe związane ze wcześniejszą chemioterapią lub/i radioterapią, poprzedzone zespołem mielodysplastycznym oraz postaci pierwotna oporna z długim czasem do uzyskania remisji również zaliczane są do grupy białaczek

o niekorzystnym rokowaniu bez względu na zmiany cytogenetyczne i molekularne [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018].

Rokowanie	Zaburzenia genetyczne
Korzystne	t(8;21)(q22;q22.1) – <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22) – <i>CBFB-MYH11</i> mutacja <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> albo z <i>FLT3-ITD</i> ^{low} mutacja <i>CEBPA</i> (bialleliczna)
Pośrednie	mutacja <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i> ^{high} wt <i>NPM1</i> z <i>FLT3-ITD</i> ^{low} lub wt <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> t(9;11)(p21.3;q23.3) – <i>MLLT3-KMT2A</i> nieprawidłowości cytogenetyczne niesklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne
Niekorzystne	inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2) – <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> t(6;9)(p23;q34.1) – <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3) – <i>KMT2A</i> rearanżacja –5 lub del(5q) –7; -17/ abnl(17p) złożony kariotyp albo monosomalny kariotyp Zmutowany <i>RUNX1</i> , <i>ASXL1</i> i <i>TP53</i> wt <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i> ^{high}

Tabela 5. Klasyfikacja cytogenetyczno-molekularna zaproponowana przez European Leukemia Net z 2017 roku wraz z oceną rokowania pacjentów.

[Döhner i wsp., 2017]

3. Leczenie pacjentów z ostrą białaczką szpikową

Leczenie pacjentów z ostrą białaczką szpikową rozpoczyna się po dokładnym ustaleniu rozpoznania, czynników ryzyka oraz chorób współistniejących [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018]. Schematy leczenia zależą od czynników prognostycznych, do których można zaliczyć: wiek oraz płeć pacjenta oraz od ryzyka cytogenetyczno-molekularnego [Szczeklik, 2018; Wierzbowska, 2013]. Plan leczenia powinien już na samym początku zakładać docelowy przeszczep allogenicznym komórek krwiotwórczych (allo-HCT) wraz z oceną antygenów zgodności tkankowej (HLA) oraz ocenę dostępności potencjalnego dawcy. Należy również jednocześnie określić ogólny stan zdrowia pacjenta, opanować ewentualne zakażenia, skazę krwotoczną czy inne powikłania [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017; Wierzbowska, 2013].

W przypadku ostrej białaczki szpikowej wyróżniamy trzy główne etapy leczenia:

- ❖ indukcja remisji
- ❖ konsolidacja remisji
- ❖ leczenie pokonsolidacyjne [Döhner i wsp., 2017, Fey i wsp., 2013; Szczeklik, 2018].

W Polsce programy leczenia koordynowane są przez Polską Grupę ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych (PALG) [Szczeklik, 2018].

3.1 Leczenie indukcyjne

Głównym celem leczenia indukcyjnego jest jak najszybsze usunięcie lub zmniejszenie masy komórek nowotworowych oraz osiągnięcie tzw. całkowitej remisji choroby (ang. *complete remission*, CR) przy jednoczesnym przywróceniu prawidłowej hematopoezy w szpiku kostnym. Szacuje się, że remisja oraz regeneracja szpiku kostnego zachodzi zwykle w ciągu 3 do 6 tygodni od momentu wdrożenia leczenia indukcyjnego [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018]. Leczenie indukcyjne jest podobne w różnych typach ostrych białaczek (z wyjątkiem białaczki promielocytowej) i opiera się na polichemioterapii polegającej na kojarzeniu leków, które działają na różne fazy cyklu komórkowego oraz różne fazy metabolizmu komórek [Szczeklik, 2018]. Leki te tak synchronizują podziały komórki, żeby kolejny lek trafiał na fazę największej wrażliwości komórek białaczkowych [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018].

Schematy leczenia indukcyjnego stosowane są u pacjentów poniżej 60. roku życia bez przeciwwskazań do chemioterapii i opierają się na siedmiu programach leczenia (wg wytycznych NCCN z 2018 roku, ang. *National Comprehensive Cancer Network*, NCCN) [Szczeklik, 2018; NCCN, 2018].

Pierwszy z nich polega na tzw. schemacie „3 + 7”, czyli podawaniu antracykliny (daunorubicyny w dawce 60–90 mg/m²/d lub idarubicyny w dawce 10–12 mg/m²/d) przez 3 dni oraz arabinozydu cytozyny (cytarabiny, Ara-C) przez 7 dni w dawce 100–200 mg/m²/d. [Szczeklik, 2018; Hołowiecki, 2013; Wierzbowska i wsp., 2010]. Nie wykazano, aby podanie innych antracyklin czy zwiększenie dawek Ara-C poprawiały skuteczność terapii [Szmałda i wsp., 2017; Wierzbowska, 2013].

Drugi ze schematów leczenia polega na przyjmowaniu daunorubicyny oraz cytarabiny w dawkach wynoszących odpowiednio 60 mg/m²/dobę oraz 200 mg/m²/d oraz dodaniu kladrybiny w dawce 5 mg/m²/d. Dodanie to tego schematu kladrybiny zwiększa wskaźnik całkowitej remisji oraz OS [Szczeklik, 2018; Hołowiecki i wsp., 2012; Hołowieckii wsp., 2004]. Schemat ten nie zwiększa zasadniczo toksyczności leczenia ani nie wydłuża czasu pobytu chorego w szpitalu [Szczeklik, 2018].

Trzeci ze schematów leczenia stosuje się u osób poniżej 45. roku życia i przewiduje wysokodawkowaną cytarabinę (2 g/m²/co 12 godzin przez 6 dni lub 3 g/m²/12 godzin przez 4 dni) oraz idarubicynę w dawce 12 mg/m²/d lub daunorubicynę w dawce 60 mg/m²/d przez 3 dni [Szczeklik, 2018].

Czwarty schemat obejmuje przyjmowanie przez pacjenta fludarabiny w dawce 30 mg/m²/d w 2. i 6. dniu terapii. Po 4 godzinach od przyjęcia fludarabiny zaleca się przyjmowanie idarubicyny w dawce 8 mg/m²/d w 4. i 6. dniu [Szczeklik, 2018].

Piąty schemat leczenia według PALG dotyczy chorych z mutacjami w genie *FLT3* i polega na przyjmowaniu cytarabiny w dawce 200 mg/m² w pierwszych 7 dniach terapii, daunorubicyny w dawce 60 mg/m²/d w dniach 1.-3. midostauryny po 50 mg dwa razy dziennie w dniach 8.-21. Terapia midostauryną jest obecnie niedostępna w Polsce [Szczeklik, 2018].

Szósty schemat leczenia dotyczy pacjentów z ostrą białaczką szpikową związaną z poprzedzającym leczeniem lub zmianami mielodysplastycznymi. Pacjenci przyjmują preparat w postaci mikrokapsułek liposomalnych zawierających cytarabinę w dawce 100 mg/m² i daunorubicynę w dawce 44 mg/ m² w dniach 1., 4. i 7. [Szczeklik, 2018].

Ostatni schemat leczenia rekomendowany przez PALG obejmuje pacjentów AML z antygenem CD33+. Leczenie to jest modyfikacją schematu „3 + 7” poprzez dodanie gemtuzumabu z ozogamycyną w dawce 3 mg/ m² w dniach 1., 4. i 7. [Szczeklik, 2018].

Istnieje również wiele innych modyfikacji tych schematów leczenia jednak poprawiają one wyniki tylko w niektórych grupach ryzyka [Szczeklik, 2018].

3.1.1 Ocena skuteczności leczenia indukcyjnego

Po 14-21 dniach od rozpoczęcia terapii zleca się wykonanie u pacjenta rozmazu szpiku kostnego. Stwierdzenie hipoplazji oraz spadek odsetka blastów <5-10% wstępnie potwierdza skuteczność zastosowanego leczenia indukcyjnego oraz rokuje uzyskanie CR [Szczeklik, 2018].

Pełną ocenę skuteczności leczenia indukcyjnego określa się po okresie od 21 do 28 dni od rozpoczęcia terapii. Opiera się ona między innymi na analizie odsetka blastów w rozmazie szpiku kostnego. Stwierdzenie całkowitej remisji choroby, a tym samym potwierdzenie skuteczności zastosowanego schematu leczenia indukcyjnego określa na podstawie spełnienia poniższych kryteriów:

- ❖ spadek odsetka blastów do <5%
- ❖ brak blastów z pałeczkami Auera
- ❖ liczba płytek krwi <100 × 10⁹/L
- ❖ liczba neutrofili < 1,0 × 10⁹/L
- ❖ oraz brak objawów choroby pozaszpikowej [Döhner i wsp., 2017; Döhner i wsp., 2010; Kata i wsp., 2011; Szczeklik, 2018].

Odsetek blastów w szpiku kostnym wynoszący >10% oceniony do 28 dnia chemioterapii świadczy o oporności na leczenie oraz skłania lekarzy do zastosowania bardziej intensywnego leczenia chemioterapeutycznego [Szczeklik, 2018].

Standardowy schemat leczenia indukcyjnego stosowany u chorych poniżej 60. roku życia. Jest skuteczny i prowadzi do uzyskania CR w przypadku >70% leczonych pacjentów (>50% u osób starszych). Częstość występowania poważnych powikłań wynosi <10% [Rowe i wsp., 2010; Szczeklik, 2018].

3.1.2 Postępowanie w przypadku uzyskania częściowej remisji lub oporności na zastosowane leczenie

U około 30% pacjentów stwierdza się wystąpienie oporności na zastosowane leczenie indukcyjne (ang. *no response*, NR). W przypadku stwierdzenia NR przeprowadza się ponownie taki sam cykl leczenia indukcyjnego lub stosuje się tzw. leczenie drugiego rzutu, które dobiera się indywidualnie dla każdego pacjenta biorąc pod uwagę ogólny stan chorego oraz cechy jego choroby. Stosuje się schematy leczenia o dużej skuteczności oraz dąży się do jak najszybszego uzyskania CR i jeśli brak przeciwwskazań- do wykonania allo-HCT [Szczeklik, 2018].

3.1.3 Powikłania leczenia indukcyjnego

Do powikłań leczenia indukcyjnego można zakwalifikować:

- ❖ zespół rozpadu nowotworu,
- ❖ zmniejszenie się do wartości minimalnych liczby leukocytów i płytek krwi,
- ❖ zakażenia wirusowe, bakteryjne i grzybicze,
- ❖ skaza krwotoczna,
- ❖ małopłytkowość,
- ❖ niedobory czynników krzepnięcia,
- ❖ zespół DIC,
- ❖ wzmożoną fibrynolizę [Szczeklik, 2018].

3.2 Leczenie konsolidacyjne

Konsolidacja remisji jest etapem leczenia przeprowadzanym po uzyskaniu całkowitej remisji (CR). Polega na usunięciu resztkowej populacji komórek nowotworowych, które przetrwały w liczbie wykrywalnej tylko za pomocą technik cytometrii przepływowej czy metod biologii molekularnej (np. RT-qPCR) czyli tzw. choroby resztkowej (MRD) [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Komórki te są odporne i zlokalizowane w strefach mało dostępnych dla leków a ich obecność może spowodować nawrót choroby w ciągu kilku miesięcy. Standardowo konsolidacja remisji polega na podawaniu dużych dawek cytostatyków w powtarzanych cyklach (głównie cytarabiny) [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017]. Umożliwia to zniszczenie komórek białaczkowych, które w poprzedniej fazie leczenia były w fazie GO. Schemat leczenia konsolidacyjnego dobiera się na podstawie oceny grupy ryzyka. U pacjentów z tzw. korzystnej grupy ryzyka stosuje się 3- 4 cykle cytarabiny w dużych dawkach 3 g/m^2 co 12 h w 1., 3., 5. dniu (stosując 6 dawek na jeden cykl) [Döhner i wsp., 2017; Hołowiecki, 2013; Kata i wsp., 2011; Szczeklik, 2018].

Wykazano również, że u pacjentów z korzystnym kariotypem zastosowanie czterech cykli konsolidujących w pierwszej fazie remisji jest równie skuteczne, co autologiczny przeszczep komórek szpiku kostnego [Estey i wsp., 2006]. Badania wykazały, że zastosowanie wysokich dawek cytarabiny jednak nie przekłada się na uzyskanie korzystniejszego efektu. Według najnowszych zaleceń European Leukemia Net rekomendowane jest obecnie stosowanie średnich dawek tego leku wynoszących $1\text{--}1,5 \text{ g/m}^2$ przez 6 dni. Kwestią sporną jest liczba cykli stosowanych w terapii, jednak najczęściej po osiągnięciu CR stosuje się od 2 do 4 cykli [Döhner i wsp., 2017]. W programach PALG stosuje się także 1 cykl z dodaniem mitoksantronu i jeden cykl z zastosowaniem wysokich dawek Ara-C [Szczeklik, 2018].

Istotnym elementem jest także eliminacja ewentualnych powikłań i oraz dostosowanie siły leczenia do odpowiedzi, którą stwierdza się na podstawie określenia minimalnej choroby resztkowej. Dzięki temu ocenia się stan remisji oraz określa kinetykę odpowiedzi na leczenie [Szmajda i wsp., 2017]. Stan minimalnej choroby resztkowej informuje również o wyborze przyszłej terapii – jest wykorzystywany do podjęcia decyzji o przeszczepie szpiku kostnego w pierwszym cyklu terapii, gdyż jest

bardzo czułym predyktorem nawrotu choroby [Döhner i wsp., 2017; Hołowiecki, 2013].

3.3 Leczenie pokonsolidacyjne

Celem leczenia pokonsolidacyjnego jest utrwalenie stanu remisji oraz zapobieganie nawrotom choroby. Wybór schematów leczenia pokonsolidacyjnego jest zależny od grupy ryzyka w której znajduje się pacjent oraz jego ogólnego stanu zdrowia, podtypu białaczki czy ryzyka cytogenetyczno-molekularnego [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017; Wierzbowska i wsp., 2010].

W przypadku pacjentów z tzw. grupy korzystnego rokowania po zastosowaniu leczenia konsolidacyjnego z użyciem 3-4 cykli cytarabiny w dużych dawkach (HiDAC) zaleca się jedynie monitorowanie remisji na poziomie MRD ocenianej za pomocą cytometrii przepływowej lub technikami molekularnymi [Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017]. W razie nawrotu choroby przeprowadza się ponowną indukcję remisji i po jej uzyskaniu przeprowadza się allo-HCT. Przeprowadzenie allo-HCT można rozważyć także w pierwszej fazie CR (CR1) gdy obecne są dodatkowe czynniki obciążające rokowanie np. mutacja w genie *KIT*, > 25% blastów, obecna MRD po konsolidacji czy duża leukocytoza w chwili rozpoznania choroby. Alternatywną opcją dla pacjentów z grupy korzystnego ryzyka z CR1 jest przeprowadzenie tzw. auto-HCT czyli autologiczny przeszczep komórek krwiotwórczych już po przeprowadzeniu 1-2 cykli konsolidacyjnych HiDAC [Szczeklik, 2018].

U chorych z grupy pośredniego lub niekorzystnego rokowania zaleca się przeprowadzenie allo-HCT od zgodnego w układzie HLA dawcy rodzinnego lub niespokrewnionego, a w przypadku braku możliwości znalezienia dawcy rozważa się przeszczep od dawcy haploidentycznego (czyli przeszczep z komórek krwi pępowinowej) [Szczeklik, 2018].

3.4 Leczenie wspomagające

Zastosowanie leczenia wspomagającego jest istotne dla skutecznego leczenia indukcyjnego, przeżycia wczesnego okresu leczenia oraz w okresie leczenia konsolidacyjnego i reindukcyjnego u chorych ze stwierdzoną wznową. Ponadto jest to jedyna możliwość leczenia u pacjentów u których nie nastąpiła remisja choroby oraz niekwalifikujących się do chemioterapii [Szczeklik, 2018].

Leczenie wspomagające u pacjentów z ostrą białaczką szpikową opiera się na:

- ❖ zapobieganiu zakażeniom,
- ❖ leczeniu zakażeń,
- ❖ leczeniem hiperleukocytozy i leukostazy,
- ❖ leczenie objawowej niedokrwistości i małopłytkowości,
- ❖ leczenie hiperurykemi przy dużej leukocytozie,
- ❖ stosowanie rekombinowanych czynników, które pobudzają hematopoezę (w indywidualnych przypadkach),
- ❖ właściwa dieta i odżywianie (zarówno jelitowe jak i pozajelitowe),
- ❖ pomoc psychologiczna,
- ❖ profilaktykę w leczeniu nudności i wymiotów [Szczeklik, 2018].

4. Przeszczep szpiku kostnego

4.1 Allogeniczny przeszczep szpiku kostnego (allo-HCT)

Allogeniczny przeszczep szpiku kostnego polega na przeszczepieniu szpiku od osoby niebędącej bliźniakiem homozygotycznym zgodnej w układzie antygenów HLA w stosunku do biorcy. Dotyczy to zarówno dawców spokrewnionych jak i dawców niespokrewnionych. W przypadku braku rodzeństwa lub dawcy niespokrewnionego zgodnego w zakresie antygenów HLA konieczne jest rozważenie przeszczepu komórek szpiku kostnego od dawcy alternatywnego lub przeszczep komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej [Brunstein i wsp., 2010; Szmajda i wsp., 2017]. Ponadto allo-HCT jest jedyną szansą na wyleczenie pacjentów pierwotnie opornych na leczenie (ang. *primary refractory disease*). Pacjenci z trwale utrzymującą się chorobą resztkową lub z wczesnym jej nawrotem są także kierowani na allo-HCT, jeszcze przed nawrotem hematologicznym choroby. Zastosowanie allo-HCT często daje lepsze wyniki od chemioterapii, jednak nie znosi negatywnych efektów niekorzystnych zmian genetycznych oraz nie wpływa na przedtransplantacyjny poziom MRD [Döhner i wsp., 2017; Szmajda i wsp., 2017]. Zaletą allo-HCT jest stosunkowo mała częstość nawrotów oraz wydłużenie czasu przeżycia bez wznowy choroby. Wadą jest znaczna śmiertelność związana ze zbyt silną reakcją przeszczepionych komórek szpiku przeciwko

gospodarzowi oraz powikłaniami infekcyjnymi [Hołowiecki, 2013; Szczeklik, 2018; Wierzbowska i wsp., 2010].

AML jest jedną z najczęstszych przyczyn skierowania pacjentów na allogeniczny przeszczep szpiku kostnego. Decyzja ta zależy od oceny ryzyka i korzyści opartego na cytogenetycznych i molekularnych czynnikach, oraz na ogólnym stanie zdrowia samego pacjenta czy zgodności potencjalnego dawcy oraz możliwości przeszczepu. Nie zaleca się kierować pacjentów będących w korzystnej grupie rokowania do allo-HCT po osiągnięciu pierwszej remisji [Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017].

Wskazania do wykonania (allo-HCT):

- ❖ chorzy z CR1 będący w grupie pośredniego i niekorzystnego ryzyka oraz dobrym stanie ogólnym, bez dodatkowych obciążających chorób współistniejących, najczęściej w wieku < 65 lat,
- ❖ we wszystkich grupach ryzyka w przypadku chorych w CR2 i kolejnych remisjach,
- ❖ chorzy we wczesnym okresie wznowy białaczki,
- ❖ gdy CR1 uzyskana u osób ze stwierdzoną pierwotną opornością na zastosowane leczenie indukujące [Szczeklik, 2018].

Istotne jest aby alogeniczny przeszczep szpiku kostnego został zaplanowany już w początkowej fazie leczenia aby chory po osiągnięciu CR1 nie czekał zbyt długo na dawcę. Zbyt długi czas od wykrycia choroby do transplantacji ma zdecydowanie niekorzystny wpływ na wskaźnik wyleczenia [Szczeklik, 2018].

4.2 Autologiczny przeszczep szpiku kostnego (auto-HCT)

Przeszczep autologiczny szpiku kostnego polega na podawaniu pacjentowi własnych macierzystych komórek szpikowych pozyskanych ze szpiku kostnego i pobranych od pacjenta jeszcze przed zastosowaniem leczenia. Atutem takiego przeszczepu jest niski wskaźnik śmiertelności związanej z przeszczepieniem (<5%). Wada to prawie dwukrotny wyższy wskaźnik nawrotów choroby [Szczeklik, 2018].

Wskazania do wykonania (auto-HCT):

- ❖ chorzy z grupy korzystnego ryzyka,
- ❖ chorzy z grupy pośredniego ryzyka niemających dawców lub z przeciwwskazaniami do allo-HCT.

Podobnie jak w przypadku allo-HCT należy przed zabiegiem zastosować terapię konsolidacyjną z oceną MRD, a po przeszczepie kontrolować i monitorować poziom choroby resztkowej [Szczeklik, 2018].

5. Postępowanie w przypadku nawrotu choroby

Nawrót choroby rokuje niekorzystnie szczególnie gdy nastąpił w < 6 miesiącach, białaczka należy do grupy pośredniego lub niekorzystnego ryzyka cytogenetycznego, chory jest starszy lub był już poddany przeszczepowi szpiku.

W przypadku gdy nawrót nastąpił > 6 miesięcy od osiągnięcia całkowitej remisji można zastosować taki sam schemat leczenia, który zakończył się pierwszą remisją.

Natomiast przypadki, w których nawrót choroby nastąpił < 6 miesięcy od osiągnięcia całkowitej remisji należy leczyć tak jak przypadki oporne czyli leczeniem drugiego rzutu z kombinacjami zawierającymi wysokie dawki cytarabiny (HiDAC).

W obu przypadkach po uzyskaniu kolejnej całkowitej remisji należy rozważyć kolejny allogeniczny przeszczep szpiku kostnego [Szczeklik, 2018].

Charakterystyka wybranych czynników transkrypcyjnych

6. Rodzina genów *RUNX*

Geny z rodziny *RUNX* należą do rodziny czynników transkrypcyjnych (ang. *Runt-related transcription factor, RUNX*) odpowiedzialnych za kodowanie wiążących DNA podjednostek alfa czynników transkrypcyjnych domeny RUNT [Ito, 2004]. Do podjednostek alfa możemy zaliczyć czynnik wiążący DNA wzmacniacza białka poliomawirusa podjednostki 2αA czyli PEBP2α (ang. *polyomavirus enhancer-binding protein 2, PEBP2α*) oraz czynnik wiążący rdzeń CBFα (ang. *α/core-binding factor, CBFα*). Działają one jako regulatory rozwoju i łączą się z podjednostkami β (PEBP2β oraz CBFβ) w celu utworzenia heterodimerycznego czynnika transkrypcyjnego, który zmienia swoją konformację oraz odsłania miejsce wiązania DNA i zwiększa powinowactwo do DNA co prowadzi do aktywacji jego funkcji jako sekwencyjnie specyficznego transaktywatora [Ito, 2004; Ito i wsp., 2015; Otálora-Otálora i wsp., 2019].

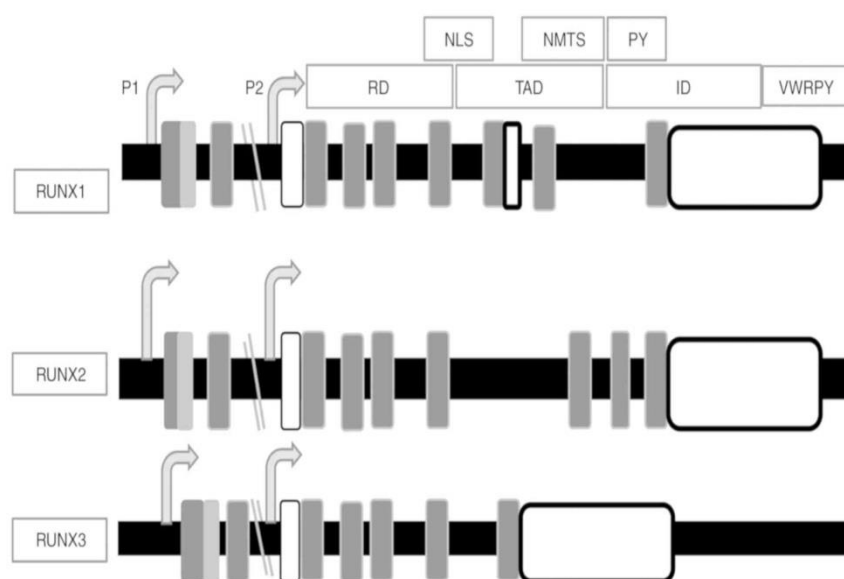
Już w roku 1993 przeprowadzono badania, które wykazały, że podjednostka PEBP2αA wymaga podjednostki PEBP2β do silnego wiązania DNA [Ogawa i wsp., 1993a; Ogawa i wsp., 1993b]. Do podobnych wniosków skłoniły badaczy badania nad sekwencjami podjednostek CBFα i CBFβ. Udowodniono, że sekwencje cDNA *PEBP2β* i *CBFβ* są identyczne [Ito, 2004]. Od tego czasu wiadano już, że potrzebne są dwie podjednostki (α oraz β) aby utworzyć aktywny kompleks transkrypcyjny [Ito, 2004; Ito i wsp., 2015].

Badania nad trójwymiarową strukturą domeny Runt zostały przeprowadzone pod koniec XX wieku. Dzięki zastosowaniu metody spektroskopii NMR (ang. *nuclear magnetic resonance, NMR*) oraz krystalografii opracowano trójwymiarową krystaliczną strukturę heterodimerowej domeny Runt zawierającej aminokwasowy region PEBP2β/CBFβ zbudowany ze 134 aminokwasów [Ito, 2004]. Wszystkie geny z rodziny *RUNX* mają podobną strukturę genomową [Levanon i wsp., 2004; Otálora-Otálora i wsp., 2019]. Każdy z genów należących do rodziny *RUNX* jest kodowany przez dwa promotory. P1-promotr dystalny i P2 promotor proksymalny. Na różnych etapach różnicowania promotory te są aktywowane i umożliwiają utworzenie izoform genów *RUNX* z różnymi końcami aminowymi o różnych właściwościach (Rycina 3) [Ito i wsp., 2015]. Domena RD (tzw. domena homologii Runt zawierająca eksony 2, 3 i 4)

pośredniczy w wiązaniu DNA i rozpoznawaniu innych czynników transkrypcyjnych, w tym białka p53, czynnika jądrowego κB (*NF- κB*), czynnika jądrowego aktywowanych komórek T oraz przetwornika sygnału i aktywatora transkrypcji [Otálora-Otálora i wsp., 2019; Williams i wsp., 1988].

Domena TAD (tzw. domena transaktywacyjna zawierająca ekson 6) pośredniczy w oddziaływaniach białko-białko [Miyoshi i wsp., 1995; Otálora-Otálora i wsp., 2019].

Domena hamująca ID odpowiada za negatywną regulację ekspresji białka [Javed i wsp., 2000; Mevel i wsp., 2019; Otálora-Otálora i wsp., 2019], a wysoce konserwatywna domena VWRPY (walina-tryptofan-arginina-prolina-tyrozyna) odpowiada za interakcję z rodziną białek TLE (ang. *transducin-like enhancer protein*, TLE) [Imai i wsp., 1998; Otálora-Otálora i wsp., 2019]. Istnieje także sekwencja dziewięciu aminokwasów zlokalizowana po domenie RD, zwana sygnałem lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localization sequence*, NLS) [Kanno i wsp., 2007; Otálora-Otálora i wsp., 2019] oraz motyw PY (sekwencja prolina-tyrozyna) odpowiadający za interakcję białka z domeną WW [Otálora-Otálora i wsp., 2019; Terry i wsp., 2007].



Rycina 3. Rycina przedstawia izoformy rodziny genów *RUNX*.

[Otálora-Otálora i wsp., 2019]

U człowieka do rodziny genów *RUNX* możemy zaliczyć:

- ❖ gen *RUNX1/AML1* (ang. *Runt-related transcription factor 1, RUNX1*) kodujący białko RUNX1
- ❖ gen *RUNX2* (ang. *Runt-related transcription factor 2, RUNX2*) kodujący białko RUNX2
- ❖ gen *RUNX3* (ang. *RUNX family transcription factor 3, RUNX3*) kodujący białko RUNX3 [Otálora-Otálora i wsp., 2019]

Geny należące do *RUNX* kodują białka o tej samej nazwie. Struktura każdego z białek z rodziny *RUNX* składa się z domeny wiążącej DNA (domena Runt) oraz końca karboksylowego, który zawiera zarówno domeny hamujące jak i aktywacyjne [Ito i wsp., 2015]. Białka *RUNX* mają średnią wielkość około 50 kDa [Otálora-Otálora i wsp., 2019].

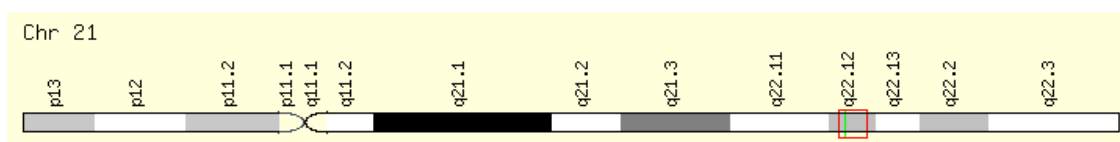
Geny z rodziny *RUNX* i ich białkowe produkty są czynnikami biorącymi udział w regulacji procesów transkrypcji oraz nadrzędnych etapów rozwoju embrionalnego oraz są zaangażowane w procesy regulacji oraz proliferacji i różnicowania się komórek. Ponadto biorą również udział w indukcji i regulacji procesów apoptozy czy specyfikacji linii komórkowych [Chuang i wsp., 2013; Ito i wsp., 2015; Otálora-Otálora i wsp., 2019]. Udowodniono, że liczne translokacje, delecje, amplifikacje czy mutacje w genach z rodziny *RUNX* mogą wpływać na ich ekspresję i aktywność, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju nowotworów [Ito i wsp., 2015; Otálora-Otálora i wsp., 2019].

Każdy z genów rodziny *RUNX* różni się charakterystyczną linią i wzorem ekspresji w konkretnych tkankach, a ich funkcja związana jest z regulacją głównych szlaków rozwojowych w komórkach. Udowodniono, że gen *RUNX1* jest istotny dla różnicowania się komórek krwiotwórczych i jest związany z rozwojem białaczki oraz guzów litych na skórze, płucach, jelicie i piersi, gen *RUNX2* jest niezbędny do regulacji procesów osteogenezy i może być związany z rozwojem kostniakomięsaka, raka tarczycy oraz raka brodawkowego czy raka prostaty [Barnes i wsp., 2003; Barnes i wsp., 2004; Dalle i wsp., 2012; Endo i wsp., 2008; Kurek i wsp., 2010; Otálora-Otálora i wsp., 2019; Sadikovic i wsp., 2010]. Gen *RUNX3* reguluje wzrost nabłonka żołądka i jest związany z rozwojem raka żołądka [Friedrich i wsp., 2006; Otálora-Otálora i wsp., 2019].

Wykazano również, że geny z rodziny *RUNX* wykazują wzajemną interakcję i należy je analizować wspólnie [Ito i wsp., 2015].

6.1 Gen *RUNX1*

Gen *RUNX1* (ang. *Runt-related transcription factor 1*, *RUNX1*) nazywany również *AML1* (ang. *acute myeloid leukemia 1 gene*, *AML1*) czy *CBFA2* (ang. *core-binding factor subunit alpha-2*, *CBFA2*) jest należącym do rodziny genów *RUNX* czynnikiem transkrypcyjnym. Zlokalizowany jest na chromosomie 21 (locus q21.22) (Rycina 4) oraz odgrywa istotną rolę w hematopoezie już podczas rozwoju embrionalnego [*RUNX1genecards.org*; Krygier i wsp., 2018; Medinger i wsp., 2016]. Ludzki gen *RUNX1* ma długość około 260 kb i może być transkrybowany przy udziale dwóch promotorów dystalnego (P1) oraz proksymalnego (P2), oddalonych od siebie o 160 par zasad [Ghozi i wsp., 1996; Komeno i wsp., 2014; van der Kouwe i wsp., 2019]. Promotor 1 dominuje w hematopoetycznych komórkach macierzystych (HSC) czy w wątrobie płodowej natomiast transkrypt P2 dominuje w innych tkankach niehematopoetycznych [Ghozi i wsp., 1996; Komeno i wsp., 2014; Telfer i wsp., 2001].



Rycina 4. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *RUNX1*.

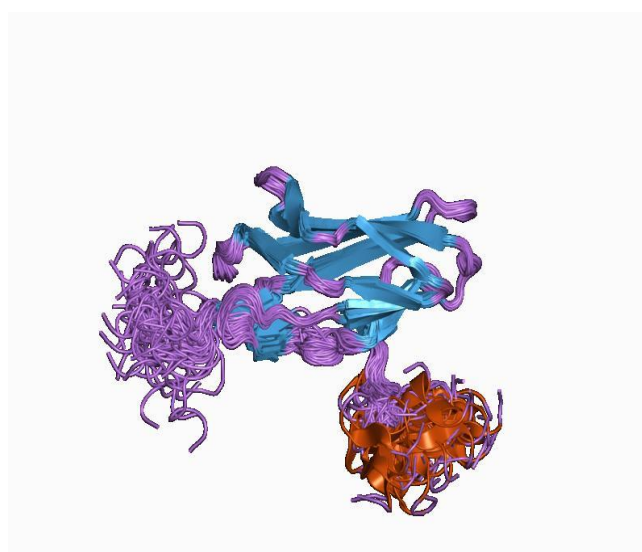
[*RUNX1genecards.org*]

Gen *RUNX1* podobnie jak pozostali członkowie w tej rodzinie moduluje transkrypcję swoich docelowych genów poprzez rozpoznanie podstawowej sekwencji wiążącej 5'-TGTGGT-3' (region C-końcowy) w ich regionach regulatorowych za pośrednictwem domeny Runt [*RUNX1genecards.org*; Simon i wsp., 2017].

Wyróżniamy 3 izoformy genu *RUNX1*: izoformy *RUNX1a* i *RUNX1b* kodowane przez promotor P1 i różniące się końcami karboksylowymi oraz izoforma *RUNX1c* kodowana przez promotor P2, która jest identyczna z izoformą 1b z wyjątkiem 32 aminokwasów kodowanych przez alternatywne egzony na jej końcu aminowym [Sood i wsp., 2017; van der Kouwe i wsp., 2019]. Te trzy izoformy mogą różnić się pełnioną funkcją. Izoforma *RUNX1a* (zbudowana z 250 aminokwasów) jest szczególnie zaangażowana w różnicowanie się niedojrzałych komórek krwi pępowinowej, a wspólnie z izoformą *RUNX1b* (zbudowaną z 453 aminokwasów) są zaangażowane w różnicowanie komórek hematopoetycznych [Levanon i wsp., 2001; Sood i wsp., 2017;

van der Kouwe i wsp., 2019]. Izoforma RUNX1c jest zbudowana z 483 aminokwasów i ulega ekspresji w momencie pojawienia się ostatecznych krwiotwórczych komórek macierzystych [Sood i wsp., 2017].

Gen *RUNX1* koduje białko RUNX1, które tworzy heterodimerski kompleks z CBF β , zapewniając tym zwiększone wiązanie DNA i stabilność kompleksu (Rycina 5). Kompletne białko RUNX1 kodowane jest przez 12 eksonów, składa się z 453 aminokwasów i ma masę 48737 Da. Jako czynnik transkrypcyjny należący do rodziny genów *RUNX* ma zdolność wiązania DNA jest kodowana przez domenę *Runt* [Lam i wsp., 2012; Miyoshi i wsp., 1995; *RUNX1genecards.org*].



Rycina 5. Rycina przedstawia model białka RUNX1.

[*RUNX1genecards.org*]

Wykazano wysoką ekspresję genu *RUNX1* między innymi w: leukocytach krwi obwodowej, szpiku kostnym, węzłach chłonnych, mózgu, korze nadnerczy, rdzeniu kręgowym, tkance nerwowej, sercu, piersiach, płucach czy jelitach. Gen *RUNX1* bierze także udział w rozwoju naczyń krwionośnych, mięśni, neuronów i tkanek nabłonkowych, w tym mieszków włosowych, nabłonka jamy ustnej i gruczołów łzowych [Komeno i wsp., 2014; *RUNX1genecards.org*].

6.1.1 Znaczenie genu *RUNX1* oraz białka *RUNX1* w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej

Liczne badania potwierdziły rolę genu *RUNX1* w rozwoju wielu nowotworów. Wykazano zróżnicowany poziom ekspresji tego genu między innymi w nowotworach złośliwych w tym: w raku jajnika czy w raku piersi [Ferrari i wsp., 2014; Fu i wsp., 2016; Ge i wsp., 2014; Krygier i wsp., 2018; Lam i wsp., 2012]. Kluczową rolę gen *RUNX1* odgrywa w hematopoezie już podczas rozwoju zarodkowego [Krygier i wsp., 2018]. Bierze udział w tworzeniu krwiotwórczych komórek macierzystych oraz komórek progenitorowych [Krygier i wsp., 2018; Tracey i wsp., 2000]. Ponadto odpowiada za ich przekształcanie w dojrzałe komórki krwi oraz pośredniczy w przejściu komórek śródbłónka w komórki hematopoetyczne [Krygier i wsp., 2018; Okuda i wsp., 2001; Tracey i wsp., 2000]. Gen *RUNX1* moduluje komórki krwiotwórcze poprzez wiązanie się z receptorem trombopoetyny (TPO) oraz promotorem c-Mpl, co prowadzi do aktywacji transkrypcji i zainicjowania powstawania komórek macierzystych hematopoezy ze śródbłónka [Knezevici wsp., 2011]. Warto zaznaczyć, że transkrypcja genu *RUNX1* jest regulowana przez dwa tkankowo-specyficzne wzmacniacze ekspresji, które umożliwiają wiązanie limfoidalnych lub erytroidalnych białek regulatorowych, dlatego aktywność genowa *RUNX1* jest wysoce aktywna w układzie krwiotwórczym [Krygier i wsp., 2018; Okuda i wsp., 2001; Otálora-Otálora i wsp., 2019; Sood i wsp., 2017].

Wykazano, że liczne aberracje genetyczne, a w szczególności translokacje oraz mutacje w genie *RUNX1* mogą być związane z rozwojem białaczek, w tym ostrej białaczki szpikowej. Mogą one również wpływać na jej przebieg oraz rokowanie [Asou i wsp., 2003; Krygier i wsp., 2018; *RUNX1*genecards.org; Szczeklik, 2018].

Analiza mutacji punktowych w genie *RUNX1* przeprowadzona u pacjentów z ostrą białaczką szpikową wykazała obecność zarówno mutacji typu missense oraz nonsense [Osato i wsp., 1999; Sood i wsp., 2017]. Zmutowany gen *RUNX1* występuje u około 15% pacjentów z AML rozpoznaną *de novo* i jest związany ze starszym wiekiem, płcią męską oraz charakteryzuje się gorszym rokowaniem w porównaniu do pacjentów z *RUNX1* typu dzikiego [Schnittger i wsp., 2011; Sood i wsp., 2017; Tang i wsp., 2009]. Wysznuło również tezę, że leukemogeneza jest indukowana przez mutacje, które zapewniają przewagę wzrostu hematopoetycznym komórkom progenitorowym z defektami różnicowania spowodowanymi zmutowanym genem *RUNX1* [Kihara i wsp.,

2014; Sood i wsp., 2017].

W piśmiennictwie dostępne są również doniesienia opisujące rolę polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) genu *RUNX1* w rozwoju wielu chorób w tym nowotworów. Badacze wskazują między innymi, że SNP genu *RUNX1* mogą być potencjalnie związane z rozwojem nowotworów układu moczowo-płciowego w tym raka prostaty czy nowotworami układu pokarmowego takimi jak zaawansowany raka żołądka oraz raka jelita grubego [Han i wsp., 2018; Huang i wsp., 2011; Slattery i wsp., 2011]. Istnieją również doniesienia opisujące związek SNP genu *RUNX1* z rozwojem czy zwiększonym ryzykiem wystąpienia ostrej białaczki szpikowej. Przykładem takiego polimorfizmu jest polimorfizm rs13051066 genu *RUNX1* mający związek ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia AML w populacji irańskiej [Javadlar i wsp., 2020].

W niniejszej rozprawie doktorskiej badanym polimorfizmem dla genu *RUNX1* był polimorfizm w pozycji 34809752 (rs2268277) polegający na zamianie guaniny na cytozynę (zamiana G>C). Polimorfizm ten nie wpływa na kodowany aminokwas (jest zaliczany do polimorfizmów występujących w niekodujących regionach genu) jednak może oddziaływać na proces powstawania mRNA oraz zmieniać jego okres półtrwania, co może prowadzić do zmiany ekspresji badanego genu. W konsekwencji może prowadzić to do zmiany budowy oraz funkcji kodowanego białka *RUNX1* co może być związane z zaburzeniem jego funkcjonowania jako czynnika transkrypcyjnego [Shastry, 2009]. Według aktualnego stanu wiedzy nie znaleziono jak dotąd badań, które opisywałyby znaczenie tego polimorfizmu w rozwoju nowotworów hematologicznych.

W literaturze dostępne są badania opisujące związek tego polimorfizmu ze schorzeniami ze spektrum chorób autoimmunologicznych: toczeniem rumieniowatym układowym oraz reumatoidalnym zapaleniem stawów [Orozco i wsp., 2006; Tokuhito i wsp., 2003; Wesoly i wsp., 2005]. Badania przeprowadzone przez Tokuhito i wsp. wskazują na częstszy związek występowania RZS u pacjentów posiadających zmutowany allel C. Ponadto wykazano także wpływ obecności zmutowanego allela C na poziom mRNA genu *RUNX1*. Badania te zostały przeprowadzone na populacji japońskiej [Tokuhito i wsp., 2003].

Gen *RUNX1* jest niezwykle podatny na czynniki generujące zmiany

i nieprawidłowości chromosomowe w ostrych białaczkach szpikowych. Dotyczy to w szczególności translokacji wpływających na *RUNX1* czy *CBFB* (znane są one jako ostre białaczki z czynnikiem wiążącym rdzeń (CBF) [Sood i wsp., 2017]. Przegrupowania chromosomów ostrych białaczek obejmują najczęściej: t (8; 21) (q22; q22) w podtypie AML M2 i inv (16) (p13.1; q22) / t (16; 16) (p13.1; q22) w podtypu AML M4Eo [Lam i wsp., 2012; Paschka i wsp., 2013; Sood i wsp., 2017].

Udowodniono między innymi, że obecność genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1*, którego powstanie jest efektem translokacji t(8;21)(q22;q22.1) czy obecność aberracji chromosomowych takich jak inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22) tworzące gen fuzyjny *CBFB-MYH11* są związana z korzystnym rokowaniem. Z kolei obecność mutacji w genie *RUNX1* rokuje niekorzystnie [Szczeklik, 2018; Sood i wsp., 2017].

Stwierdzenie mutacji w genie *RUNX1* czy genie fuzyjnym *RUNX1-RUNX1T1* może być związane ze złym czynnikiem rokowniczym [Szczeklik, 2018]. Wykazano, że obecność u pacjentów zmutowanego genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* jest związana z niekorzystną prognozą [Krauth i wsp., 2014; Sood i wsp., 2017].

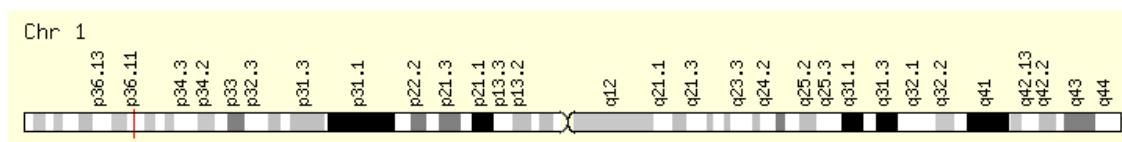
Ponadto udowodniono także, że zmiany w ekspresji genu *RUNX1* również mogą być związane z rozwojem ostrej białaczki szpikowej. Jedne doniesienia potwierdzają rolę genu *RUNX1* jako supresora nowotworowego [Krygier i wsp., 2018; Silva i wsp., 2003], którego zmniejszona ekspresja lub delecja może prowadzić do rozwoju AML [Krygier i wsp., 2018; Ostato, 2004]. Inne badania sugerują natomiast, że *RUNX1* działa jako onkogen i że może powodować rozwój AML ze względu na jego rolę w przeżywaniu i zwiększonej proliferacji komórek białaczkowych [Ben-Ami i wsp., 2013; Goyama i wsp., 2013; Goyama i wsp., 2015; Wilkinson i wsp., 2013].

6.2 Gen *RUNX3*

Gen *RUNX3* (ang. *RUNX Family Transcription Factor 3, Runt-Related Transcription Factor 3, RUNX3*) nazywany również *AML2* (ang. *acute myeloid leukemia 2 gene, AML2*) czy *CBFA3* (ang. *Core-Binding Factor, Runt Domain, Alpha Subunit 3, CBFA3*) jest należącym do rodziny genów *RUNX* czynnikiem transkrypcyjnym. Zlokalizowany jest na chromosomie 1 (locus p36)(Rycina 6) [Bangsow i wsp., 2001; Krygier i wsp., 2018; *RUNX3*genecards.org]. Ludzki gen *RUNX3* zawiera 6 eksonów i ma długość około 66 kb, z czego połowa (35 kb) obejmuje pierwszy intron. Jest to

najmniejszy gen z rodzin *RUNX* [Bangsow i wsp., 2001; *RUNX3genecards.org*]. Analiza sekwencji genu *RUNX3* pozwoliła wyróżnić regiony bogate w zasady GC (zlokalizowane między sekwencją genu, a dalszym regionem międzygenowymi) oraz dwie duże wyspy CpG: jedną wokół eksonu 2, a drugą na początku eksonu 6 [Bangsow i wsp., 2001].

Gen *RUNX3* koduje białko *RUNX3* o heterodimerskiej budowie (Rycina 7). Białko to składa się z 415 aminokwasów oraz ma masę 44 kDa [Bangsow i wsp., 2001; *RUNX3genecards.org*]. Heterodimer tego białka wraz z podjednostką beta wiąże się z podstawową sekwencją DNA 5'-PYGPYGGT-3' występującą w wielu wzmacniaczach i promotorach. Dzięki temu białko *RUNX3* może albo aktywować, albo tłumić transkrypcję [*RUNX3genecards.org*]. Transkrypcja *RUNX3* jest regulowana przez dwa różne regiony promotora: dystalnego (P1) oraz proksymalnego (P2) [Bangsow i wsp., 2001; *RUNX3genecards.org*].



Rycina 6. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *RUNX3*.

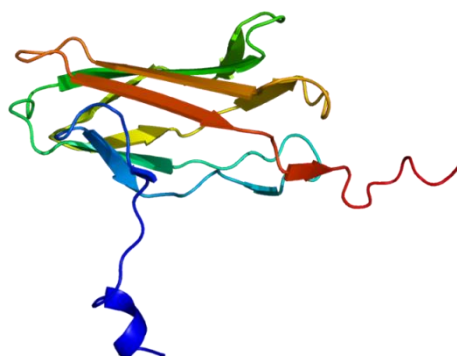
[*RUNX3genecards.org*]

Gen *RUNX3* podobnie jak pozostali członkowie rodziny genów *RUNX* (w tym gen *RUNX1*) tworzy heterodimerski kompleksowy czynnik wiążący rdzeń (CBF) z cząsteczką *CBFB* modulując tym samym transkrypcję swoich docelowych genów poprzez rozpoznanie podstawowej sekwencji wiążącej 5'-TGTGGT-3' (region C-końcowy) w ich regionach regulatorowych za pośrednictwem domeny Runt [*RUNX3genecards.org*; Mevel i wsp., 2019]. Heterodimery wiążą się z rdzeniem szeregu wzmacniaczy i promotorów genów w tym: wzmacniacza poliomawirusa, wzmacniaczy receptora komórek T, promotorów LCK, IL3 i GM-CSF dzięki temu gen *RUNX3* może być zaangażowany w kontrolę proliferacji i różnicowania się komórek [*RUNX3genecards.org*].

Ze względu na niewielką liczbę eksonów *RUNX3* posiada dwie izoformy. P-*RUNX3* (transkrybowana przez promotor proksymalny) oraz izoforma D-*RUNX3* (transkrybowana przez promotor dystalny). Porównanie funkcjonalnych izoformy P, jak i D genu *RUNX3* pokazuje, że oba zawierają domenę aktywacyjną jednak izoforma D jest bardziej aktywna w procesach transkrypcji [Chung i wsp., 2007].

Wykazano, że gen *RUNX3* jest odpowiedzialny za regulację wielu innych genów w tym np. podjednostki czynnika wiążącego rdzeń β , transformację szlaków czynnika wzrostu β i *Notch 1*, protoonkogenu *ETS 1* czy transkrypcji protoonkogenu *ETS 2* [*RUNX3genecards.org*; Krygier i wsp., 2018]. Współdziała również z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Działa jako supresor nowotworu, a gen ten jest często usuwany lub wyciszany w wielu nowotworach. Istnieją również badania wskazujące na rolę genu *RUNX3* w indukcji nowotworzenia. Wskazuje to na złożoną rolę genu *RUNX3* oraz kodowanego przez niego czynnika w onkogenezie [Whittle i wsp., 2017]. Ponadto wykazano silną ekspresję tego genu we wszystkich hematopoetycznych komórkach macierzystych [Haider i wsp., 2016; Krygier i wsp., 2018; Otto i wsp., 2003].

Wskazano również na rolę genu *RUNX3* w neurogenezie i tymopoezie. Gen *RUNX3* jest również uznawany za supresor nowotworowy w raku żołądka [Cheng i wsp., 2008; Inoue i wsp., 2002; Li i wsp., 2002; Taniuchi i wsp., 2002]. Stwierdzono również rolę genu *RUNX3* w rozwoju raka piersi [Jiang i wsp., 2008].



Rycina. 7. Rycina przedstawia model białka RUNX3.

[*RUNX3genecards.org*]

6.2.1 Znaczenie genu *RUNX3* oraz białka RUNX3 w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej

Gen *RUNX3* działa prawdopodobnie jako supresor nowotworowy. Wykazano, że inaktywacja tego genu i obniżony poziom ekspresji jest związany z rozwojem raka piersi [Lau i wsp., 2006; Krygier i wsp., 2018], a delecja tego genu jest związana z rozrostem błony śluzowej żołądka i rozwojem raka żołądka [Bae i wsp., 2004; Guo i wsp., 2005; Krygier i wsp., 2018]. Główną przyczyną tego mechanizmu inaktywacji może być hipermetylacja w regionie promotora [Jiang i wsp., 2008]. W literaturze dostępne są

również prace dotyczące roli genu *RUNX3* w rozwoju nowotworów pęcherza, płuc czy raka wątrobowo komórkowego [Jeong i wsp. 2018; Li i wsp., 2002]. Jego rola w rozwoju ostrej białaczki szpikowej wciąż nie została jeszcze dokładnie poznana.

Wykazano, że ekspresja genu *RUNX3* jest obecna w układzie krwiotwórczym co może wskazywać na rolę tego genu w różnicowaniu szpiku kostnego i komórek B [Bangsow i wsp., 2001; Wu i wsp., 2014]. Dane z piśmiennictwa potwierdzają również rolę *RUNX3* w przebiegu tymopoezy i różnicowania się komórek T oraz modulacjach funkcji efektorowych komórek szpikowych. Ponadto wykazano wysoką ekspresję tego genu we wszystkich hematopoetycznych komórkach macierzystych [Krygier i wsp., 2018; Haider i wsp., 2016; Otto i wsp., 2003; Wu i wsp., 2014].

Szczególnie istotne dla rozwoju ostrej białaczki szpikowej w kontekście genu *RUNX3* i jego produktu białkowego wydają się być zmiany w poziomach jego ekspresji. Wykazano, że ekspresja genu *RUNX3* może być niezależnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z AML a wyższe poziomy mogą być traktowane jako niekorzystny czynnik prognostyczny [Cheng i wsp., 2008; Krygier i wsp., 2018; Lacayo i wsp., 2004]. Powiązano również poziom ekspresji genu *RUNX3* ze śmiertelnością oraz rokowaniem pacjentów cierpiących z powodu ostrej białaczki szpikowej [Cheng i wsp., 2008; Krygier i wsp., 2018].

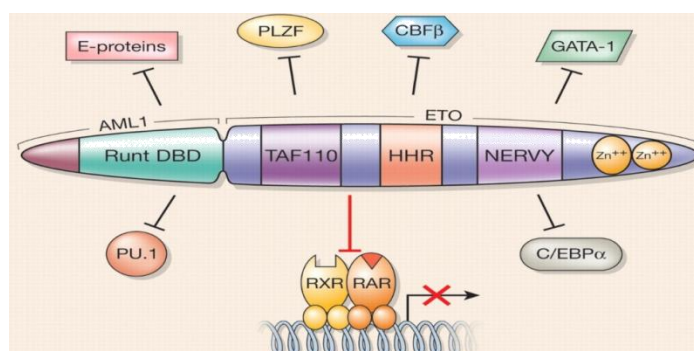
Oceniono również, że polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genie *RUNX3* mogą być związane z rozwojem nowotworów lub chorób zapalnych przewodu pokarmowego. Udowodniono znaczenie SNP między innymi w rozwoju raka żołądka, jelita grubego czy wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [Hai-Xing i wsp., 2019; Suárez-Villanueva i wsp., 2015; Wu i wsp., 2009]. Wskazano także na rolę polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w rozwoju raka pęcherza moczowego [Zhang i wsp., 2008].

Dla genu *RUNX3* oceniano polimorfizm w pozycji 24964519 (rs6672420) w wyniku którego dochodzi do zamiany adeniny na tyminę (zamiana A>T). W wyniku tego polimorfizmu dochodzi do zamiany aminokwasu w pozycji 19 z asparaginy (Asn) na izoleucynę (Ile). Obecność polimorfizmu rs6672420 wpływa na ekspresję i funkcjonowanie genu *RUNX3* co może prowadzić do powstania białka *RUNX3* o zmienionej budowie oraz zaburzonej funkcji wiązania innych czynników

transkrypcyjnych [Shastry, 2009]. Jak dotąd nie opisano znaczenia roli tego polimorfizmu w rozwoju ostrych białaczek szpikowych. Polimorfizm ten był jednak badany w nowotworach układu chłonnego (Zespół Sezary’ego) [Haider i wsp., 2016] oraz nowotworach przewodu pokarmowego (raku żołądka oraz jelita grubego) [Lim i wsp., 2011; Slattery i wsp., 2011]. Badania przeprowadzone przez Lim i wsp. wskazały na związek obecności zmutowanego allele T ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka żołądka [Lim i wsp., 2011] jednak wyniki badań przeprowadzone u pacjentów z rakiem jelita grubego były odmienne [Slattery i wsp., 2011].

6.3 Gen fuzyjny *RUNX1-RUNX1T1*

Powstanie gen fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* jest wynikiem translokacji chromosomowej t(8;21) czyli wymiany dwóch fragmentów niehomologicznych chromosomów [Rubnitz i wsp., 1998; Shimada i wsp., 2002]. W jej wyniku dochodzi do połączenia się genu *RUNX1* zlokalizowanego na chromosomie 21 i genu *RUNX1T1* zlokalizowanego na chromosomie 8. Miejscem połączenia się obu genów jest intron 5 genu *RUNX1* oraz intron 1a lub 1b genu *RUNX1T1* (Rycina 8). Pierwszy raz opisano tę aberrację w 1973 roku [Grimwade i wsp., 2010; Lam i wsp., 2012; van der Kouwe i wsp., 2019].



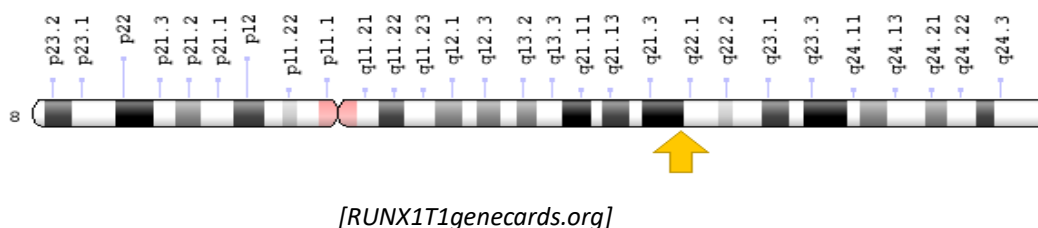
Rycina 8. Rycina przedstawia schemat budowy genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1*.

[Petrie i wsp., 2007]

Gen *RUNX1T1* (ang. *RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1*, *RUNX1T1*) zlokalizowany jest na ramieniu długim (q) chromosomu 8 w locus 21.3 (Rycina 9). Składa się z 20 eksonów a jego wielkość to 148 kB [*RUNX1T1*genecards.org]. Gen *RUNX1T1* odpowiada za powstawanie białka o tej samej nazwie składającego się z 604 aminokwasów o masie wynoszącej 67566 Da. Bierze ono udział w regulacji aktywności innych genów oraz hamuje je czynnościowo oraz ułatwia represję transkrypcji dlatego

nazywane jest transkrypcyjnym korepresorem. Oddziaływając wzajemnie z innymi białkami korepresorowymi efekt hamowania przez białko *RUNX1T1* zostaje wzmocniony [Guo i wsp., 2009; Kumar i wsp., 2008; *RUNX1T1*genecards.org].

Rycina 9. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *RUNX1T1*.



Gen fuzyjny *RUNX1-RUNX1T1* koduje białko fuzyjne zbudowane z 752 aminokwasów. Na strukturę tego białka składa się niemal całe białko *RUNX1T1* (575 aminokwasów) oraz N-końcowa (177 aminokwasów) część białka *RUNX1*, która zawiera domenę RD [Lam i wsp., 2012; Miyoshi i wsp., 1993; van der Kouwe i wsp., 2019]. W strukturze białka fuzyjnego można wyróżnić: domenę białkową o funkcji wiązania DNA (ang. *runt DNA – binding domain*, DBD); region homologiczny dla białka TAF110 i innych białek TAF; region HHR; region homologiczny dla białka gatunku *Drosophila* (ang. *Drosophila nervy protein*) oraz C – końcowy region z domeną białkową [Petrie i wsp., 2007].

Białko *RUNX1-RUNX1T1* posiada zdolność wiązania DNA co umożliwia i reguluje aktywację genów, normalnie podlegających regulacji przez białko *RUNX1*. Translokacja t(8;21) jest częstym zjawiskiem w przypadku ostrej białaczki szpikowej (blisko 12% przypadków AML u dzieci i 7% przypadków u dorosłych), jednakże jej występowanie odnotowano również u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną i ostrą białaczkę bifenotypową (BAL) [Forster i wsp., 2016; Lam i wsp., 2012; Müller i wsp., 2008; van der Kouwe i wsp., 2019].

Ze względu na dwa alternatywne warianty splicingowe translokacja t (8; 21) prowadzi do dwóch izoform *RUNX1-RUNX1T1*: *RUNX1-RUNX1T1 9a* i *RUNX1-RUNX1T1 11a* [van der Kouwe i wsp., 2019].

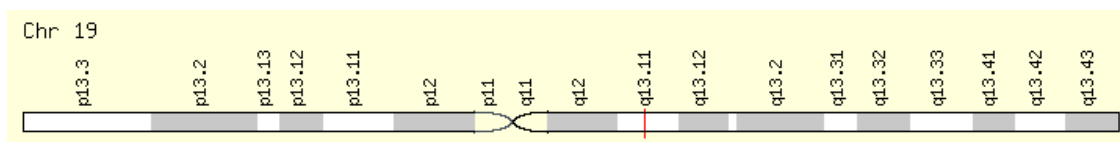
6.3.1 Znaczenie genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej

Gen fuzyjny *RUNX1-RUNX1T1* jest jedną z najczęstszych translokacji chromosomalnych i nieprawidłowości kariotypowych występujących w ostrej białaczce szpikowej [Grimwade i wsp., 2010; Lam i wsp., 2012]. Występuje głównie w podtypie M2 AML według klasyfikacji FAB [van der Kouwe i wsp., 2019]. Badania wykazały, że gen fuzyjny oddziałuje na dojrzewanie i różnicowanie komórek prekursorowych krwi oraz ma wpływ na rokowanie pacjentów cierpiących z powodu ostrej białaczki szpikowej. Według najnowszych wytycznych ELN z roku 2017 obecność genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* związana jest z korzystnym czynnikiem rokowniczym [Döhner i wsp., 2017]. Ponadto gen fuzyjny *RUNX1-RUNX1T1* promuje samoodnawianie się komórek krwiotwórczych, a także hamuje ich późniejsze różnicowanie [Tonks i wsp., 2006]. Jego obecność jest także związana z dobrym rokowaniem pod względem całkowitej remisji, ryzyka nawrotu i ogólnego przeżycia w porównaniu z innymi podtypami i mają tendencję do pozytywnej odpowiedzi do leczenia szczególnie cytarabiną w dużych dawkach i antracykliną [Döhner i wsp., 2017; Tonks i wsp., 2006; van der Kouwe i wsp., 2019]. Obecnie nie wiadomo, dlaczego pacjenci, u których stwierdzono obecność tego genu fuzyjnego charakteryzują się dobrym rokowaniem. Warto nadmienić, że stwierdzenie mutacji w genie fuzyjnym *RUNX1-RUNX1T1* jest związana ze złym czynnikiem rokowniczym i prognostycznym [Krauth i wsp., 2014; Szczeklik, 2018; Sood i wsp., 2017; Tokumasu i wsp., 2015].

7. Gen *CEBPA*

Gen *CEBPA* (ang. *RCCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*, *CEBPA*) jest bezintronowym genem należącym do czynników transkrypcyjnych zawierający podstawową domene bZIP (ang. *basic leucine zipper*, bZIP). Składa się z 4 funkcjonalnych domen zlokalizowanych w obrębie pojedynczego egzonu: z dwóch tzw. N-końcowych domen transaktywacyjnych (TAD1 i TAD2), które są odpowiedzialne za wzmacnianie transkrypcji, region podstawowy zbudowany z homologicznych C-końcowych wiązań DNA oraz regionu dimeryzacji i wiązania DNA (tzw. „zamek leucynowy” połączony w jedną funkcjonalną domenę bZip [Fasan i wsp., 2014; Pieronkiewicz i wsp., 2010; Tenen i wsp., 1997].

Gen *CEBPA* rozpoznaje motyw CCAATT (cytozyna-cytozyna-adenozyna-adenozyna-tymidyna) znajdujący się w promotorach genów docelowych. Zlokalizowany jest na chromosomie 19 (locus q13.11) (Rycina 10) i ma długość około 2,631 zasad. W jego strukturze znaleziono region bogaty w GC [*CEBPAgenecards.org*; Fasan i wsp., 2014]. *CEBPA* należy do rodziny czynników transkrypcyjnych wiążący wzmacniacz (*ang. CCAAT-enhancer-binding proteins*) składających się z 6 członków [*CEBPAgenecards.org*].



Rycina 10. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *CEBPA*.

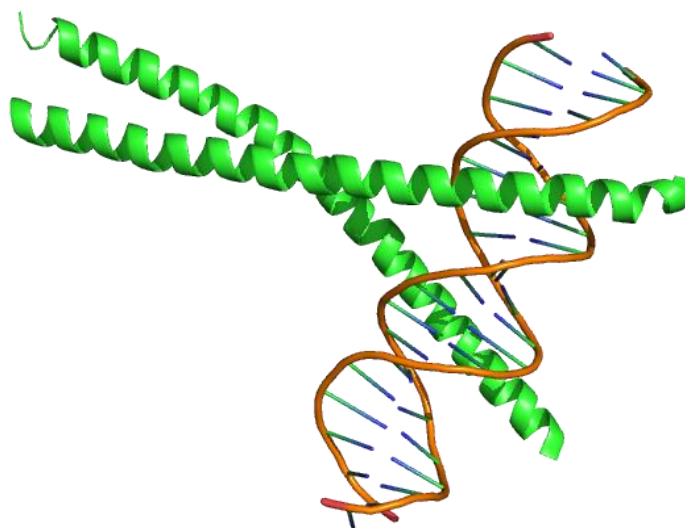
[*CEBPAgenecards.org*]

Gen *CEBPA* koduje dwa białka o masach 30 kDa i 42 kDa. Białko o mniejszej masie nie posiada domeny TAD1 oraz nie aktywuje wydajnie transkrypcji. Jego translacja jest zapoczątkowana dalej od 5'-końca mRNA. Białko *CEBPA* wykazuje aktywność jako czynnik transkrypcyjny jedynie w formie dimeru. Potrafi więc działać jako homodimer (izoformy białka *CEBPA* o masie 42 kDa) oraz heterodimer (zbudowany z białka *CEBPA* o masie 42 kDa oraz białka *CEBPA* o masie 30 kDa lub innego z członków rodziny białek *CEBP* np. *CEBPA*-beta czy *CEBPA*-gamma). Funkcjonalne dimery białkowe formują się w komórkach na różnych etapach różnicowania i łączą się z białkami CCAATT [*CEBPAgenecards.org*; Fasan i wsp., 2014; Pieronkiewicz i wsp., 2010; Ranjan i wsp., 2009].

Funkcjonalne białko *CEBPA* ma wielkość 358 aminokwasów oraz masę molekularną 37561 Da (Rycina 11). Białko to wpływa na regulację genów zaangażowanych między innymi w regulację cyklu komórkowego, a także na przebieg hemostazy. Dzięki modyfikacjom w kodonach genu *CEBPA* wyróżniamy 3 izoformy białkowe o różnych długościach [*CEBPAgenecards.org*; Pieronkiewicz i wsp., 2010; Parkin i wsp., 2002; Ranjan i wsp., 2009].

Białko *CEBPA* jest kluczowym regulatorem w procesie tworzenia nowych komórek tłuszczowych (adipogenezy), a także metabolizmu glukozy i lipidów w wątrobie [*Koschmieder i wsp., 2009*; *Olofsson i wsp., 2008*]. Bierze udział w regulacji proliferacji i różnicowania się komórek progenitorowych szpiku, komórek krwi,

hepatocytów i komórek płuc oraz łożyska [CEBPAgenecards.org Koschmieder i wsp., 2009]. Gen *CEBPA* oraz kodowane przez niego białko bierze udział również w regulacji cyklu komórkowego i masy ciała [Wang i wsp., 2003; Porse i wsp., 2001; Pabst i wsp., 2009]. Ma również duże znaczenie w różnicowaniu się granulocytów [Pabst i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2004]. Uważa się, że *CEBPA* działa jako supresor nowotworowy, co oznacza, że bierze udział w mechanizmach komórkowych, które pomagają zapobiegać wzrostowi i podziałowi komórek nowotworowych [CEBPA gene NIH].



Rycina 11. Rycina przedstawia model białka CEBPA.

[CEBPAgenecards.org]

7.1 Znaczenie genu *CEBPA* oraz białka CEBPA w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej

Liczne badania potwierdziły rolę genu *CEBPA* w regulacji procesu hematopoezy oraz różnicowania się granulocytów [Pabst i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2004]. Udowodniono, że białko CEBPA wzmacnia ekspresję części białek granulocytów, m.in. receptorów cytokin w tym G-CSF, M-CSF, GM-CSF oraz peptydów zawartych w ziarnistościach neutrofilii takich jak np.: MPO, NE, lizozymu, MBN, LF czy kolagenazy neutrofilowej. Ponadto białko CEBPA działa jako represor ekspresji genów

stymulujących erytropoezę [Pieronkiewicz i wsp., 2010]. Warto nadmienić, że aktywność genu *CEBPA* zmienia się podczas rozwoju komórek mieloidalnych. Ekspresja genu *CEBPA* stopniowo maleje w dojrzewających granulocytach [Pieronkiewicz i wsp., 2010].

Wykazano, że mutacje w genie *CEBPA* mogą być związane z rozwojem białaczek w tym ostrej białaczki szpikowej [Pieronkiewicz i wsp., 2010; Szmajda i wsp., 2017]. Obecność mutacji w genie *CEBPA* może również wpływać na przebieg ostrej białaczki oraz rokowanie pacjentów [Pieronkiewicz i wsp., 2010; Szczeklik, 2018; Szmajda i wsp., 2017]. Mutacje w genie *CEBPA* opisano u około 15% pacjentów z AML [Fasan i wsp., 2014]. Porównując pacjentów, u których występowały mutacje w genie *CEBPA* (*CEBPA*+) oraz tych u których te mutacje nie występowały (*CEBPA*-) stwierdzono, że odsetek pacjentów uzyskujących remisję jest podobny natomiast odsetek 5-letnich przeżyć pacjentów *CEBPA*+ w porównaniu z *CEBPA*- jest wyższy [Pieronkiewicz i wsp., 2010; Renneville i wsp., 2009]. Zaobserwowano również, że u ponad 50% przypadków pacjentów *CEBPA*+ obecne są dwie różne mutacje, zlokalizowane na dwóch chromosomach, czyli tzw. mutacje bialleliczne. Według najnowszych wytycznych ELN z 2017 roku obecność biallelicznej mutacji *CEBPA* jest uznawana za korzystny czynnik rokowniczy u pacjentów AML [Döhner i wsp., 2017; Szmajda i wsp., 2017]. Warto nadmienić, że prawdopodobnie wystąpienie pojedynczej mutacji w genie *CEBPA* nie wpływa korzystnie na czas trwania pierwszej remisji i średni czas przeżycia chorych [Dufour i wsp., 2010; Green i wsp., 2010; Pieronkiewicz i wsp., 2010; Wouters i wsp., 2009].

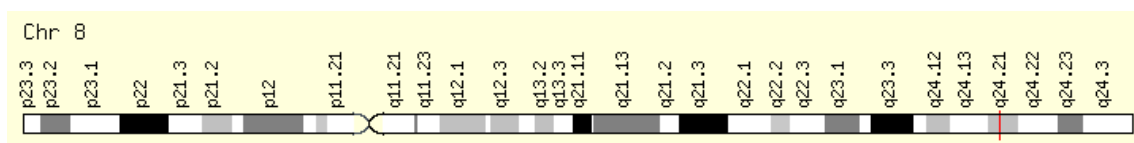
Zaobserwowano również różnicę w poziomach ekspresji tego genu u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową w porównaniu do osób zdrowych. Jedne doniesienia literaturowe opisują podwyższony poziom ekspresji genu *CEBPA* u pacjentów z AML oraz ich związek z podtypem białaczek określonej według klasyfikacji FAB co potwierdza tezę iż gen *CEBPA* odgrywa istotną rolę w rozwoju i progresji ostrej białaczki szpikowej [Gholami i wsp., 2019]. Inne badania natomiast opisują obniżoną ekspresję tego genu u pacjentów białaczkowych [Paz-Priel i wsp., 2011].

8. Gen *c-MYC*

Do rodziny genów *Myc* (ang. *MYC Binding Protein, MYC*) możemy zaliczyć trzy powiązane ze sobą geny: *c-MYC*, *i-MYC* oraz *n-MYC* wykazujące właściwości regulatorowe oraz pełniące funkcję protoonkogenów. Geny należące do rodziny *Myc* kodują czynniki transkrypcyjne [*c-MYC genecards.org*].

Ludzki gen *c-Myc* (ang. *MYC Proto-Oncogene BHLH Transcription Factor, c-MYC*), został odkryty jako pierwszy z rodziny. Znajduje się on na chromosomie 8 (locus q24.21) oraz ma wielkość 7,518 par zasad (Rycina 12). Składa się z trzech eksonów o długości ponad 4 kb, przy czym to drugi i trzeci ekson kodują znacznie większą część struktury białka MYC [*Battery i wsp., 1983; c-MYC genecards.org; Salvatori i wsp., 2011*]. Ekson 1 odgrywa rolę w kontroli translacji i warunkuje stabilność mRNA. Istnieją cztery promotory transkrypcji genów *MYC*. W normalnych komórkach promotor P2 przyczynia się do około 75% wszystkich transkryptów *MYC*, podczas gdy P1 stanowi większość pozostałych 25% transkryptów tego genu [*c-MYC genecards.org; Dang, 2012; atlasgeneticsoncology.org*].

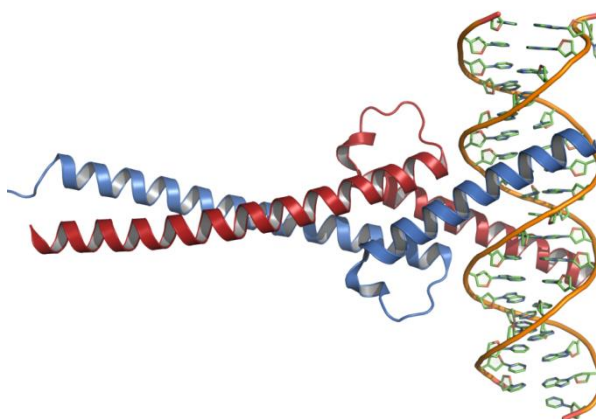
Gen *c-Myc* należy do protoonkogenów i koduje fosfoproteinę jądrową która odgrywa rolę w przebiegu cyklu komórkowego, apoptozie i transformacji komórkowej [*atlasgeneticsoncology.org; Bretones i wsp., 2015; c-MYC genecards.org; Juin i wsp., 1999; Prendergast., 1999*]. Gen *c-Myc* reguluje i prowadzi do nadekspresji genów związanych między innymi ze zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych [*Dang i wsp., 2017*]. *c-MYC* wiąże DNA w sposób niespecyficzny, a jednocześnie swoiście rozpoznaje sekwencję rdzeniową 5'-CAC [GA] TG-3' tym samym aktywując transkrypcję genów związanych ze wzrostem i proliferacją. mRNA genów z rodziny *Myc* zawiera fragment IRES (tzw. wewnętrzne miejsce wejścia rybosomu), który pozwala na translację RNA na białko, gdy proces ten jest hamowany przykład podczas infekcji wirusowej [*c-MYC genecards.org; atlasgeneticsoncology.org; Snow, 1997*].



Rycina 12. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *c-MYC*.

[*c-MYC genecards.org*]

Geny z rodziny *Myc* kodują białko Myc, które zbudowane jest z 439 aminokwasów, a jego masa molekularna wynosi 48,804 kDa (Rycina 13). W przypadku genu *c-MYC* kodowane białko posiada 64 kDa [Snow, 1997]. W strukturze tego białka można wyróżnić motyw bHLH umożliwiający białkom Myc wiązanie DNA oraz motyw LZ (tzw. „zamek leucynowy”) umożliwiający dimeryzację z czynnikami transkrypcyjnymi MAX [MYC *genecards.org*; *atlasgeneticsoncology.org*]. Do skutecznego wiązania DNA, białko MYC potrzebuje dimeryzacji z innym białkiem bHLH oraz wiąże DNA jako heterodimer z MAX. Białka z rodziny genów *MYC* stymulują oraz aktywują ekspresję innych genów proliferacyjnych poprzez wiązanie sekwencji DNA wzmacniające wiązania (E-boxes) działającego jako miejsce wiązania białka i regulują transkrypcję genów docelowych oraz aktywację acetylotransferaz histonowych (HAT) [c-MYC *genecards.org*; *atlasgeneticsoncology.org*]. Regulują również wzrost, samoodnawianie się i różnicowanie komórek macierzystych oraz wpływają na ich apoptozę [Fagnocchi i wsp., 2017; Iavarone i wsp., 2014; McMahon i wsp., 2014]. Białko MYC może działać także jako represor transkrypcji oraz odgrywa bezpośrednią rolę w kontroli replikacji DNA [Dominguez-Sola i wsp., 2014].



Rycina 13. Rycina przedstawia model białka c-MYC.
[c-MYC *genecards.org*]

Głównym efektem działania genu *c-Myc* jest proliferacja limfocytów B, a wzrost aktywności białka MYC związany jest z nowotworami złośliwymi limfocytów B i ich zwiększoną agresywnością [Habib i wsp., 2007; Nguyen i wsp., 2017; Snow, 1997; Li i wsp., 2003]. Aktywność białka MYC jest aktywowana na podstawie różnych sygnałów mitogennych. Ufosforylowanie białka MYC na drodze modyfikacji translacyjnych

sprawia, że jest ono bardziej stabilne [*atlasgeneticsoncology.org*; *MYC genecards.org* *Smith-Sørensen i wsp., 1996*]. Amplifikację genu *c-MYC* często obserwuje się w nowotworach. W piśmiennictwie można znaleźć badania oceniające poziom ekspresji genu *c-Myc* w raku szyjki macicy, okrężnicy, piersi, macicy, płuca, jelita grubego, raku żołądka czy raku nabłonkowym jajnika [*Abba i wsp., 2004*; *Barr i wsp., 2000*; *Green i wsp., 2016*; *Iba i wsp., 2004*; *Jung i wsp., 2018*; *Lee i wsp., 2016*; *Smith i wsp., 1993*; *Sovani i wsp., 1989*; *Zhang i wsp., 2018*; *Zhang i wsp., 2010*; *Zhang i wsp., 2018*]. Udowodniono także, że powszechna ludzka translokacja obejmująca gen *c-Myc* ma kluczowe znaczenie dla rozwoju większości przypadków chłoniaka Burkitta (translokacja t(8;14)), szpiczaka mnogiego czy chłoniaka B-komórkowego o wysokim stopniu złośliwości. Dochodzi tutaj do nadekspresji genu *c-MYC* [*Ericson i wsp., 1983*; *Nguyen i wsp., 2017*; *Ott i wsp., 2013*; *Taub i wsp., 1982*].

8.1 Znaczenie genu *c-MYC* oraz białka *c-MYC* w regulacji hematopoezy oraz rozwoju ostrej białaczki szpikowej

Dane z piśmiennictwa opisują rolę genu *c-MYC* oraz jego mutacji, amplifikacji czy ekspresji w rozwoju nowotworów. Udowodniono, że gen *c-Myc* jest często aktywowany w ostrej białaczce szpikowej (AML) i odgrywa ważną rolę w indukcji leukemogenezy [*Delgado i wsp., 2010*; *Hoffman i wsp., 2002*; *Renneville i wsp., 2008*; *Salvatori i wsp., 2011*]. Stwierdzono również, że zwiększona ekspresja lub nieprawidłowa aktywacja *c-Myc* indukuje rozwój komórek białaczkowych. Zwiększona aktywność genu *c-MYC* jest obserwowana u pacjentów z ostrą białaczką szpikową, u których wykryto mutację w genie *FLT3*. Ekspresja genu *c-MYC* jest zwiększona również u pacjentów, u których wykazano obecność białek fuzyjnych AML1-ETO czy PML / RAR α [*Gilliland i wsp., 2002*; *Muellar-Tidow i wsp., 2004*; *Salvatori i wsp., 2011*]. Wykazano również, że ekspresja genu *c-Myc* jest podwyższona w białaczkach szpikowych, w których mamy do czynienia z mutacjami w genie *CEBP α 7*. Ponadto *c-Myc* jest stabilizowany w AML za pomocą mutacji prowadzących do nieprawidłowej cytoplazmatycznej lokalizacji nukleofosminy (NPM), najczęstszej zmiany genetycznej w AML bez aberracji kariotypowych [*Renneville i wsp., 2008*; *Salvatori i wsp., 2011*].

Gen *c-MYC*, zlokalizowany w chromosomie 8 w locus q24, jest jednym z najczęściej amplifikowanych regionów u chorych z ostrą białaczką szpikową [*Salvatori i wsp., 2011*; *Slovak i wsp., 1994*]. Podwyższona ekspresja genu *c-MYC* u pacjentów

z AML jest związana z dłuższym całkowitym czasem do uzyskania remisji oraz wpływała negatywnie na czas przeżycia pacjenta [Ohanian i wsp., 2019]. Istotna wydaje się również rola wysokiej ekspresji genu *c-MYC* w odpowiedzi na zastosowane leczenie u pacjentów z AML. Wysoka ekspresja *c-Myc* warunkowała zwiększoną oporność komórek białaczkowych [Pan i wsp., 2014].

Analizę polimorfizmów genu *c-Myc* przeprowadzono między innymi w raku prostaty, pęcherza moczowego, raku wątrobowokomórkowym, czy raku piersi [Figueiredo i wsp., 2007; Gao i wsp., 2015; Zhao i wsp., 2018]. Przebadano również polimorfizmy tego genu w chłoniaku Burkitta [Habib i wsp., 2007; Nguyen i wsp., 2017; Snow, 1997; Li i wsp., 2003]. Niewiele jest dostępnych badań opisujących rolę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów genu *c-MYC* w ostrych białaczkach szpikowych. Większość artykułów opisuje rolę translokacji oraz fuzji genu *c-MYC* w chłoniakach ludzkich komórek B oraz chorobach limfoidalnych [Eklund i wsp., 2010; L Abbate i wsp., 2018; Poddighe i wsp., 2014; Sewastianik i wsp., 2014].

Rozdział II

9. Cel pracy

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena polimorfizmów, poziomu ekspresji oraz obecności produktów białkowych genów kodujących czynniki transkrypcyjne potencjalnie zaangażowanych w leukemogenezę oraz w patogenezę i rozwój ostrej białaczki szpikowej. Analizę przeprowadzono na trzech poziomach molekularnych włączając w to DNA, RNA oraz białko. Dodatkowym ocenianym parametrem była również obecność genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej były następujące:

- ❖ Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1*
- ❖ Ocena polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3* wraz z analizą jego produktu białkowego
- ❖ Określenie względnego poziomu ekspresji genu *CEBPA* oraz ocena obecności jego produktu białkowego
- ❖ Ocena względnego poziomu ekspresji genu *c-MYC*
- ❖ Analiza obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1*

Poszukiwano również związku pomiędzy uzyskanymi wynikami, a danymi demograficznymi pacjentów takimi jak: płeć, wiek w momencie rozpoznania choroby oraz kliniczno-patologicznymi takimi jak: typ ostrej białaczki szpikowej według klasyfikacji FAB czy mniej niż trzyletnie przeżycie pacjentów wyrażone poprzez wystąpienie zgonu pacjenta do czasu końca trwania obserwacji, który wynosił 3 lata.

10. Materiały i metody

10.1 Materiał badany

Materiałem do badań były próby krwi obwodowej pobrane od pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową, pobranych podczas kontrolnych badań laboratoryjnych. Próby krwi pochodziły z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Próby krwi stanowiły materiał reszkowy pozostały po przeprowadzeniu badań laboratoryjnych.

Grupę kontrolną stanowiły próby krwi obwodowej pobrane od osób bez choroby nowotworowej. Próby krwi pochodziły z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi i zostały pobrane od dobrowolnych dawców krwi.

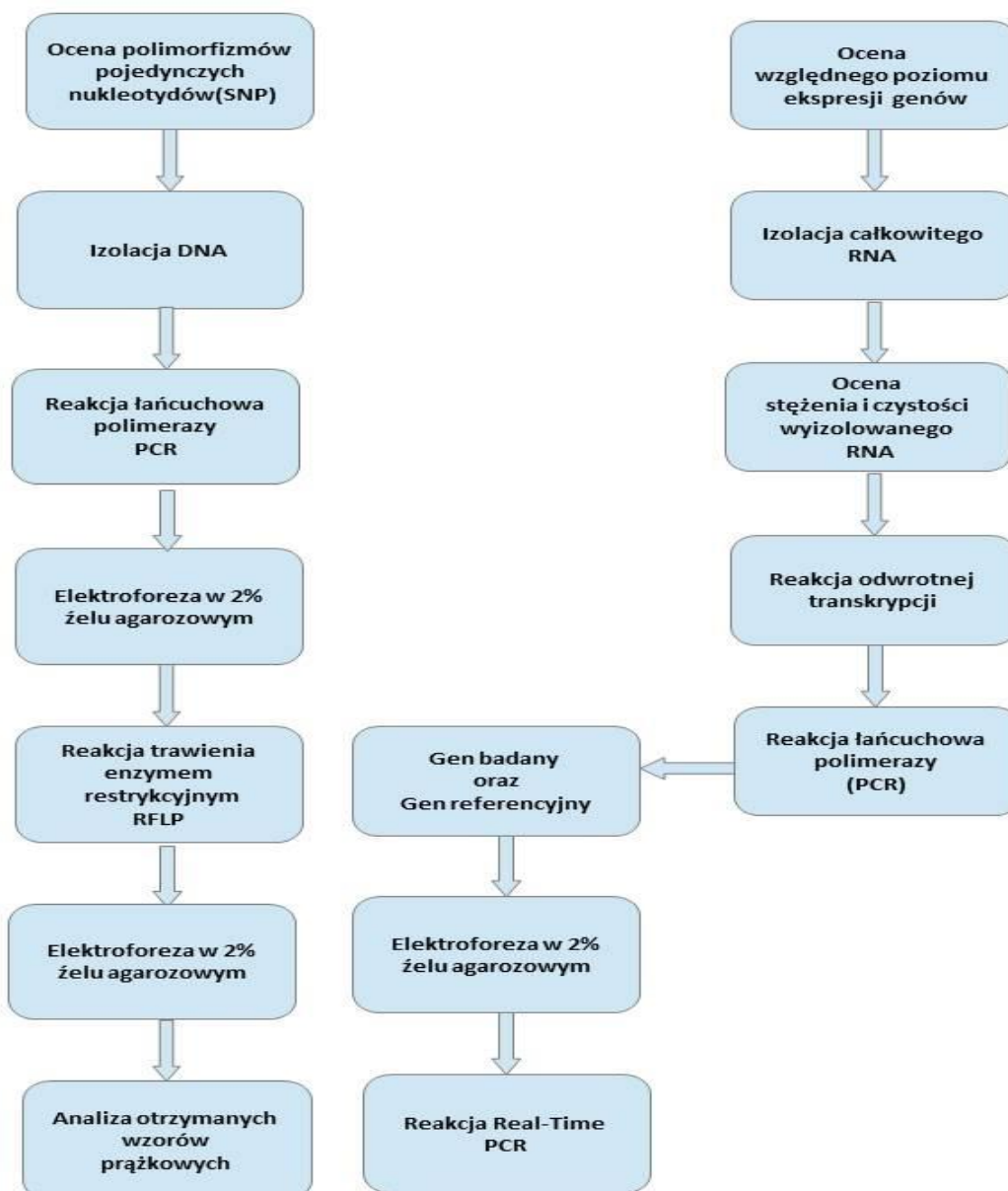
Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi o numerze RNN/88/16/KE. Wszyscy pacjenci biorący udział w badaniu podpisali świadomą i dobrowolną zgodę na udział w nim. Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej. Dane zbierano anonimowo.

Próby krwi stanowiły punkt wyjścia do dalszych analiz. W celu oceny polimorfizmów pojedynczych nukleotydów dla genów *RUNX1* oraz *RUNX3* wyizolowano DNA natomiast w celu oceny względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA*, *c-MYC* oraz obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* z uzyskanych prób krwi wyizolowano RNA. Kwas rybonukleinowy RNA jest związkami nietrwałym oraz podatnym na działanie endo- i egzogennych RNaz (enzymów rozkładających RNA) dlatego w pierwszej kolejności z uzyskanych prób krwi obwodowej pobranej od pacjentów z ostrą białaczką szpikową przeprowadzono izolację RNA, a następnie izolację DNA. Ze względu na fakt iż zebrane od pacjentów próby stanowiły materiał reszkowy pozostały po standardowych badaniach laboratoryjnych izolację DNA udało się przeprowadzić jedynie w 40 z 46 prób krwi, stanowiących grupę badaną.

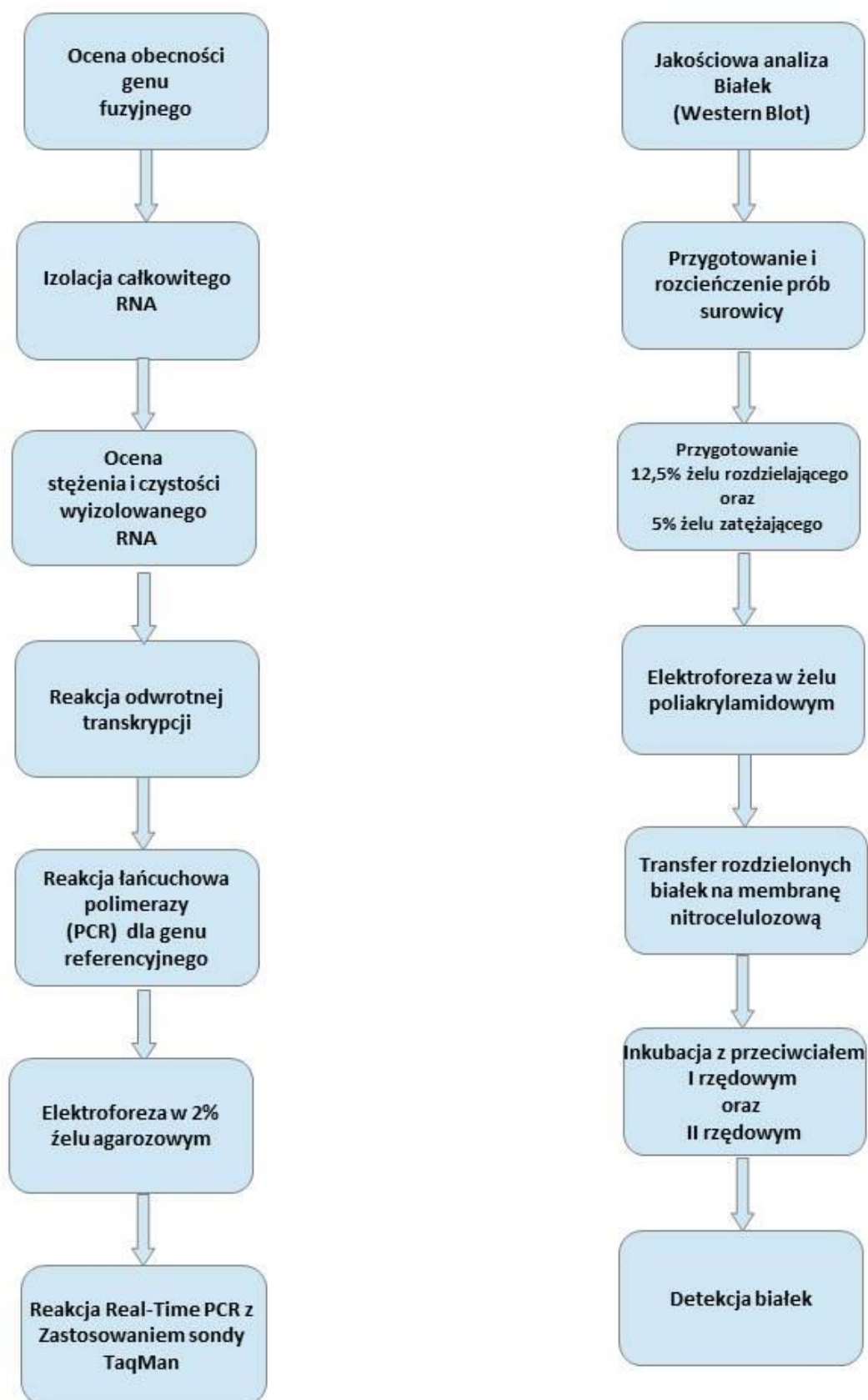
W celu oceny produktów białkowych genów *RUNX3* i *CEBPA* materiał badany stanowiło 18 prób surowicy uzyskanej po odwirowaniu pobranych od pacjentów prób krwi.

10.2 Metody

Podczas wykonywania badań do niniejszej rozprawy doktorskiej posługiwano się metodami biologii molekularnej, które zostały przedstawione na poniższych schematach (Rycina 14 i Rycina 15).



Rycina 14. Rycina przedstawia techniki biologii molekularnej zastosowane przy analizie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz ocenie poziomu ekspresji wybranych genów.



Rycina 15. Rycina przedstawia techniki biologii molekularnej zastosowane przy ocenie obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* oraz analizie obecności produktów białkowych wybranych czynników transkrypcyjnych.

10.2.1 Izolacja DNA

Pierwszym etapem analizy była ocena polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) badanych genów. W tym celu przeprowadzono izolację DNA z prób krwi pobranych od pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Izolację DNA przeprowadzono korzystając z zestawu Blood Mini (*A&A Biotechnology, DNA Gdańsk*) umożliwiającego izolację genomowego DNA z krwi świeżej lub mrożonej z zastosowaniem minikolumn (wykorzystano zjawisko adsorpcji kwasów nukleinowych na ziarnach krzemionki) oraz proteiny K. Postępowano zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta.

W pierwszym etapie izolacji DNA przeniesiono około 200-300 µl krwi pobranej od pacjentów do czystych i jałowych probówek typu Ependorf. Do probówek z krwią dodano 200 µl roztworu lizującego LT oraz 20 µl Proteiny K w celu całkowitej lizy komórek oraz inaktywacji białek. Zawartość probówek intensywnie wymieszano, a następnie inkubowano przez okres 20 minut w temperaturze 37 °C. Następnie próbki zwirowano przez 20 sekund oraz ich zawartość naniesiono na minikolumny do izolacji DNA. W tym samym czasie przestawiono temperaturę termobloku na 75°C oraz inkubowano w nim probówki z roztworem elucyjnym, który był wykorzystywany w końcowym etapie izolacji DNA. Próbkę krwi następnie wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM. Po odwirowaniu wyjęto minikolumny z probówek, przesącz wylano oraz ponownie umieszczono minikolumny w tych samych probówkach. Na minikolumny naniesiono po 500 µl roztworu płuczącego A1 oraz próbki wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM. Następnie minikolumny przeniesiono do nowych probówek o pojemności 2 ml (znajdowały się one w zestawie) oraz dodano 400 µl roztworu płuczącego A1. Próbkę wirowano przez 2 minuty przy 12 000 RPM. W kolejnym etapie izolacji osuszone minikolumny przeniesiono do nowych probówek o objętości 1,5 ml oraz naniesiono po 100 µl buforu elucyjnego Tris uprzednio podgrzanego do 75°C. Próbkę inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej oraz wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM. Minikolumnę usunięto, a wyizolowane DNA przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C w celu dalszych analiz.

10.2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR (do oceny polimorfizmów pojedynczych nukleotydów)

Kolejnym etapem analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów badanych genów było przeprowadzenie reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR).

Reakcja PCR umożliwia amplifikację określonego fragmentu RNA, DNA czy cDNA w milionach kopii w ciągu zaledwie kilku godzin. Dzięki tej reakcji można uzyskać nawet od 10^6 do 10^9 kopii wyjściowego fragmentu DNA. Na PCR składają się trzy etapy powtarzane w 30-40 cyklach. Wyróżniamy etap denaturacji (rozerwanie wiązań wodorowych pomiędzy obiema niciami matrycowego DNA), annealing (przyłączanie odpowiednich starterów w komplementarnych miejscach do jednoniciowych fragmentów DNA) oraz elongacji (wydłużanie starterów od końca 3'). Dodatkowo do prawidłowego zajścia reakcji PCR potrzebne są enzym- termostabilna polimeraza DNA oraz odpowiednie sekwencje starterów. Startery są komplementarne do jednego z końców sekwencji DNA wybranych genów. Wyróżniamy starter przedni (F – ang. *forward*) i wsteczny (R – ang. *reverse*) [Allison, 2009; Brown, 2018; Bal, 2013; Winter, 2000].

Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystano zestaw odczynikowy AccuTaq™LA DNA Polymerase firmy Sigma-Aldrich. Zestaw zawierał:

- ❖ Bufor PCR (10x stężony) o pH 8,3 (1,5 mM)
- ❖ Chlorek magnezu (V=1,5 ML; 25mM MgCl₂)
- ❖ dNTP (deoksynukleotydy) (0,2 mM)
- ❖ Enzym- JumpStart® AccuTaq™ LA DNA Polymerase (0,5U)

Do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy niezbędne były również startery: Primer forward i reverse (10 μM, firma Sigma-Aldrich), które umożliwiły namnożenie tylko tych fragmentów danego genu, który zawierał odpowiednie miejsca polimorficzne: rs2268277, G>C (dla genu *RUNX1*) oraz rs6672420, A>T (dla genu *RUNX3*). Startery zostały zaprojektowane za pomocą programów bioinformatycznych Primer-BLAST oraz Primer3. Sekwencje starterów zostały przedstawione w Tabeli 6.

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

Tabela 6. Tabela przedstawia sekwencje starterów do oceny polimorfizmów SNP badanych genów.

W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z odczynników przedstawionych w Tabeli 7.

Odczynnik	Objętość na 1 próbę
Bufor (10x stężony) o pH 8,3 (1,5 mM)	3,5 µl
Chlorek magnezu (V=1,5 ML; 25mM MgCl ₂)	0,7 µl
Primer Forward (10uM)	0,7 µl
Primer Reverse (10uM)	0,7 µl
dNTP (0,2 mM)	0,4 µl
Enzym (0,5U)	0,2 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	12,3 µl
Łączna objętość	18,5 µl

Tabela 7. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji PCR przy ocenie polimorfizmów badanych genów.

Całość wymieszano oraz rozpipetowano w ilości 18,5 μ l do jałowych probówek (0,2 ml). Następnie do każdej z probówek dodano po 1,5 μ l DNA. Jedna próbówka stanowiła tzw. kontrolę ujemną gdzie zamiast DNA dodano 1,5 μ l czystej jałowej wody destylowanej. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 20 μ l. Następnie każdą z próbek wymieszano oraz zwirowano i umieszczono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad) oraz uruchomiono program o następującym profilu temperaturowym (Tabela 8).

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

Tabela 8. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji PCR użyty do oceny SNP wybranych genów.

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

10.2.3 Elektroforeza w 2% żelu agarozowym

W celu wizualizacji otrzymanych produktów amplifikacji genów *RUNX1* i *RUNX3*, fragmentów genów zawierających miejsce polimorficzne oraz produktów powstających po trawieniu enzymem restrykcyjnym wykonano rozdział elektroforetyczny.

Elektroforeza w żelu agarozowym jest techniką która umożliwia identyfikację oraz rozdział fragmentów kwasów deoksyrybonukleinowych różniących się długością (ilością par zasad). Metoda ta może być również wykorzystywana do rozdziału RNA lub innych cząsteczek posiadających ładunek. Rozdział elektroforetyczny polega na przemieszczaniu się naładowanych cząsteczek kwasów nukleinowych pod wpływem

pola elektrycznego. Do elektrody dodatniej wędrują ujemnie naładowane cząstki, natomiast dodatnio naładowane cząstki migrują w kierunku elektrody ujemnej. Elektroforeza prowadzona jest na żelach tworzących sieć porów dzięki czemu podstawowe znaczenie dla tempa migracji ma długość cząsteczek kwasów nukleinowych. Fragmenty DNA migrują w kierunku elektrody dodatniej ze względu na obecność w ich strukturze ujemnie naładowanych reszt kwasu fosforanowego. Wynik elektroforezy stanowią prążki złożone z cząsteczek DNA o równej długości położone w różnych miejscach żelu. Ich dokładna identyfikację umożliwia wzorzec masy molekularnej zawierające prążki o znanej ilości par zasad [Allison, 2009; Bal, 2013; Brown, 2018; Słomski, 2011].

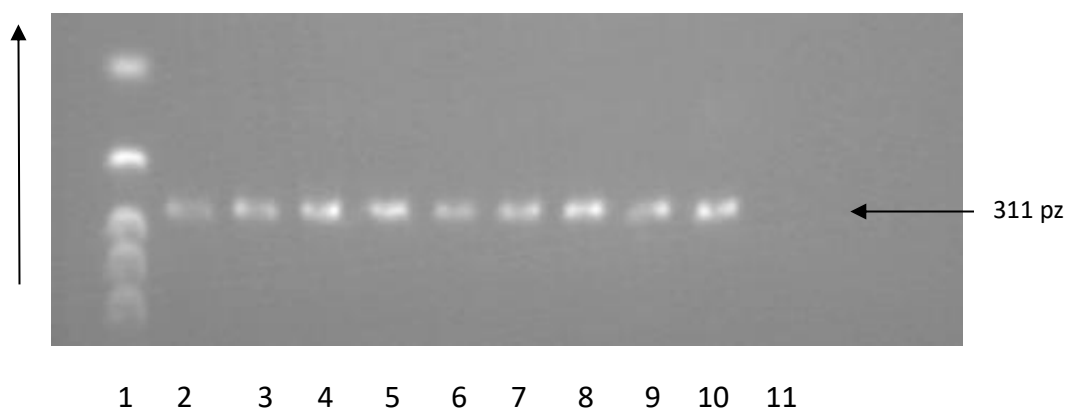
W przypadku identyfikacji produktów reakcji PCR powstałych po amplifikacji fragmentów genów zawierających miejsca polimorficzne elektroforezę przeprowadzono na 2% żelu agarozowym. Do przygotowania 2% żelu agarozowego użyto 0,7 g agarozy (*Maksimus*) oraz 35 ml buforu TBE- Tris-Boran-EDTA (0,5x). Bufor 0,5x powstał z rozcieńczenia roztworu podstawowego 10x TBE. Bufor ten zawierał 108 g Tris o pH 8.3, 55 g kwasu borowego, 9,3 g EDTA oraz wodę destylowaną. Całkowita objętość roztworu podstawowego wynosiła 1 l.

Do stożkowej kolby, która zawierała odważoną ilość agarozy, dodano 35 ml buforu oraz ogrzano w celu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Po schłodzeniu klarownej zawiesiny do temperatury pokojowej dodano 2 µl bromku etydy, który interkaluje w cząsteczki DNA i pozwala na uwidocznienie fragmentów kwasów nukleinowych. Mieszaninę wylano na tzw. sanki wcześniej przygotowanego aparatu do elektroforezy oraz umieszczono grzebień umożliwiający utworzenie studzienek. Żel pozostawiono do zastygnięcia oraz zalano buforem TBE (0,5x).

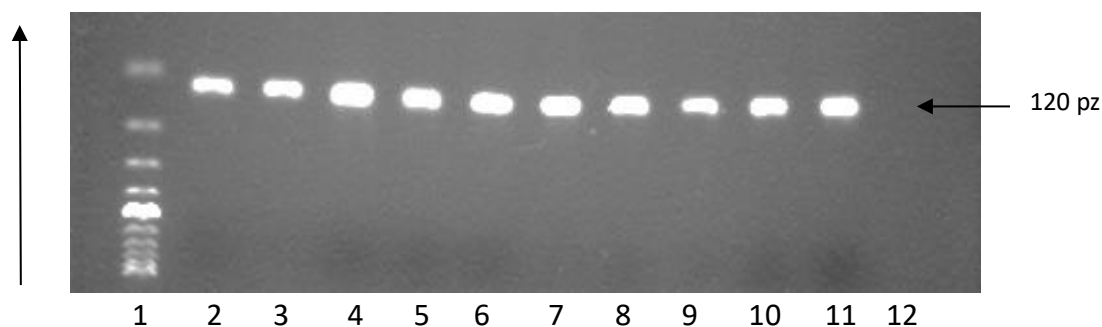
W utworzonych studzienkach umieszczono kolejno: 2 µl wzorca masy molekularnej Marker DNA M100-500 (DNA Gdańsk), 4 µl odpowiednich prób badanych wymieszanych z 1 µl roztworu obciążającego (zawierającego błękit bromofenolowy, glicerol i wodę) oraz 4 µl kontroli negatywnej (również zmieszanej z roztworem obciążającym). Roztwór obciążający zapobiegał samoistnemu dyfundowaniu prób ze studzienek. Elektroforezę przeprowadzono w aparacie firmy Sigma-Aldrich najpierw przez 5 minut przy napięciu prądu wynoszącym 110 V, i dalej przez 12 minut przy napięciu 130 V. Korzystano z zasilacza PowerPacTM Universal firmy Bio-Rad. Po

zakończonych reakcji elektroforezy otrzymane wzory prążkowe uwidoczniono za pomocą aparatu firmy Mini Bis Pro UV firmy DNR Bio-Imaging System. Uzyskany obraz elektroforetyczny zarejestrowano za pomocą oprogramowania komputerowego GelCapture firmy DNR Bio-Imaging System. Potwierdzenie obecności produktu PCR potwierdzono oceniając jego wielkość względem wzoru prążkowego uzyskanego dla wzorca masy molekularnej.

W przypadku wizualizacji produktów amplifikacji miejsc polimorficznych genów *RUNX1* oraz *RUNX3* uzyskanych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi elektroforezę przeprowadzono w na 2,5% żelu agarozowym. W tym celu użyto 0,875g agarozy i rozpuszczono ją w 35 ml buforu 0,5x TBE. Próbkę w objętości 8 μ l mieszało z 1 μ l obciążnika i nanoszono na studzienki. Do każdej serii rozdzielu dodano również wzorzec masy molekularnej DNA Marker pUC/Msp I (A&A Biotechnology) lub DNA Marker 1 (A&A Biotechnology). Elektroforezę przeprowadzano przez 5 minut przy napięciu 110V oraz 20 minut przy napięciu 130V. Uzyskane wzory prążkowe również zarejestrowano za pomocą oprogramowania GelCapture (DNR Bio-Imaging System). Przykładowe rozdzielu elektroforetyczne reakcji amplifikacji fragmentów genów *RUNX1* oraz *RUNX3* zawierające miejsca polimorficzne przedstawia Rycina 16 oraz 17.



Rycina 16. Przykładowy rozdziel elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*. Studzienka nr 1- wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki 2,-10 próby badane, studzienka 11- kontrola negatywna.



Rycina 17. Przykładowy rozdział elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*.

Studzienka nr 1- wzorec masy molekularnej 100-1000 pz; studzienki 2,-11 próby badane, studzienka 12-kontrola negatywna.

10.2.4 Reakcja trawienia enzymem restrykcyjnym

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism*, RFLP) jest metodą oceny występowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów. Technika RFLP stosowana jest się razem z reakcją PCR (PCR-RFLP) i polega na trawieniu enzymem restrykcyjnym produktu po reakcji PCR zawierającego zamplifikowane fragmenty miejsc polimorficznych danego genu. Niezbędne jest zastosowanie starterów które flankują miejsca polimorficzne [Allison, 2009; Bal, 2013; Brown, 2018; Słomski, 2011].

Enzymy restrykcyjne należą do tzw. endonukleaz, które wiążą się z cząsteczką DNA ponieważ rozpoznają specyficzną sekwencję miejsca polimorficznego oraz wykonują cięcia (hydrolizują nici) poprzez zerwanie wiązań fosfodiesterowych. Prowadzi to do powstania zdefiniowanych oraz powtarzalnych fragmentów DNA różniących się długościami. Jeśli w DNA wystąpi mutacja czy polimorfizm w wyniku których powstaje lub zanika miejsce restrykcyjne (tzw. miejsce cięcia), w mieszaninie poreakcyjnej występują fragmenty o innej długości dla DNA zmutowanego i DNA niezmutowanego. Powstające fragmenty kwasów nukleinowych można analizować przeprowadzając np. rozdział elektroforetyczny uzyskując charakterystyczny wzór prążkowy, który po analizie umożliwia ocenę genotypu. Enzymy restrykcyjne występują naturalnie wśród wielu bakterii [Bal, 2013; Brown, 2018; Słomski, 2011].

Trawienie uzyskanego produktu PCR została przeprowadzona w celu oceny genotypów pacjentów dla SNP genów *RUNX1* (rs2268277, G>C) oraz *RUNX3* (rs6672420, A>T). W celu przeprowadzenia tych reakcji wykorzystano następujące

zestawy odczynnikowe:

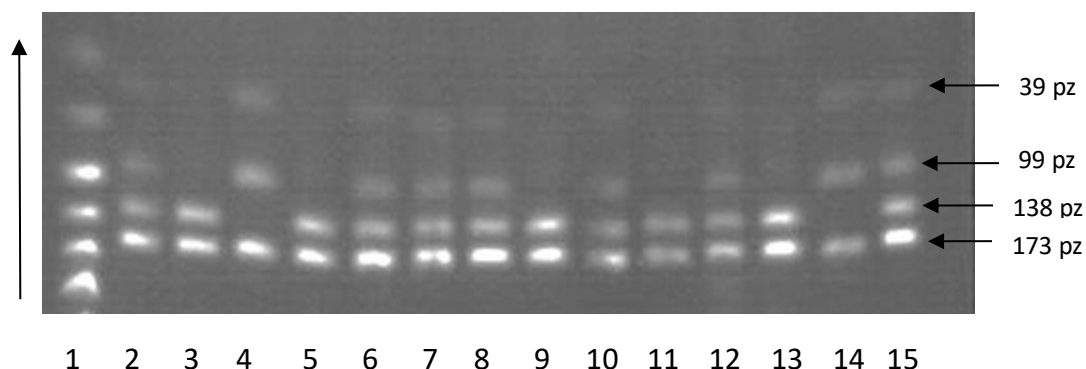
- ❖ SNP genu *RUNX1*- enzym *MvaI* (*BstNI*) (10 U/ μ L) wraz z buforem 10x Buffer R (*ThermoFisher Scientific*TM)
- ❖ SNP genu *RUNX3*- enzym *BseGI* (*BtsCI*) (10 U/ μ L) wraz z buforem 10x Buffer Tango (*ThermoFisher Scientific*TM)

Postępowano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (*ThermoFisher Scientific*TM). W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z odpowiedniej ilości buforu enzymu oraz jałowej wody (Tabela 9). Otrzymaną mieszaninę wymieszano, odwirowano oraz rozpipetowano w ilości 4 μ l do próbek zawierających 16 μ l produktu reakcji PCR (dla danego genu *RUNX1* lub *RUNX3*). Próbki wymieszano, zworteksovano oraz umieszczono w aparacie *MJ Mini Personal Thermal Cycler* firmy *Bio-Rad*, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C (SNP genu *RUNX1*) oraz 55°C (SNP genu *RUNX3*) przez 16 godzin.

Odczynnik	Objętość na 1 próbę	SNP
10x Bufor R	2,0 μ l	<i>RUNX1</i> rs2268277 oraz <i>RUNX3</i> rs6672420
Enzym (10 U/ μ L)	0,3 μ l	
Woda jałowa	1,7 μ l	
Łączna objętość	4 μ l	

Tabela 9. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji RFLP.

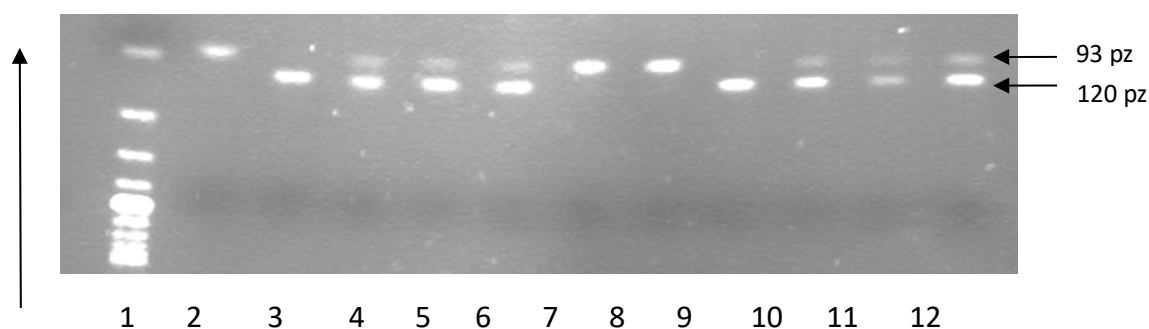
Dla genu *RUNX1* badanym polimorfizmem był polimorfizm w pozycji 34809752 (rs2268277) gdzie w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* uzyskano następujące warianty genotypów: homozygota dzika GG (zawierająca fragmenty o długościach 173 oraz 138 pz), heterozygota GC (zawierająca fragmenty o następujących długościach: 173, 138, 99 oraz 39 pz) oraz homozygota zmutowana CC (zawierająca fragmenty o następujących długościach 173, 99 oraz 39 pz). Przykładowy wynik genotypowania rs2268277 genu *RUNX1* przedstawia Rycina 18.



Rycina 18. Przykładowy rozdział elektroforezy produktów po trawieniu enzymem restrykcyjnym dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*.

Studzienka nr 1- wzorec masy molekularnej 34-501 pz (Mer pUC/Msp I); studzienki 2,6,7,8,10,12,15- próby badane, heterozygoty GC, studzienki 3,5,9,11,13 - homozygoty dzikie GG, a studzienki 4,14- homozygoty zmutowane CC.

Dla genu *RUNX3* wybranym polimorfizmem był polimorfizm w pozycji 24964519 (rs6672420). Trawienie enzymem restrykcyjnym dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* pozwala uzyskać następujące warianty genotypów: homozygota dzika AA (zawierająca fragmenty o długościach 27 oraz 93 pz), heterozygota AT (zawierająca fragmenty o następujących długościach: 27, 193 i 120 pz) oraz homozygota zmutowana TT (zawierająca fragment o długości 120 pz). Przykładowy wynik genotypowania rs6672420 genu *RUNX3* przedstawia Rycina 19.



Rycina 19. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*. Studzienka nr 1-wzorec masy molekularnej DNA Marker 1 100 – 1000 pz; studzienki: 4,5,6,10,11,12- próby badane, heterozygoty AT, studzienki 2,7,8- homozygoty dzikie AA oraz studzienki 3,9- homozygoty zmutowane TT.

Prążek o dł. 27 pz ma zbyt małą masę cząsteczkową i nie jest widoczny na żelu.

10.2.5 Izolacja całkowitego RNA

Pierwszym etapem oceny ekspresji badanych genów była izolacja całkowitego RNA z prób krwi pobranych od pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Izolację RNA przeprowadzono za pomocą zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology, DNA Gdańsk). Zastosowana metoda izolacji RNA jest oparta na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego bazującej na ekstrakcji fenolowo-chloroformowej z użyciem soli chaotropowych.

Izolacja kwasu rybinukleinowego RNA składa się z następujących etapów:

- ❖ liza komórek
- ❖ homogenizacja próbki
- ❖ ekstrakcja fenolowo-chloroformowa
- ❖ precypitacja [Słomski, 2011].

W pierwszym etapie izolacji RNA przeniesiono około 200-300 µl krwi pobranej od pacjentów do czystych i jałowych probówek typu Ependorf. Do probówek z krwią dodano 800 µl fenozolu aby nastąpiła całkowita liza komórek oraz inaktywacja endogennych RNAz. Zawartość probówek intensywnie wymieszano, a następnie inkubowano przez okres 5 minut w 50 °C. Kolejnym etapem było dodanie 200 µl chloroformu i delikatne wymieszanie (poprzez kilkukrotne odwracanie probówek) oraz inkubacja przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Próbkę następnie wirowano przez 10 minut przy 12 000 RPM (ang. *Revolution Per Minute*; obroty na minutę). Po odwirowaniu uzyskano trzy frakcje- górną zawierającą RNA, środkową zawierającą DNA oraz białka oraz fazę dolną, która zawierała elementy morfotyczne rozpadłych komórek. Górną frakcję supernatantu odpipetowano do nowych 1,5 ml probówek typu Ependorf oraz dodawano 250 µl izopropanolu w celu wytrącenia RNA z wodnej fazy oraz związania ze złożem krzemionkowym na minikolumnie. Całość dokładnie mieszano oraz przeniesiono na specjalne minikolumny do izolacji RNA zawierające złożo krzemionkowe i wirowano 1 minutę przy 12 000 RPM. W kolejnym etapie izolacji kolumny przenoszono do nowych probówek o objętości 2 ml oraz dodawano 700 µl roztworu płuczącego A1. Próbkę wirowano przy 12 000 RPM przez 1 minutę. Przesącz wylewano oraz ponownie płukano minikolumnę stosując taką samą objętość roztworu płuczącego A1. Kolejnym etapem izolacji było dodanie do minikolumny 200 µl roztworu

płuczającego A1 i wirowanie przez 2 minuty przy obrotach 12000 RPM w celu dokładnego oczyszczenia materiału genetycznego. Ostatnim etapem była precypitacja wyizolowanego RNA. W tym celu umieszczono minikolumnę w nowych 1,5 ml probówkach i dodano na dno kolumny 100 µl jałowej wody wolnej do RN-az. Próbkę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM. Ostatnim etapem izolacji było usunięcie mini kolumny, a wyizolowane RNA niezbędne do przeprowadzania dalszych analiz mrożono oraz przechowywano w temperaturze -76 °C.

10.2.6 Ocena stężenia i czystości wyizolowanego RNA

Izolacja RNA jest jednym z kluczowych etapów oceny względnego poziomu ekspresji genów. Ze względu na to iż kwas rybonukleinowy jest materiałem nietrwałym i mało stabilnym wyekstrahowane RNA powinno cechować się wysokim stężeniem i dużym stopniem czystości (czyli stosunkiem absorpcji przy długości fali 260 nm i 280 nm na poziomie 1,8-2,0). Przed przystąpieniem do dalszych analiz przeprowadzono ocenę stężenia i czystości wyizolowanego RNA [Słomski, 2011; Brown, 2018].

Spektrofotometryczne oznaczenie stężenia wyizolowanego RNA polega na pomiarze absorpcji światła monochromatycznego w zakresie światła UV. Maksimum absorbancji dla RNA wynosi 260 nm, dla białek 280 nm a dla drobin komórkowych 320 nm. Po włączeniu spektrofotometr dokonuje autokalibracji. Absorbancję dla badanych próbek RNA odczytywano przy długości fali 260 nm (maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych) [Słomski, 2011; Brown, 2018].

Aby określić stężenie oraz czystość wyizolowanego RNA zastosowano metodę spektrofotometryczną oraz użyto aparatu NanoPhotometer UV/VIS (Implen, Germany). Na pole pomiarowe naniesiono kolejno po 1 µl wyizolowanych próbek RNA oraz zmierzono ich absorbancję przy dł. fali 260 nm. Aparat zerowano na 1µl wody destylowanej.

Stężenie RNA obliczane jest ze wzoru: $C(\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \times 40 \times \text{rozcieńczenie}$. Gdzie:

- A_{260} , A_{320} – absorbancja przy długości fali 260 i 320 nm
- 40 – stężenie RNA przy którym absorbancja przy długości fali 260 jest równa 1
- R – rozcieńczenie roztworu [Słomski, 2011; Brown, 2018].

Aby ocenić czystość oraz jakość uzyskanego RNA oszacowano stosunek absorbancji przy długości fali 260nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Dla czystego i niezanieczyszczonego białkami RNA wartość stosunku absorbancji wynosi ok. 2,0. Uzyskane próbki uznano za czyste ponieważ stosunek A_{260}/A_{280} w każdej próbce wynosił >1,8 [Słomski, 2011; Brown, 2018]. Ostatecznie przy ocenie względnego poziomu ekspresji wybranych genów stężenie dla każdej z prób ujednolicono i wynosiło ono 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

10.2.7 Reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR

Reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR (ang. *reverse transcription PCR*, RT-PCR) polega na przepisaniu informacji genetycznej z jednoniciowego RNA na komplementarną dwuniciową cząsteczkę cDNA (ang. *complementary DNA*, cDNA) wykorzystywaną do ilościowej oceny ekspresji genów. Proces ten umożliwia enzym-odwrotna transkryptaza, która syntetyzuje komplementarną nić DNA w kierunku 5' → 3'. Matrycą dla tego procesu jest cząsteczką RNA. RT- pozwala na powielanie tylko sekwencji zawartej w mRNA, a więc sekwencji kodujących czyli egzonów [Allison, 2009; Bachman, 2013].

W celu przepisania informacji z RNA na cDNA wykorzystano zestaw High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Litwa). Zestaw ten zawiera:

- enzym- Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/ μl ; V= 100 μl)
- Bufor RT (10x stężony; V= 1ml)
- mix dNTP (100 mM; V=200 μl)

Dodatkowo do przeprowadzenia reakcji użyto Inhibitora RN-az (Sigma-Aldrich)- 10x rozcieńczonego oraz startery oligo(dT) (3401 μg ; 62,8 nmol, Sigma Aldrich), komplementarne do ogona poliA w obrębie końca 3' wszystkich cząsteczek mRNA. Postępowano zgodnie z załączonym protokołem reakcji RT-PCR.

W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z odczynników umieszczonych w Tabeli 10. Całość wymieszano oraz rozpipetowano w ilości 6,8 μl do jałowych probówek (0,2 ml). Następnie do każdego z probówek dodano odpowiednio wyliczoną objętość RNA tak aby uzyskać dla każdej próbki jednakowe stężenie RNA (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). W kolejnym etapie uzupełniono probówki

wyliczoną objętością wody destylowanej do końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej wynoszącej 20 μ l. Każdą z próbek wymieszano oraz zwirowano i umieszczono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad) oraz uruchomiono odpowiedni program (Tabela 11).

Odczynniki użyte do reakcji odwrotnej transkrypcji	Objętość
Bufor RT (10x stężony; V= 1ml)	2,0 μ l
Oligo dT (3401 μ g; 62,8 nmol)	2,0 μ l
dNTP mix (100 mM; V=200 μ l)	0,8 μ l
Inhibitor RNAz (10x rozcieńczony)	1,0 μ l
Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/ μ l; V= 100 μ l)	1,0 μ l
Łączna objętość	6,8 μ l

Tabela 10. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji.

Etapy reakcji odwrotnej transkrypcji	Temperatura	Czas
Wstępna inkubacja	25°C	10 minut
Działanie enzymu odwrotnej transkryptazy	37°C	2 godziny
Denaturacja produktów niespecyficznych, zablokowanie działania enzymu	85°C	5 minut
Po zakończeniu syntezy	4°C	∞

Tabela 11. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji odwrotnej transkrypcji.

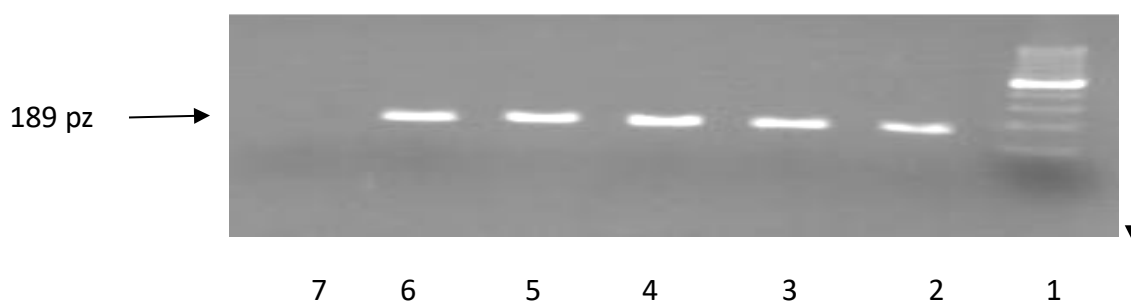
Po zakończonej reakcji odwrotnej transkrypcji próbki cDNA przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C.

10.2.8 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

W przypadku oceny względnego poziomu ekspresji genów reakcję PCR należy przeprowadzić zarówno dla genu referencyjnego jak i genu badanego. Matrycą dla obu reakcji jest cDNA uzyskane z RNA po reakcji odwrotnej transkrypcji.

Geny referencyjne (ang. *housekeeping genes*) są genami metabolizmu podstawowego i biorą udział w regulacji podstawowych funkcji komórek. Geny te są stosowane jako punkty odniesienia do kontroli ekspresji genów (w związku z ich niezmienną ekspresją) oraz do sprawdzenia poprawności zajścia reakcji odwrotnej transkrypcji. Do najpopularniejszych genów referencyjnych należą: *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego), *ACT* (β -aktyna), *ALB* (albumina) czy *EF1A* (elongation factor 1 α) [Romanowski i wsp., 2007].

W przypadku niniejszej rozprawy doktorskiej, w celu potwierdzenia poprawności reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) oraz prawidłowego przepisania informacji genetycznej zawartej w RNA na cDNA, dla każdej z prób przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem odpowiedniej pary starterów dla genu referencyjnego, którym był gen kodujący dehydrogenazę gliceraldehydo-3-fosforanową *GAPDH* (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*). Obecność genu *GAPDH* stwierdzono we wszystkich 46 próbach. Przykładowy rozdział elektroforetyczny dla genu *GAPDH* przedstawia Rycina 20.



Rycina 20. Przykładowy rozdział elektroforetyczny dla genu *GAPDH*.

Studzienka nr 1- wzorzec masy molekularnej 100-500 pz, studzienki od 2 do 6 – próby badane (produkt o wielkości 189 pz), studzienka 7-kontrola negatywna.

Genami badanymi dla których przeprowadzono reakcję PCR były: gen *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*. Sekwencje starterów dla genu referencyjnego oraz genów badanych zostały przedstawione w Tabeli 12. Dokładny opis oraz zasada reakcji PCR zostały przedstawione w podrozdziale 10.2.2.

Starter	Sekwencja
<i>GAPDH</i> F <i>GAPDH</i> R (10 µM)	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3' 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'
<i>RUNX1</i> F <i>RUNX1</i> R (10 µM)	5'-AGTGAAGAGGGAAAAGC-3' 5'-ATCCACTGTGATTTTGATGG-3'
<i>RUNX3</i> F <i>RUNX3</i> R (10 µM)	5'-ATGACGAGAACTACTCCG-3' 5'-TCAGGGTGAACTCTTCC-3'
<i>CEBPA</i> F <i>CEBPA</i> R (10 µM)	5'-AGCCTTGTTTGTACTGTATG-3' 5'-AAAATGGTGGTTTAGCAGAG-3'
<i>c-MYC</i> F <i>c-MYC</i> R (10 µM)	5'-CCACAGCAAACCTCCTCACAG-3' 5'-GCAGGATAGTCCTCCGAGTG-3'

Tabela 12. Tabela przedstawia sekwencje starterów dla genu referencyjnego oraz genów badanych.

Analizę przeprowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta zestawu (AccuTaq™LA DNA Polymerase firmy Sigma-Aldrich). W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z odczynników przedstawionych w Tabeli 13.

Odczynnik	Objętość na 1 próbę
Bufor (10x stężony) o pH 8,3 (1,5 mM)	3,5 μ l
Chlorek magnezu (V=1,5 ML; 25mM MgCl ₂)	0,7 μ l
Primer Forward (10 μ M)	0,7 μ l
Primer Reverse (10 μ M)	0,7 μ l
dNTP (0,2 mM)	0,4 μ l
Enzym (0,5U)	0,2 μ l
Woda jałowa, wolna od nukleaz	13,8 μ l
Łączna objętość	20 μ l

Tabela 13. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji PCR.

Całość wymieszano oraz rozpipetowano w ilości 20 μ l do jałowych probówek (0,2 ml). Następnie do każdego z probówek dodano odpowiednio po 1 μ l cDNA. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 21 μ l. Następnie każdą z próbek wymieszano oraz zwirowano i umieszczono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad) oraz uruchomiono odpowiedni program o charakterystycznym dla każdego z genów profilu termicznym (Tabela 14).

Gen	Warunki reakcji PCR			Cykle	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		
<i>c-MYC</i>	Denaturacja	95°C	60 s	35	105 pz
	Annealing	57°C	30 s		
	Elongacja	72°C	45 s		

Tabela 14. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji PCR.

Ponadto na początku każdej reakcji PCR prowadzono wstępną denaturację w 95°C przez 2 minuty oraz dodatkową elongację w 72°C przez 5 minut na końcu cyklu. W każdej serii reakcji PCR dołączono tzw. kontrolę negatywną, która zamiast matrycy cDNA zawierała wodę jałową wolną od nukleaz. Po zakończonej reakcji PCR uzyskane produkty przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

W celu wizualizacji otrzymanych produktów amplifikacji badanych genów przeprowadzono elektroforezę w 2% żelu agarozowym. Szczegółowy opis metody i zasada wykonania elektroforezy zostały opisane w podrozdziale 10.2.3.

10.2.9 Reakcja Real-Time PCR- PCR w czasie rzeczywistym

Real-Time PCR jest ilościową metodą oceny ekspresji genów. Reakcja ta pozwala na amplifikację DNA wraz z jednoczesnym monitorowaniem w czasie rzeczywistym ilość powstającego produktu. Reakcja Real-Time PCR przebiega analogicznie do standardowej reakcji PCR czyli namnażania fragmentu materiału genetycznego dzięki zastosowaniu specyficznych oligonukleotydowych starterów oraz polimerazy, natomiast w Real-Time PCR dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych możliwe jest również śledzenie w czasie rzeczywistym wykładniczego wzrostu ilości powstającego produktu po każdym cyklu [Allison, 2009; Studzińska i wsp., 2008; Słomski, 2011].

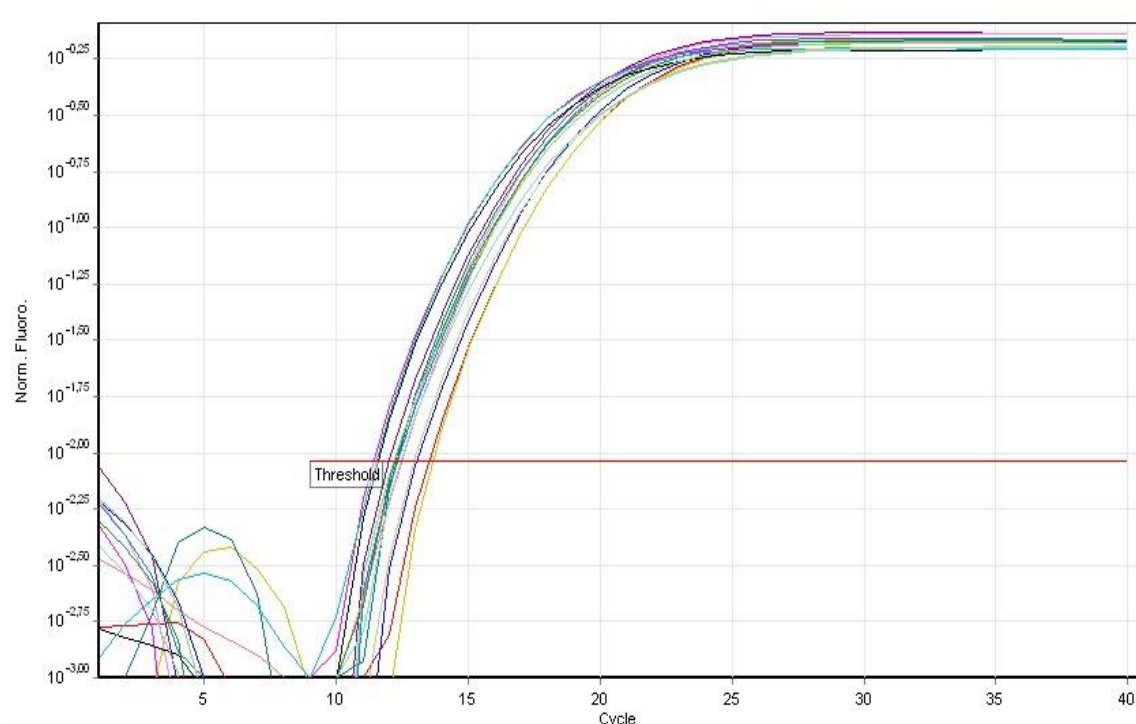
Do analizy przebiegu reakcji Real-Time PCR wykorzystywane są fluorescencyjne związki interkalujące do dwuniciowego DNA takie jak: SYBR Green I oraz komplementarne do powielanej sekwencji sondy molekularne wyznakowane fluorochromami: Molecular Beacons, TaqMan, Hybridization Probes i sondy typu Scorpion [Studzińska i wsp., 2008]. Emitowany przez barwniki poziom fluorescencji jest proporcjonalny do stężenia amplikonu w próbce. W pierwszych cyklach reakcji powolne powielanie produktu charakteryzuje się niskim poziomem fluorescencji, która rejestrowana jest jako tzw. tło (ang. background). W kolejnych etapach wrastające stężenie produktu prowadzi do zwiększenia fluorescencji. Cykl w którym fluorescencja przekracza poziom tła określany jest mianem cyklu progowego (ang. threshold cycle, C_t lub ang. crossing point, C_p). W cyklu tym badana matryca zostaje powielona odpowiednią liczbę razy, tak że fluorescencja osiąga wartość progową (F_t , ang. fluorescence threshold) [Studzińska i wsp., 2008]. Od cyklu progowego rozpoczyna się wczesna faza logarytmiczna reakcji PCR. Wyznaczenie cykli progowych C_t dla badanych próbek pozwala na wyznaczenie początkowej ilości fragmentu badanego DNA użytego do reakcji. Wartość C_t jest odwrotnie proporcjonalna do ekspresji badanego genu. Względny poziom ekspresji materiału genetycznego w próbach badanych określana jest w stosunku do ekspresji genu metabolizmu podstawowego [Studzińska i wsp., 2008].

W niniejszej rozprawie doktorskiej w reakcji Real-Time PCR zastosowano niespecyficzny barwnik fluorescencji SYBR Green.

W przypadku zastosowania barwników niespecyficznych należy przeprowadzić analizę krzywej topnienia, na podstawie której można ocenić specyficzność przeprowadzonej reakcji Real-Time PCR. Wykorzystany barwnik SYBR Green I oprócz

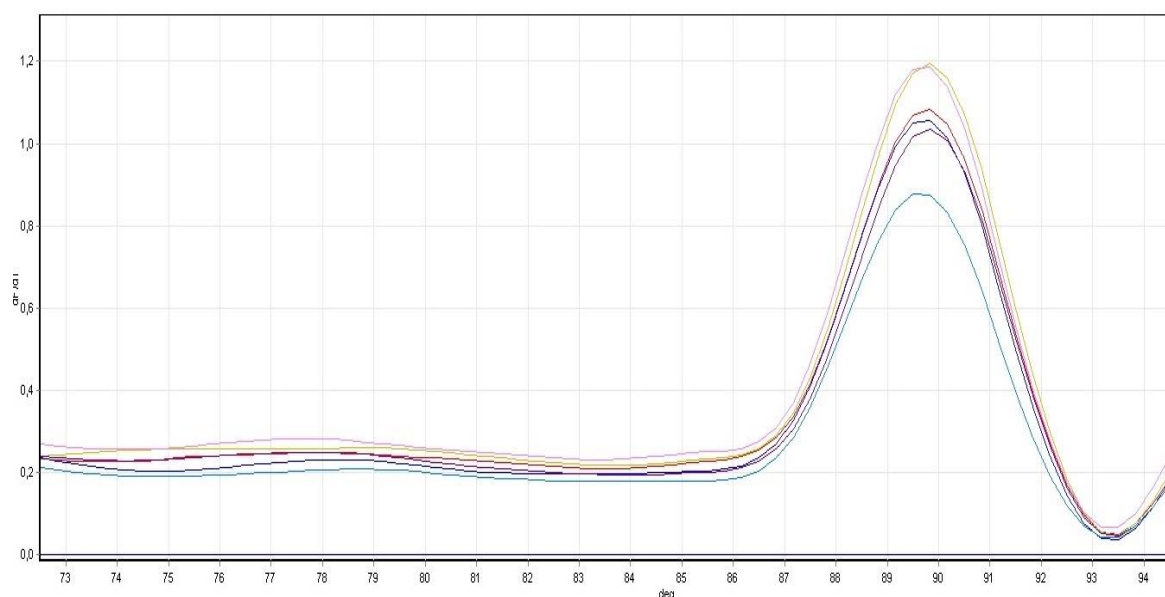
związania się z dwuniciowym DNA może połączyć się również z ze sparowanymi starterami (*ang. primer-dimer*). Im większa ilość cykli, tym większe prawdopodobieństwo powstania produktów niespecyficznych. Temperatura topnienia jest cechą charakterystyczną dla danych cząsteczek i zależy od ich danego składu nukleotydowego. Stworzenie krzywej topnienia polega na stopniowym podwyższaniu temperatury mieszaniny reakcyjnej aż do momentu denaturacji wszystkich podwójnych nici i analizowaniu zmiany sygnału fluorescencji [Allison, 2009; Studzińska i wsp., 2008; Słomski, 2011].

Metodę Real-Time PCR wykorzystano do oceny względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*. Reakcję dla genów badanych prowadzono równolegle z genem referencyjnym *GAPDH*. Rycina 21 oraz 22 przedstawia przykładowe krzywe amplifikacji oraz krzywą topnienia dla genu referencyjnego *GAPDH*. Ilościową ocenę względnego poziomu ekspresji badanych genów oceniono tylko w próbach, które wykazywały jakościową obecność ekspresji.



Rycina 21. Krzywa amplifikacji dla genu referencyjnego *GAPDH*.

Oś X przedstawia kolejne cykle natomiast oś Y przedstawia poziom znormalizowanej fluorescencji.



Rycina. 22 Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu referencyjnego *GAPDH*.

Ocenę względnego poziomu ekspresji genów przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników RT HSPCR Mix Sybr® B (2 razy stężony, V=1,25 ml) firmy A&A Biotechnology oraz odpowiednich starterów postępując zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Analizę dla każdej z prób wykonano w tripletach, a uzyskane wyniki uśredniono.

W pierwszym etapie analizy przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z odczynników przedstawionych w Tabeli 15.

Odczynnik	Objętość na 1 próbę
RT HS-PCR Mix Sybr® B (2 razy stężony, V=1,25 ml)	5 µl
Primer forward (10 µM)	0,7 µl
Primer reverse (10 µM)	0,7 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	2,6 µl
Objętość końcowa	9 µl

Tabela 15. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR.

Do przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR dla każdego z genów wykorzystano sekwencje starterów użyte w analizie jakościowej (Tabela 12). Mieszaninę reakcyjną wymieszano oraz zwirowano i rozpipetowano w ilości 9 μ l do jałowych probówek (0,2 ml) oraz dodano 1 μ l cDNA. Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 10 μ l. Następnie każdą z próbek wymieszano oraz zwirowano i umieszczono w aparacie Rotor-GeneTM 6000 firmy Corbett Life Science, Qiagen (w przypadku genów *RUNX3* i *CEBPA*) oraz aparacie Stratagene Mx3000P, Agilent Technologies (w przypadku genów *RUNX1* oraz *c-MYC*) oraz uruchomiono odpowiedni program o charakterystycznym dla każdego z badanych genów profilu termicznym (Tabela 16). Doświadczenia dla genów badanych oraz genu referencyjnego przeprowadzano równolegle. Do każdej serii doświadczeń dołączano kontrolę negatywną, niezawierającą matrycy cDNA- również w triplicie.

Gen	Warunki reakcji PCR			Cykle
<i>RUNX1</i>	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	55°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	
<i>RUNX3</i>	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	58°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	
<i>CEBPA</i>	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	56°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	
<i>c-MYC</i>	Denaturacja	95°C	10 s	40
	Annealing	57°C	15 s	
	Elongacja	72°C	20 s	

Tabela 16. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji Real-Time PCR.

Na początku każdej reakcji Real-Time PCR prowadzona została wstępna denaturacja w 95°C przez 10 minut. Dla każdego z analizowanych genów przeprowadzono również analizę tzw. krzywej topnienia w celu potwierdzenia specyficzności oraz prawidłowego przeprowadzenia reakcji. Krzywą topnienia wykonano w ostatnim cyklu reakcji, kiedy stopniowo podgrzewano mieszaninę w zakresie od 72 do 95°C oraz obserwowano spadek sygnału fluorescencji [Studzińska i wsp., 2008].

W przeprowadzonych badaniach przyjęto wydajność reakcji jako 100%. Aby obliczyć względny poziom ekspresji genów wykorzystano metodę podwójnej delty [Livak, Schmittgen] korzystając ze wzoru:

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

gdzie:

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

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

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

R: oznacza względny poziom ekspresji genu; gdzie:

- ❖ wartość współczynnika równa 1 oznacza, że poziom transkryptu w próbie kalibracyjnej i badanej są jednakowe
- ❖ wartość >1 oznacza nadekspresję
- ❖ wartość <1 obniżoną wartość ekspresji [Livak i wsp., 2001].

10.2.10 Ocena obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1*

W celu oceny obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową w pierwszej kolejności wyizolowano RNA, które następnie przepisano na cDNA przeprowadzając reakcję odwrotnej transkrypcji. Dokładny opis procedury izolacji RNA z krwi obwodowej pacjentów oraz reakcji RT-PCR znajdują się odpowiednio w podrozdziałach: 10.2.5 oraz 10.2.7. Poprawność reakcji odwrotnej transkrypcji sprawdzono za pomocą reakcji PCR dla genu referencyjnego, którym był gen *GAPDH* (podrozdział 10.2.8).

Tak przygotowane i sprawdzone cDNA zostało użyte do reakcji Real-Time PCR, która to umożliwiła jakościową ocenę obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* u pacjentów z AML. W tej metodzie zastosowano specyficzne sondy TaqMan (sondę MGB znakowaną barwnikiem FAMTM), które rozpoznawały sekwencje genu fuzyjnego i prowadziły do jego amplifikacji. Odczyty fluorescencji przeprowadzono w kanale zielonym (FAM).

Sondy TaqMan są oligonukleotydami o długości około 30 par zasad, które są komplementarne do powielanej sekwencji DNA oraz produktu PCR. W strukturze sondy wyróżniamy dwa końce: 5' zawierający barwnik fluorescencyjny oraz koniec 3' zawierający tzw. wygaszcz. W przypadku sondy niezhybrydyzowanej z DNA barwnik i wygaszcz są zbyt blisko siebie co blokuje fluorescencję. Podczas kolejnych cykli reakcji PCR sonda rozpoznaje komplementarną dla siebie sekwencję na matrycy DNA oraz wiąże się z nią pomiędzy miejscami przyłączania starterów. Dodatkowo obecność termostabilnej polimerazy posiadającej aktywność egzonukleazową 5'-3' degradowe sondę oraz rozdziela przestrzennie barwnik z wygaszczem co prowadzi do emisji fluorescencji. Analizy akumulującego się produktu PCR dokonuje się po zakończeniu elongacji. Wraz ze wzrostem stężenia produktu zwiększa się również ilość sondy zhybrydyzowanej z nim oraz zdegradowanej poprzez działanie polimerazy. W konsekwencji w każdym kolejnym cyklu reakcji PCR zwiększa się intensywność fluorescencji [Studzińska i wsp., 2008; Słomski, 2011].

Analizę obecności genu fuzyjnego przeprowadzono korzystając z odczynników *TaqMan® Gene Expression Assay* firmy *Applied Biosystems* (identyfikator testu: Hs03024752_ft). W pierwszej kolejności przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z odczynników przedstawionych w Tabeli 17.

Odczynnik	Objętość na jedną próbę
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl
Sonda <i>RUNX1/RUNX1T1</i> 20X TaqMan® Gene Expression Assay	1 µl
Woda jałowa, wolna od nukleaz	5 µl
Łączna objętość mieszaniny	16 µl

Tabela 17. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR w celu oceny obecności genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*.

Mieszaninę wymieszano na wortexie oraz zwirowano i rozpipetowano do próbek (0,2 ml) w objętości 16 µl. Do próbek dodano odpowiednio po 4 µl cDNA. Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl. Do każdej serii oznaczeń dołączono próbkę zawierającą tzw. kontrolę pozytywną. Była to próba cDNA uzyskana od pacjenta ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową u którego potwierdzono przy wykorzystaniu metody FISH obecność genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1*. Dodatkowo do każdej serii badań dodano kontrolę negatywną, która zamiast matrycy cDNA zawierała czystą jałową wodę destylowaną.

Próbki umieszczono w aparacie *Rotor-Gene™ 6000* firmy *Corbett Life Science, Qiagen* oraz ustawiono odpowiedni program temperaturowy (Tabela 18).

	Inkubacja	Wstępna denaturacja	Właściwa denaturacja 40 cykli	Przyłączanie starterów (annealing) 40 cykli
Temperatura	50°C	50°C	95°C	60°C
Czas	2 minuty	10 min	15 s	60 s

Tabela 18. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR w celu oceny obecności genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*.

10.2.11 Jakościowa ocena obecności białka RUNX3 oraz białka CEBPA przy wykorzystaniu metody Western-Blot

W celu oceny obecności białka RUNX3 oraz białka CEBPA w surowicy krwi pacjentów z ostrą białaczką szpikową zastosowano metodę Western-Blot służącą do wykrywania obecności oraz identyfikacji określonych białek. Metoda Western Blot składa się z kilku etapów i obejmuje między innymi [Allison, 2009; Brown, 2018]:

- ❖ przygotowanie prób
- ❖ elektroforezę w żelu poliakrylamidowym
- ❖ przeniesienie rozdzielonych białek na membranę nitrocelulozową
- ❖ inkubację z odpowiednimi przeciwciałami
- ❖ detekcję białek [Brown, 2018; Mahmood i wsp., 2012]

Przygotowanie prób:

W pierwszym etapie analizy próby surowicy krwi zostały wymieszane z buforem zawierającym 2-merkaptoetanol czyli tzw. „Sample Buffer”. Posiada on właściwości redukujące dzięki czemu zwiększa rozpuszczalność białek oraz ułatwia proces elektroforezy. Dodatkowo dodanie buforu Sample Buffer umożliwia odpowiednie rozcieńczenie prób surowicy. Sample Buffer składał się z następujących odczynników: 2,5 ml 1M TRIS-HCL o pH=6,8, 4ml glicerolu, 920mg SDS, 400ul 0,1% błękitu bromofenolowego oraz 2 ml 2-merkaptoetanolu [Faoro i wsp., 2011; Mahmood i wsp., 2012].

Próby surowicy w których przeprowadzono ocenę jakościową obecności białka RUNX3 oraz białka CEBPA zostały rozcieńczone pięciokrotnie 5x (10 µl surowicy oraz 40 µl buforu Sample Buffer). W celu denaturacji białek próby surowicy ogrzewano w temperaturze 95 °C.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym:

Kolejnym etapem jakościowej oceny badanych białek było przeprowadzenie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności odczynnika denaturującego, którym był 10% SDS (ujemnie naładowany detergent anionowy opłaszczający jednostki monomeryczne białek) [Brown, 2018; Mahmood i wsp., 2012]. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym umożliwia rozdzielenie białek, ale również i innych cząsteczek

takich jak lipidy czy kwasy nukleinowe w polu elektrycznym. Zastosowanie SDSu powoduje denaturację białek oraz nadanie im ładunku ujemnego. W wyniku przeprowadzonej elektroforezy zdenaturowane białka ulegają rozdzielaniu na podstawie ich mas cząsteczkowych i wędrują w kierunku elektrody dodatniej [Brown, 2018; Mahmood i wsp., 2012].

W celu przeprowadzenia elektroforezy białek w surowicy pacjentów z AML przygotowano 12,5% żel poliakrylamidowy. W pierwszym etapie analizy przygotowano tzw. żel rozdzielający. Do cylindra miarowego odmierzone kolejno: 5 ml odczynnika A (175,2 g akrylamidu, 4,8 g N'N'-Bis- metylenowego akrylamidu w 600 ml wody), 3 ml odczynnika B (27,23 g Tris base w 100 ml wody, pH=8,8) oraz 3,84 ml czystej, jałowej wody destylowanej. Całość przeniesiono do kolby ssawkowej oraz odpowietrzono za pomocą pompy próżniowej. Do tak przygotowanej mieszaniny dodano 140 µl świeżo przygotowanego APS-u (0,1 g APS w 0,9 ml wody destylowanej) 120 µl 10% SDS-u (10 g SDS w 100 ml wody destylowanej) oraz 30 µl TEMED-u (TEMED działa jako katalizator reakcji polimeryzacji dlatego dodawany jest w ostatniej kolejności). Roztwór wymieszano oraz wylano między przygotowane wcześniej szklane płytki do odpowiedniej wysokości oraz nawarstwiono 60% roztwór alkoholu etylowego (100 ml zawiera 3 krople 0,1% roztworu błękitu bromofenolowego). W następnej kolejności przygotowano 5% żel zatężający. W tym celu w cylindrze miarowym odmierzone odpowiednio 2,6 ml odczynnika A oraz 5 ml odczynnika C (6 g Tris base w 60 ml wody destylowanej, pH=6,8). Całość uzupełniono wodą destylowaną do łącznej objętości 19 ml oraz odpowietrzono przy pomocy pompy próżniowej. Następnie dodano 140 µl świeżo przygotowanego APS-u, 120 µl 10% SDS-u oraz 40 µl TEMED-u. Powstały roztwór wymieszano oraz stopniowo wylewano na żel rozdzielający (wcześniej z powierzchni żelu rozdzielającego zlano warstwę alkoholu etylowego, trzykrotnie ją przemywając wodą destylowaną). Pomiedzy szklane płytki wprowadzono grzebień.

Tak spolimeryzowane żele umieszczono w naczyniu do elektroforezy oraz zalano odpowiednim buforem do elektroforezy o pH=8,6 (12 g Tris base, 2 g SDS i 57,5 g glicyny w 1l wody destylowanej). Grzebień usunięto i naniesiono wcześniej przygotowane próbki w ilości 2µl na studzienkę. Dodatkowo do jednej ze studzienek dodano 5 µl wzorca masy molekularnej EUR_x –PerfectTM Tricolor Protein Ladder, 245-11kDA (Eurx, Polska). Elektroforezę przeprowadzano w chłodni pod napięciem 150 V

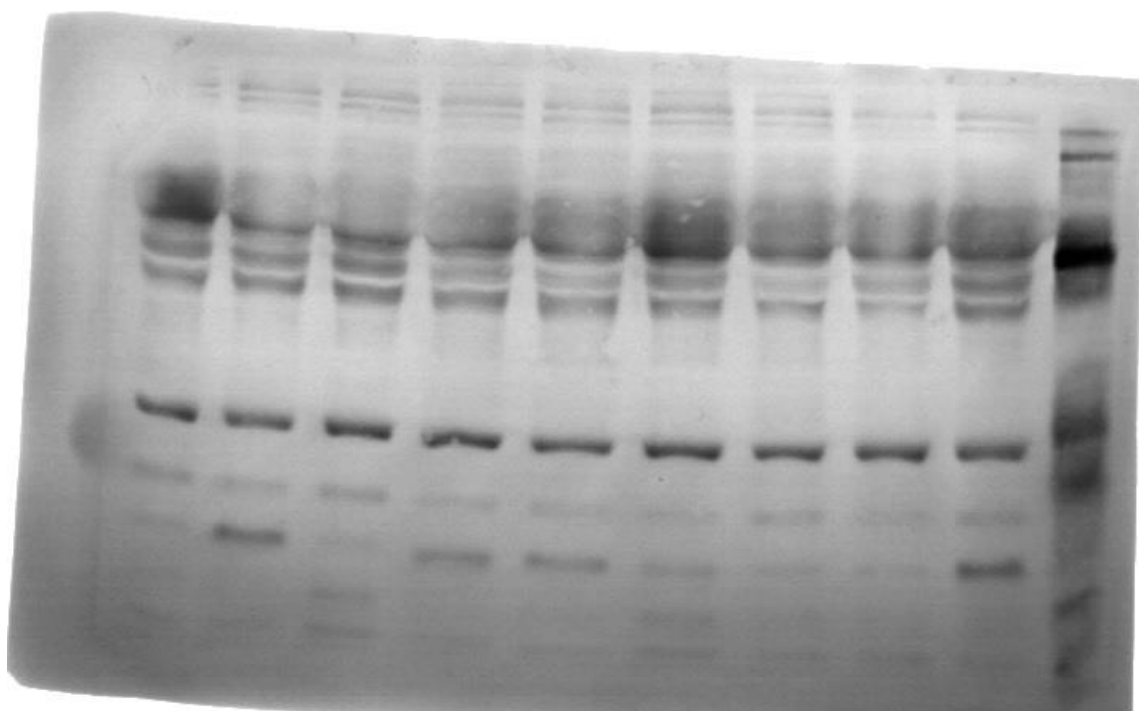
przez 1 godzinę i 15 minut korzystając z aparatu do elektroforezy firmy BioRad oraz zasilacza PowerPacTM Universal firmy Bio-Rad.

Transfer rozdzielonych białek na membranę nitrocelulozową:

Transfer polega na przeniesieniu rozdzielonych białek z żelu na membranę w wyniku działania pola elektrostatycznego. Dzięki temu białka zostają związane na membranie. W przypadku oceny jakościowe białek RUNX1 oraz CEBPA przeprowadzono tzw. transfer mokry na membranę nitrocelulozowej. Transfer mokry przeprowadzany jest w naczyniu wypełnionym buforem. Żel, membrana oraz bibuły Whatmana tworzą tzw. kanapkę, którą umieszcza się pionowo pomiędzy dwoma elektrodami. Transfer przeprowadza się w chłodni [Brown, 2018; Hirano, 2012; Mahmood i wsp., 2012].

W celu przeprowadzenia transferu rozdzielonych białek w pierwszej kolejności przygotowano tzw. „kanapkę”. Składała się ona kolejno z następujących warstw: gąbki do blottingu, bibuły Whatmana, żelu, nitrocelulozowej membrany oraz ponownie bibuły Whatmana oraz gąbki do blottingu. Kanapkę przygotowano na szalce Petriego wypełnionej buforem do transferu (6 g Tris base, 28,8 g glicyny, 400 ml metanolu oraz 1600 ml woda destylowana). W celu usunięcia pęcherzyków powietrza dokładnie uciskano powstałą kanapkę. tak przygotowane „kanapki” spięto klamrą oraz umieszczono w aparacie do transferu wypełnionym odpowiednim buforem. W środku umieszczono mieszadło. Aparat umieszczono w chłodni na mieszadle magnetycznym i prowadzono całonocny transfer przy napięciu 20 V.

Po transferze membrany nitrocelulozowe zalano 5% roztworem Poncoau S w celu uzyskania dobrze widocznych rozdzielonych frakcji białkowych. Przykładowy rozdział elektroforetyczny surowic pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową po transferze na membranę nitrocelulozowej wybarwiony barwnikiem Ponceau S przedstawia Rycina 23.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Rycina 23. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego surowic pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową po transferze na membranie nitrocelulozowej wybarwionej barwnikiem Ponceau S .

Studzienka nr 10-wzorzec masy molekularnej EUR_x-Perfect™ Tricolor Protein Ladder, 245-11kDa;
studzienki 1-9- próby badane.

Inkubacja przeciwciałami

Uzyskane membrany nitrocelulozowe z rozdzielonymi białkami surowicy należy inkubować w buforze blokującym, który składa się z odtłuszczonego mleka w proszku rozpuszczonego w odpowiednim buforze. Ma to na celu blokowanie możliwości niespecyficznego wiązania się przeciwciała do białek. Następnie zablokowane membrany inkubuje się z przeciwciałami pierwszorzędowymi specyficznymi rozpoznającymi poszukiwane białko i przeciwciałami drugorzędowymi znakowanymi enzymem, które rozpoznają przeciwciała pierwszorzędowe [Brown, 2018; Hirano, 2012; Mahmood i wsp., 2012].

W tym celu w rynienkach przygotowano 5% roztwór mleka w proszku (2,5g mleka dodano do 50 ml 0,05 M TRIS HCL o pH 7,4), umieszczono w nim membrany nitrocelulozowe oraz postawiono na kołysce w chłodni na całą noc. Następnie mleko zlano, a membrany przepłukano 3 razy buforem 0,05 M TRIS HCL o pH 7,4 przez 10

minut. Następnie do rynienek w których znajdowały się membrany dodano przeciwciało pierwszorzędowe (RUNX3 oraz CEBPA antibody firmy Biorbyt), rozcieńczono zgodnie z sugestią producenta przeciwciał 1000x przy pomocy 0,05 M TRIS HCL o pH 7,4 (1 obj. przeciwciała oraz 999 obj. buforu 0,05 M TRIS HCL) i inkubowano na kołysce w chłodni przez okres dwóch godzin.

Przeciwciało zlane, a następnie membrany przepłukano 3-krotnie buforem 0,05 M TRIS HCL o pH 7,4 przez 15 minut. Następnie do rynienek z membranami dodano roztwór 1000-krotnie rozcieńczonego poliklonalnego koziego przeciwciała drugorzędowego (GoatAnti-Rabbit IgG skonigowanego z peroksydazą chrzanową) i ponownie inkubowano na kołysce w chłodni przez okres jednej godziny. Po tym czasie membrany ponownie przepłukano 3-krotnie przy pomocy 0,05 M TRIS HCL o pH 7,4 przez 15 minut.

Detekcja białek

W celu detekcji białek na membranę nitroceluzozową naniesiono substrat, specyficznie reagujący z peroksydazą chrzanową, składający się z 200μl 3% roztworu DAB, 200μl 3% wody utlenionej oraz 10 ml 0,05 M buforu Tris-HCl o pH 7,4. Membrany inkubowano z substratem do momentu pojawienia się zabarwienia o kolorze brązowym co oznaczało reakcję pozytywną. Membrany przemyto wodą destylowaną w celu zatrzymania reakcji. Membrany osuszono, a uzyskane wyniki zarchiwizowano. Uzyskane wzory prążkowe porównano ze wzorcem masy molekularnej (EUR_x –Perfect™ Tricolor Protein Ladder, 245-11kDa). Obecność białek RUNX3 oraz CEBPA oznaczała pojawienie się brązowych prążków odpowiednio na wysokości około 48kDa (w przypadku białka RUNX3) oraz 30,43 kDa w przypadku białka CEBPA).

11. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy wykorzystaniu programu Statistica 13.1 (Statsoft Inc.).

W przypadku oceny cech ilościowych w pierwszej kolejności przeprowadzono analizę zgodności badanych cech z rozkładem normalnym wykorzystując test Shapiro-Wilka. W przypadku gdy rozkład cech ilościowych był zgodny z normalnym wyniki zostały przedstawione jako średnia wraz odchyleniem standardowym. Jeśli rozkład cech ilościowych był niezgodny z rozkładem normalnym wyniki przedstawiono jako mediana oraz zakres kwartylowy. Aby ocenić jednorodność wariancji użyto testu Levene'a. Ocena istotności różnic dla cech ilościowych między grupami została przeprowadzona przy użyciu testu t-Studenta, testu U Mann'a-Whitney'a oraz analizy wariancji ANOVA.

W przypadku gdy dwie analizowane cechy miały charakter ilościowy do poszukiwania zależności między nimi wykorzystano korelację r-Pearsona.

Ocenę czasu przeżycia pacjentów analizowano przy pomocy krzywych Kaplana-Meiera. Występowanie różnic pomiędzy podgrupami określono przy pomocy testu log-rank.

Dla cech jakościowych do oceny istotności różnic między nimi wykorzystano test χ^2 Pearsona.

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

Rozdział III

12. Wyniki

12.1 Charakterystyka grupy badanej

Grupa badana składała się z 46 pacjentów w tym z 22 kobiet co stanowiło 47,8% badanych oraz 24 mężczyzn, którzy stanowili 52,2% badanych. Uzyskane wyniki porównano z następującymi danymi demograficznymi takimi jak: płeć oraz wiek pacjentów w momencie rozpoznania choroby oraz kliniczno–patologicznymi jak: podtyp ostrej białaczki szpikowej (według klasyfikacji FAB) oraz przeżywalność w trakcie 3-letniej obserwacji.

Średni wiek rozpoznania ostrej białaczki szpikowej w grupie zrekrutowanych do badania pacjentów wynosił 58,5 lat. W przypadku kobiet było to 59,2 lat, a w przypadku mężczyzn były to 57,7 lata.

Pacjenci zostali sklasyfikowani według typu ostrej białaczki szpikowej (rozpoznanie dokonano na podstawie klasyfikacji FAB). W grupie badanych pacjentów zdiagnozowano następujące podtypy AML: AML0 (1 pacjent), AML1 (4 pacjentów), AML2 (8 pacjentów), AML3 (2 pacjentów), AML4 (6 pacjentów), AML5 (3 pacjentów), AML6 (1 pacjent). U pozostałych 21 pacjentów nie określono podtypu AML (pacjenci Ci zostali sklasyfikowani jako AML o nieokreślonym typie).

Kolejną cechą pod względem której sklasyfikowano pacjentów było również przeżycie w okresie 3-letniej obserwacji. Do zakończenia czasu obserwacji zgon stwierdzono u 20 (43,5%) spośród 46 pacjentów. Było to 10 kobiet (45,5%) oraz 10 mężczyzn (41,7%). Średni czas upływający od momentu rozpoznania choroby do momentu zgonu wynosił 7 miesięcy.

Pełna charakterystyka danych demograficznych oraz kliniczno-patologicznych dotyczących całej grupy badanych pacjentów znajduje się w Tabeli 19.

Płeć/cecha	Liczność grupy	Wiek pacjentów w momencie rozpoznania AML (lata)		Podtyp AML (według FAB)
Kobiety	22 (47,8%)	59,22	Mediana 64	AML0: 1 (4,5%) AML1: 2 (9,1%) AML2: 5 (22,8%) AML3: 1 (4,5%) AML4: 2 (9,1%) AML5: 1(4,5%) AML6: 0 (0,0%) AML nieokreślonym typie: 10 (45,5%)
			Zakres 27-80	
Mężczyźni	24 (52,2%)	57,75	Mediana 58	AML0: 0 (0,0%) AML1: 2 (8,3%) AML2: 3 (12,5%) AML3: 1 (4,2%) AML4: 4 (16,7%) AML5: 2 (8,3%) AML6: 1 (4,2%) AML nieokreślonym typie: 11 (45,8%)
			Zakres 17-76	
Cała populacja	46 (100%)	58,4	Mediana 61,5	AML0: 1 (2,2%) AML1: 4 (8,7%) AML2: 8 (17,4%) AML3: 2 (4,4%) AML4: 6 (13,0%) AML5: 3 (6,5%) AML6: 1(2,2%) AML o nieokreślonym typie: 21 (45,6%)
			Zakres 17-80	

Tabela 19. Charakterystyka wybranych danych demograficznych oraz kliniczno-patologicznych pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową.

12.2 Ocena wybranych genotypów i alleli polimorfizmu genu *RUNX1* oraz genu *RUNX3*

Ocenę wybranych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) dla genów należących do rodziny *RUNX* czyli dla genu *RUNX1* oraz dla genu *RUNX3* przeprowadzono u 40 pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Wybrany polimorfizmem dla genu *RUNX1* był polimorfizm rs2268277, a dla genu *RUNX3* polimorfizm rs6672420.

Grupę kontrolną stanowiło 60 zdrowych pacjentów, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Pacjenci zrekrutowani do grupy kontrolnej byli dobrani do populacji pacjentów z grupy badanej zarówno pod względem etnicznym jak i geograficznym.

W pierwszym etapie analizy przeprowadzono ocenę zgodności częstości występowania obserwowanych genotypów zarówno w grupie badanej jak i w grupie kontrolnej z oczekiwaną częstością występowania genotypów dla obu badanych polimorfizmów, co pozwoliło na ocenę ich zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga. Rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów dla obu badanych SNP zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej był zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga, co świadczy o prawidłowym doborze obu kohort oraz o ich reprezentatywności względem populacji (odpowiednio $p=0,9967$ oraz $0,9287$ dla genu *RUNX1* oraz $p=0,2918$ oraz $0,7646$ dla genu *RUNX3*) (Tabela 20 oraz Tabela 21).

Kolejnym etapem analizy była ocena porównawcza uzyskanych wyników genotypowania oraz częstości występowania poszczególnych alleli dla obu wybranych polimorfizmów u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową z wynikami uzyskanymi dla grupy kontrolnej.

W przypadku polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* przeprowadzono analizę statystyczną, która miała na celu porównanie częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli tego SNP występujących w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej oraz określeniu potencjalnych różnic między kohortami. Analiza przeprowadzona za pomocą testu χ^2 nie wykazała istotnej statystycznie różnicy pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów i alleli. Wartość p wynosiła odpowiednio $0,9173$ w przypadku porównania genotypów oraz $0,9556$ dla allela dzikiego G oraz $0,9666$ dla allela zmutowanego C. Dla polimorfizmu rs2268277

genu *RUNX1* dominującym genotypem w grupie badanej i kontrolnej był genotyp heterozygoty GC (odpowiednio 47,5% oraz 43,3% przypadków). W obydwu grupach genotyp homozygoty zmutowanej CC pojawiał się z najmniejszą częstością (odpowiednio 15,0% i 16,7%). Genotyp homozygoty dzikiej GG występował w 37,5% przypadkach pacjentów grupy badanej oraz 40,0% przypadkach w grupie kontrolnej. W przypadku analizy częstości występowania poszczególnych alleli zaobserwowano, że wśród grupy badanej jak i kontrolnej allel dziki G występował najczęściej (odpowiednio 85,0% oraz 83,3%) (Tabela 20).

Genotyp i allele SNP genu <i>RUNX1</i>	Grupa Badana N=40	Grupa Kontrolna N=60	Wartość p
GC	19 (47,5%)	26 (43,3%)	p=0,9173 Test χ^2
CC	6 (15,0%)	10 (16,7%)	
GG	15 (37,5%)	24 (40,0%)	
allel G obecny	34 (85,0%)	50 (83,3%)	p=0,9556 Test χ^2 z popr. Yatesa
allel G nieobecny	6 (15,0%)	10 (16,7%)	
allel C obecny	25(62,5%)	36 (60,0%)	p=0,9666 Test χ^2 z popr. Yatesa
allel C nieobecny	15 (37,5%)	24 (40,0%)	
HWE	p=0,9967 (Test χ^2)	p=0,9287 (Test χ^2)	

Tabela 20. Porównanie częstości występowania genotypów oraz alleli wśród grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*.

Następnie za pomocą testu χ^2 przeprowadzono analizę statystyczną dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*. W tym przypadku również nie wykazano istotniej różnicy pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* pomiędzy pacjentami z AML, a grupą kontrolną. Wartość p wynosiła odpowiednio 0,5450 dla analizy genotypów oraz odpowiednio p=0,5991 w przypadku oceny allela A oraz p=0,4130 dla allela T (Tabela 21). W przypadku polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* dominującymi genotypami w grupie badanej były genotypy heterozygoty AT oraz homozygoty dzikiej AA. Występowały one z identyczną częstością (odpowiednio 40,0%). W obrębie grupy

kontrolnej najczęstszym genotypem był genotyp heterozygoty AT. Występował w 43,3% przypadków. Homozygoty zmutowane TT występowały w obydwu grupach z najmniejszą częstością (20,0% w grupie badanej oraz 27,0% w grupie kontrolnej). W przypadku analizy częstości występowania alleli zaobserwowano, że wśród grupy badanej jak i kontrolnej allel dziki A występował z największą częstością (odpowiednio 80,0% oraz 73,3%).

Genotyp i allele SNP genu <i>RUNX3</i>	Grupa Badana N=40	Grupa Kontrolna N=60	Wartość p
AT	16 (40,0%)	26 (43,3%)	p=0,5450 Test χ^2
AA	16 (40,0%)	18 (30,0%)	
TT	8 (20,0%)	16 (27,0%)	
Allel A obecny	32 (80,0%)	44 (73,3%)	p=0,5991 Test χ^2 z popr. Yatesa
Allel A nieobecny	8 (20%)	16 (26,7%)	
Allel T obecny	24 (60,0%)	42(70,0%)	p=0,4130 Test χ^2 z popr. Yatesa
Allel T nieobecny	16(40,0%)	18 (30,0%)	
HWE	p=0,2918 (Test χ^2)	p=0,7646 (Test χ^2)	

Tabela 21. Porównanie częstości występowania genotypów oraz alleli wśród grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*.

12.3 Wyniki genotypowania polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, a dane demograficzne oraz kliniczno–patologiczne pacjentów z AML

W kolejnym etapie analizy statystycznej porównano uzyskane częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmów genów *RUNX1* oraz *RUNX3* z danymi demograficznymi oraz kliniczno-patologicznymi pacjentów.

W pierwszej kolejności grupę badaną podzielono na podstawie płci pacjentów. Występowanie poszczególnych genotypów i alleli dla obu polimorfizmów oceniono w grupie 21 kobiet oraz wśród 19 mężczyzn.

W przypadku polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* zaobserwowano, że homozygota CC występowała częściej w podgrupie kobiet niż w podgrupie mężczyzn (odpowiednio: 12,5%; 2,5%). Jakkolwiek nie była to różnica istotna statystycznie (p=

0,2602). Podgrupy kobiety i mężczyźni nie różniły się istotnie statystycznie również po względem częstości występowania allele C ($p=0,8063$), choć występował on częściej w podgrupie kobiet (66,7%) niż w podgrupie mężczyzn (57,9%) (Tabela 22).

W przypadku polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* homozygota TT oraz allel T występowały częściej w podgrupie mężczyzn niż pod grupie kobiet (genotyp TT odpowiednio: 12,5%; 7,5%; allel T odpowiednio: 68,4%; 52,4%). Także w tym przypadku nie była to zależność istotna statystycznie (odpowiednio $p=0,4957$; $p=0,4771$). Częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmów SNP dla genów *RUNX1* oraz *RUNX3* w zależności od płci pacjentów przedstawia Tabela 22.

Genotypy oraz allele		Grupa Badana		Wartość p
		Kobiety N=21	Mężczyźni N=19	
SNP rs2268277 <i>RUNX1</i>	GC	9(22,5%)	10 (25,0%)	$p=0,2602$ (Test χ^2)
	CC	5 (12,5%)	1 (2,5%)	
	GG	7 (17,5%)	8 (20,0%)	
	allel G obecny	16(76,2%)	18(94,7%)	$p=0,2313$ (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel G nieobecny	5 (23,8%)	1 (5,3%)	
	allel C obecny	14 (66,7%)	11(57,9%)	$p=0,8063$ (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel C nieobecny	7 (33,3%)	8 (42,1%)	
SNP rs6672420 <i>RUNX3</i>	AT	8 (20,0%)	8(20,0%)	$p=0,4957$ (Test χ^2)
	AA	10 (25,0%)	6 (15,0%)	
	TT	3 (7,5%)	5 (12,5%)	
	allel A obecny	18 (85,7%)	14 (73,7%)	$p=0,4420$ (dokładny test Fishera)
	allel A nieobecny	3 (14,3%)	5 (26,3%)	
	allel T obecny	11 (52,4%)	13 (68,4%)	$p=0,4771$ (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel T nieobecny	10 (47,6%)	6 (31,6%)	

Tabela 22. Częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli dla genu *RUNX1* oraz genu *RUNX3* odpowiednio u kobiet i mężczyzn.

Następnie przeprowadzono analizę statystyczną, która miała na celu ocenę związku pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmów wybranych genów, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby. Szczegółowe dane dotyczące wieku rozpoznania choroby u pacjentów z AML, w porównaniu z poszczególnymi genotypami polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3* przedstawia Tabela 23.

	Genotyp polimorfizmu genu <i>RUNX1</i> oraz <i>RUNX3</i>	Wiek rozpoznania AML w latach					Wartość p
		N	Średnia	Mediana	Minimum	Maximum	
SNP rs2268277 <i>RUNX1</i>	GC	19	64,0	67,0	17,0	80,0	p=0,0071 (Test Kruskala-Wallis)
	CC	6	46,0	44,0	27,0	64,0	
	GG	15	55,5	56,0	39,0	76,0	
SNP rs6672420 <i>RUNX3</i>	AT	16	62,2	65,5	27,0	80,0	p=0,2269 (Test Kruskala-Wallis)
	AA	16	53,9	50,0	17,0	79,0	
	TT	8	58,4	56,5	44,0	73,0	

Tabela 23. Szczegółowe dane wieku rozpoznania choroby w porównaniu do poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*.

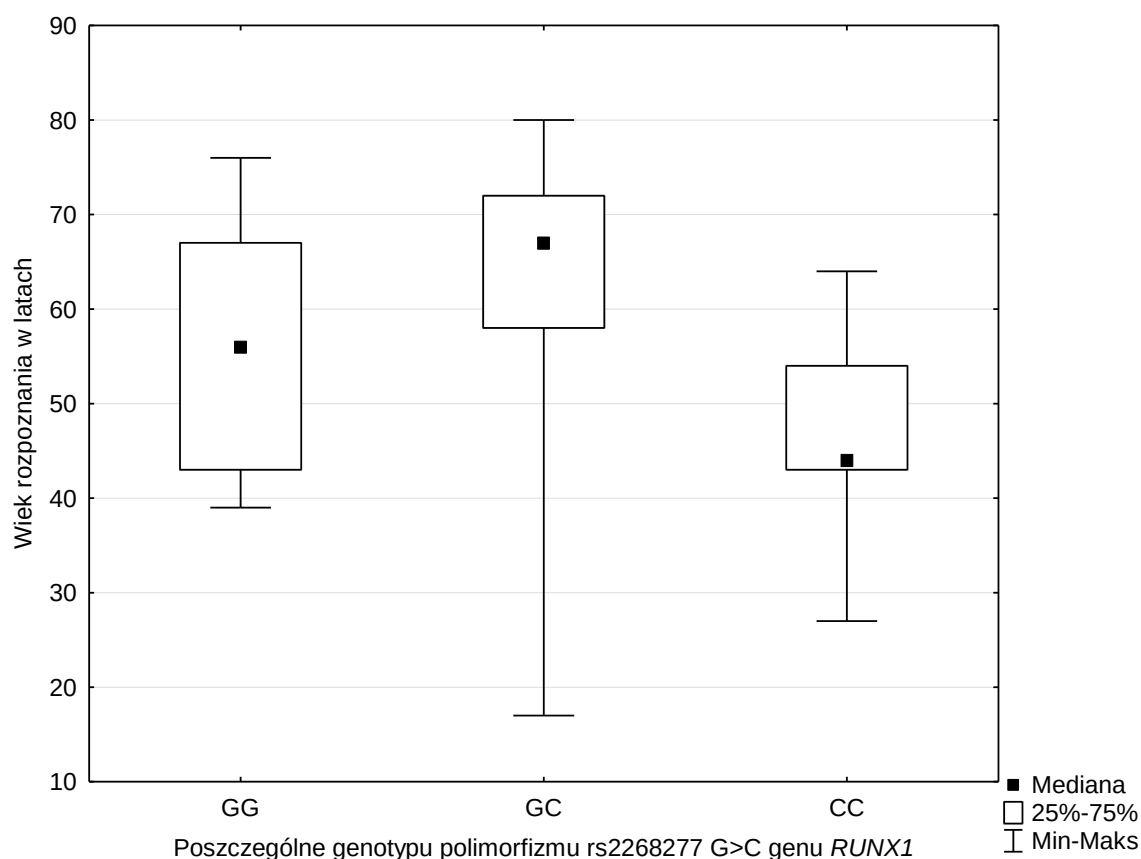
Analiza statystyczna nie wykazała istotnego związku pomiędzy wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, a poszczególnymi genotypami polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*. Zaobserwowano jednak, że genotyp homozygoty dzikiej AA występował częściej u młodszych pacjentów (Tabela 23).

W przypadku polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* zaobserwowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy genotypami, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby. Analiza statystyczna przeprowadzona przy pomocy testu Kruskala-Wallis wykazała, że heterozygota GC oraz homozygota zmutowana CC mają istotny związek z wiekiem rozpoznania choroby u pacjentów z AML ($p=0,0071$, $p<0,05$) (Tabela 23). Test Kruskala-Wallis informuje nas o wystąpieniu istotnie statystycznej różnicy pomiędzy podgrupami natomiast nie wskazuje na kierunek zmian. Dopiero analiza post-hoc wskazuje na dokładną różnicę w poszczególnych podgrupach. W tym celu wykonano test Dunn'a z poprawką Benjamini-Hochberg, który miał na celu

określenie, które podgrupy genotypów różnią się między sobą pod kątem wieku rozpoznania choroby u pacjentów (Tabela 24 oraz Wykres 1). Analiza statystyczna przeprowadzona przy pomocy testu Dunn'a z poprawką Benjamini-Hochberg wykazała, że u heterozygot GC wiek pacjentów w momencie rozpoznania choroby był istotnie statystycznie wyższy niż u pacjentów z genotypem homozygoty dzikiej GG ($p=0,0446$, $p<0,05$) oraz z genotypem homozygoty zmutowanej CC ($p=0,0127$, $p<0,05$). Prawdopodobnie pacjenci będący homozygotami CC mogli charakteryzować się wcześniejszym pojawieniem objawów klinicznych oraz być może cięższym przebiegiem choroby. Może się to wiązać z niższym wiekiem rozpoznania choroby u tych pacjentów (średnia wieku wynosiła 46,0 lat) w przeciwieństwie do pacjentów będących heterozygotami GC (średnia wynosiła 64,0 lata). Warto nadmienić, że średnia wieku rozpoznania choroby w całej badanej grupie pacjentów wynosiła 58 lat.

SNP rs2268277 RUNX1	CC	GC
GC	$p=0,0127$	x
GG	$p=0,2234$	$p=0,0446$

Tabela 24. Wyniki analizy Post-hoc. Test Dunn'a z poprawką Benjamini-Hochberg.



Wykres 1. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu genu *RUNX1*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby.

W następnej kolejności przeprowadzono analizę dla alleli badanych polimorfizmów genów *RUNX1* oraz *RUNX3*. Analiza częstości występowania poszczególnych alleli dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* wykazała, że istnieje statystycznie istotna zależność pomiędzy występowaniem allela G, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby. Pacjenci u których allel G był obecny charakteryzowali się istotnie statystycznie wyższym wiekiem rozpoznania choroby niż pacjenci u których obecności allela G nie stwierdzono ($p=0,0242$, $p<0,05$) (Tabela 25 oraz Wykres 2).

Allele SNP rs2268277 genu <i>RUNX1</i>	N	Wartość p
Allel G obecny	34	p=0,0242 Test U Manna-Whiteya
Allel G nieobecny	6	
Allel C obecny	25	p=0,1939 Test U Manna-Whiteya
Allel C nieobecny	15	
Allel A obecny	32	p=0,9569 Test T-Studenta
Allel A nieobecny	8	
Allel T obecny	24	p=0,1280 Test T-Studenta
Allel T nieobecny	16	

Tabela 25. Wyniki analizy statystycznej związku poszczególnych alleli polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby przeprowadzonej przy pomocy testu U Manna-Whitneya.



Wykres 2. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem allela G polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby.

Natomiast analiza częstości występowania poszczególnych alleli polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* nie wykazała istotnej statystycznie zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych alleli, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby (allel A; $p=0,9569$, allel T; $p=0,1280$).

Kolejnym etapem analizy była ocena związku pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, a określonym rozpoznaniem. Pacjentów sklasyfikowano także pod względem typu ostrej białaczki szpikowej określonej na podstawie klasyfikacji FAB. Dane zostały przedstawione w Tabeli 26.

Genotyp		Grupa badana							
		AML0	AML1	AML2	AML3	AML4	AML5	AML6	AML o nieokreślonym typie
SNP rs2268277 <i>RUNX1</i>	GC	0 (0,0%)	1 (2,5%)	5 (12,5%)	0 (0,0%)	2 (5,0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	9 (22,5%)
	CC	0 (0,0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	0 (0,0%)	1 (2,5%)
	GG	0 (0,0%)	2 (5,0%)	2 (5,0%)	0 (0,0%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	0 (0,0%)	7 (17,5%)
	Suma	0 (0,0%)	4 (10,0%)	8 (20,0%)	1 (2,5%)	6 (15,0%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	17 (42,5%)
SNP rs6672420 <i>RUNX3</i>	AT	0 (0,0%)	2 (5,0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	3 (7,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	9 (22,5%)
	AA	0 (0,0%)	2 (5,0%)	3 (7,5%)	0 (0,0%)	1 (2,5%)	2 (5,0%)	0 (0,0%)	8 (20,0%)
	TT	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (10,0%)	0 (0,0%)	2 (5,0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	0 (0,0%)
	Suma	0 (0,0%)	4 (10,0%)	8 (20,0%)	1 (2,5%)	6 (15,0%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	17 (42,5%)

Tabela 26. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* a typem AML według klasyfikacji FAB.

Na podstawie częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* można stwierdzić, że genotyp heterozygoty GC najczęściej występował u pacjentów ze stwierdzonym podtypem ostrej białaczki szpikowej AML2. Genotyp homozygoty zmutowanej CC występował w równych częstościach u pacjentów ze stwierdzonym AML1, AML2, AML3, AML4 oraz AML5. Genotyp homozygoty dzikiej

GG najczęściej występował u pacjentów z AML4.

W przypadku polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* można zaobserwować, że pacjenci u których stwierdzono AML4 byli najczęściej heterozygotami AT. Genotyp homozygoty dzikiej AA występował najczęściej u pacjentów z AML2. U pacjentów będących homozygotą zmutowaną TT najczęściej rozpoznawano podtyp białaczki AML2 (Tabela 26). Ze względu na zbyt małą liczbę przypadków w poszczególnych podgrupach rozpoznania pacjentów z AML analiza statystyczna nie została wykonana.

Następnie oceniono związek pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów obu polimorfizmów, a przeżywalnością pacjentów w czasie trwania trzyletniej obserwacji. Stwierdzenie zgonu pacjenta przed upływem końca czasu trwania obserwacji mogło wskazywać na gorszy przebieg choroby oraz rokowanie pacjentów. Z przeprowadzonej analizy wynika, że w badanej grupie pacjentów z AML mniej niż trzyletnie przeżycie stwierdzono u 42,5% pacjentów. W przypadku polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* największą ilość zgonów stwierdzono u pacjentów będących heterozygotami GC (22,5%), a najmniejszą u homozygot zmutowanych CC. Analizując wyniki dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* zaobserwowano, że heterozygoty AT charakteryzowały się najniższą przeżywalnością (20,0%), a pacjenci będący homozygotami zmutowanymi TT najmniejszym odsetkiem zgonów (5,0%).

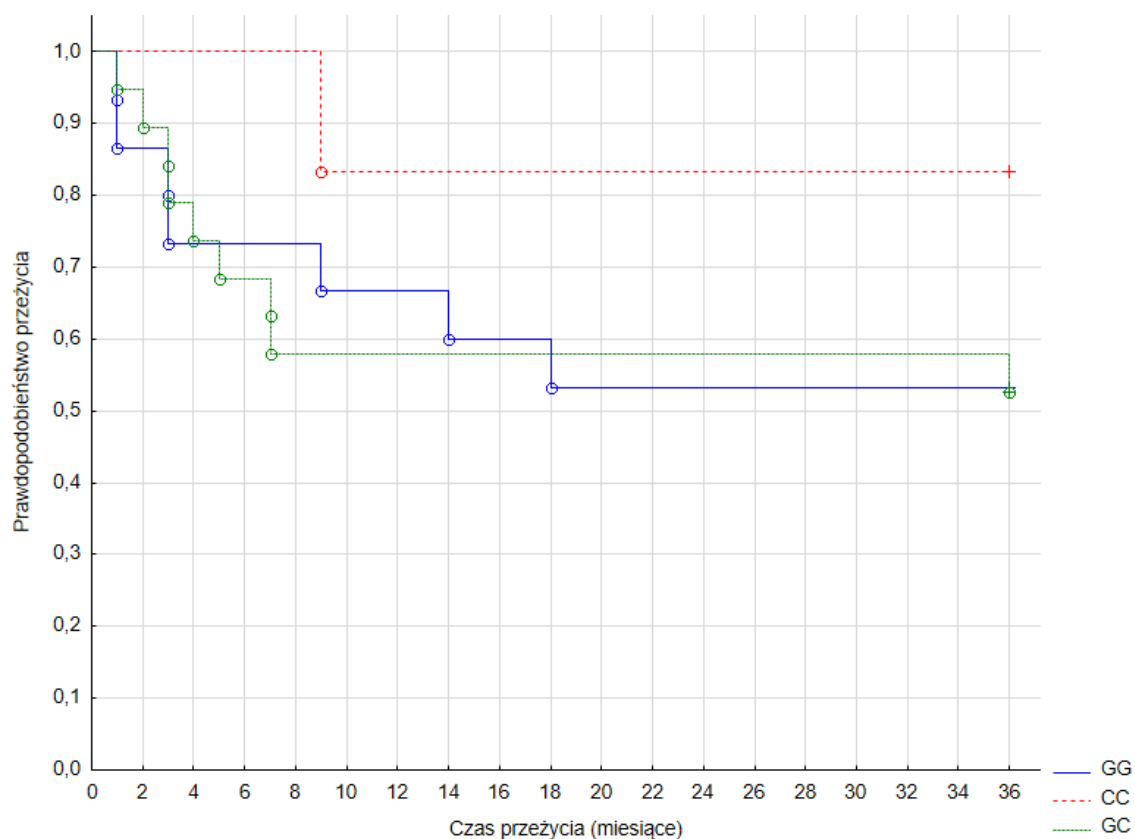
Szczegółowe dane dotyczące związku pomiędzy przeżywalnością pacjentów, a poszczególnymi genotypami polimorfizmów genów z rodziny *RUNX* przedstawia Tabela 27.

Genotypy oraz allele SNP dla genu <i>RUNX1</i>		Grupa badana		Wartość p
		Brak zgonu pacjenta N=23	Zgon pacjenta N=17	
SNP rs2268277 <i>RUNX1</i>	GC	10 (25,0%)	9 (22,5%)	p=0,3811 (Test χ^2 Pearsona)
	CC	5 (12,5%)	1 (2,5%)	
	GG	8 (20,0%)	7 (17,5%)	
	allel G obecny	18(78,3%)	16 (94,1%)	p=0,3469 (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel G nieobecny	5 (21,7%)	1 (5,9%)	
	allel C obecny	15(83,3%)	10(58,8%)	p=0,6835 (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel C nieobecny	8 (16,7%)	7(41,2%)	
SNP rs6672420 <i>RUNX3</i>	AT	8 (20,0%)	8 (20,0%)	p=0,5013 (Test χ^2 Pearsona)
	AA	9 (22,5%)	7 (17,5%)	
	TT	6 (15,0%)	2 (5,0%)	
	allel A obecny	17 (73,9%)	15 (88,2%)	p=0,4717 (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel A nieobecny	6 (26,1%)	2 (11,8%)	
	allel T obecny	14 (60,9%)	10 (58,8%)	p=0,8974 (Test χ^2 z poprawką Yatesa)
	allel T nieobecny	9 (39,1%)	7 (41,2%)	

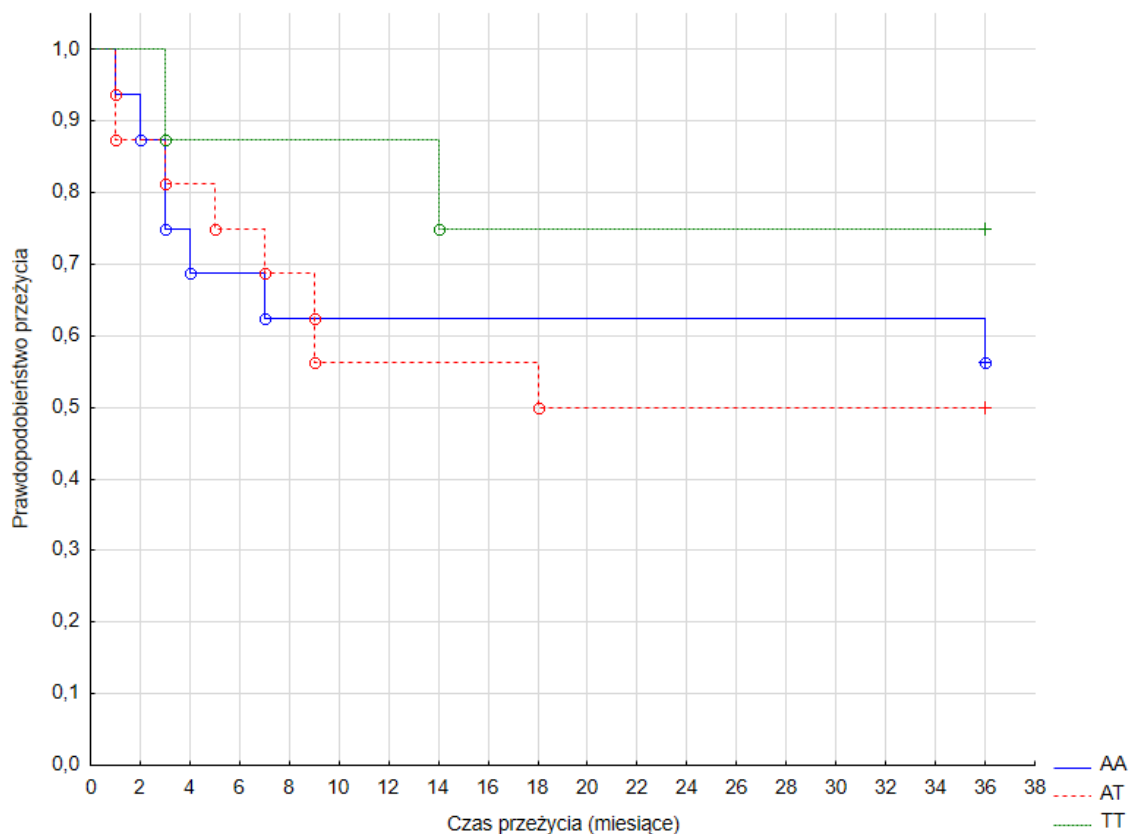
Tabela 27. Częstości występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* a przeżywalność pacjentów.

Jakkolwiek zależności te dla obu polimorfizmów badanych genów nie były istotne statystycznie (wartości p znajdują się w Tabeli 27). Zatem prawdopodobnie zarówno genotypy jak i poszczególne allele polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3* nie są związane ze zwiększoną śmiertelnością w czasie trwania 3-letniej obserwacji wśród pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Ze względu na małą liczebność grupy badanej wszystkie wyniki analiz dla polimorfizmów rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3* powinny zostać potwierdzone na większej grupie pacjentów.

Ostatnim etapem analizy statystycznej była ocena czasu przeżycia pacjentów w zależności od występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*. W celu przeprowadzenia analizy czasu przeżycia w trakcie trwania 3-letniej obserwacji dla każdego z pacjentów wykonano krzywe Kaplana-Meiera (Wykresy 3 i 4).



Wykres 3. Wykres przedstawiający krzywe przeżycia pacjentów z AML w zależności od występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*. Odpowiednio GG-homozygota dzika, CC-homozygota zmutowana, GC-heterozygota.



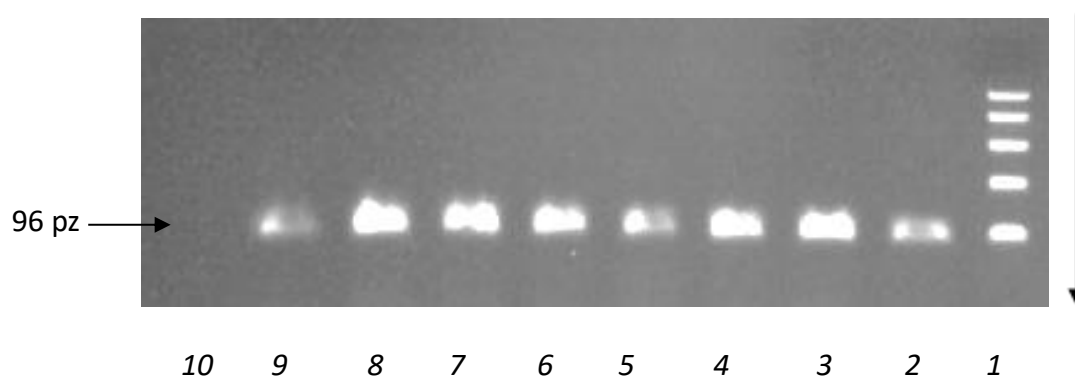
Wykres 4. Wykres przedstawiający krzywe przeżycia pacjentów z AML w zależności od występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*. Odpowiednio: AA-homozygota dzika, AT-heterozygota, TT-homozygota zmutowana.

Analiza powyższych wykresów pozwoliła stwierdzić, że w przypadku polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* homozygoty zmutowane CC charakteryzowały się najwyższym prawdopodobieństwem przeżycia w trakcie trwania 3-letniej obserwacji. Najmniejsze prawdopodobieństwo przeżycia występowało u heterozygot GC oraz homozygot dzikich GG. Warto nadmienić, że w przypadku heterozygot GC zaobserwowano największą liczbę zgonów w pierwszym roku obserwacji pacjentów. Analizując wyniki dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* zaobserwowano, że dla homozygot zmutowanych TT prawdopodobieństwo przeżycia w trakcie trwania 3-letniej obserwacji pacjentów było najwyższe, a najniższe dla heterozygot AT. Ponadto w przypadku heterozygot AT zaobserwowano największą śmiertelność w pierwszym roku obserwacji pacjentów.

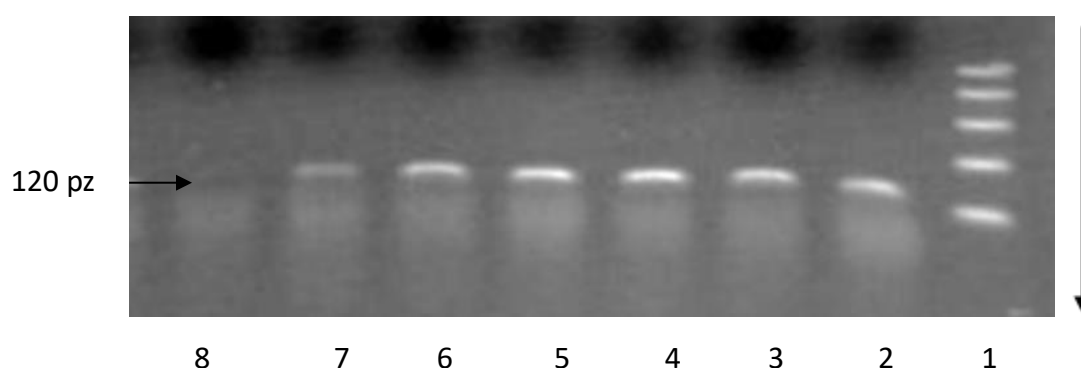
Jednak przeprowadzona za pomocą testu log-rank analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy czasem przeżycia pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową a występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* ($p=0,3265$) oraz rs6672420 genu *RUNX3* ($p=0,4882$).

12.4 Ocena poziomów ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych

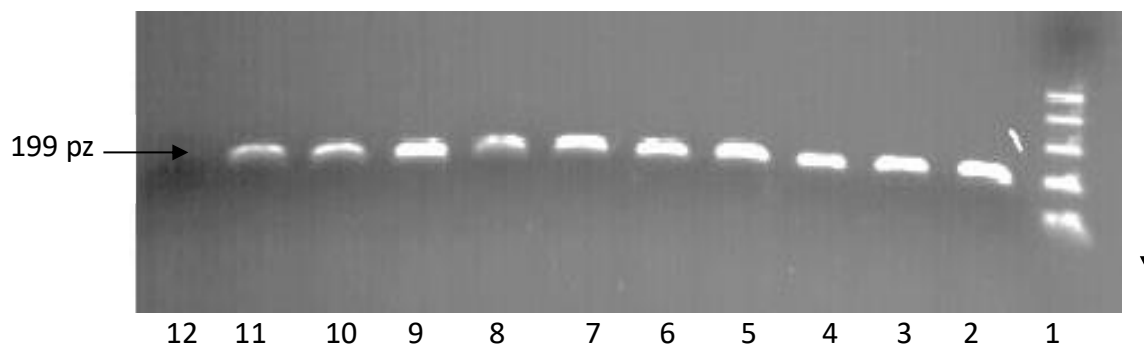
Przed przystąpieniem do analizy ilościowej względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* przeprowadzono analizę jakościową obecności ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych. Analizę jakościową badanych genów przeprowadzono we wszystkich 46 próbach stanowiących grupę badaną. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne dla wybranych genów przedstawiają odpowiednio Ryciny 24,25,26,27.



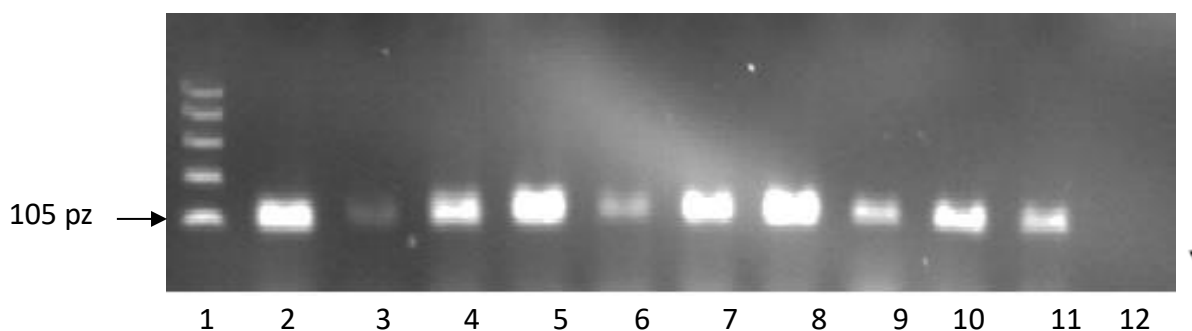
Rycina 24. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *RUNX1*. Studzienka nr 1- wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki od 2 do 5 oraz od 8 do 9- próby badane zawierające produkt o wielkości 96 pz. studzienka nr10- kontrola ujemna



Rycina 25. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *RUNX3*. Studzienka nr 1- wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki od 2 do 7- próby badane zawierające produkt o wielkości 120 pz, studzienka nr 8-kontrola ujemna.



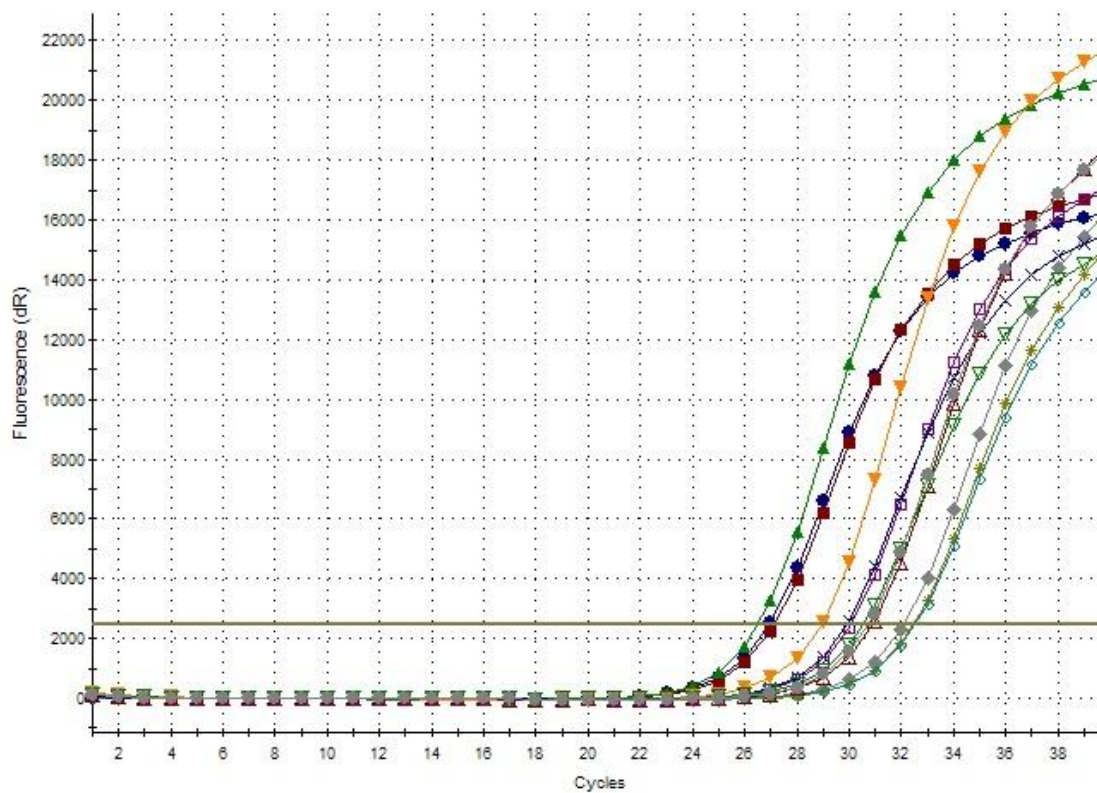
Rycina 26. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *CEBPA*. Studzienka nr 1- wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki od 2 do 11- próby badane (produkt o wielkości 199 pz), studzienka nr 12 to kontrola ujemna reakcji PCR.



Rycina 27. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *c-MYC*. Studzienka nr 1- wzorzec masy molekularnej 100-500 pz; studzienki od 2 do 11- próby badane (produkt o wielkości 105 pz), studzienka nr 12 to kontrola ujemna reakcji PCR.

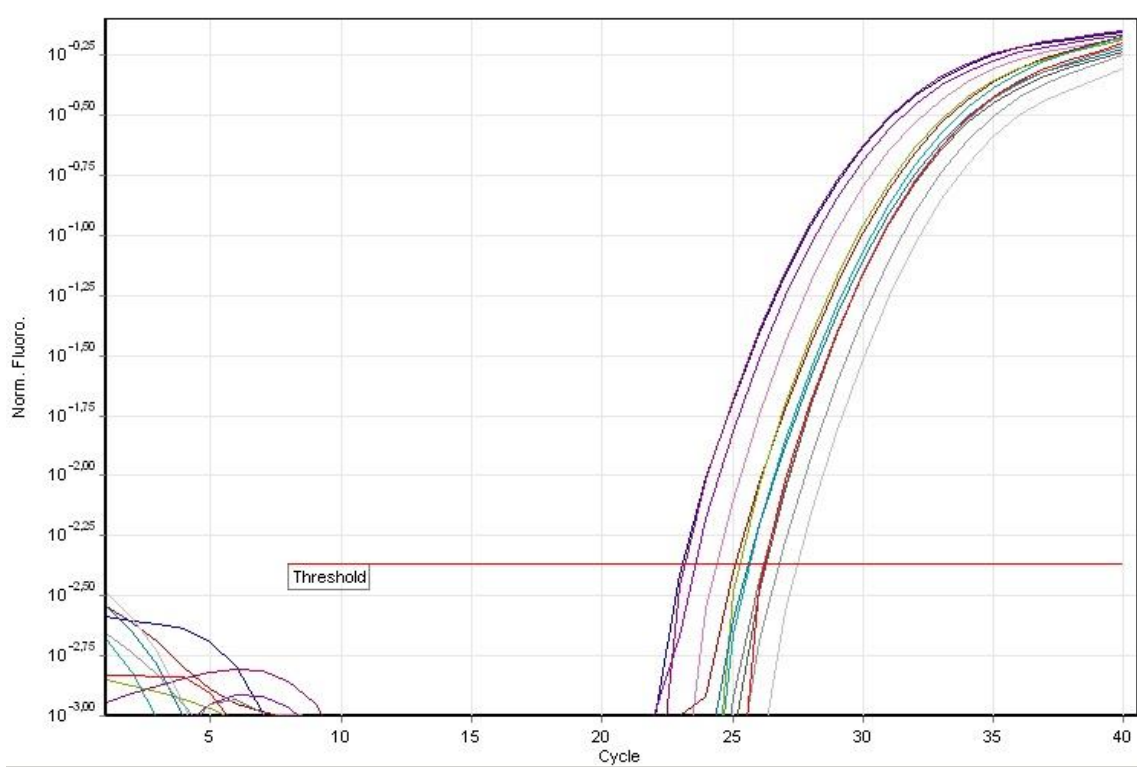
Obecność ekspresji genów *RUNX1* i *RUNX3* stwierdzona została w 43 próbach co stanowiło 93,5% wszystkich prób cDNA, a ekspresji genu *c-MYC* została określona u 44 pacjentów, co stanowiło 95,6% wszystkich prób natomiast obecność ekspresji genu *CEBPA* została stwierdzona w 45 próbach, co stanowiło 97,8% wszystkich prób cDNA stanowiących grupę badaną.

Kolejnym etapem badań była ilościowa ocena poziomów ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* z zastosowaniem metody Real-Time PCR. Jako gen referencyjny względem którego oceniono poziom ekspresji wszystkich badanych genów wykorzystano, gen metabolizmu podstawowego, *GAPDH*. Ilościową ocenę względnego poziomu ekspresji badanych genów oceniono tylko w tych próbach w których potwierdzono jakościowo ekspresję badanych genów. Przykładowe krzywe amplifikacji dla genu *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* przedstawiają kolejno Ryciny 28,29,30,31.



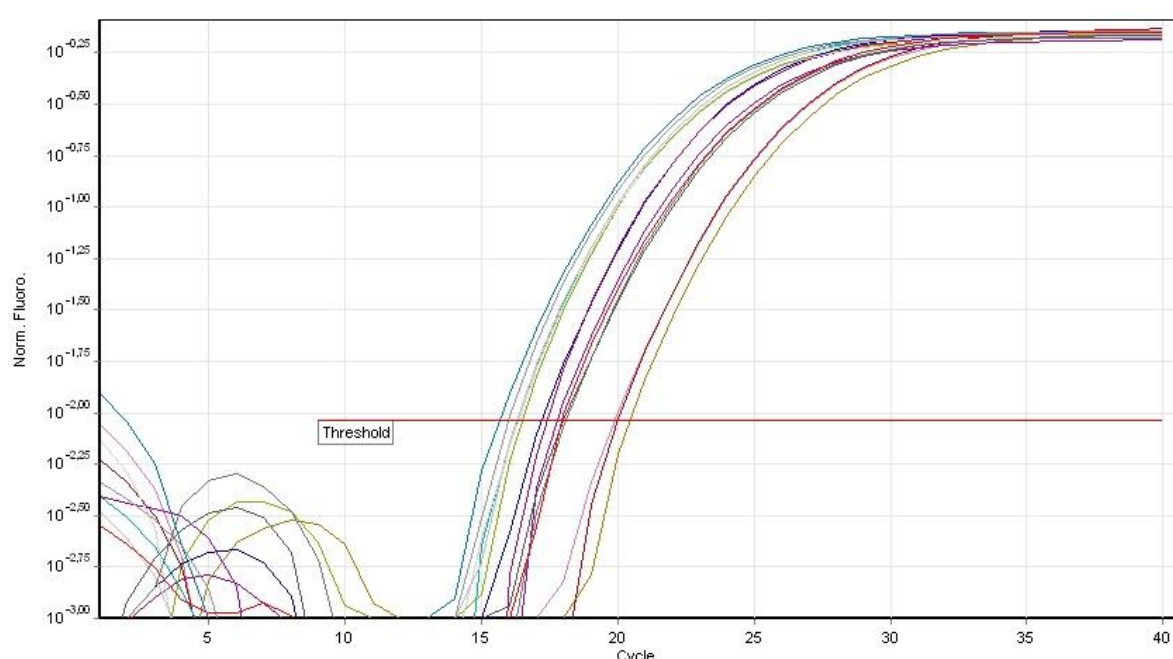
Rycina 28. Przykładowa krzywa amplifikacji genu badanego *RUNX1*.

Oś X przedstawia kolejne cykle natomiast oś Y przedstawia poziom znormalizowanej fluorescencji.



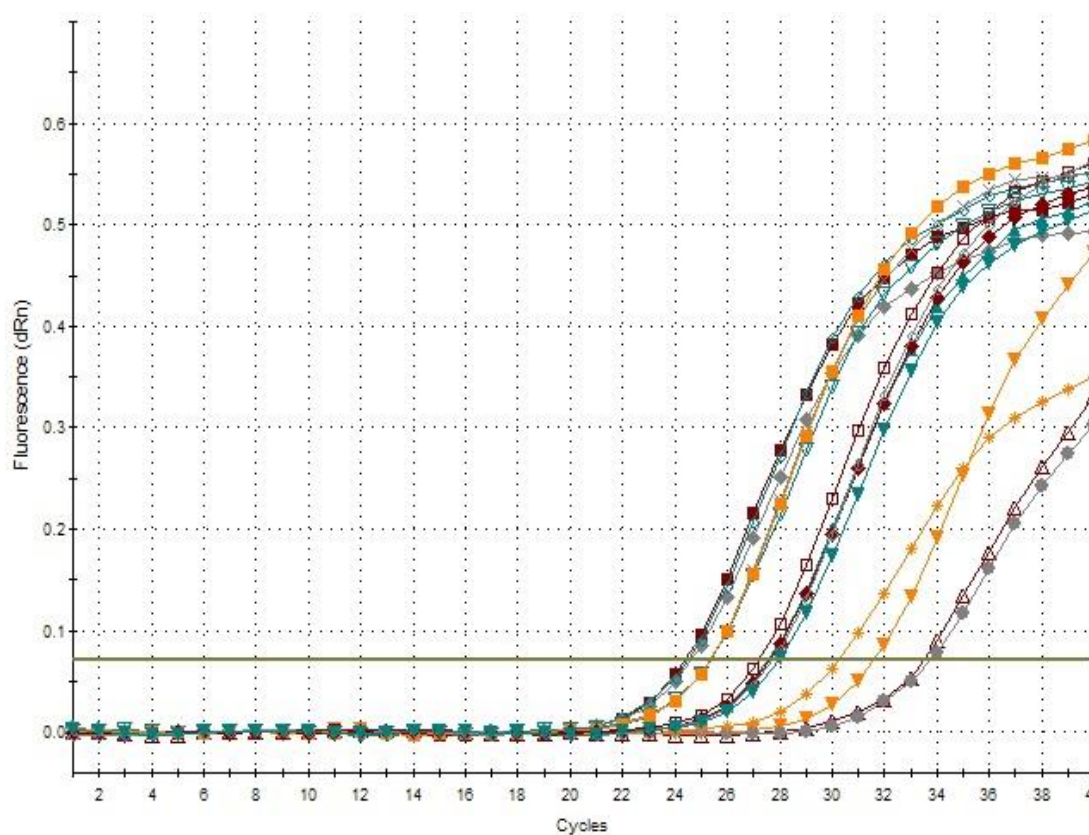
Rycina 29. Przykładowa krzywa amplifikacji genu badanego *RUNX3*.

Oś X przedstawia kolejne cykle natomiast oś Y przedstawia poziom znormalizowanej fluorescencji.



Rycina 30. Przykładowa krzywa amplifikacji genu badanego *CEBPA*.

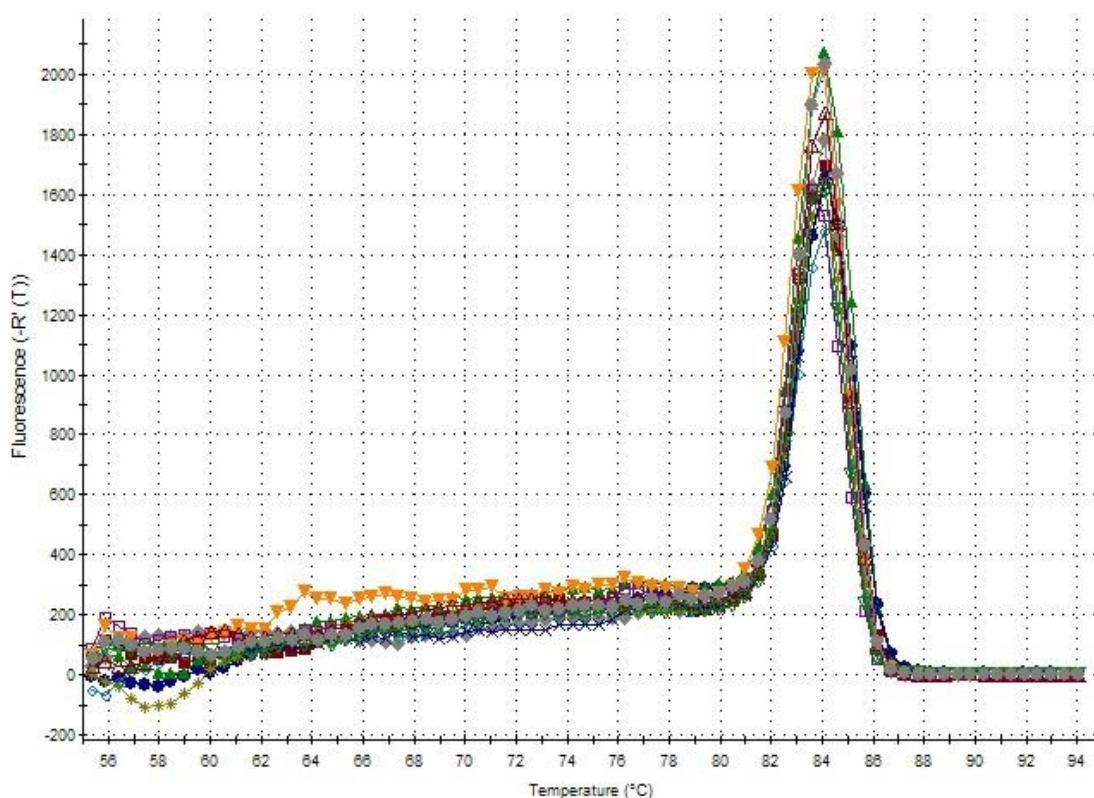
Oś X przedstawia kolejne cykle natomiast oś Y przedstawia poziom znormalizowanej fluorescencji.



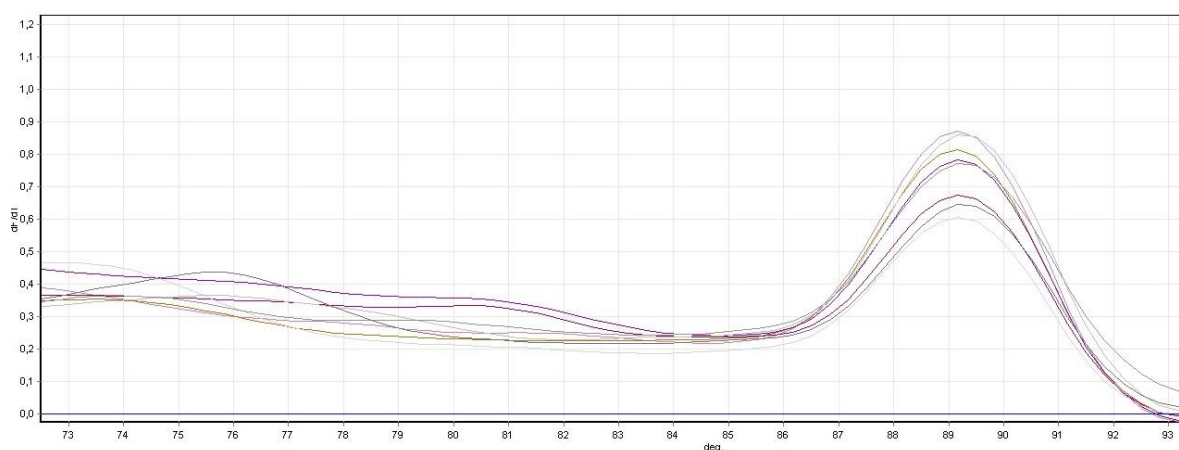
Rycina 31. Przykładowa krzywa amplifikacji genu *c-MYC*.

Oś X przedstawia kolejne cykle natomiast oś Y przedstawia poziom znormalizowanej fluorescencji.

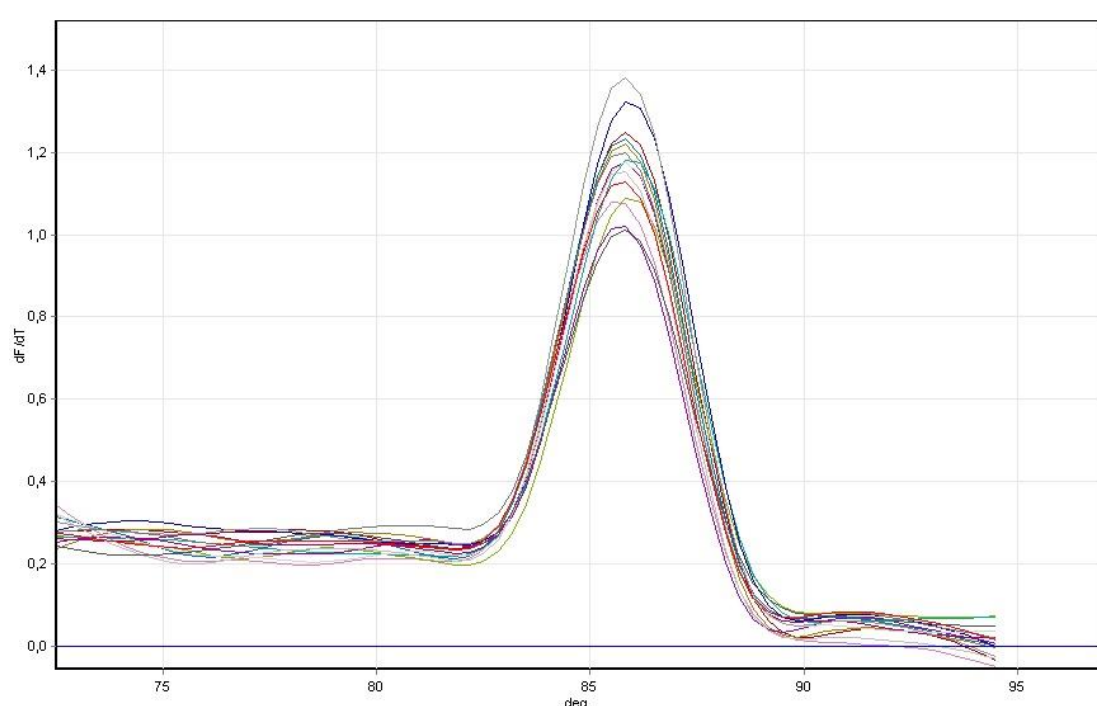
Dla każdego z genów badanych oraz dla genu referencyjnego przeprowadzono również analizę krzywych topnienia produktów reakcji, która miała na celu potwierdzenia specyficzności otrzymanego produktu reakcji Real-Time PCR. Przykładowe krzywe topnienia dla analizowanych czynników transkrypcyjnych przedstawiają kolejno Ryciny 32,33,34,35.



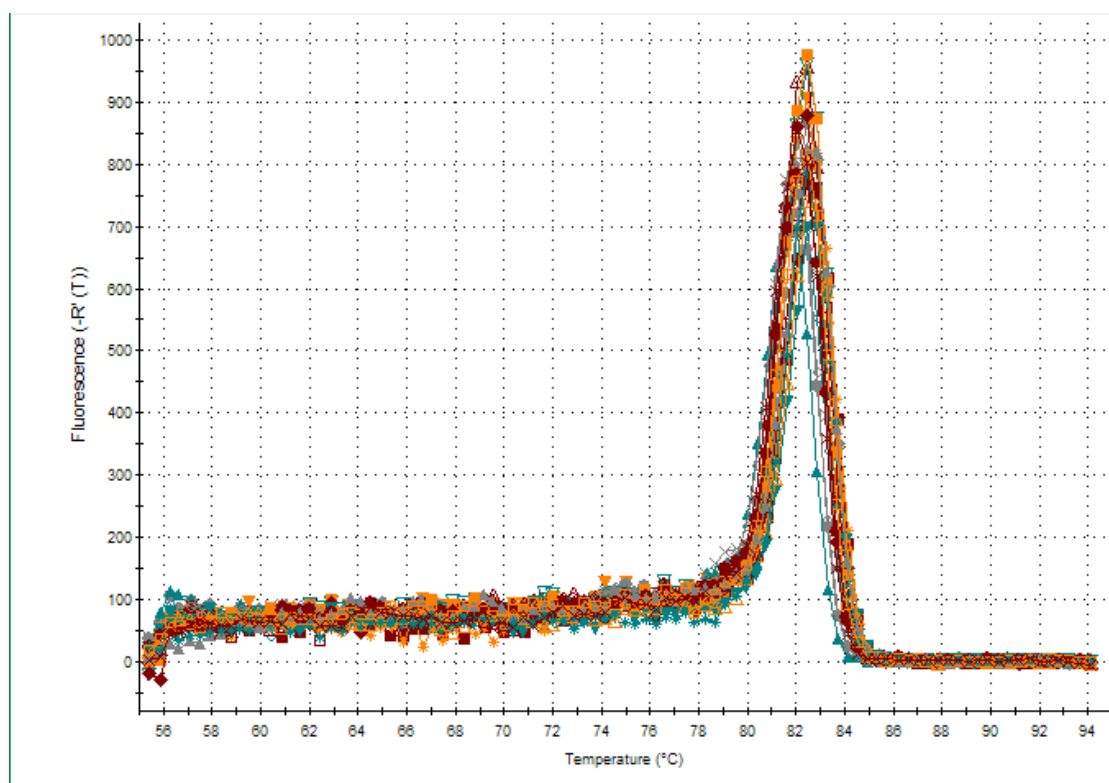
Rycina 32. Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu badanego *RUNX1*.



Rycina 33. Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu badanego *RUNX3*.



Rycina 34. Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu badanego *CEBPA*.



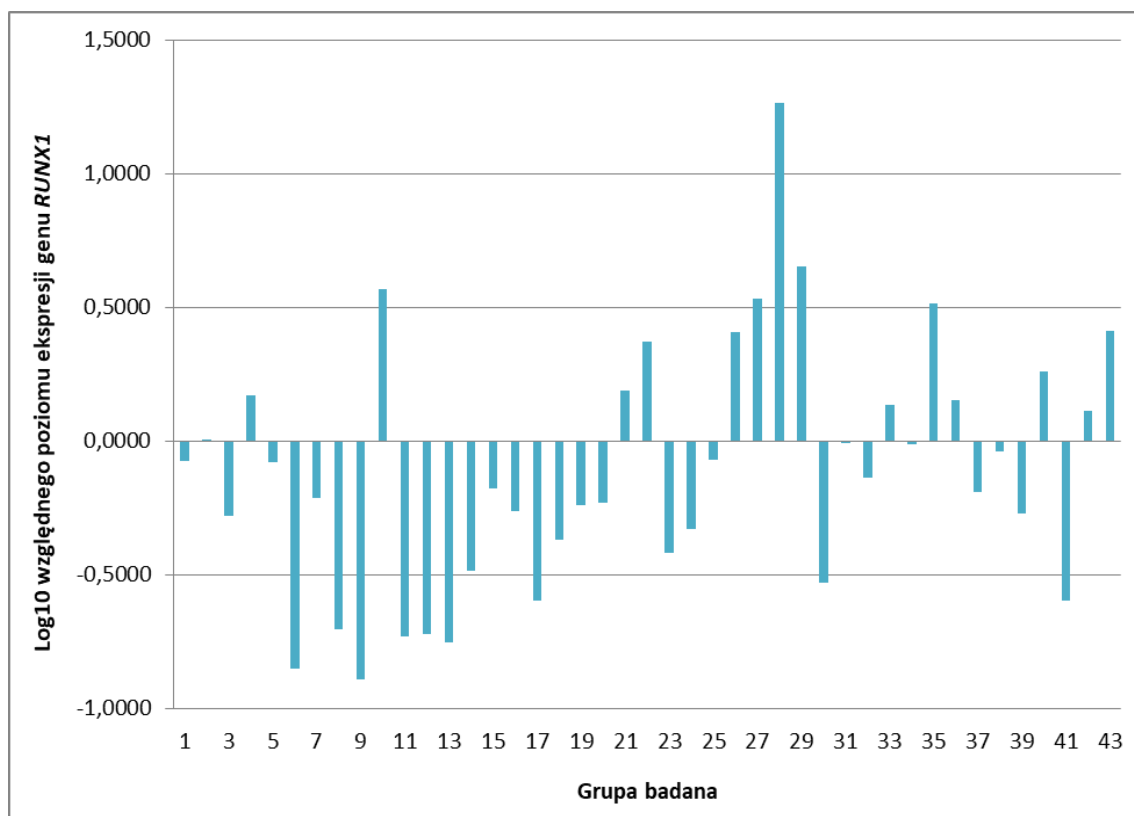
Rycina 35. Przykładowa krzywa topnienia produktu genu badanego *c-MYC*.

Uzyskane wyniki względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* przedstawiono w Tabeli 28.

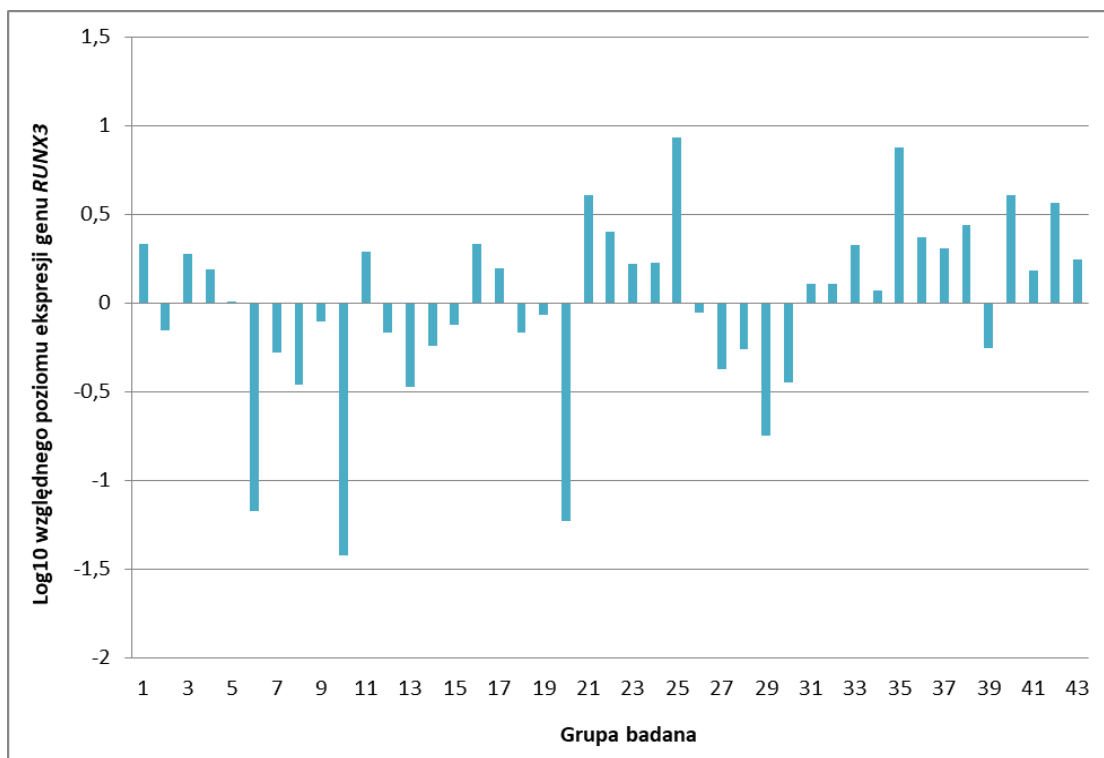
Względny poziom ekspresji genów:	Liczebność populacji badanej N	Mediana	Min.	Max.	Dolny kwartył	Górny kwartył	Kwartył. Rozstęp
<i>RUNX1</i>	43	0,7285	0,1282	18,3741	0,3823	1,4739	1,0915
<i>RUNX3</i>	43	1,2760	0,0379	8,5445	0,5529	2,1214	1,5685
<i>CEBPA</i>	44	1,5748	0,0107	3,9384	0,5688	2,5124	1,9435
<i>c-MYC</i>	43	0,4937	0,0532	2,0657	0,2253	1,0163	0,7910

Tabela. 28. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* w grupie badanej.

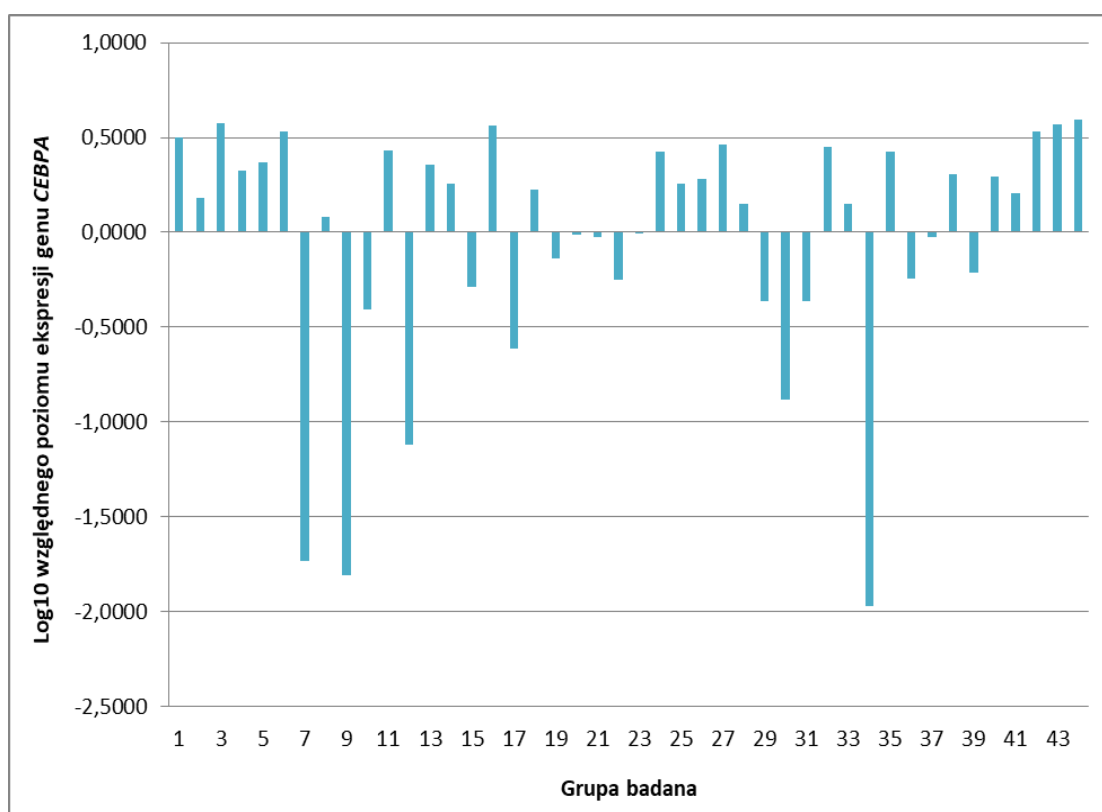
Z analizy median względnych poziomów ekspresji wybranych genów wynika, że w obrębie badanej grupy pacjentów z AML najwyższą ekspresję wykazywał gen *CEBPA* (1,5748), a gen *c-MYC* najniższą (0,4937). Zaobserwowano, również że ekspresja każdego z badanych genów była zróżnicowana. Aby lepiej zobrazować zebrane wyniki, dane przedstawiono również na wykresie jako log10 z wartości R (określającej względny poziom ekspresji badanych genów (Wykresy 5,6,7,8).



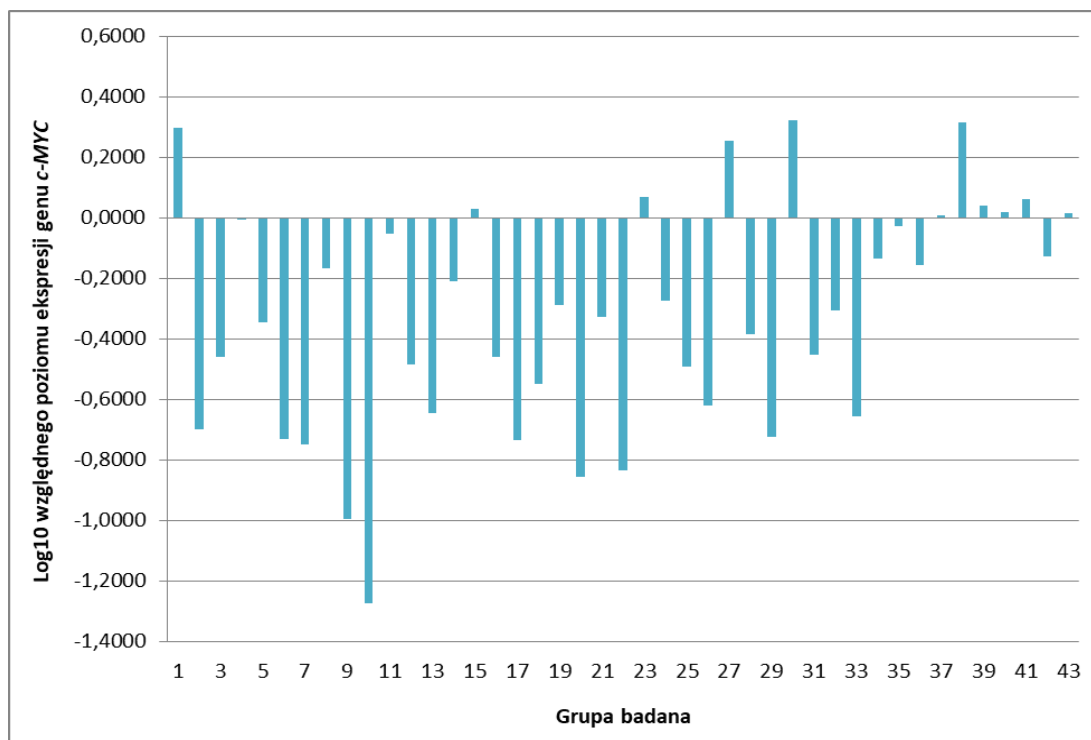
Wykres 5. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *RUNX1*.



Wykres 6. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *RUNX3*.



Wykres 7. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *CEBPA*.



Wykres 8. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *c-MYC*

12.5 Względny poziom ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* w porównaniu do cech demograficznych oraz kliniczno-patologicznych pacjentów z AML

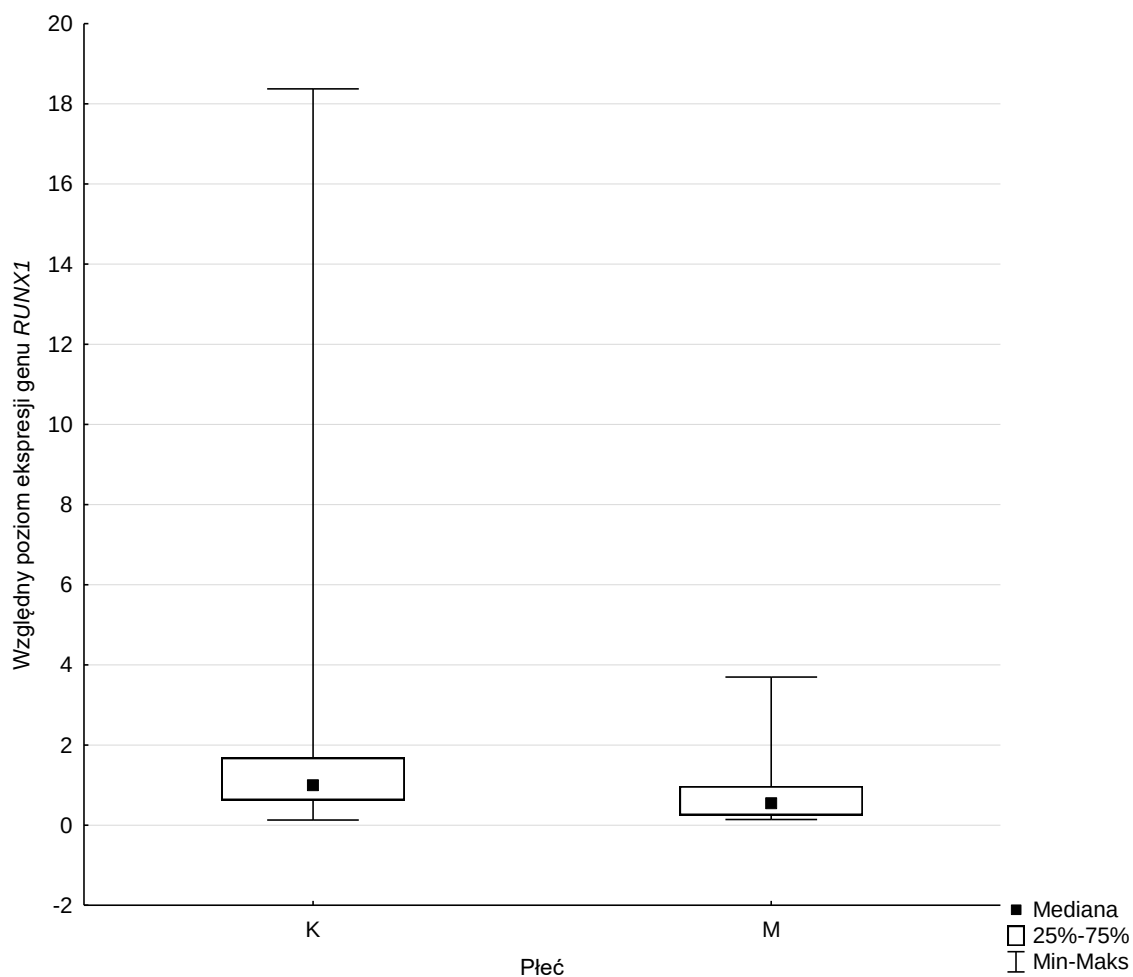
W kolejnym etapie analizy wyniki względnego poziomu ekspresji każdego z badanych genów skorelowano z uzyskanymi od pacjentów danymi demograficznymi: płcią oraz wiekiem w momencie rozpoznania choroby oraz cechami kliniczno-patologicznymi jak: rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej wg klasyfikacji FAB, stwierdzenie mniej niż trzyletniego przeżycia pacjentów od czasu rozpoznania choroby.

Pierwszym etapem analizy statystycznej było poszukiwanie zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*, a płcią pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. W tym celu pacjentów z grupy badanej podzielono na dwie podgrupy względem płci. Według danych epidemiologicznych mężczyźni chorują na ostrą białaczkę szpikową nieco częściej niż kobiety [Szczeklik, 2018]. Istotna wydaje się ocena roli ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych oraz jej potencjalnego związku z wystąpieniem oraz przebiegiem ostrej białaczki szpikowej w zależności od płci pacjentów. Szczegółowe dane dotyczące analizy względnych poziomów ekspresji wybranych genów, a płcią pacjentów przedstawia Tabela 29.

Względny poziom ekspresji genów	Płeć	N	Śr.	Med.	Min.	Max.	Dolny kwarty I	Górny kwarty I	Kwarty I. Rozstęp	Odch. Stan- dard.	Wartość p
<i>RUNX1</i>	K	20	-	0,9986	0,1282	18,3741	0,6251	1,6838	1,0587	-	p=0,0445 Test U Manna-Whitneya
	M	23	-	0,5470	0,1412	3,6968	0,2528	0,9724	0,7195	-	
<i>RUNX3</i>	K	22	-	1,6164	0,1792	8,5445	0,6806	2,5227	1,8421	-	p=0,1416 Test U Manna-Whitneya
	M	21	-	1,0035	0,0379	7,4902	0,5529	1,6605	1,1077	-	
<i>CEBPA</i>	K	21	1,6011	-	0,0155	3,9383	-	-	-	1,2402	p=0,8325 Test T-studenta
	M	23	1,6782	-	0,0107	3,7867	-	-	-	1,1654	
<i>c-MYC</i>	K	21	-	0,6830	0,1007	2,0657	0,2398	1,0473	0,8075	-	p=0,1698 Test U Manna-Whitneya
	M	22	-	0,3499	0,0532	1,1487	0,2253	0,8827	0,6574	-	

Tabela 29. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji wybranych genów w porównaniu do płci pacjentów.

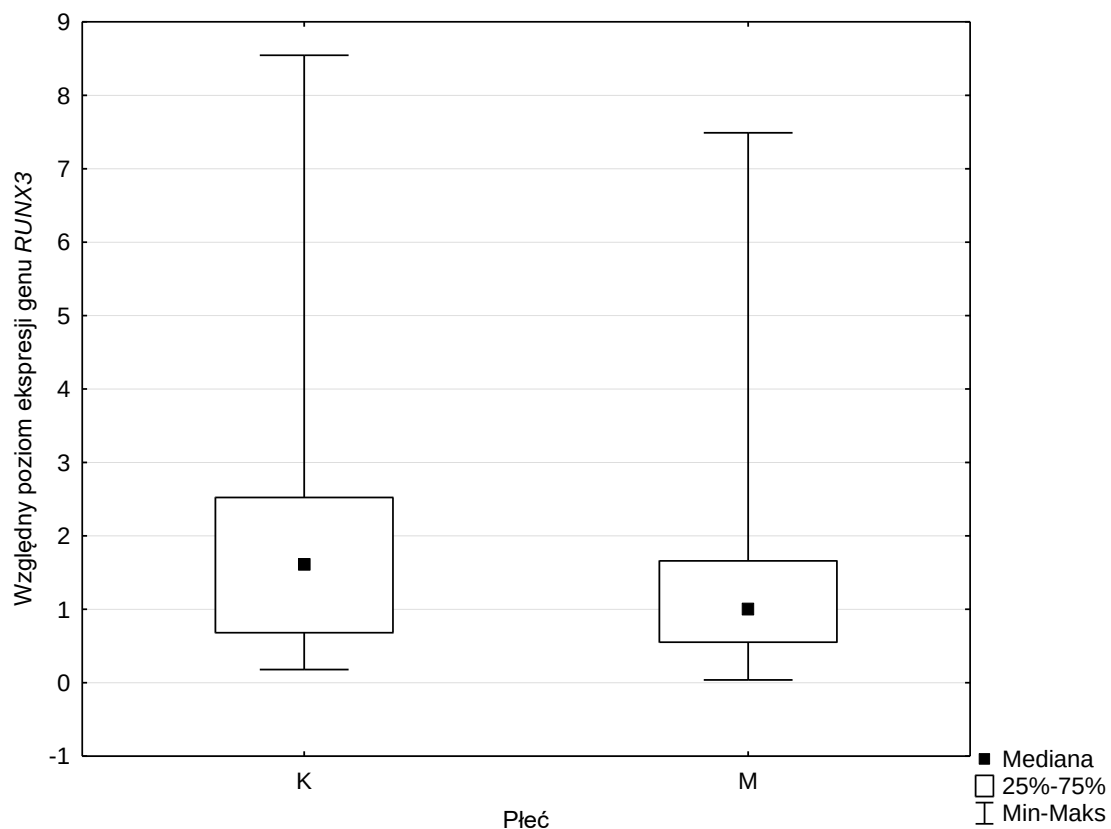
Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1*, a płcią pacjentów ($p=0,0445$, $p<0,05$). Względny poziom ekspresji genu *RUNX1* był wyższy w podgrupie kobiet w porównaniu do podgrupy mężczyzn (odpowiednio: 0.9986 oraz 0.5470) (Wykres 9 i Tabela 29). Różnice w poziomie ekspresji genu *RUNX1* w obrębie obu płci mogą potencjalnie wpływać na odmienny przebieg ostrej białaczki szpikowej u obu płci.



Wykres 9. Wykres zależności względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1* od płci pacjentów.

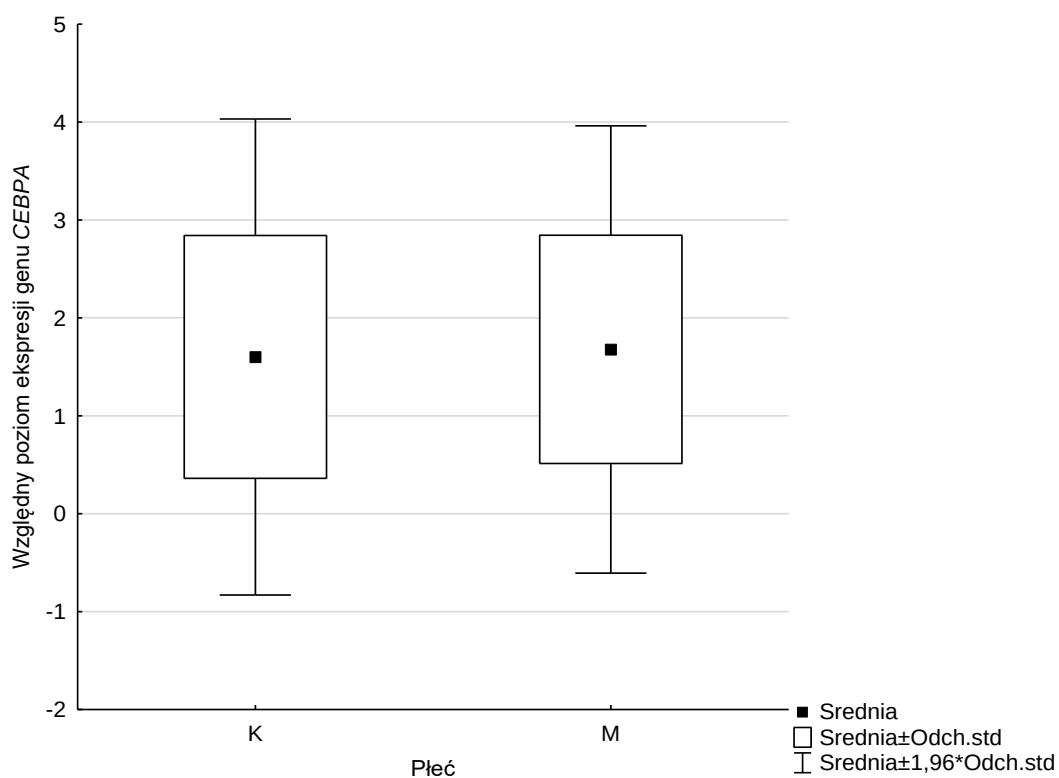
$p=0,0445$, $p<0,05$.

Dla genów *RUNX3* oraz *c-MYC* zaobserwowano tendencje do występowania wyższych względnych poziomów ekspresji u kobiet w porównaniu do mężczyzn (odpowiednio dla *RUNX3*: 1,6164 oraz 1,0035; odpowiednio dla *c-MYC*: 0,6830 oraz 0,3499) (Wykresy 10 i 12 oraz Tabela 29). Jakkolwiek zależności te nie były istotne statystycznie (odpowiednio $p=0,1416$; $p=0,1698$). Natomiast w przypadku genu *CEBPA* nieco wyższe poziomy ekspresji występowały w podgrupie mężczyzn (Wykres 11). Uzyskane wyniki nie były jednak statystycznie istotne ($p=0,8325$) (Tabela 29).



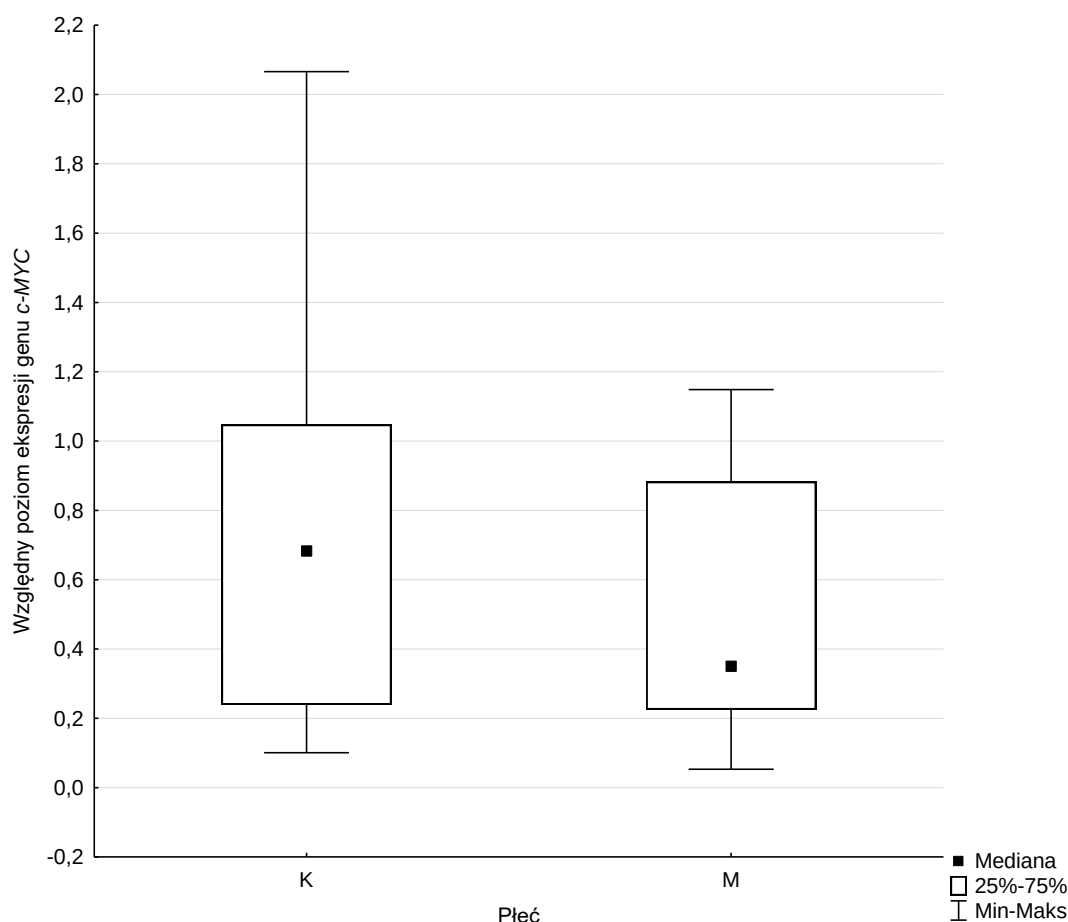
Wykres 10. Wykres zależności względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3* w zależności od płci pacjentów.

$p=0,1416$, $p>0,05$.



Wykres 11. Wykres zależności względnego poziomu ekspresji genu *CEBPA* od płci pacjentów.

$p=0,8325$, $p>0,05$.

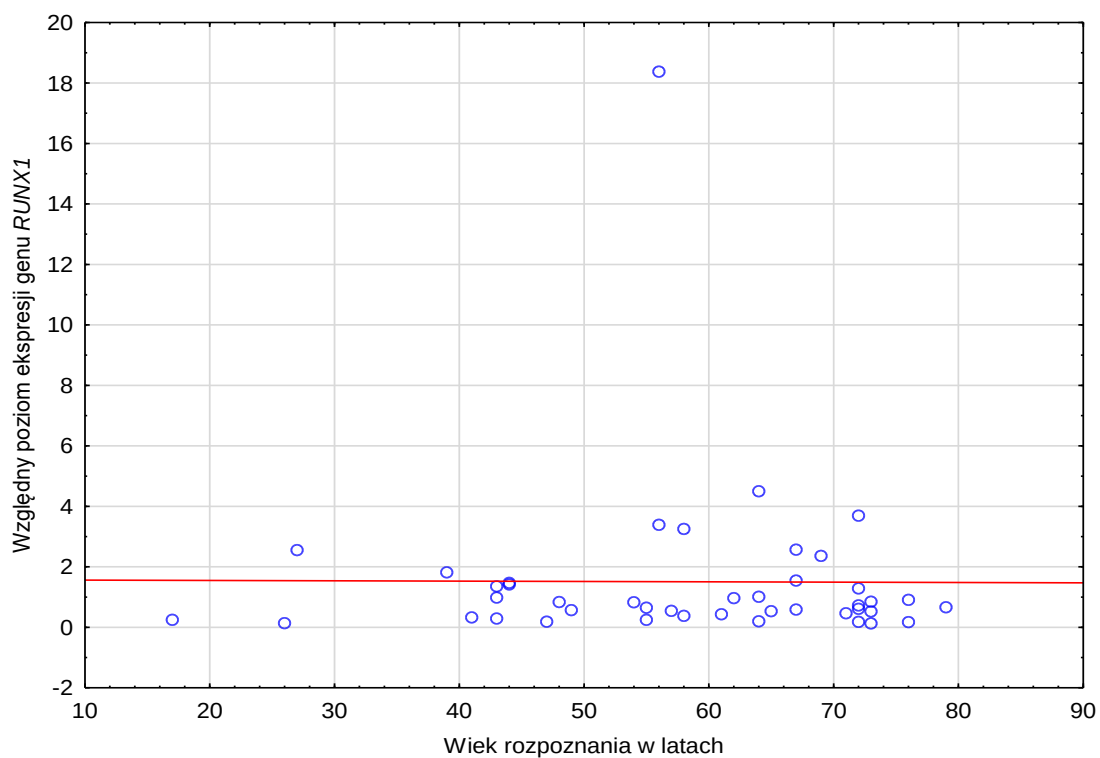


Wykres. 12. Względny poziom ekspresji genu *c-MYC* w zależności od płci pacjentów.

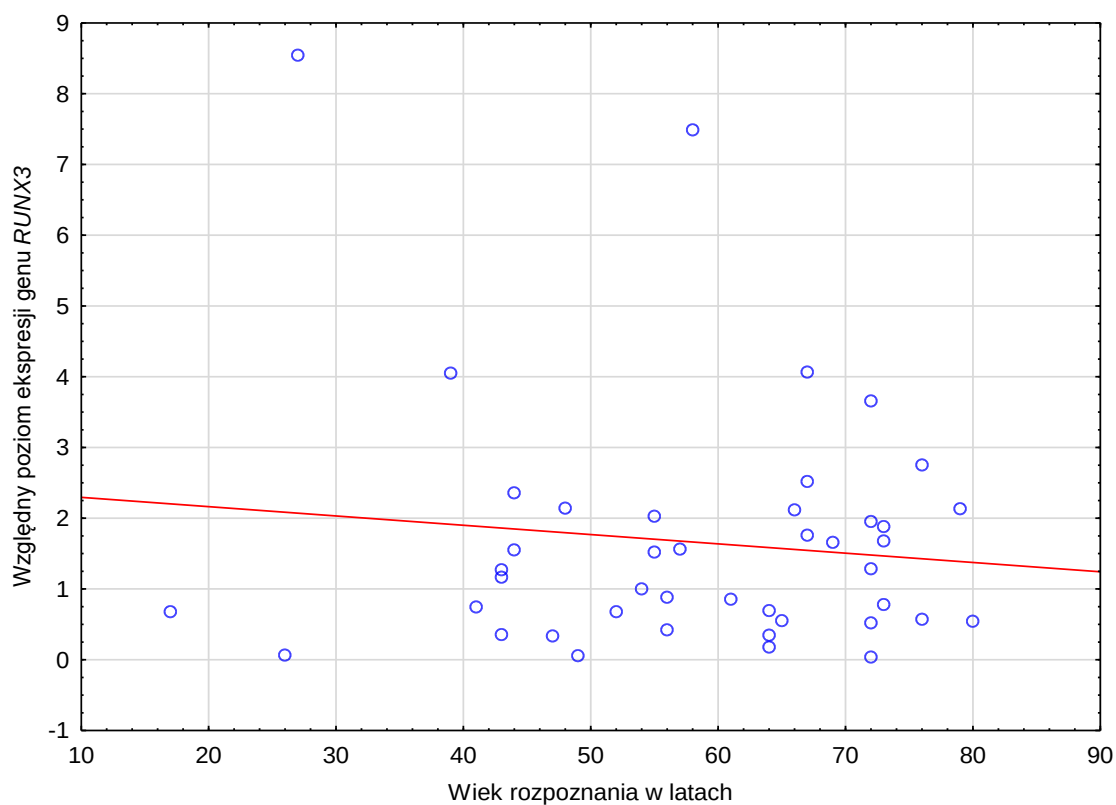
$p=0,1698$, $p>0,05$.

W kolejnym etapie analizy oceniono zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby. Średni wiek pacjentów w momencie rozpoznania choroby u których oceniono poziom ekspresji: genu *RUNX1* wynosił 57,9 lat; dla genu *RUNX3* było to 58,6 lat, w przypadku genu *CEBPA* było to 58,3 lat a dla genu *c-MYC* średni wiek rozpoznania choroby wynosił 58,0 lat.

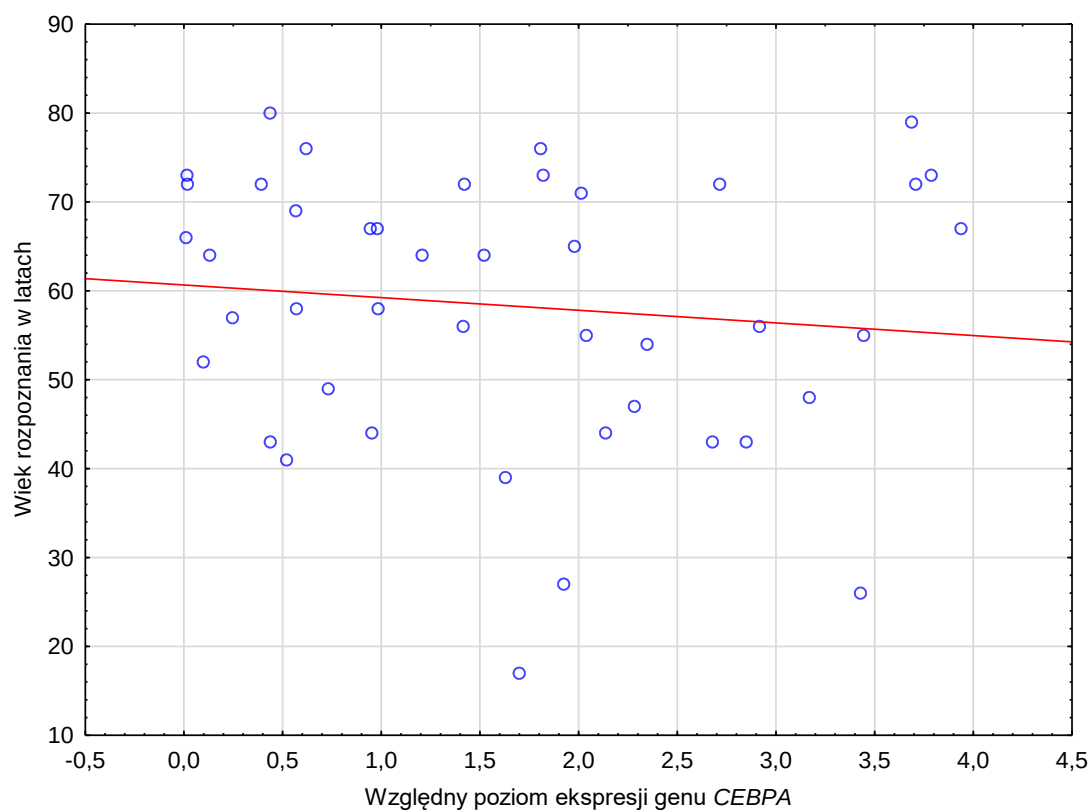
Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnej zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji badanych genów, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby (Wykresy 13, 14, 15, 16). Prawdopodobnie wiek pacjentów w momencie rozpoznania choroby nie jest związany ze względnymi poziomami ekspresji badanych genów.



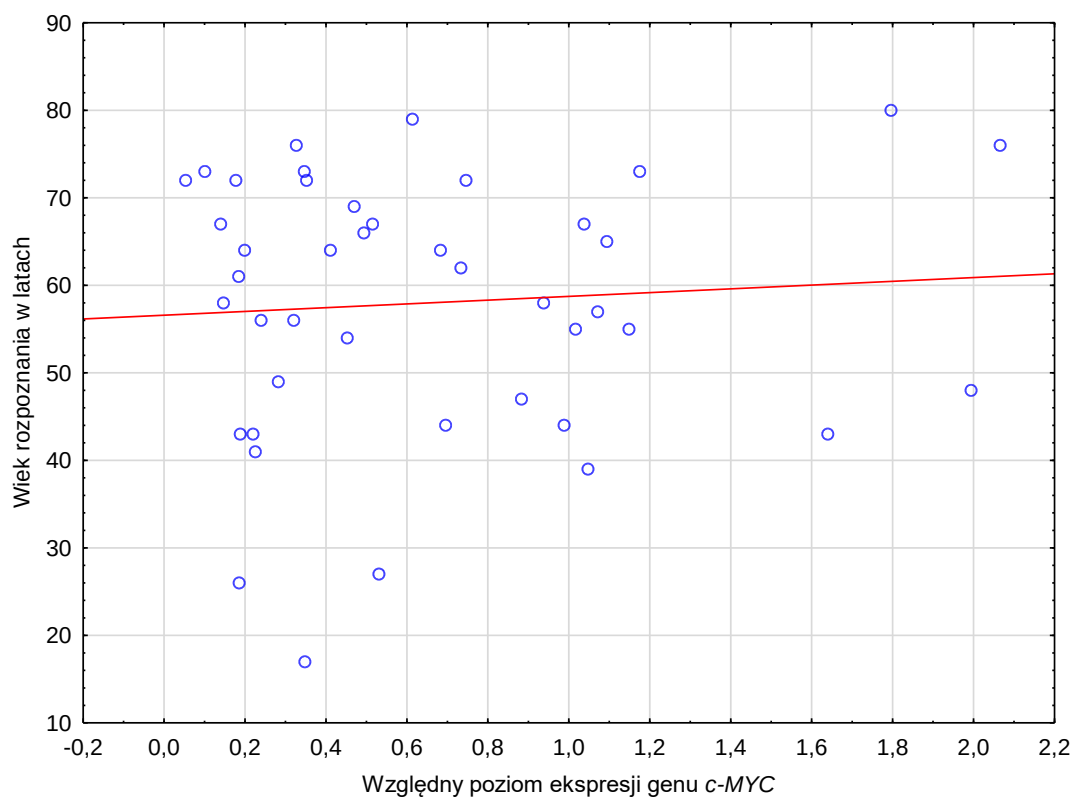
Wykres 13. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby; $p=0,9698$, $p>0,05$.



Wykres 14. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji mRNA genu *RUNX3* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby; $p=0,4684$, $p>0,05$.



Wykres 15. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CEBPA* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby; $p=0,4679$, $p>0,05$.



Wykres 16. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *c-MYC* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby; $p=0,6344$, $p>0,05$.

Następnie pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową podzielono na podgrupy w zależności od podtypu diagnozowanej ostrej białaczki szpikowej (według klasyfikacji FAB). Po podziale otrzymano następujące podgrupy pacjentów: AML 0 (tzw. AML o niskim stopniu zróżnicowania), AML1 (podtyp ostrej białaczki mieloblastycznej bez cech różnicowania), AML2 (podtyp ostrej białaczki mieloblastycznej o cechach dojrzewania), AML3 (podtyp ostrej białaczki promielocytowej), AML4 (podtyp ostrej białaczki mielomonocytowej), podtyp AML5 oraz podtyp ostrej białaczkę erytroblastyczną AML6. U pacjentów u których nie udało się rozpoznać typu ostrej białaczki szpikowej zakwalifikowano do grupy AML o nieokreślonym typie. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji badanych genów w odpowiednich podgrupach rozpoznania AML przedstawia Tabela 30.

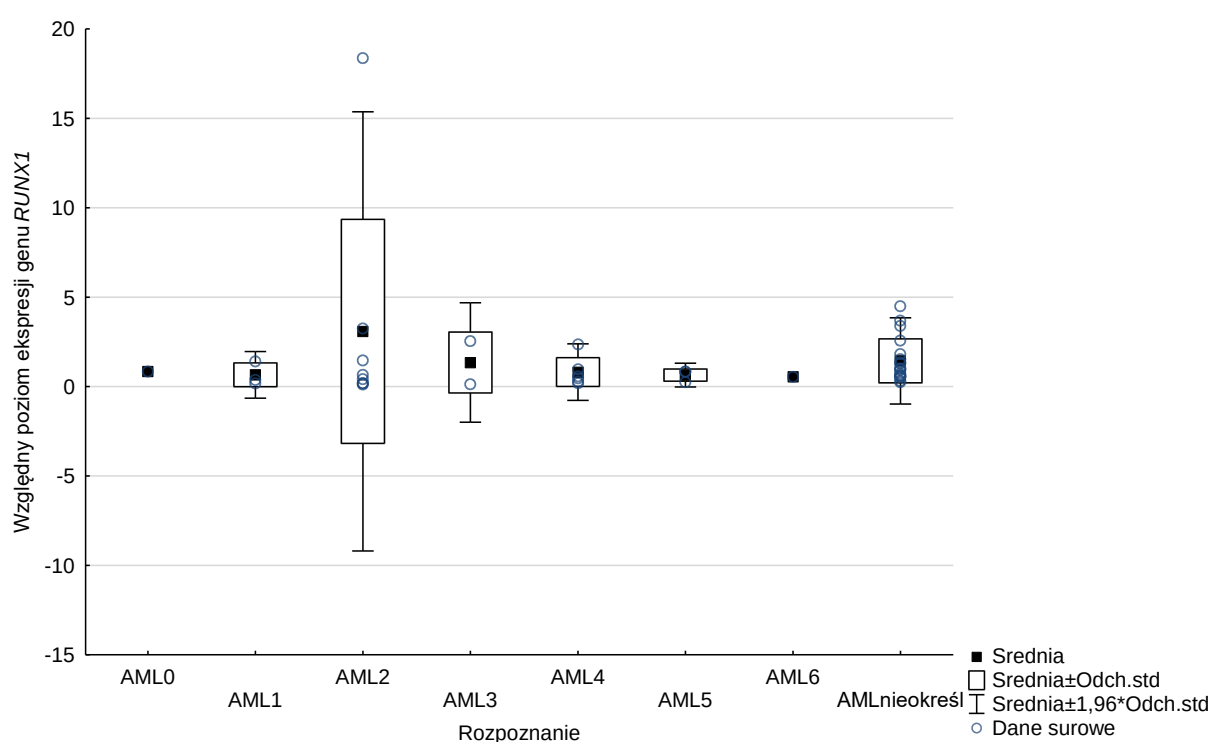
Względny poziom ekspresji genu <i>RUNX1</i>	Rozpoznanie AML wg. FAB	N	Śr.	Min.	Max.	Odch. Standardowe
	AML 0	1	-	-	-	-
	AML 1	3	0,6588	0,1771	1,4171	0,6646
	AML 2	8	3,0872	0,1282	18,3741	6,2660
	AML 3	2	1,3463	0,1412	2,5514	1,7042
	AML 4	6	0,8113	0,1968	2,3613	0,8057
	AML 5	3	0,6421	0,2528	0,8407	0,3372
	AML 6	1	-	-	-	-
	AML o nieokreślonym typie	19	1,4373	0,2528	4,5042	1,2312
Względny poziom ekspresji genu <i>RUNX3</i>	Rozpoznanie AML wg. FAB	N	Śr.	Min.	Max.	Odch. Standardowe
	AML 0	1	-	-	-	-
	AML 1	3	1,2050	0,5750	2,3592	1,0010
	AML 2	8	1,9422	0,3372	7,4902	2,3412
	AML 3	2	4,3057	0,0670	8,5445	5,9945
	AML 4	4	0,6064	0,0588	1,6605	0,7163
	AML 5	3	1,2760	0,6806	2,1435	0,7685
	AML 6	1	-	-	-	-
	AML nieokreślonym typie	21	1,6321	0,0379	4,0699	1,2115

Względny poziom ekspresji genu <i>CEBPA</i>	Rozpoznanie AML wg. FAB	N	Śr.	Min.	Max.	Odch. Standardowe
	AML 0	1	-	-	-	-
	AML 1	4	0,9609	0,0978	1,8078	0,6983
	AML 2	7	1,8320	0,0155	3,6873	1,2638
	AML 3	2	2,6764	1,9242	3,4285	1,0637
	AML 4	5	0,9913	0,4376	2,0129	0,6410
	AML 5	3	2,4051	1,6985	3,1695	0,7372
	AML 6	1	-	-	-	-
	AML nieokreślonym typie	21	1,7125	0,0107	3,9383	1,3342
Względny poziom ekspresji genu <i>c-MYC</i>	Rozpoznanie AML wg. FAB	N	Śr.	Min.	Max.	Odch. Standardowe
	AML 0	1	-	-	-	-
	AML 1	3	0,3896	0,1462	0,6958	0,2801
	AML 2	8	0,5001	0,0532	0,9885	0,3992
	AML 3	2	0,3585	0,1860	0,5309	0,2439
	AML 4	5	0,4715	0,1886	0,7337	0,2394
	AML 5	3	0,9315	0,3479	1,9941	0,9217
	AML 6	1	-	-	-	-
	AML nieokreśl.	20	0,7496	0,1397	2,0657	0,5821

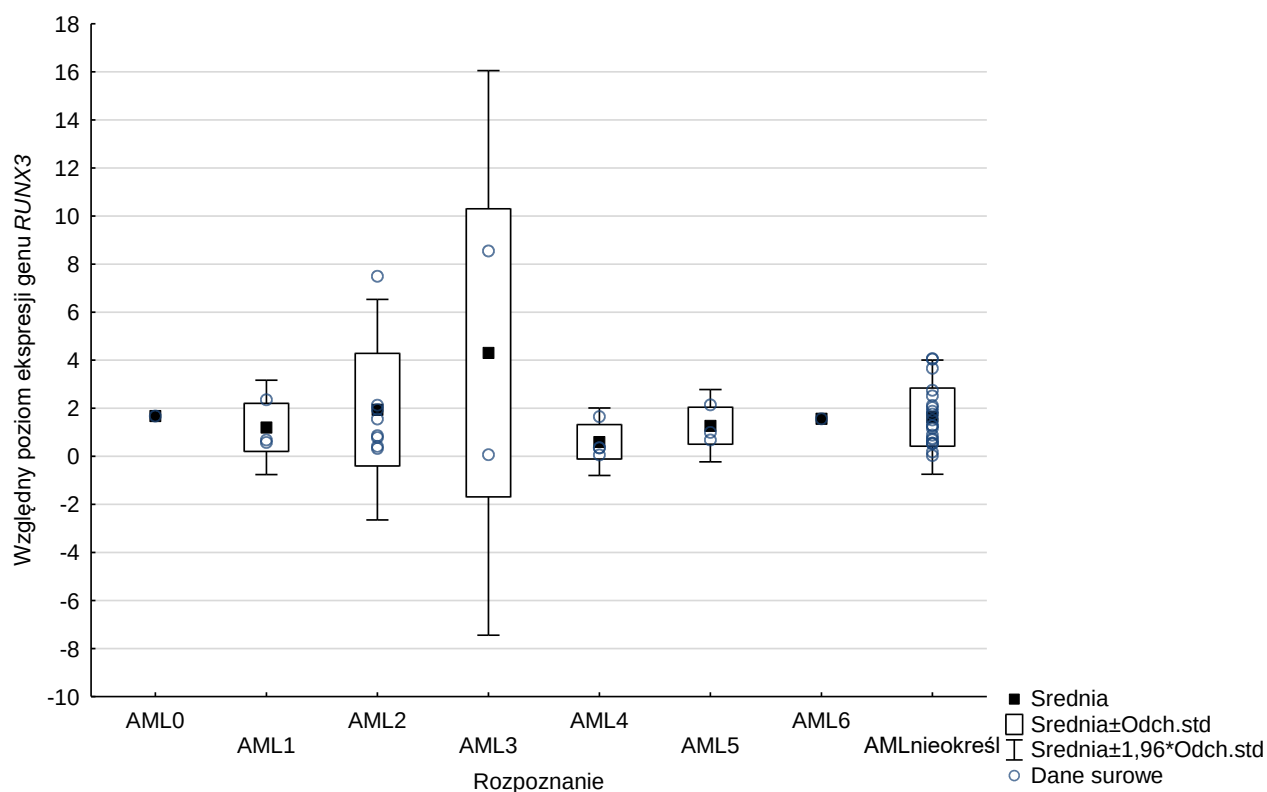
Tabela 30. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji wybranych genów w poszczególnych podtypach AML według klasyfikacji FAB.

Na podstawie analizy średnich wartości względnego poziomu ekspresji genów uzyskanych w odpowiednich podgrupach ostrych białaczek szpikowych według klasyfikacji FAB można stwierdzić, że najwyższy poziom ekspresji genu *RUNX1* zaobserwowano wśród pacjentów ze stwierdzonym AML2 (3,0872). Najniższy poziom ekspresji tego genu występowały w podgrupie pacjentów ze stwierdzonym AML5 (0,6421). W przypadku genu *RUNX3* najwyższy względny poziom ekspresji zaobserwowano wśród pacjentów z rozpoznaniem AML3 (4,3057), a najniższy wśród

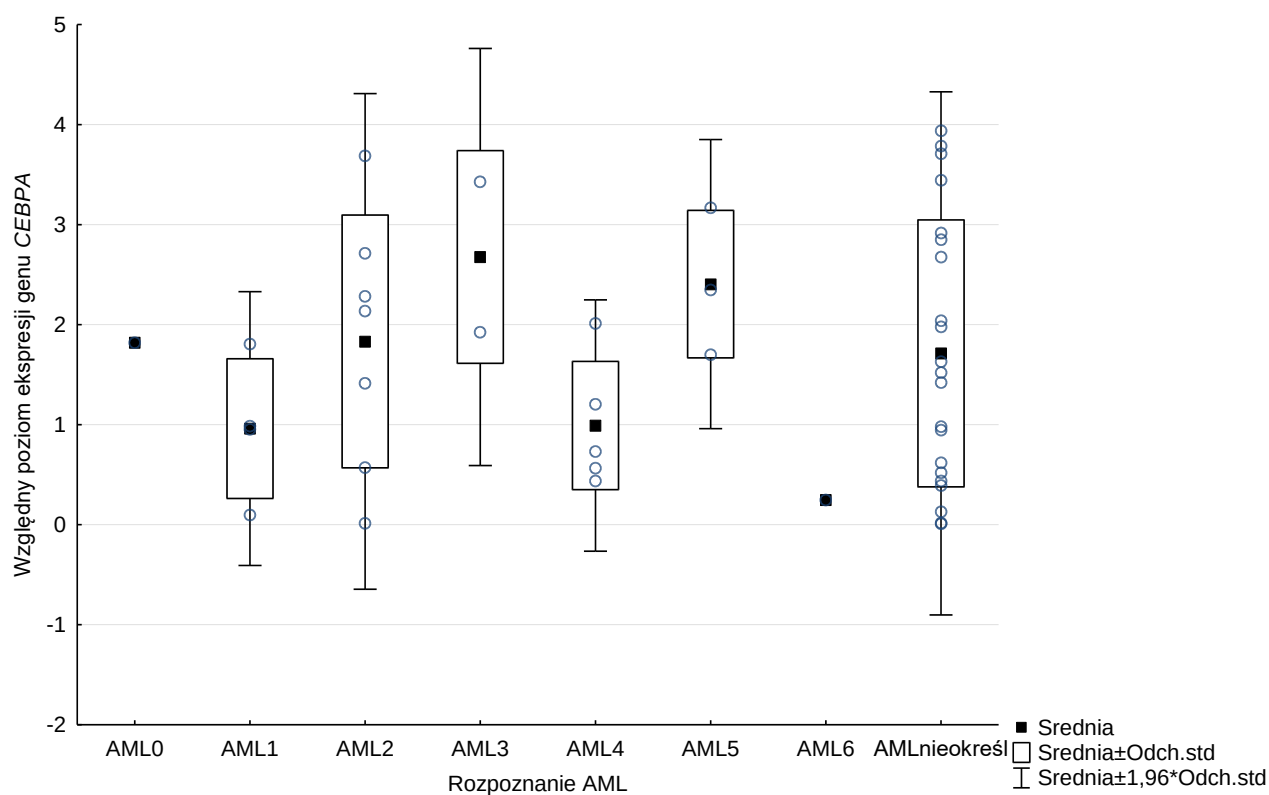
pacjentów z podtypem AML1. Najwyższe poziomy mRNA genu *CEBPA* zaobserwowano w podtypie białaczki AML2 (2,6764), najniższe podobnie jak w przypadku genu *RUNX3* w typie AML1. Zaobserwowano również, że ekspresja genu *c-MYC* była najwyższa u pacjentów z podtypem białaczki AML5, a najniższa u pacjentów z podtypem białaczki AML3. Ze względu na małe licznosci pacjentów w poszczególnych podgrupach analiza statystyczna nie została przeprowadzona. Wykresy 17, 18, 19, 20 przedstawiają analizę względnego poziomu ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych w zależności od podtypu białaczki według klasyfikacji FAB.



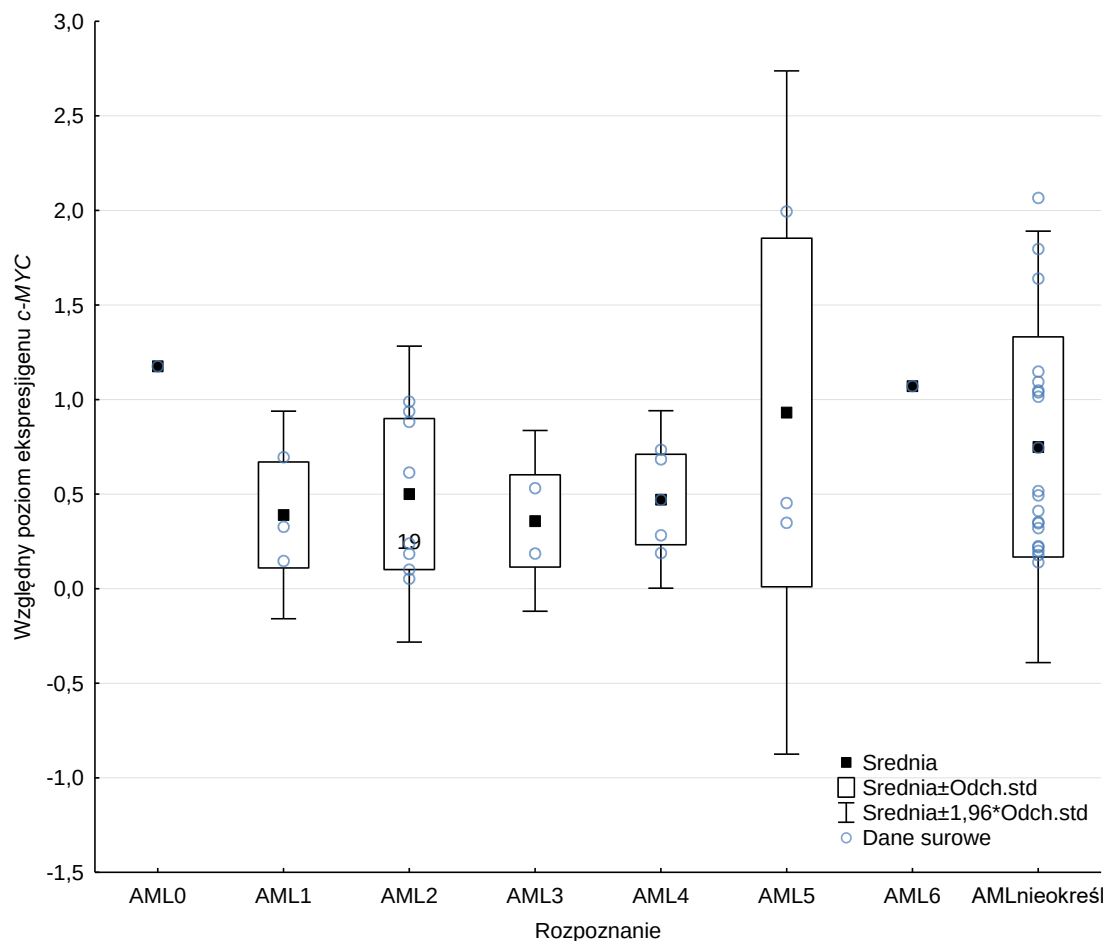
Wykres 17. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *RUNX1* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej.



Wykres 18. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *RUNX3* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej.



Wykres 19. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *CEBPA* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej.



Wykres 20. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *c-MYC* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej.

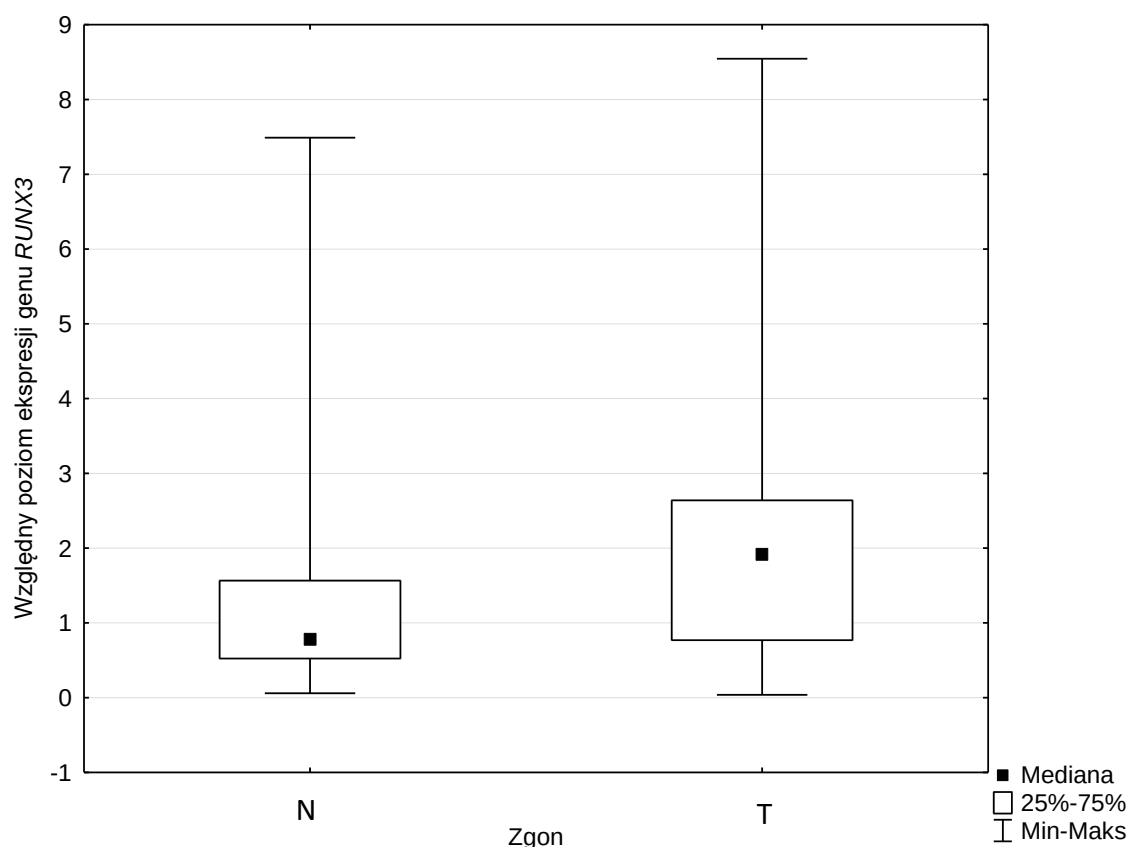
W kolejnym etapie analizy, grupę pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową, podzielono pod kątem wystąpienia zgonu do końca czasu trwania 3-letniej obserwacji. Stwierdzenie krótszego czasu przeżycia pacjentów z AML świadczyło o gorszym rokowaniu oraz bardziej agresywnym przebiegu choroby. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji badanych genów, a czasem przeżycia pacjentów przedstawiono w Tabeli 31.

Względny poziom ekspresji genów	Zgon	N	Mediana	Min.	Max.	Dolny kwartyl	Górny kwartyl	Kwartyl. Roztęp	Wartość p
<i>RUNX1</i>	T	19	0,7285	0,1771	18,3741	0,4282	2,3613	1,9331	p=0,4411 Test U Manna-Whitneya
	N	24	0,7234	0,1282	4,5042	0,3549	1,1846	0,8296	
<i>RUNX3</i>	T	20	1,9211	0,0379	8,5445	0,7691	2,6385	1,8694	p=0,0373 Test U Manna-Whitneya
	N	23	0,7810	0,0588	7,4902	0,5230	1,5655	1,0425	
<i>CEBPA</i>	T	19	1,6293	0,0107	3,7867	0,9445	2,7149	1,7705	p=0,5858 Test U Manna-Whitneya
	N	25	1,5202	0,0155	3,9383	0,4376	2,3472	1,9010	
<i>c-MYC</i>	T	19	0,4698	0,0532	2,0658	0,3208	0,6830	0,3622	p=0,8437 Test U Manna-Whitneya
	N	24	0,7147	0,1007	1,9940	0,2096	1,0830	0,8734	

Tabela 31. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji wybranych genów w podgrupie pacjentów u których stwierdzono zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu.

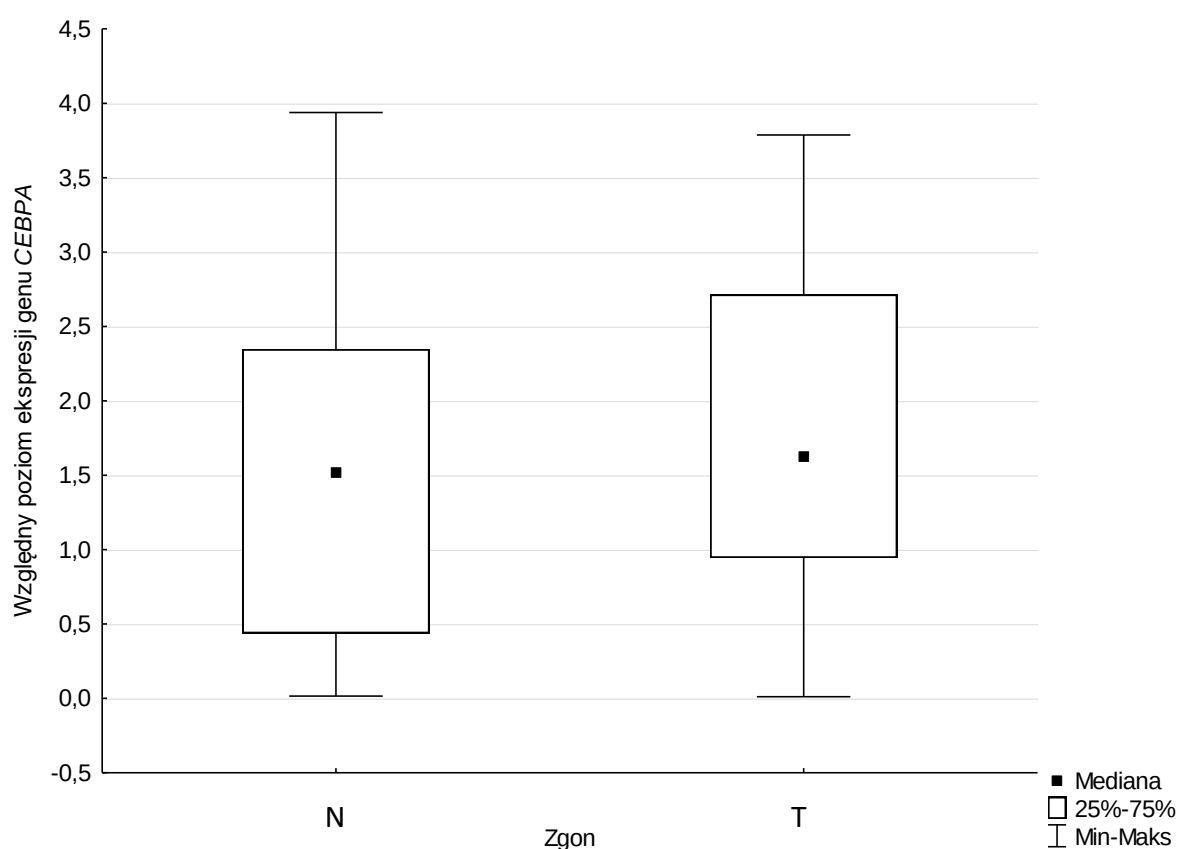
Kolejnym etapem tej części analizy była ocena zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*, a czasem przeżycia w trakcie trwania trzyletniej obserwacji. W tym celu grupę badaną podzielono na dwie podgrupy: pacjentów u których nie stwierdzono zgonu w trakcie trwania 3-letniej obserwacji oraz podgrupę pacjentów u których w trakcie obserwacji stwierdzono zgon, a następnie przeprowadzono analizę dla każdego z badanych genów. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę we względnym poziomie transkryptu genu *RUNX3* pomiędzy tymi podgrupami pacjentów (p=0,0373) (Wykres 21). Wykazano, że względny poziom ekspresji genu *RUNX3* był statystycznie istotnie wyższy u pacjentów, u których do końca trwania czasu obserwacji trwającej trzy lata stwierdzono krótszy czas przeżycia w porównaniu do pacjentów, u których czas przeżycia był dłuższy.

Prawdopodobnie zwiększony poziom ekspresji genu *RUNX3* może być związany z gorszym rokowaniem dla pacjentów oraz zwiększonym wskaźnikiem śmiertelności wśród grupy badanej. Podwyższony poziom ekspresji tego genu może być zatem złym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z AML.

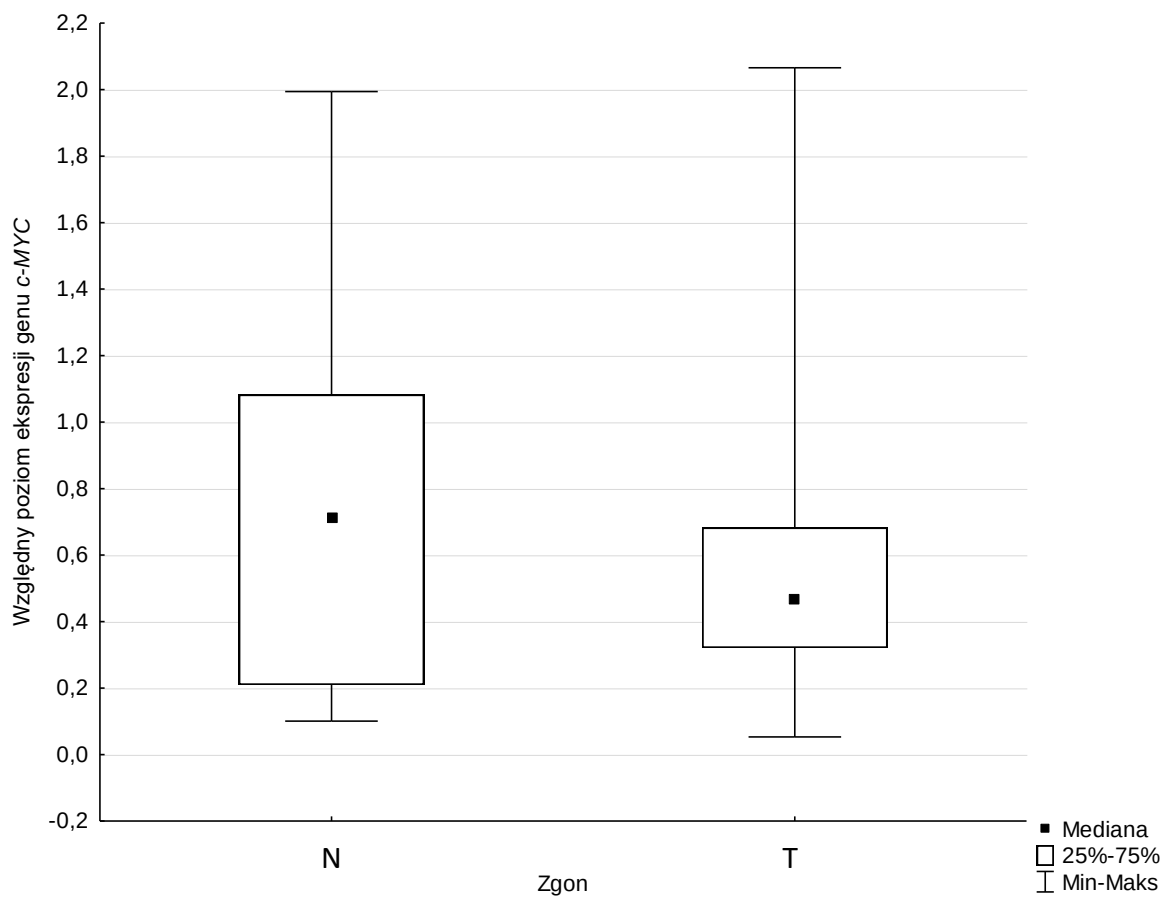


Wykres 21. Względny poziom ekspresji genu *RUNX3* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu.
 $p = 0,0373$, $p < 0,05$.

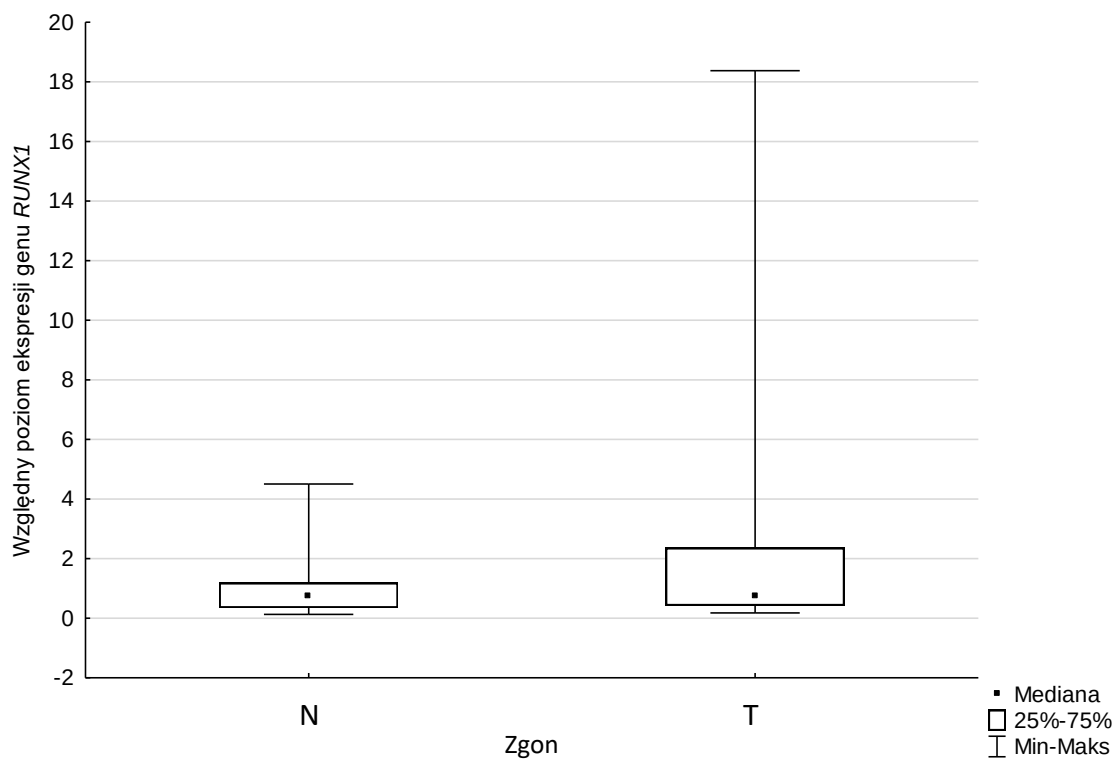
Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy względnym poziomem ekspresji pozostałych genów, a wystąpieniem zgonu w czasie trzyletniej obserwacji. Zaobserwowano jednak skłonność do występowania wyższych poziomów ekspresji genu *CEBPA* u pacjentów u których stwierdzono zgon w porównaniu do pacjentów u których zgon nie wystąpił ($p=0,5858$) (Wykres 22). Odwrotna zależność została zaobserwowana w przypadku genu *c-MYC*. Zaobserwowano wyższe poziomy względnej ekspresji genu *c-MYC* u pacjentów z lepszym rokowaniem ($p=0,8437$) (Wykres 23). Względne poziomy ekspresji genu *RUNX1* w obydwu grupach były podobne ($p=0,4411$)(Wykres 24).



Wykres 22. Względny poziom ekspresji genu *CEBPA* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu.
 $p=0,5858$, $p>0,05$.



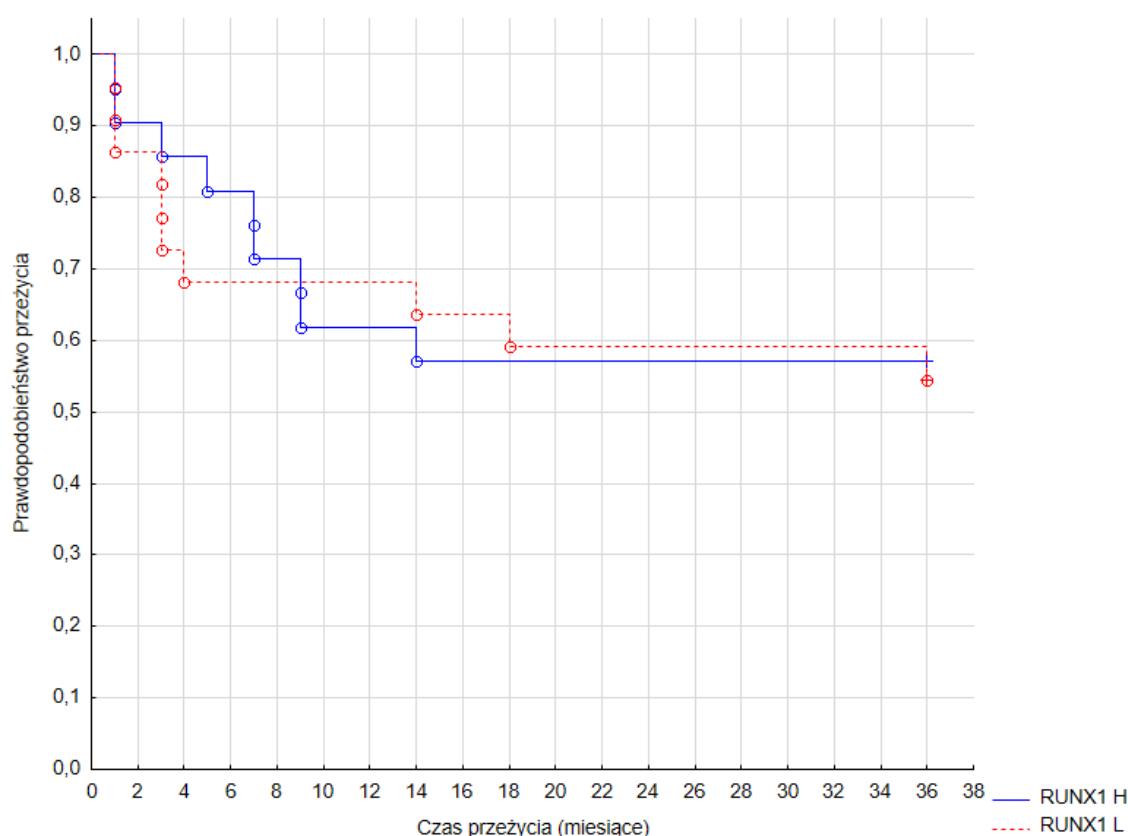
Wykres 23. Względny poziom ekspresji genu *c-MYC* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu.
 $p = 0,8437$, $p > 0,05$.



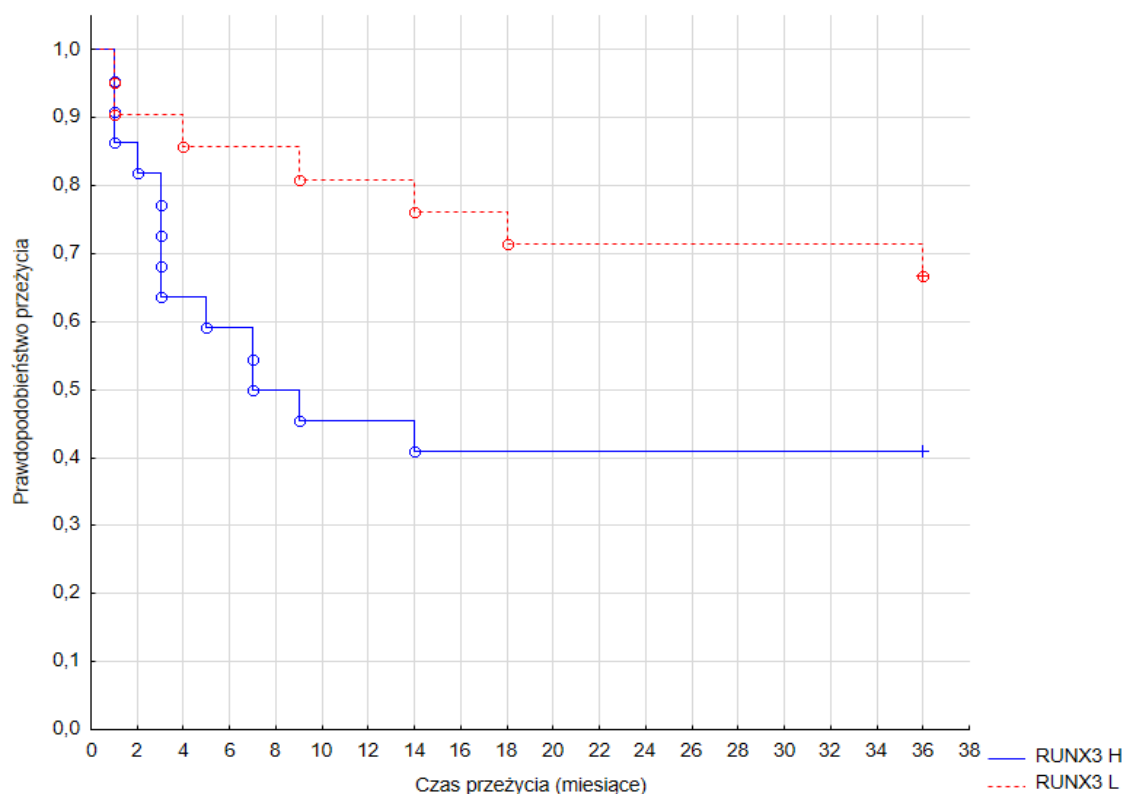
Wykres 24. Względny poziom ekspresji genu *RUNX1* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu.
 $p = 0,4411$, $p > 0,05$.

Ostatnim etapem tej części analizy statystycznej była ocena czasu przeżycia pacjentów w zależności od wartości względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*. Analizę czasu przeżycia przeprowadzono dwóch podgrupach. Kryterium podziału były mediany względnych poziomów ekspresji badanych genów. Wyodrębniono następujące podgrupy: H (wyższy poziom ekspresji-powyżej mediany) oraz L (niższy poziom ekspresji-poniżej mediany).

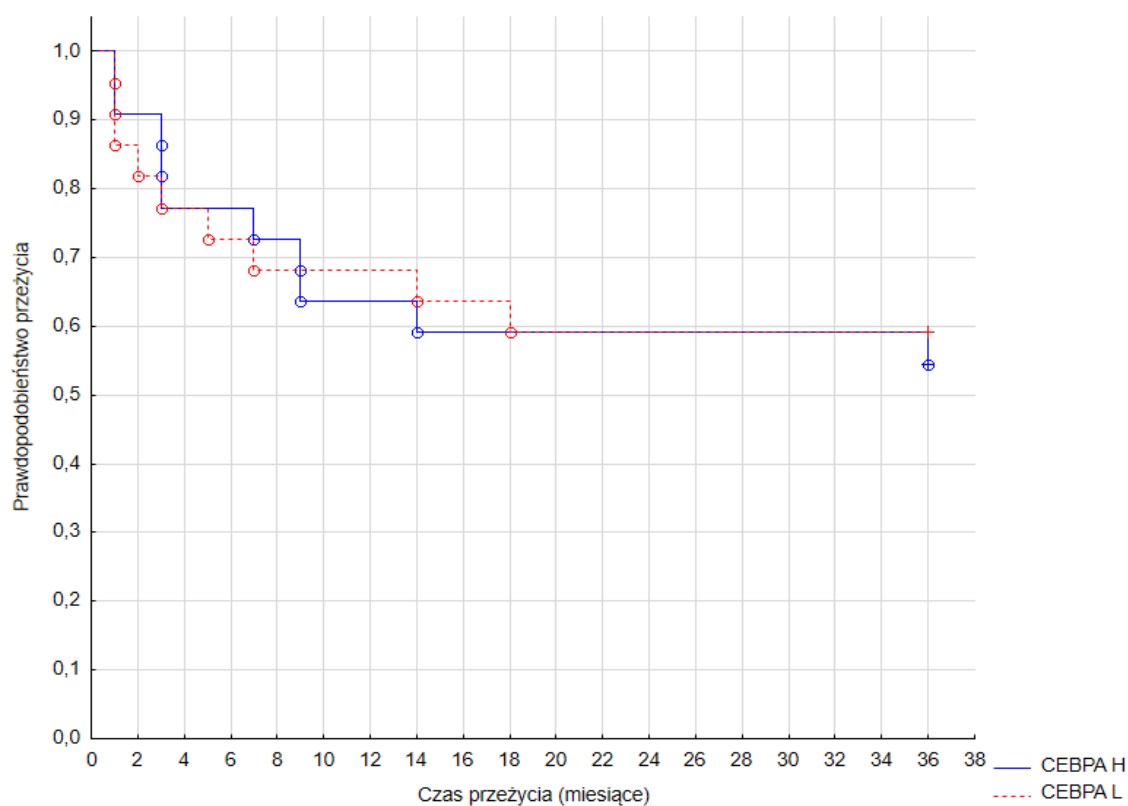
Mediany względnych poziomów ekspresji genów dla wybranych czynników transkrypcyjnych były następujące: 0,7285 (gen *RUNX1*), 1,2760 (gen *RUNX3*), 1,5748 (gen *CEBPA*) oraz 0,4937 (gen *c-MYC*). W celu przeprowadzenia analizy czasu przeżycia każdego z pacjentów w trakcie trwania 3-letniej obserwacji w zależności od poziomu ekspresji każdego z badanych genów wykonano krzywe Kaplana-Meiera (Wykresy 25,26,27,28).



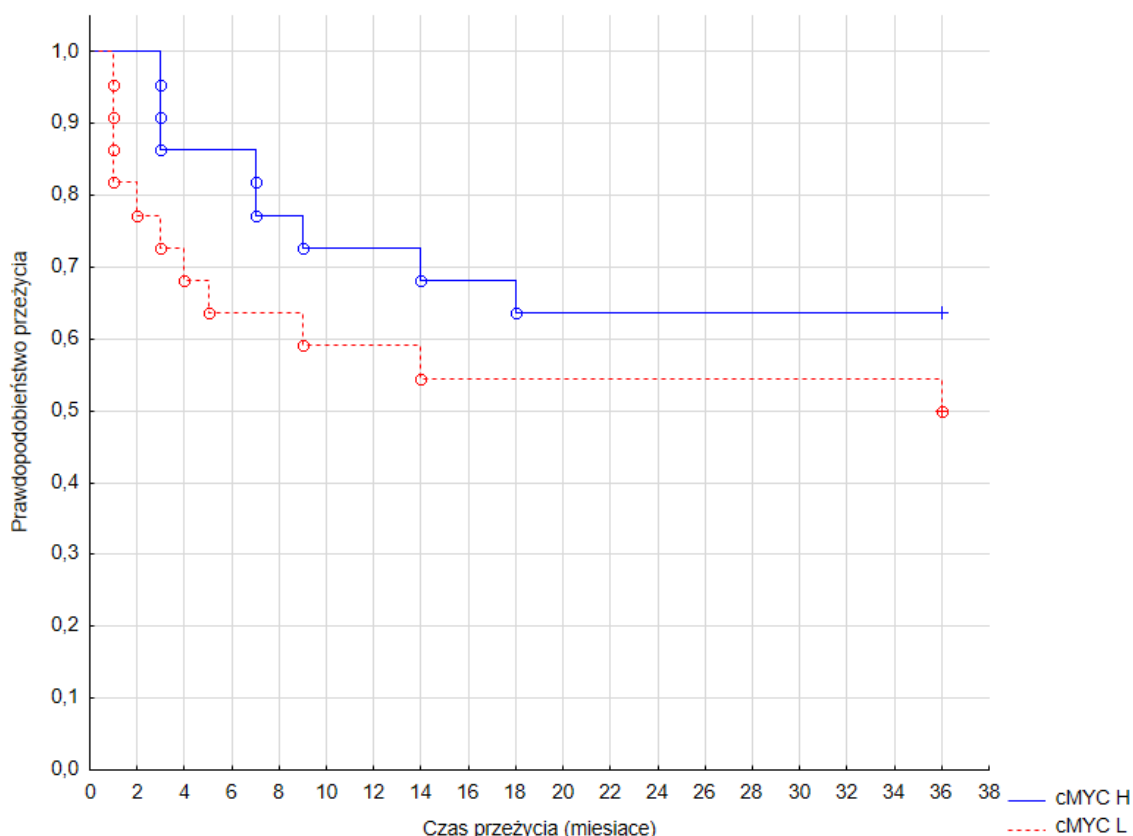
Wykres 25. Wykres przedstawia krzywe przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1*. H- wyższy względny poziom ekspresji (powyżej mediany), L- niższy poziom ekspresji (poniżej mediany).



Wykres 26. Wykres przedstawia krzywe przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3*. H-wyższy względny poziom ekspresji (powyżej mediany), L- niższy poziom ekspresji (poniżej mediany).



Wykres 27 Wykres przedstawia krzywe przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *CEBPA*. H-wyższy względny poziom ekspresji (powyżej mediany), L- niższy poziom ekspresji (poniżej mediany).



Wykres 28. Wykres przedstawia krzywe przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *c-MYC*. H-wyższy względny poziom ekspresji (powyżej mediany), L- niższy poziom ekspresji (poniżej mediany).

Ocena powyższych wykresów pozwoliła stwierdzić, że w przypadku genów *RUNX1* oraz *CEBPA* nie zaobserwowano różnic w prawdopodobieństwie przeżycia w obu podgrupach. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą testu log-rank również nie wykazała istotnych statystycznie różnic we względnym poziomie ekspresji a prawdopodobieństwem przeżycia pomiędzy podgrupami ($p=0,8316$ dla genu *RUNX1* oraz $p=0,2683$ dla genu *CEBPA*). Względny poziom ekspresji tych genów nie ma związku z przeżyciem pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

W przypadku genu *RUNX3* zaobserwowano, że w podgrupie pacjentów charakteryzujących się wyższymi względnymi poziomami ekspresji tego genu prawdopodobieństwo przeżycia było niższe. Ponadto w tej grupie pacjentów zaobserwowano również większą liczbę zgonów w trakcie trwania 3-letniej obserwacji. Przeprowadzona za pomocą testu log-rank analiza statystyczna nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów ze

stwierdzoną ostrą białaczką szpikową a względnym poziomem ekspresji genu *RUNX3* w obu podgrupach ($p=0,0612$). Warto nadmienić, że uzyskana wartość p była na granicy istotności statystycznej. Uzyskane wyniki mogą potwierdzać hipotezę, że zwiększony poziom ekspresji genu *RUNX3* może być związany z gorszym rokowaniem dla pacjentów oraz zwiększonym wskaźnikiem śmiertelności.

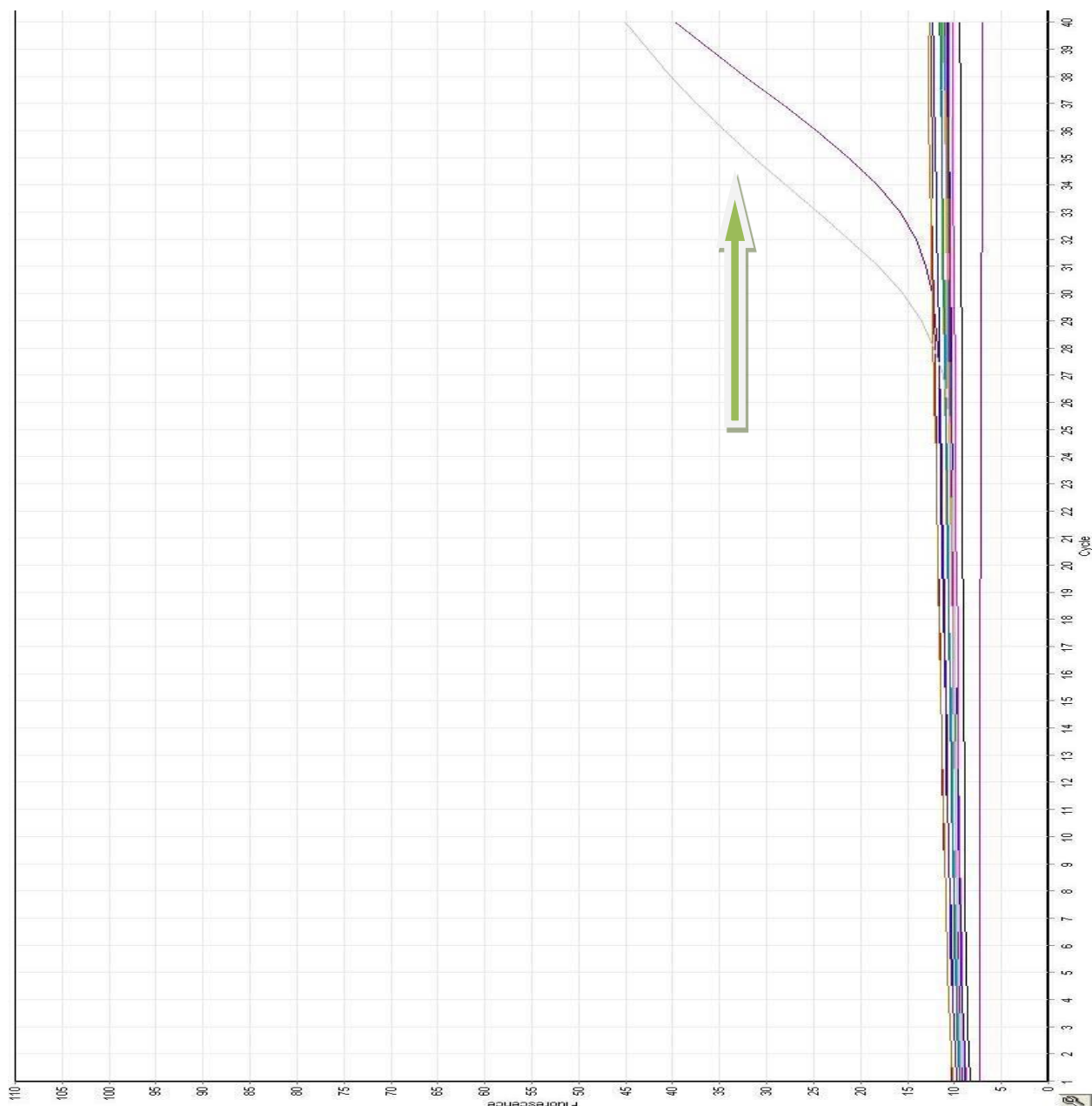
Analiza statystyczna przeprowadzona przy pomocy testu log-rank nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową a względnym poziomem ekspresji genu *c-MYC* w podgrupach o wyższym oraz o niższym względem mediany poziomie ekspresji ($p=0,2683$). Zaobserwowano jednak nieco niższe prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów w podgrupie o niższym poziomie ekspresji transkryptu genu *c-MYC*.

12.6 Ocena obecności ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową

W badanej grupie 46 pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową przeprowadzono również ocenę obecności genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* z zastosowaniem metody Real-Time z użyciem odpowiedniej sondy TaqMan. Do każdej serii oznaczeń dołączono kontrolę pozytywną, którą stanowiło cDNA uzyskane od pacjenta ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową u którego z zastosowaniem metody FISH potwierdzono obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*. Przeprowadzenie analiz wraz z kontrolą dodatnią pozwoliło stwierdzić, że uzyskane wyniki są prawdziwie dodatnie lub prawdziwie ujemne. Według piśmiennictwa w przypadku pacjentów dorosłych, u których stwierdzono ostrą białaczkę szpikową obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* występuje w około 7% przypadków i najczęściej jest diagnozowana u pacjentów u których stwierdzono podtyp AML2 czyli białaczkę mieloblastyczną o cechach dojrzewania. Ponadto obecność niezmutowanej formy tego genu jest korzystnym czynnikiem rokowniczym. Z kolei występowanie zmutowanej formy genu fuzyjnego rokuje niekorzystnie [Krauth i wsp., 2014; Szczeklik, 2018; Sood i wsp., 2017; Tokumasu i wsp., 2015].

Spośród 46 pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową, stanowiących grupę badaną obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* stwierdzono w dwóch przypadkach co stanowiło 4,34% wszystkich badanych. Była to 73 letnia kobieta u, której zdiagnozowano podtyp białaczki AML2 oraz 41 letni mężczyzna u którego nie

określono podtypu ostrej białaczki szpikowej według klasyfikacji FAB. Warto nadmienić, że u tych pacjentów w trakcie trzyletniej obserwacji nie stwierdzono zgonu. Może prawdopodobnie świadczyć o tym iż obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* jest korzystnym czynnikiem rokowniczym u tych pacjentów. Przykładowa krzywa amplifikacji genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* przedstawia Rycina 36.



Rycina 36. Przykładowy wynik obecności genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*. Strzałka zaznacza krzywą amplifikacji dla kontroli pozytywnej.

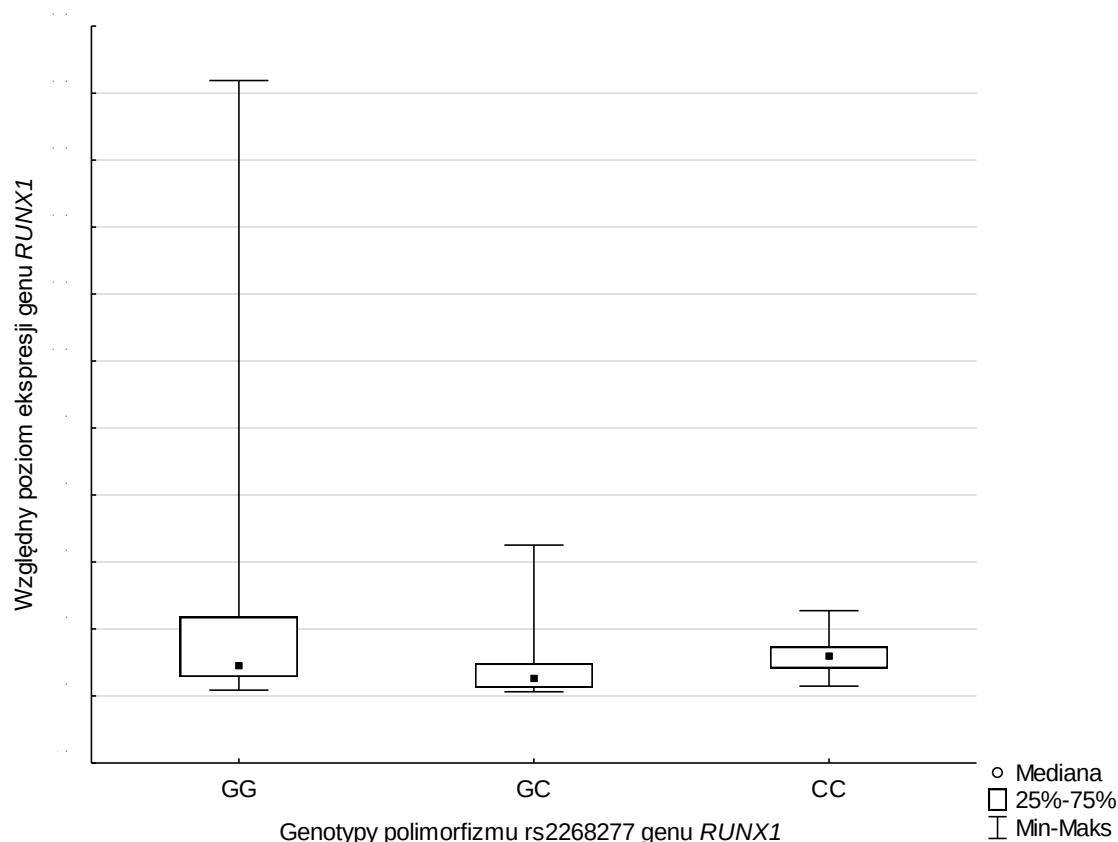
12.7 Ocena związku pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmów rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3* a względnym poziomem ekspresji tych genów

W kolejnym etapie analizy statystycznej oceniono związek pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmów rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*, a względnym poziomem ekspresji tych genów.

Polimorfizm	Genotypy i allele	Mediana	Min.	Max.	Dolny Kwartyl	Górny Kwartyl	Wartość p
rs2268277 genu <i>RUNX1</i>	GC	0,5470	0,1282	4,5042	0,2528	0,9724	p=1 (Test Kruskala-Wallis)
	CC	1,2142	0,2952	2,5514	0,8329	1,4739	
	GG	0,9133	0,1771	18,3741	0,5729	2,3613	
	allel G obecny	0,6626	0,1282	18,3741	0,3275	1,5489	p=0,3329 (Test U Manna-Whiteya)
	allel G nieobecny	1,2142	0,2952	2,5514	0,8329	1,4739	
	allel C obecny	0,7285	0,1281	4,5042	0,2952	1,4171	p=0,3395 (Test U Manna-Whiteya)
	allel C nieobecny	0,9133	0,1771	18,3741	0,5729	2,3613	
rs6672420 genu <i>RUNX3</i>	AT	1,5916	0,3483	8,5445	0,6958	3,6595	p=0,2991 (Test Kruskala-Wallis)
	AA	1,0132	0,1792	4,0511	0,6278	2,1287	
	TT	1,0034	0,0588	1,9566	0,4258	1,5655	
	allel A obecny	1,2805	0,1792	8,5445	0,6806	2,3592	p=0,3621 (Test U Manna-Whiteya)
	allel A nieobecny	1,0035	0,0588	1,9566	0,4258	1,5655	
	allel T obecny	1,5227	0,0588	8,5445	0,6958	2,3592	p=0,4712 (Test U Manna-Whiteya)
	allel T nieobecny	1,0132	0,1792	4,0511	0,6278	2,1287	

Tabela 32. Tabela przedstawia ocenę zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1* oraz *RUNX3*, a odpowiednimi genotypami oraz allelami polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*.

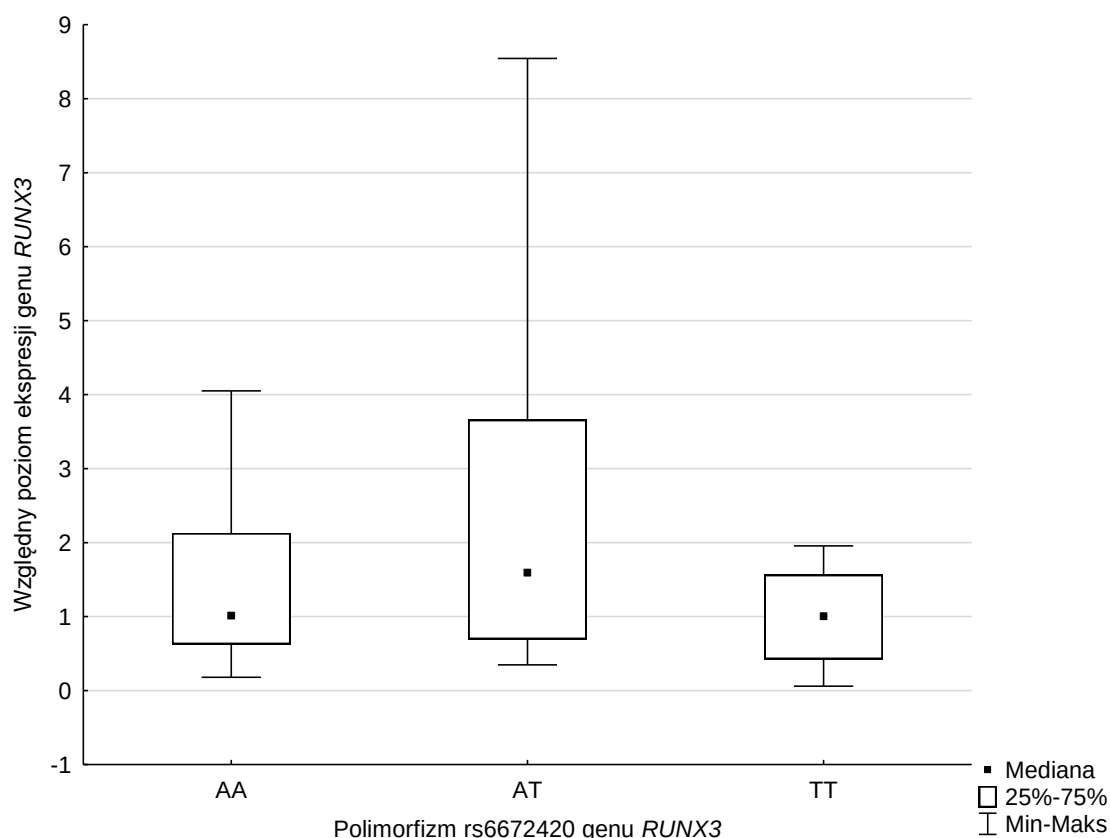
Dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* zaobserwowano nieco wyższy poziom ekspresji genu *RUNX1* związany z genotypem homozygoty zmutowanej CC (1,2142), a najniższy względny poziom ekspresji był związany z genotypem heterozygoty GC (0,5470). Jednak zależność ta nie była istotna statystycznie ($p=1,0$). Nie wykazano także związku pomiędzy występowaniem alleli tego polimorfizmu, a poziomem ekspresji mRNA genu *RUNX1* ($p=0,3329$ dla allela G oraz $p=0,3395$ dla allela C). Poszczególne genotypy oraz allele polimorfizmu genu *RUNX1* prawdopodobnie nie wpływają na względny poziom ekspresji genu *RUNX1* (Tabela 32 oraz Wykres 29).



Wykres 29. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* a względnym poziomem ekspresji tego genu.

W przypadku genu *RUNX3* najwyższe poziomy ekspresji były związane z genotypem heterozygoty AT (1,5916). W przypadku homozygoty dzikiej i zmutowanej względne poziomy ekspresji były na podobnych poziomach (odpowiednio 1,0132 i 1,0034). Analiza nie wykazała jednak istotnej statystycznie zależności pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmu

rs6672420 genu *RUNX3*, a względnym poziomem ekspresji tego genu (odpowiednio $p=0,2991$; $p=0,3621$ dla allele A oraz $p=0,4712$ dla allele T). Poszczególne genotypy oraz allele polimorfizmu genu *RUNX3* prawdopodobnie nie wpływają na poziom względnej ekspresji genu *RUNX3* (Tabela 32 oraz Wykres 30).



Wykres 30. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu oraz rs6672420 genu *RUNX3* a względnym poziomem ekspresji tego genu.

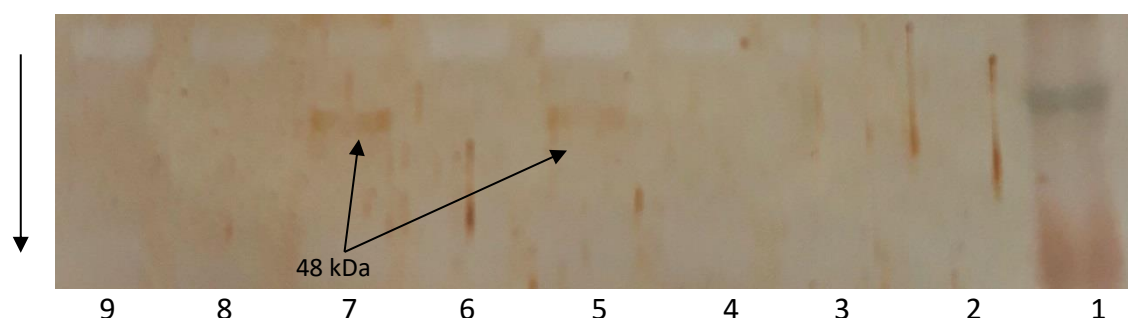
12.8 Analiza oceny jakościowej białek *RUNX3* oraz *CEBPA* z zastosowaniem techniki Western Blot

Analizę oceny jakościowej białek *RUNX3* oraz *CEBPA* przeprowadzono na 18 próbach surowicy krwi uzyskanych od pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Próby te stanowiły odrębną grupę pacjentów i nie wchodziły w skład badanej populacji 46 prób dla których przeprowadzono analizę polimorfizmów oraz ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych.

Ze względu na fakt, iż materiał do badań stanowił materiał reszkowy po przeprowadzeniu badań laboratoryjnych jego ilość była nie wystarczająca do uzyskania odpowiednich ilości surowic dlatego niezbędne było zebranie dodatkowych 18 prób.

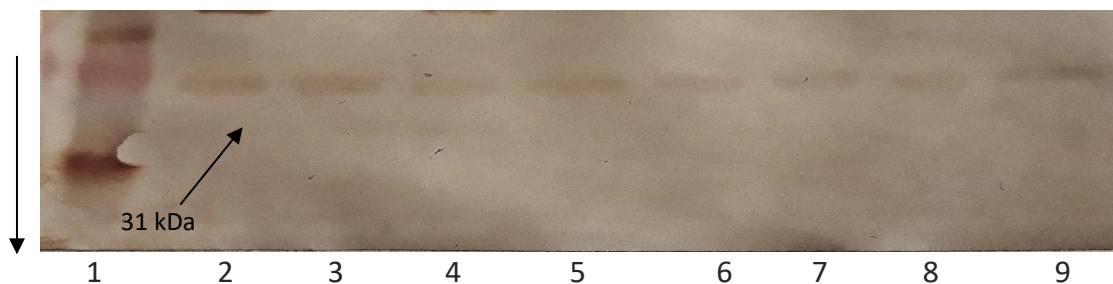
Dla 18 osobowej grupy pacjentów od których uzyskano surowicę nie otrzymano żadnych danych demograficznych ani kliniczno-patologicznych dlatego analiza polegała tylko na ocenie jakościowej obecności białek w badanym materiale biologicznym.

Jakościowa analiza produktów białkowych wybranych czynników transkrypcyjnych miała na celu ocenę obecności białka RUNX3 oraz białka CEBPA w 18 próbach surowicy krwi. W przypadku białka RUNX3 jego jakościową obecność zaobserwowano jedynie w 3 próbach surowicy krwi. Otrzymane produkty białkowe charakteryzowały się niezwykle słabą jakościową ekspresją (Rycina 37). Dostępne w piśmiennictwie dane również wskazują na obniżoną ekspresję tego białka w surowicy krwi pacjentów. Może to być spowodowane faktem iż gen *RUNX3* kodujący białko RUNX3 ulega procesowi metylacji, a to z kolei może mieć wpływ na ekspresję kodowanego genu oraz białka [Jiang i wsp., 2008]. Ponadto na ostateczne formowanie się produktu białkowego mogą mieć wpływ liczne procesy potranslacyjne, którym może podlegać gen *RUNX3* (Rycina 37).



Rycina 37. Analiza techniką Western blot białka RUNX3 w surowicach pacjentów z AML – studzienki 2 – 9. Słaba, immunopoztywna reakcja odpowiadająca masie molekularnej 48 kDa – studzienki 5 i 7. Wzorzec masy molekularnej (EURx –PerfectTM Tricolor Protein Ladder, 245-11kDa) - studzienka 1.

Natomiast jakościowa analiza białek z zastosowaniem techniki Western Blot wykazała obecność produktu białkowego CEBPA we wszystkich 18 surowicach krwi pobranych od pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Jakkolwiek otrzymane produkty białkowe również charakteryzowały się niską ekspresją (Rycina 38).



Rycina 38. Analiza techniką Western Blot białka CEBPA w surowicach pacjentów z AML. Immunopozytywna reakcja odpowiadająca masie molekularnej 31 kDa – studzienki 2 – 9. Wzorzec masy molekularnej (EURx –Perfect™ Tricolor Protein Ladder, 245-11kDa) - studzienka 1.

Ze względu na fakt iż badana grupa stanowiła osobną populację pacjentów uzyskane wyniki analizy jakościowej białek nie zostały porównane z obecnością polimorfizmów oraz ekspresją badanych czynników transkrypcyjnych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej analiza białek RUNX3 oraz CEBPA techniką Western Blot miała na celu jedynie potwierdzenie obecności/braku analizowanych białek w surowicach pacjentów. Ze względu na brak możliwości odniesienia wyników do badań molekularnych wyniki Western Blot nie zostały poddane analizie densytometrycznej.

Rozdział IV

Dyskusja

Ostra białaczka szpikowa jest jedną z najczęstszych chorób nowotworowych układu białokrwinkowego wstępującą wśród osób dorosłych. Charakteryzuje się klonalną proliferacją oraz rozrostem w szpiku kostnym lub/i we krwi komórek blastycznych transformowanych nowotworowo. Komórki te naciekając krew, szpik kostny oraz sąsiadujące tkanki prowadzą do nieprawidłowej hematopoezy [Szczeklik, 2018; De Kouchkovsky i wsp., 2016, Wierzbowska, 2013]. Ostra białaczka szpikowa jest chorobą, której etiopatogeneza nie została jeszcze dokładnie poznana. Istnieje wiele czynników, które prowadzą do jej rozwoju [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018; De Kouchkovsky i wsp., 2016]. Wśród nich istotną rolę odgrywają liczne zmiany genetyczne oraz molekularne czynniki transformacji nowotworowej predysponujące do powstania samoodtwarzającego się klonu komórek białaczkowych. Możemy zaliczyć do nich: mutacje, fuzje jak również liczne rearanżacje i amplifikacje w genach odpowiedzialnych za regulację i przebieg prawidłowej hematopoezy [Saultz i wsp., 2016; Szczeklik, 2018]. Wśród nich istotną rolę odgrywają geny supresorowe (np. gen *TP53*), mieloidalne czynniki transkrypcyjne (np. gen *RUNX1* czy gen *CEBPA*), zaktywowane szlaki sygnałowe proliferacji (np. gen *FLT3*, gen *KIT* czy gen *KRAS*) czy modyfikacje chromatyny (np. fuzje *KMT2A (MLL)*, *KMT2a-PTD(MLL-PTD)* czy *NUP95-NSD1*). Udowodniono, że współistnienie zmian genetycznych prowadzących do pobudzenia niekontrolowanej proliferacji lub blokujących dojrzewanie komórek może prowadzić do rozwoju ostrej białaczki szpikowej [Szczeklik, 2018].

Warto nadmienić, że na istotną rolę czynników genetycznych w rozpoznaniu oraz przebiegu ostrej białaczki szpikowej wskazuje opracowana w 2008 roku klasyfikacja według WHO. Dawny podział morfocytochemiczny został zastąpiony klasyfikacją, która opierała się na powtarzających się cechach cytogenetycznych oraz molekularnych. Klasyfikacja ta została zaktualizowana w 2016 roku i wprowadzono do niej nowe podtypy ostrych białaczek szpikowych takich jak: AML z genem fuzyjnym *BCR-ABL1* oraz AML ze zmutowanym genem *RUNX1* [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Według najnowszych wytycznych ELN z 2017 roku stwierdzenie występowania poszczególnych aberracji genetycznych jest również jednym z najważniejszych elementów diagnostycznych, rokowniczych oraz prognostycznych wśród pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Ponadto stwierdzenie poszczególnych zmian genetycznych

może pomóc w wyborze odpowiedniej terapii i schematu leczenia. Udowodniono między innymi, że obecność niezmutowanego genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* czy mutacji biallelicznej w genie *CEBPA* jest korzystnym czynnikiem rokowniczym. Z kolei stwierdzenie mutacji w genie *RUNX1* czy genie *TP53* jest związane z niekorzystnym rokowaniem. Ponadto badanie obecności genów fuzyjnych takich jak *RUNX1-RUNX1T1* czy *CBFB-MYH11* wykonywane jest gdy niezbędne jest podjęcie szybkiej decyzji o wyborze odpowiedniej terapii [Döhner i wsp., 2017].

Wśród wymienionych powyżej aberracji genetycznych mających potencjalny związek z rozwojem ostrej białaczki szpikowej czy oceną rokowania wśród pacjentów istotne wydają się zmiany w genach kodujących tzw. czynniki transkrypcyjne.

Czynnikiem transkrypcyjnym nazywamy białko mające zdolność do wiązania DNA w obrębie promotora genu lub sekwencji wzmacniającej w miejscu odpowiedzialnym za regulację procesu transkrypcji [Lambert i wsp., 2018; Vaquerizas i wsp., 2009]. Główną funkcją białkowych czynników transkrypcyjnych jest regulacja tworzenia się kompleksu preinicjacyjnego wiążącego DNA z promotorem genu, wskazanie miejsca rozpoczęcia procesu transkrypcji czy przyspieszanie lub hamowanie tego procesu. Czynniki transkrypcyjne mogą być aktywowane lub inaktywowane przez inne białka co w konsekwencji prowadzi do regulacji procesu przepisywania DNA na RNA. Ponadto czynniki transkrypcyjne sprawują również kontrolę nad procesami różnicowania i kształtowania się komórek oraz regulują ścieżki odpowiedzi immunologicznej [Lambert i wsp., 2018; Vaquerizas i wsp., 2009]. W swojej strukturze posiadają także domenę wchodzącą w interakcję z polimerazą RNA II lub z innymi czynnikami transkrypcyjnymi prowadząc do zmian we względnym poziomie ekspresji genów co w konsekwencji zaburza ilość powstającego produktu białkowego [Lambert i wsp., 2018; Vaquerizas i wsp., 2009]. Czynniki transkrypcyjne można podzielić pod kątem mechanizmu działania, ich funkcji regulacyjnej czy homologii sekwencji w ich domenach wiążących DNA. Biorąc pod uwagę, kryterium działania wyróżniamy dwie główne klasy czynników transkrypcyjnych: ogólne czynniki transkrypcyjne zaangażowane w tworzenie kompleksów preinicjacyjnych (np. TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH) oddziałujące z regionem promotora oraz umożliwiające polimerazie RNA zainicjowanie procesu transkrypcji oraz specyficzne czynniki transkrypcyjne wiążące z wiodącą nicią DNA przed miejscem inicjacji. Należą do nich między innymi: SP-1, AP-

1,C/CEBPA, c-MYC czy NF-1 i ich główną rolą jest regulacja procesu transkrypcji. Czynniki transkrypcyjne mogą być także zaangażowane w regulację podziałów komórkowych, inicjowanie procesu apoptozy czy regulację różnicowania się komórek podczas rozwoju embrionalnego [Lambert i wsp., 2018; Vaquerizas i wsp., 2009].

Udowodniono, że mutacje występujące w genach kodujących czynniki transkrypcyjne oraz zmiany w poziomie ekspresji czy ilości produktów białkowych tych genów mogą być związane z zaburzeniami w aktywacji i przebiegu szlaków biochemicznych, a także z rozwojem wielu chorób [Lee i wsp., 2013; Lambert i wsp., 2018; Vaquerizas i wsp., 2009]. Naukowcy potwierdzili również rolę czynników transkrypcyjnych w prawidłowym przebiegu hematopoezy oraz różnicowaniu się komórek krwiotwórczych. Udowodniono, że czynniki transkrypcyjne (np. TIF1-y, PU.1 czy C / EBPα) kontrolują prawidłowy rozwój komórek erytroidalnych oraz regulują inne geny odpowiedzialne za prawidłowy rozwój układu krwiotwórczego [Kehrl, 1995; Willson i wsp., 2011; Zhu i wsp., 2002]. Mutacje, aberracje chromosomalne czy zmiany w ekspresji czynników transkrypcyjnych mogą prowadzić do rozwoju nowotworów w tym ostrej białaczki szpikowej [Rosenbauer i wsp., 2005; Takei i wsp., 2019; Thoms i wsp., 2019].

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena polimorfizmów, ekspresji oraz stwierdzenie obecności produktów białkowych wybranych czynników transkrypcyjnych takich jak gen *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* u pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową.

Pierwszym analizowanym czynnikiem transkrypcyjnym był gen *RUNX1*. Udowodniono, że odgrywa on kluczową rolę w prawidłowym procesie hematopoezy już na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego [Krygier i wsp., 2018; Tracey i wsp., 2000]. Warto nadmienić, że bierze również udział w tworzeniu oraz różnicowaniu się komórek macierzystych szpiku kostnego [Krygier i wsp., 2018; Okuda i wsp., 2001; Tracey i wsp., 2000]. Odkryto, że obecność mutacji w genie *RUNX1* prowadzi do rozwoju ostrej białaczki szpikowej oraz może być złym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z AML [Schnittger i wsp., 2011; Szczeklik, 2018]. W niniejszej rozprawie doktorskiej przeprowadzono analizę genu *RUNX1* na dwóch poziomach molekularnych: DNA oraz RNA. Pierwszym etapem analizy była ocena polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genie *RUNX1*. Badacze wskazują, że SNP genu *RUNX1* odgrywają rolę

w rozwoju wielu chorób w tym między innymi: raku prostaty, zaawansowanym raku żołądka czy ostrej białaczce szpikowej [Javadlar i wsp., 2020; Han i wsp., 2018; Huang i wsp., 2011; Slattery i wsp., 2011].

W niniejszej rozprawie doktorskiej analizowanym SNP genu *RUNX1* był polimorfizm rs2268277. Polimorfizm ten prowadzi do zamiany guaniny na cytozynę (zamiana G>C) w pozycji 34809752 i znajduje się w egzonie 6. Jest on zaliczany do tzw. cichych polimorfizmów ponieważ nie wpływa na zmianę w kodowanym aminokwasie, ale może jednak ostatecznie modyfikować powstałe podczas procesu transkrypcji mRNA, co może w konsekwencji prowadzić do zmiany ilości powstającego produktu białkowego tego genu [Shastry, 2009]. Analiza częstości rozkładu poszczególnych genotypów tego SNP w grupie kontrolnej osób zdrowych w populacjach europejskich wykazała, że dominującym genotypem był genotyp GC (odpowiednio 47,5% w populacji duńskiej oraz 50,0% w populacji hiszpańskiej). Wykazano również, że najrzadszym genotypem w tych populacjach był genotyp CC (odpowiednio 12,5% i 14,9% dla populacji duńskiej i hiszpańskiej). Genotyp GG występował odpowiednio z częstością 40% oraz 35,1% [Orozco i wsp., 2006; Wesoly i wsp., 2005]. W niniejszej rozprawie doktorskiej uzyskano podobne częstości rozkładu poszczególnych genotypów dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*. Odpowiednio: heterozygota GC-43,0%, homozygota zmutowana CC-17,0%, homozygota dzika GG-40,0%. Badania przeprowadzone na populacji osób zdrowych przez Wesoly i wsp. wykazały, że dominującym allelem polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* wśród populacji duńskiej był allel G, który występował z częstością 64,0%, a allel C stwierdzono u 36,0% badanych [Wesoly i wsp., 2005]. Uzyskane częstości występowania poszczególnych alleli u osób zdrowych są podobne do wyników uzyskanych przez Orozco i wsp. w populacji hiszpańskiej. Allel G pojawiał się z częstością 60,1%, a allel C z częstością 39,9% [Orozco i wsp., 2006]. Dane uzyskane z międzynarodowej bazy National Library of Medicine również potwierdzają, że w populacji europejskiej dominującym allelem polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* jest allel G (62,9%) w porównaniu do allela C (37,1%) [ncbi.nlm.nih.gov/rs2268277]. W niniejszej rozprawie doktorskiej rozkłady częstości występowania poszczególnych alleli dla wybranego polimorfizmu dla grupy kontrolnej są porównywalne z obserwowanymi w populacjach europejskich i wynoszą odpowiednio: allel G-62,0%, allel C-38,0%. Świadczy to o prawidłowym dobrze grupy

badanej oraz umożliwia odniesienie i porównanie otrzymanych wyników do tych uzyskanych w innych populacjach kaskaskich.

Według obecnego stanu wiedzy nie znaleziono jak dotąd badań opisujących znaczenie badanego polimorfizmu w rozwoju nowotworów układu białokrwinkowego dlatego uzyskane częstości genotypów i alleli zostaną porównane z innymi jednostkami chorobowymi. Polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1* został badany między innymi w chorobach o podłożu autoimmunologicznym: toczeniem rumieniowatym układowym oraz reumatoidalnym zapaleniem stawów [Orozco i wsp., 2006; Tokuhira i wsp., 2003; Wesoly i wsp., 2005]. W niniejszej rozprawie doktorskiej częstości rozkładu poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* nie różnią się między grupą badaną, a kontrolną ($p=0,9173$ w przypadku genotypów oraz $p=0,9556$ dla allela G, $p=0,9666$ dla allela C). Prawdopodobnie polimorfizm ten nie jest związany ze zwiększoną zapadalnością na ostrą białaczkę szpikową. Podobne wyniki uzyskali Wesoly i wsp., którzy przeprowadzili ocenę polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* na populacji duńskiej. Badania nie wykazały różnicy pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów i alleli pomiędzy grupą pacjentów ze stwierdzonym reumatoidalnym zapaleniem stawów, a grupą kontrolną (odpowiednio $p=0,45$ w przypadku genotypów oraz $p=0,43$ dla allela G oraz $p=0,11$ dla allela C) [Wesoly i wsp., 2005]. Badania przeprowadzone w populacji hiszpańskiej przez Orozco i wsp. w grupie pacjentów cierpiących z powodu toczenia rumieniowatego układowego również nie wykazały istotnych różnic pomiędzy obserwowanymi częstościami genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną i kontrolną (odpowiednio $p=0,90$ dla genotypów oraz $p=0,75$ dla allela G oraz allela C) [Orozco i wsp., 2006]. W niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano, że wśród heterozygot GC wiek pacjentów w momencie rozpoznania choroby był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do genotypów homozygoty dzikiej GG ($p=0,0446$) oraz genotypu homozygoty zmutowanej CC ($p=0,0128$). Może to świadczyć o późniejszym występowaniu objawów chorobowych oraz łagodniejszym przebiegiem ostrej białaczki szpikowej u heterozygot GC. Średnia wieku rozpoznania choroby u heterozygot wynosi 64,0 lata a w przypadku homozygoty zmutowanej CC było to 46,0 lat w dla homozygoty dzikiej GG 55,5 lat. Ponadto wykazano, że pacjenci, u których stwierdzono obecność allela G charakteryzowali się istotnie wyższym wiekiem rozpoznania choroby niż pacjenci, u których obecności allela

G nie stwierdzono ($p=0,0242$) co zdaje się potwierdzać fakt iż obecność allela G może prowadzić do późniejszej manifestacji objawów klinicznych u pacjentów z AML. Warto zaznaczyć, że Tokuhiro i wsp. potwierdzili z kolei istotnie statystyczny związek pomiędzy występowaniem zmutowanego allela C polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*, a częstszym występowaniem reumatoidalnego zapalenia stawów wśród populacji japońskiej ($p=0,00035$) [Tokuhiro i wsp., 2003]. Prawdopodobnie obecność zmutowanego allela C może być związana ze zwiększoną chorobotwórczością u pacjentów z RZS w populacji japońskiej. W niniejszej rozprawie doktorskiej nie zaobserwowano istotnego związku pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów i alleli tego polimorfizmu a pozostałymi cechami demograficznymi oraz kliniczno-patologicznymi. W niniejszej rozprawie doktorskiej nie zaobserwowano wpływu badanego polimorfizmu na względny poziom ekspresji genu *RUNX1* ($p=1$ w przypadku geotypów oraz $p=0,3329$ dla allela G oraz $p=0,3395$ dla allela C). W przeciwieństwie do uzyskanych wyników Tokuhiro i wsp. wskazali na prawdopodobny wpływ występowania zmutowanego allela C na poziom ekspresji genu *RUNX1* [Tokuhiro i wsp., 2003].

Prawdopodobnie w przypadku pacjentów z ostrą białaczką szpikową obecność polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* nie jest związana z rozwojem ostrej białaczki szpikowej. Stwierdzenie istotnie statystycznie wyższego wieku rozpoznania choroby u heterozygot GC w porównaniu do homozygot dzikich GG oraz homozygot zmutowanych CC może świadczyć o późniejszej manifestacji objawów klinicznych oraz chorobowych co wskazuje na potencjalny charakter ochronny tego wariantu genetycznego.

Następnym etapem analizy genu *RUNX1* była ocena względnego poziomu ekspresji. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na rolę genu *RUNX1* oraz jego zróżnicowanej ekspresji w rozwoju wielu chorób nowotworowych. Zaobserwowano nieprawidłową ekspresję genu *RUNX1* w różnych nowotworach złośliwych, w tym w raku jajnika, raku piersi czy cytogenetycznie prawidłowej ostrej białaczce szpikowej (CN-AML) [Ferrari i wsp., 2014; Fu i wsp., 2016; Ge i wsp., 2014; Krygier i wsp., 2018; Lam i wsp., 2012]. Badania przeprowadzone przez Silva i wsp. potwierdzają rolę genu *RUNX1* jako supresora nowotworowego [Silva i wsp., 2003]. Osato M. sugeruje, że zmniejszona ekspresja tego genu wpływa na różnicowanie się komórek krwiotwórczych

oraz prowadzi do rozwoju AML [Osato, 2004], Badania przeprowadzone przez Fu i wsp. sugerują, że prawidłowy poziom ekspresji genu *RUNX1* promuje różnicowanie się hematopoetycznych komórek progenitorowych, a dezaktywacja tego genu może prowadzić do amplifikacji komórek progenitorowych oraz dalszy rozwój AML [Fu i wsp., 2016]. Istnieją również badania, które wskazują, że gen *RUNX1* pośredniczy w przeżywaniu oraz proliferacji komórek białaczkowych przez co może działać jako onkogen i prowadzić do rozwoju ostrej białaczki szpikowej a poziom ekspresji genu *RUNX1* może odgrywać rolę w prognozowaniu przebiegu ostrej białaczki szpikowej w CN-AML [Fu i wsp., 2016; Goyama i wsp., 2013; Goyama i wsp., 2015].

W niniejszej rozprawie doktorskiej poziomy transkryptu mRNA genu *RUNX1* były zróżnicowane. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę we względnym poziomie ekspresji tego genu między kobietami i mężczyznami: kobiety wykazywały istotnie statystycznie wyższy i bardziej zmienny poziom ekspresji genu ($p=0,4411$) co może potencjalnie wpływać na odmienny przebieg ostrej białaczki szpikowej u obu płci. Przeciwnie wyniki uzyskali Fu i wsp., którzy nie znaleźli istotnego związku pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1* a płcią pacjentów ($p=0,27$) [Fu i wsp., 2016]. Kolejnym etapem analizy była ocena związku względnego poziomu ekspresji a 3-letnią przeżywalnością pacjentów. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono różnic pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1* w grupie pacjentów u których do końca czasu trwania obserwacji trwającej 3 lata stwierdzono zgon w porównaniu do grupy pacjentów u których zgonu nie stwierdzono. Mediany względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1* w obydwóch podgrupach były niemal identyczne (mediany wynosiły odpowiednio 0,7285 vs 0,7234, $p=0,4411$). Wskazuje to na fakt, że poziom ekspresji genu *RUNX1* nie jest związany z rokowaniem oraz nie wpływa na przeżycie pacjentów z AML. Uzyskane wyniki dotyczące związku poziomu ekspresji genu *RUNX1*, a rokowaniem pacjentów różniły się od tych uzyskanych przez Fu i wsp. Badania przeprowadzone przez Fu i wsp. udowodniły, że zwiększone poziomy ekspresji genu *RUNX1* mogą być negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów białaczkowych [Fu i wsp., 2016]. Odmienne wyniki uzyskali Goyama i wsp. Stwierdzili bowiem, że nadekspresja genu *RUNX1*, poprzez indukowanie różnicowania szpiku kostnego, prowadzi do hamowania wzrostu regularnych komórek krwi pępowinowej [Goyama i wsp., 2013]. Wysłunięto hipotezę, że gen *RUNX1* może być

uznany nowym markerem stratyfikacji ryzyka u pacjentów z ostrą białaczką szpikową i może być kandydatem dla terapii przeciwnowotworowej ze względu na modulację jego modyfikacji potranslacyjnych [Goyama i wsp., 2015]. Fu i wsp. udowodnili również że onkogenna lub supresorowa rola genu *RUNX1* zależy od poziomu jego ekspresji [Fu i wsp., 2016]. Zaobserwowano, że wysoki poziom ekspresji mRNA genu *RUNX1* u pacjentów z CN-AML był związany z gorszym rokowaniem, niższym wskaźnikiem całkowitego przeżycia (OS) oraz niższym wskaźnikiem przeżycia wolnym od objawów (EFS) w porównaniu do pacjentów u których poziom ekspresji genu był niższy [Fu i wsp., 2016]. Mediana wskaźników OS oraz EFS u pacjentów z wyższym poziomem ekspresji genu *RUNX1* była niższa w porównaniu do pacjentów o obniżonej ekspresji tego genu ($p=0,0025$) [Fu i wsp., 2016]. Jednak ta hipoteza nie została potwierdzona w niniejszej rozprawie doktorskiej. W pracy stwierdzono również, że u pacjentów, u których stwierdzono podtyp białaczki AML2 poziom ekspresji genu *RUNX1* jest najwyższy. Jednak ze względu na małą liczebność badanej populacji analiza statystyczna nie została przeprowadzona. Podobne wyniki uzyskali Fu i wsp. Spośród wszystkich pacjentów z CN-AML u których stwierdzono podwyższoną ekspresję genu *RUNX1* u większości stwierdzono podtyp białaczki M2 ($p=0,001$). Ponadto oceniono również, że w podgrupie pacjentów o wyższym poziomie ekspresji genu *RUNX1* istotnie statystycznie częściej stwierdzano podtyp białaczki AML1 ($p=0,0014$). Może to sugerować, że u pacjentów u których stwierdzono podtyp białaczki o mniejszym stopniu zróżnicowania poziom ekspresji genu *RUNX1* jest wyższy, co może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym.

Kolejnym etapem badań była ocena genu *RUNX3* przeprowadzona na trzech poziomach molekularnych włączając w to DNA, RNA oraz białko. Pierwszym etapem analizy była ocena polimorfizmu SNP w genie *RUNX3*. Badacze potwierdzili istotną rolę genu *RUNX3* w rozwoju chorób układu pokarmowego a w szczególności w rozwoju raka żołądka oraz raka jelita grubego [Bae i wsp., 2004; Carvalho i wsp., 2005; Guo i wsp., 2005; Krygier i wsp., 2018; Wen i wsp., 2017]. Wykazano także związek z rozwojem nowotworów piersi oraz rakiem szyjki macicy [Gao i wsp., 2020; Jeong i wsp. 2018; Lau i wsp., 2006; Krygier i wsp., 2018; Robertson i wsp., 2012]. Gen *RUNX3* działa prawdopodobnie jako supresor nowotworowy, a jego obniżona ekspresja lub inaktywacja w chorobach nowotworowych może być związana ze zjawiskiem

hipermetylacji w regionie promotora genu [Jeong i wsp. 2018]. Istnieją również badania, które wskazują na rolę genu *RUNX3* jako onkogenu. Badania wykazały jego podwyższoną ekspresję w nowotworach jajnika, raku płaskonabłonkowym głowy i szyi czy raku trzustki [Barghout i wsp., 2015; Tsunematsu i wsp., 2009; Whittle i wsp., 2015]. Wykazano również, że gen *RUNX3* ulega ekspresji w układzie krwiotwórczym (szczególnie we wszystkich hematopoetycznych komórkach macierzystych) co może wskazywać na jego potencjalną rolę w różnicowaniu się tych komórek w szpiku kostnym [Krygier i wsp., 2018; Haider i wsp., 2016; Wu i wsp., 2014]. Naukowcy ocenili, że polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genie *RUNX3* mogą mieć związek z rozwojem wielu chorób nowotworowych oraz zapalnych w tym między innymi raka żołądka, jelita grubego, pęcherza moczowego czy we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [Chen i wsp., 2019; Ju i wsp., 2013; Suárez-Villanueva i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2008].

Ocenianym w pracy SNP był polimorfizm rs6672420 genu *RUNX3*. W wyniku tego polimorfizmu dochodzi do zamiany adeniny na tyminę (zamiana A>T) w pozycji 24964519. Obecność tego polimorfizmu prowadzi do zamiany kodowanego aminokwasu w pozycji 19 z asparaginy (Asn) na izoleucynę (Ile) co w konsekwencji może prowadzić do powstania białka o zmienionej budowie oraz zaburzonej funkcji wiązania innych czynników transkrypcyjnych [Shastry, 2009]. W niniejszej rozprawie doktorskiej częstości uzyskanych genotypów i alleli dla badanego polimorfizmu uzyskane dla grupy kontrolnej były następujące: genotyp AT – 43%, AA – 30%, TT – 27%, allel A – 52%, allel T – 48% i różniły się nieznacznie z zaobserwowanymi w innych populacjach europejskich (allel A-47,9% oraz allel T-52,1%) [ncbi.nlm.nih.gov/rs6672420]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy nie opisano znaczenia roli tego polimorfizmu w rozwoju ostrych białaczek szpikowych czy innych chorobach hematologicznych. W niniejszej rozprawie doktorskiej nie zaobserwowano istotnie statystycznej różnicy pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną (odpowiednio $p=0,5450$ dla genotypów, $p=0,5991$ dla allela A, $p=0,4130$ dla allela T). Ze względu na fakt, iż rozkłady częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* pomiędzy grupą badaną a kontrolną są podobne świadczy to o tym iż polimorfizm ten nie jest związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na ostrą

białączkę szpikową wśród badanych pacjentów. Zaobserwowano, jednak że wśród grupy badanej allel dziki A występował z największą częstością (80,0%). Podobne częstości występowania alleli zostały zaobserwowane przez Haider i wsp. W badaniu przeprowadzonym na 25 pacjentach ze stwierdzonym zespołem Sézary'ego oceniono, że allel dziki A występował u 16 z 25 pacjentów [Haider i wsp., 2016]. W niniejszej rozprawie doktorskiej nie stwierdzono istotnie statystycznie różnic pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów i alleli genu *RUNX3* a cechami demograficznymi i kliniczno-patologicznymi. Zaobserwowano jednak, że najwyższy średni wiek rozpoznania choroby jest związany z genotypem heterozygoty AT. Ponadto u pacjentów będących homozygotami zmutowanymi TT zaobserwowano najmniejszy odsetek zgonu. Na podstawie analizy czasu przeżycia zaobserwowano również, że u pacjentów będących homozygotami zmutowanymi TT prawdopodobieństwo przeżycia w trakcie trwania 3-letniej obserwacji pacjentów było najwyższe. Zależności te nie były jednak statystycznie istotne (odpowiednio $p=0,2269$, $p=0,5013$ oraz $p=0,4882$). Na tej podstawie można wysnuć hipotezę, że obecność zmutowanego allela T może być prawdopodobnie korzystnym czynnikiem rokowniczym i prognostycznym u pacjentów z AML. Zależność ta powinna być potwierdzona na większej grupie pacjentów. Podobne wyniki uzyskali Slattery i wsp., którzy zaobserwowali, że to genotyp homozygoty dzikiej AA oraz obecność allela A jest są istotnie związane z częstszym występowaniem raka jelita grubego w populacji amerykańskiej ($p=0,0239$) [Slattery i wsp., 2011]. Obecność zmutowanego allela T może być zatem również korzystnym czynnikiem rokowniczym. Natomiast badania przeprowadzone przez Lim i wsp. w populacji pacjentów u których stwierdzono raka żołądka wykazały, że obecność allela zmutowanego T polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* jest złym czynnikiem rokowniczym i wiąże z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka żołądka ($p=0,028$) [Lim i wsp., 2011]. W literaturze dostępne są również dane dotyczące związku pomiędzy obecnością zmutowanego allela T polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, a poziomem ekspresji tego czynnika transkrypcyjnego [Lim i wsp., 2011, Puig-Kröger i wsp., 2010]. W niniejszej rozprawie doktorskiej nie znaleziono związku pomiędzy poziomem ekspresji genu *RUNX3*, a występowaniem poszczególnych genotypów i alleli tego SNP ($p=0,5450$ dla genotypów oraz $p=0,5991$ dla allela A oraz $p=0,4130$ dla allela T). W celu

potwierdzenia uzyskanych w niniejszej rozprawie wyników badania powinny być przeprowadzone na większej grupie pacjentów.

Następnym etapem oceny genu *RUNX3* była analiza względnego poziomu jego ekspresji. Dotychczas przeprowadzone badania potwierdziły udział tego genu w procesie tymopoezy oraz neurogenezie. Potwierdzono również supresorową rolę tego genu w raku żołądka [Cheng i wsp., 2008; Inoue i wsp., 2002; Taniuchi i wsp., 2002; Li i wsp., 2002]. Jiang i wsp. wykazali, że obniżony poziom ekspresji genu *RUNX3* jest związany z rozwojem raka piersi. Prawdopodobną przyczyną tego procesu jest inaktywacja genu spowodowana hipermetylacją w regionie promotora [Jiang i wsp., 2008]. Oceniono również rolę ekspresji genu *RUNX3* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Badanie przeprowadzone przez Cheng i wsp. wykazało, że ekspresja genu *RUNX3* może być niezależnym czynnikiem prognostycznym u dzieci z ostrą białaczką szpikową. W tym badaniu zaobserwowano, że wyższy poziom ekspresji genu *RUNX3* był związany z krótszym czasem EFS i OS ($p=0,038$) [Cheng i wsp., 2008]. Podobne wyniki uzyskano w niniejszej rozprawie doktorskiej. Zaobserwowano istotne statystyczną różnicę między poziomem ekspresji genu *RUNX3* u pacjentów u których do końca czasu trwania obserwacji trwającego 3 lata stwierdzono zgon w porównaniu do grupy pacjentów u których zgonu nie stwierdzono. Wyższy poziom ekspresji genu *RUNX3* był związany z gorszym rokowaniem pacjentów z AML ($p=0,0373$). Ponadto przeprowadzona analiza czasu przeżycia pozwoliła stwierdzić, że niższe prawdopodobieństwo przeżycia występuje w grupie pacjentów u których stwierdzono podwyższone poziomy ekspresji genu *RUNX3*. Uzyskane wyniki są podobne do tych otrzymanych przez Cheng i wsp. [Cheng i wsp., 2008]. Na tej podstawie można stwierdzić, że poziom ekspresji genu *RUNX3* może być potencjalnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Podobne wyniki uzyskali Lacayo i wsp. [Lacayo i wsp., 2004]. Jednak badanie to zostało przeprowadzone na pacjentach należących do grupy mutantów FLT3, co mogło mieć również wpływ na wskaźnik przeżycia wolny od objawów EFS ($p=0,018$) [Lacayo i wsp., 2004]. W niniejszej rozprawie nie stwierdzono istotnie statystycznego związku między pozostałymi cechami demograficznymi oraz kliniczno-patologicznymi takimi jak wiek, płeć pacjentów czy rozpoznanie ostrej białaczki szpikowej według klasyfikacji FAB, a względnym poziomem ekspresji genu *RUNX3*. Podobne wyniki uzyskali Cheng i wsp.,

którzy również nie stwierdzili statystycznie istotnego związku między tymi cechami a względnym poziomem ekspresji genu *RUNX3* [Cheng i wsp., 2008]. Może to wskazywać na fakt iż względny poziom ekspresji genu *RUNX3* nie jest związany z płcią pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Zaobserwowano jednak, że u pacjentów u których poziom ekspresji genu *RUNX3* był niższy częściej stwierdzano podtyp białaczki M2 i M4 [Cheng i wsp., 2008]. W niniejszej rozprawie doktorskiej również uzyskano najniższe poziomy ekspresji genu *RUNX3* wśród pacjentów ze stwierdzonym AML4 jednak ze względu na małą liczebność podgrupy pacjentów analiza statystyczna nie została przeprowadzona. Wyniki względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3* uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej były zróżnicowane oraz nieco wyższe od tych uzyskanych przez Cheng i wsp. (mediany wynosiły odpowiednio: 0,0379- 8,5445 vs 0,006-0,677). Zaobserwowane różnice mogą wynikać z odmiennego wieku pacjentów zrekrutowanych do obu badań. W przypadku niniejszej rozprawy doktorskiej mediana wieku wszystkich pacjentów zrekrutowanych do badania wynosiła 61,5 lat, a w przypadku badań przeprowadzonych przez Cheng et al. było to 8,5 roku [Cheng i wsp., 2008]. Prawdopodobnie może to świadczyć o tym iż względny poziom ekspresji genu *RUNX3* jest obniżony u dzieci oraz rośnie wraz z wiekiem pacjentów. Może to świadczyć o odmiennym przebiegu choroby u pacjentów dorosłych w porównaniu do populacji pediatrycznej.

Ostatnim etapem oceny genu *RUNX3* była analiza jakościowa jego produktu białkowego. Jakościową obecność białka *RUNX3* stwierdzono jedynie w 3 próbach surowicy uzyskanej od pacjentów z ostrą białaczką szpikową (16,7%). Dostępne dane piśmiennictwa wskazują na obniżone stężenie i aktywność tych białek w surowicy krwi [*RUNX3 genecards.org*]. Wykazano, że aktywność białka *RUNX3* obserwowana jest w osoczu, monocytach, limfocytach B oraz limfocytach T posiadających receptory CD4, CD8 oraz komórkach NK. W innych rodzajach komórek oraz tkankach aktywność białka *RUNX3* jest znikoma [*RUNX3 genecards.org*]. Uzyskane w rozprawie wyniki są zgodne z dostępnymi danymi z piśmiennictwa. Ponadto istnieją doniesienia o występowaniu zjawiska hipermetylacji w genie *RUNX3*. Hipermetylacja ujemnie koreluje z poziomem ekspresji genów. Być może nasilony proces hipermetylacji w genie *RUNX3* może być związany z obniżeniem stężenia i aktywności białka *RUNX3* w wielu komórkach i tkankach [Jeong i wsp. 2018].

W niniejszej rozprawie doktorskiej, w celu określenia rokowania w grupie badanych pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową oceniono obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*. Według najnowszych wytycznych ELN z roku 2017 obecność genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* jest uznawana za korzystny czynnik rokowniczy wśród pacjentów z AML [Döhner i wsp., 2017; Szczeklik, 2018]. Gen fuzyjny *RUNX1-RUNX1T1* indukuje również samoodnawianie się komórek krwiotwórczych, a także hamuje ich późniejsze różnicowanie [Tonks i wsp., 2006]. Stwierdzenie obecności tego genu pozwala również na ocenę rokowania oraz dostosowania odpowiedniego leczenia u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Udowodniono, że gen fuzyjny *RUNX1-RUNX1T1* jest związany z dobrym rokowaniem oraz mniejszym ryzykiem nawrotu choroby. Ponadto pacjenci u których stwierdzono obecność genu fuzyjnego charakteryzują się wyższym odsetkiem całkowitej remisji oraz mają tendencję do pozytywnej odpowiedzi na leczenie cytarabiną w dużych dawkach i antracykliną [Döhner i wsp., 2017; Tonks i wsp., 2006; van der Kouwe i wsp., 2019]. Obecnie nie wiadomo, dlaczego pacjenci, u których stwierdzono obecność genu fuzyjnego charakteryzują się dobrym rokowaniem. Warto jednak nadmienić, że stwierdzenie obecności zmutowanej formy genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* jest złym czynnikiem rokowniczym i prognostycznym wśród pacjentów z AML [Krauth i wsp., 2014; Szczeklik, 2018; Sood i wsp., 2017; Tokumasu i wsp., 2015]. Według dostępnych badań gen fuzyjny *RUNX1/RUNX1T1* występuje w około 7% pacjentów z ostrą białaczką szpikową i najczęściej jest diagnozowany u pacjentów u których stwierdzono podtyp AML2 czyli białaczkę mieloblastyczną o cechach dojrzewania [Forster i wsp., 2016; Lam i wsp., 2012; Müller i wsp., 2008; van der Kouwe i wsp., 2019].

W niniejszej rozprawie doktorskiej gen fuzyjny został stwierdzony u 2 pacjentów co stanowiło 4,34% badanych. U jednego z dwóch pacjentów rozpoznano podtyp białaczki AML2. Uzyskane wyniki są podobne do wyników dostępnych w piśmiennictwie. Warto nadmienić, że u wszystkich pacjentów, u których stwierdzono obecność genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* zaobserwowano lepsze rokowanie (nie stwierdzono zgonu do końca czasu trwania 3 letniej obserwacji). Ze względu na fakt iż w niniejszej rozprawie doktorskiej oznaczono dziką formę genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* można wysnuć wniosek, że obecność niezmutowanej formy tego genu jest

związana z lepszym rokowaniem u pacjentów. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. Istotne byłoby wykonanie tych oznaczeń na większej grupie pacjentów.

Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, który został oceniony w niniejszej pracy doktorskiej był gen *CEBPA*. Analiza tego genu została przeprowadzona na dwóch poziomach molekularnych: RNA oraz na poziomie białka. Udowodniono, że gen *CEBPA* odpowiada za modulację i regulację ekspresji innych genów odpowiedzialnych między innymi za przebieg procesu cyklu komórkowego, regulację masy ciała oraz różnicowanie się komórek krwi w tym między innymi granulocytów [Szmajda i wsp., 2019; Wang i wsp., 2003; Porse i wsp., 2001; Pabst i wsp., 2009]. Analizę genu *CEBPA* przeprowadzono za względu na fakt, iż dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że gen ten odpowiada również za regulację równowagi między proliferacją i różnicowaniem komórek szpikowych podczas wczesnego rozwoju hematopoetycznego [Chapiro i wsp., 2006]. Białko kodowane przez gen *CEBPA* wzmacnia ekspresję części białek granulocytów oraz peptydów zawartych w ich ziarnistościach oraz działa jako represor ekspresji genów stymulujących erytropoezę. Warto nadmienić, że aktywność genu *CEBPA* zmienia się podczas rozwoju komórek mieloidalnych i stopniowo maleje w dojrzewających granulocytach [Pabst i wsp., 2009; Pieronkiweicz i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2004]. W piśmiennictwie Istnieją również doniesienia wskazujące na rolę tego genu jako supresora w nowotworach hematologicznych jak i niehematologicznych [Pabst i wsp., 2009]. Doniesienia w tym zakresie są jednak niejasne. Poziomy ekspresji genu *CEBPA* pomiędzy pacjentami z AML, a osobami zdrowymi są znacznie zróżnicowane [Gholami i wsp., 2019]. Istnieją prace opisujące podwyższony poziom ekspresji tego genu u pacjentów z AML co potwierdza jego istotną rolę w rozwoju i progresji ostrej białaczki szpikowej [Chapiro i wsp., 2006; Gholami i wsp., 2019]. Z kolei dostępne są również badania opisujące obniżoną ekspresję tego genu u pacjentów z białaczką [Grossmann i wsp., 2012; Paz-Priel i wsp., 2011]. To czy gen *CEBPA* pełni funkcje supresorową czy onkogeną nie zostało jeszcze dokładnie wyjaśnione.

Gholami i wsp. ocenili poziom ekspresji genu *CEBPA* zarówno u pacjentów z ostrą białaczką szpikową jak i u pacjentów zdrowych. Badania te wykazały, że ekspresja genu *CEBPA* jest podwyższona u pacjentów z AML w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0,027$) [Gholami i wsp., 2019]. Podobne wyniki otrzymali Fatemeh

Salarpour i wsp. W tych badaniach również stwierdzono, że ekspresja genu *CEBA* jest podwyższona u pacjentów białaczkowych ($p < 0.0001$) [Salarpour i wsp., 2017]. Do podobnych wniosków doszli także Szmajda i wsp., którzy porównywali względy poziom ekspresji genu *CEBPA* u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną w porównaniu do ostrej białaczki szpikowej. W przypadku pacjentów z AML poziom ekspresji *CEBPA* wykazał wyższy poziom ekspresji w porównaniu do pacjentów z ALL ($p < 0.0000$) [Szmajda i wsp., 2019]. W rozprawie doktorskiej względny poziom ekspresji genu *CEBPA* charakteryzował się największym zróżnicowaniem i był najwyższy z pośród wszystkich pozostałych przebadanych czynników transkrypcyjnych. Warto jednak nadmienić, że nie przeprowadzono analizy oceny poziomu ekspresji tego genu w grupie kontrolnej oraz nie porównano uzyskanych wyników pomiędzy obiema grupami dlatego porównanie uzyskanych wyników do tych, którzy otrzymali Szmajda i wsp., Gholami i wsp. oraz Fatemeh Salarpour i wsp. nie jest możliwe.

Ponadto Gholami i wsp. stwierdzili, że w grupie pacjentów z AML znacznie wyższy poziom ekspresji genu *CEBPA* zaobserwowano u dorosłych mężczyzn ($p = 0.006$) [Gholami i wsp., 2019]. Do podobnych wniosków doszli Szmajda i wsp. gdzie również wykazano, że mężczyźni prezentowali podwyższone i bardziej zróżnicowane poziomy mRNA genu *CEBPA* ($p = 0.032$) [Szmajda i wsp., 2019]. W niniejszej rozprawie również zaobserwowano nieco wyższy poziom względnego poziomu ekspresji tego genu w grupie mężczyzn w porównaniu do kobiet (1,6782 vs 1,6011). Zależność ta nie była jednak statystycznie istotna ($p = 0.8325$). Prowadzone badania udowodniły, że gen *CEBPA* ulega częstym mutacjom w AML (około 7–15% przypadków) oraz mogą one wpływać na jego ekspresję [Lin i wsp., 2005; Pabst i wsp., 2009; Pieronkiweicz i wsp., 2010]. Badania przeprowadzone przez Sahar Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovan i wsp. dowiodły, że obecność mutacji biallelicznych w genie *CEBPA* może być korzystnym czynnikiem prognostycznym i rokowniczym wśród pacjentów z AML. W badaniu tym potwierdzono, że obecność zmutowanej formy genu prowadzi do znacznego obniżenia wskaźników EFS oraz OS w porównaniu do pacjentów bez stwierdzonej mutacji (odpowiednio $p = 0.02$, $p = 0.03$). Zaproponowano również, że obniżony poziom ekspresji genu *CEBPA* może być związany ze złym rokowaniem [Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani i wsp., 2003]. Z kolei w niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano tendencje do występowania nieco wyższych

poziomów ekspresji genu *CEBPA* u pacjentów charakteryzujących się gorszym rokowaniem (stwierdzenie zgonu w czasie 3 letniej obserwacji). Uzyskane wyniki są one sprzeczne z opublikowanymi przez Sahar Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovan i wsp. Warto zaznaczyć, że uzyskana w niniejszej rozprawie zależność nie była istotna statystycznie ($p=0,5858$). Dlatego wydaje się, że względny poziom ekspresji genu *CEBPA* nie wpływa na rokowanie w tej grupie pacjentów z AML.

Istotny wydaje się również związek pomiędzy typem ostrej białaczki szpikowej według klasyfikacji FAB, a poziomem mRNA genu *CEBPA*. Fatemeh Salarpou i wsp. zaobserwowali obniżony poziom ekspresji genu *CEBPA* w podtypie białaczki M3 a podwyższony w typie M4 [Salarpour i wsp., 2017]. Z kolei w niniejszej rozprawie doktorskiej uzyskane wyniki były odwrotne. Najniższe poziom ekspresji genu *CEBPA* uzyskano w podtypie białaczki M1 oraz M4, a najwyższe w podtypie M3. Uzyskane wyniki były zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Kassem i wsp., którzy znaleźli istotnie statystycznie związek pomiędzy podwyższonym poziomem ekspresji genu *CEBPA* w podtypem AML M3 ($p=0,036$) [Kassem i wsp., 2013]. Różnice w doniesieniach literaturowych mogą wynikać z odmiennej liczebności grup badanych i różnic populacyjnych.

Następnie oceniono jakościowo białko CEBPA, które jest produktem białkowym genu *CEBPA*. Przeprowadzona w niniejszej rozprawie doktorskiej analiza jakościowa techniką Western-Blot ujawniła obecność tego białka we wszystkich analizowanych surowicach chociaż wynik reakcji wskazywał na występowania tego białka w bardzo niskich stężeniach. Dostępne publikacje również wskazują, na obniżone stężenie tego białka w surowicy krwi. Podobne wyniki uzyskano przy ocenie poziomu aktywności białka CEBPA. Zaobserwowano aktywność tego białka w wątrobie i łożysku natomiast poziom CEBPA w pozostałych narządach i komórkach jest znacznie obniżona [CEBPA genecards.org].

Ostatnim czynnikiem, który był analizowany w niniejszej rozprawie doktorskiej był gen *c-MYC*. Jego analiza została przeprowadzona jedynie na poziomie mRNA. Gen *c-MYC* jest czynnikiem transkrypcyjnym zaliczanym do protoonkogenów. Reguluje poziom ekspresji wielu genów oraz prowadzi do zwiększania poziomu ich transkryptów mRNA. Dostępne w piśmiennictwie dane wskazują, że gen *c-Myc* jest jednym z czynników transkrypcyjnych odgrywających istotną rolę w procesie hematopoezy

[Delgado i wsp, 2010; Wilson i wsp., 2004]. Wykazano, że gen ten jest niezbędny do zachowania prawidłowej równowagi między samoodnawianiem a różnicowaniem się hematopoetycznych komórek macierzystych [Fagnocchi i wsp., 2017; Iavarone i wsp., 2014; McMahon i wsp., 2014]. Wykazano również, że zróżnicowana ekspresja genu *c-MYC* może być związana z postępem choroby oraz może być czynnikiem rokowniczym oraz prognostycznym u pacjentów z AML [Ohanian i wsp., 2019; Pan i wsp., 2014].

Badania dotyczące roli i znaczenia zmienionego poziomu ekspresji genu *c-MYC* jako czynnika prognostycznego u pacjentów z ostrą białaczką szpikową są niejasne. Badania przeprowadzone przez Akhter Ariz i wsp. dowiodły, że nadekspresja genu *MYC* w powiązaniu ze zwiększonym poziomem ekspresji genu *BCL2* jest istotnie statystycznie związana z niższym współczynnikiem całkowitego przeżycia ($p < 0,036$). Na podstawie tych badań można wysnuć wniosek, że podwyższona ekspresja genu *c-MYC* jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u pacjentów z AML [Akhter i wsp., 2018]. Do podobnych wniosków doszli Maro Ohanian i wsp., którzy z kolei potwierdzili rolę ekspresji białka MYC jako czynnika prognostycznego u pacjentów z AML. Dowiedli oni, że dłuższy czas do osiągnięcia stanu remisji korelował z nadekspresją białka MYC ($p = 0,028$). Ponadto zaobserwowano, że zwiększony poziom ekspresji tego białka jest niekorzystnym biomarkerem przeżycia w grupie pacjentów powyżej 55 roku życia [Ohanian i wsp., 2019]. Warto nadmienić, że badacze skupili się na roli białka *c-MYC* a nie zbadali poziomu ekspresji transkryptu tego genu. Poziom ekspresji genu *c-MYC* u pacjentów z AML został również przebadany przez Mohammad Sayyadi i wsp. Badanie to również wykazało zwiększoną ekspresję genu *c-MYC* wśród pacjentów białaczkowych w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,05$) [Sayyadi i wsp., 2020]. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez Mohammad Sayyadi i wsp., w niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano, że względny poziom ekspresji genu *c-MYC* jest obniżony u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Nie znaleziono ponadto istotnie statystycznych różnic pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *c-MYC* a danymi demograficznymi oraz kliniczno-patologicznymi takimi jak: wiek, płeć czy rozpoznanie według FAB. Podobnych zależności nie zaobserwowali również Mohammad Sayyadi i wsp. oraz Ohanian i wsp.

Z kolei Muhammed Kashif Mughail i wsp. zaobserwowali, że obniżone poziomy stężenia białka *c-MYC* występują w grupie pacjentów zaliczanych do tzw.

niekorzystnego rokowania. Ponadto u tych pacjentów stwierdzono niższy wskaźnik OS ($p=0,001$) [Mughail i wsp., 2017]. Może to wskazywać na fakt iż obniżone poziomy białka c-MYC u pacjentów z niekorzystnym rokowaniem mogą być związane z gorszą prognozą i przebiegiem choroby. Badania przeprowadzone przez Antonella Poloni i wsp. opisują zwiększony poziom ekspresji genu *c-MYC* u pacjentów białaczkowych w porównaniu z pacjentami zdrowymi. Jednak zaobserwowano również, że u pacjentów u których wystąpiła delecja chromosomu 5 (del5q), która jest zaliczana do niekorzystnych czynników ryzyka, ekspresja genu *c-Myc* również była obniżona [Poloni i wsp., 2013]. W niniejszej rozprawie doktorskiej zaobserwowano, tendencje do występowania niższych poziomów ekspresji genu *c-MYC* u pacjentów u których w czasie trwania 3 letniej obserwacji stwierdzono zgon. Również ocenione prawdopodobieństwo przeżycia w tej grupie pacjentów była niższe. Być może obniżona ekspresja tego genu może być niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u tych pacjentów. Uzyskane wyniki nie były jednak statystycznie istotne ($p=0,8437$). Warto jednak zaznaczyć, że w niniejszej rozprawie nie klasyfikowano pacjentów pod kątem czynników ryzyka tak jak zrobili to Antonella Poloni i wsp. Prawdopodobnie poziomy ekspresji genu *c-MYC* oraz kodowanego przez niego białka mogą dwojako wpływać na rokowanie oraz prognozę wśród pacjentów z AML. Może być to związane z przynależnością pacjentów do określonej grupy ryzyka (korzystnego, pośredniego lub niekorzystnego).

Podsumowując, obecność polimorfizmu rs2268277 w genie *RUNX1* prawdopodobnie nie jest związana z rozwojem AML, ale może mieć wpływ na przebieg choroby wśród pacjentów. Polimorfizm rs6672420 genu *RUNX3* nie jest związany z zapadalnością oraz przebiegiem i rokowaniem. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano również, że różnice we względnym poziomie ekspresji czynników transkrypcyjnych zaliczanych do genów z rodziny *RUNX* mogą mieć związek z przebiegiem ostrej białaczki szpikowej oraz mogą być uznane za niekorzystny czynnik rokowniczy wśród pacjentów. W przypadku pozostałych wybranych czynników transkrypcyjnych nie określono roli względnego poziomu ekspresji w rozwoju AML.

Przeprowadzone analizy mogą stanowić wstęp do kontynuacji oraz przeprowadzenia dalszych badań dotyczących oceny roli czynników transkrypcyjnych w rozwoju oraz przebiegu ostrej białaczki szpikowej oraz poszukiwania nowych

biomarkerów związanych z tą chorobą. Istotne wydaje się zwiększenie liczebności grupy badanej oraz przeprowadzenie analiz na wszystkich trzech poziomach molekularnych DNA-RNA-białko. Warte uwagi byłoby zbadanie innych kluczowych czynników epigenetycznych, które mogą potencjalnie wpływać na zapadalność oraz przebieg i rokowanie u pacjentów cierpiących z powodu ostrej białaczki szpikowej.

Wnioski

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwoliły na przedstawienie następujących wniosków:

- ❖ Polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1* nie jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AML.
- ❖ Istotny statystycznie związek pomiędzy stwierdzeniem wyższego wieku w momencie rozpoznania choroby stwierdzonym u pacjentów z genotypem GC (polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1*) w porównaniu do homozygot dzikich GG oraz genotypem homozygoty zmutowanej CC może świadczyć o późniejszym występowaniu objawów chorobowych, łagodniejszym przebiegu oraz późniejszą manifestacją objawów klinicznych ostrej białaczki szpikowej wśród chorych będących heterozygotami.
- ❖ Obecność dzikiego allela G polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* była istotnie statystycznie związana z wyższym wiekiem rozpoznania choroby w porównaniu do pacjentów u których obecności allela G nie stwierdzono.
- ❖ Brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy częstościami występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* pomiędzy grupą badaną a kontrolną oraz brak istotnych statystycznie związków między wybranymi danymi demograficznymi oraz kliniczno-patologicznymi u pacjentów z ostrą białaczką szpikową wskazują na brak wpływu badanego polimorfizmu na etiopatogenezę oraz zachorowalność na AML.
- ❖ Polimorfizm rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizm rs6672420 genu *RUNX3* nie wpływają na względny poziom ekspresji tych genów.
- ❖ Istotnie statystycznie wyższy względny poziom ekspresji genu *RUNX1* stwierdzony u kobiet w porównaniu do podgrupy mężczyzn może potencjalnie wpływać na zapadalność oraz odmienny przebieg ostrej białaczki szpikowej u obu płci.

- ❖ Istotnie statystycznie podwyższone poziomy ekspresji genu *RUNX3* w grupie pacjentów którzy w czasie trwania 3-letniej obserwacji charakteryzowali się krótszym czasem przeżycia mogą być związane z gorszym rokowaniem oraz wyższym wskaźnikiem śmiertelności u tych pacjentów. Podwyższona względna ekspresja genu *RUNX3* może być złym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z AML.
- ❖ Brak istotnych statystycznie zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CEBPA* oraz *c-MYC* a wybranymi cechami demograficzno-klinicznymi wskazuje na brak związku ekspresji tych genów z rozwojem oraz przebiegiem AML.
- ❖ Stwierdzona obecność genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* u pacjentów z AML jest korzystnym czynnikiem rokowniczym.
- ❖ Uzyskane niskie stężenia białek *CEBPA* oraz stwierdzenie jakościowej obecności białka *RUNX3* u 3 pacjentów potwierdza fakt iż ekspresja tych białek w surowicy krwi jest niezwykle obniżona. Prawdopodobnie na ilość powstającego białka w różnych komórkach i tkankach wpływają zmiany epigenetyczne oraz modyfikacje potranslacyjne. Potwierdzenie tych wyników wymaga dalszych analiz.

ROZDZIAŁ V

Streszczenie

Ostra białaczka szpikowa należy do grupy heterogennych chorób nowotworowych układu białokrwinkowego. Charakteryzuje się klonalną proliferacją oraz rozrostem w szpiku kostnym oraz we krwi, transformowanych nowotworowo komórek blastycznych, które wywodzą się z prekursorowej komórki mieloidalnej. Przebieg ostrej białaczki szpikowej jest niezwykle ciężki: nieleczona, może w ciągu kilku tygodni doprowadzić do śmierci chorego. Spośród czynników, które mogą prowadzić do rozwoju AML coraz większą uwagę przykładą się do roli molekularnych wskaźników transformacji nowotworowej, które mogą przyczynić się do powstania samoodtwarzającego się klonu komórek białaczkowych. Wśród aberracji genetycznych mających potencjalny związek z rozwojem AML czy oceną rokowania wśród pacjentów istotne wydają się zmiany w genach kodujących tzw. czynniki transkrypcyjne, regulujące procesy transkrypcji, a także kontrolujące procesy różnicowania i kształtowania się komórek.

Do czynników transkrypcyjnych należą między innymi białka kodowane przez geny z rodziny *RUNX* (*RUNX1* oraz *RUNX3*) oraz geny *CEBPA* oraz *c-MYC*.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena polimorfizmów, poziomów ekspresji oraz obecności produktów białkowych genów, kodujących czynniki transkrypcyjne, potencjalnie zaangażowanych w leukemogenezę oraz patogenezę AML. Analizę przeprowadzono na trzech poziomach molekularnych, włączając w to DNA, RNA oraz produkt białkowy. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów dla genów *RUNX1* (rs2268277) oraz *RUNX3* (rs6672420) zostały ocenione przy wykorzystaniu techniki PCR-RFLP. Za pomocą techniki RT-qPCR przeprowadzono analizę względnych poziomów ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC*. Obecność produktów białkowych genów *RUNX3* oraz *CEBPA* została oceniona przy wykorzystaniu metody Western-Blot. Dodatkowym ocenianym parametrem była również obecność ekspresji genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową przy użyciu metody RT-qPCR z wykorzystaniem sondy typu TaqMan. Grupa badana składała się z 46 pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową. Materiałem badanym była krew pobrana na EDTA z której wyizolowano odpowiednio DNA oraz RNA. Próby krwi pochodziły z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Uzyskane wyniki genotypowania zostały porównane do 60 prób DNA wyizolowanego od zdrowych osób.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały porównane z danymi demograficznymi oraz kliniczno-patologicznymi pacjentów.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na wyciągnięcie następujących wniosków. Obecność polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* nie jest związana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AML, natomiast heterozygoty GC oraz pacjenci u których występuje allel dziki G charakteryzują się wyższym wiekiem w momencie rozpoznania choroby w porównaniu do homozygot dzikich GG oraz homozygot zmutowanych CC co może świadczyć o późniejszym występowaniu objawów chorobowych oraz o późniejszej manifestacji objawów klinicznych. Polimorfizm rs6672420 genu *RUNX3* nie wpływa na poziom jego ekspresji oraz nie ma związku z etiopatogenezą oraz zachorowalnością na AML.

Analiza poziomów transkryptów genów *CEBPA* oraz *c-MYC* wskazuje na brak związku pomiędzy poziomem ekspresji tych genów a rozwojem oraz przebiegiem AML. Stwierdzone istotnie wyższe poziomy ekspresji genu *RUNX1* u kobiet w porównaniu do mężczyzn, co może potencjalnie wpływać na zapadalność oraz odmienny przebieg ostrej białaczki szpikowej u obu płci. Istotnie statystycznie podwyższone poziomy ekspresji genu *RUNX3* w grupie pacjentów, którzy w czasie trwania 3-letniej obserwacji charakteryzowali się krótszym czasem przeżycia mogą być związane z gorszym rokowaniem oraz wyższym wskaźnikiem śmiertelności u tych pacjentów. Podwyższona względna ekspresja genu *RUNX3* może być złym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z AML. Jednak uzyskane wyniki powinny zostać potwierdzone na większej grupie pacjentów. Ponadto stwierdzenie obecności genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1* u grupie pacjentów z AML potwierdza jego rolę jako korzystny czynnik rokowniczy. Uzyskane niskie stężenia białek *CEBPA* oraz stwierdzenie jakościowej obecności białka *RUNX3* jedynie u 3 pacjentów potwierdza fakt, iż ekspresja tych białek w surowicy krwi jest niezwykle obniżona. Potwierdzenie tych wyników wymaga dalszych analiz.

Poznanie funkcji oraz pełnej charakterystyki genów z rodziny *RUNX* oraz genów *CEBPA* oraz *c-MYC* w grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową może być szczególnie pomocne w ocenie rokowania oraz może być uznane za czynnik rokowniczy. Może przełożyć się to na opracowanie nowych celowanych strategii leczniczych oraz zwiększenie skuteczność leczenia u pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

Summary

Acute myeloid leukemia belongs to the group of heterogeneous neoplastic diseases of the white blood cell system. It is characterized by clonal proliferation and growth of cancer-transformed blast cells that originate from the precursor myeloid cell in the bone marrow and in the blood. The course of acute myeloid leukemia is extremely severe: if left untreated, it can lead to death of a patient within a few weeks. Among the factors that can lead to the AML development, more and more attention is paid to the role of molecular indicators of tumor transformation, which may contribute to the formation of a self-regenerating leukemia cell clone. Among genetic aberrations potentially related to the development of AML or prognosis assessment among patients, changes in genes coding for the so-called transcription factors regulating transcription processes as well as controlling the cell differentiation and formation seem significant.

Transcription factors include, among others, proteins encoded by the *RUNX* family genes (*RUNX1* and *RUNX3*) as well as the *CEBPA* and *c-MYC* genes.

The purpose of this dissertation was to evaluate polymorphisms, expression levels and the protein products presence of genes encoding transcription factors potentially involved in leukemogenesis and AML pathogenesis. The analysis was carried out at three molecular levels, including DNA, RNA and protein. Single nucleotide polymorphisms for the *RUNX1* (rs2268277) and *RUNX3* (rs6672420) genes were evaluated using PCR-RFLP method. The relative expression levels of the *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* and *c-MYC* genes were analyzed using RT-qPCR. The presence of *RUNX3* and *CEBPA* gene protein products was assessed using the Western-Blot method. Additionally the expression presence of *RUNX1-RUNX1T1* fusion gene in patients with acute myeloid leukemia using the RT-qPCR method with a TaqMan probe was evaluated. The study group consisted of 46 patients diagnosed with acute myeloid leukemia. Investigated material comprised blood collected on EDTA from which DNA and RNA were isolated, respectively. Blood samples came from the Institute of Hematology and Transfusion Medicine in Warsaw. The obtained genotyping results were compared to 60 DNA samples isolated from healthy people. All collected data was compared with demographic and clinical-pathological features of patients.

Analysis of the obtained results allowed to define the following conclusions. The presence of the *RUNX1* gene rs2268277 polymorphism is not associated with an increased risk of developing AML, however GC heterozygotes and patients with the wild G allele have a higher age at diagnosis when compared to wild GG homozygotes and mutant CC homozygotes, which may indicate later occurrence of disease symptoms and subsequent clinical manifestation. The *RUNX3* gene rs6672420 polymorphism does not affect its expression level nor is associated with etiopathogenesis and AML incidence.

Analysis of *CEBPA* and *c-MYC* transcript levels indicate that there is no association between the expression level of these genes and the development and course of AML. Significantly higher levels of *RUNX1* gene expression in women compared to men have the potential to affect the incidence and different course of acute myeloid leukemia in both sexes. Significantly increased *RUNX3* gene expression levels in the group of patients, who had a shorter survival time during the 3-year observation, may be associated with worse prognosis and a higher mortality rate in these patients. Increased relative expression of the *RUNX3* gene may be a poor prognostic factor in AML patients. However, the obtained results should be confirmed on a larger group of patients. In addition, the presence of the *RUNX1 / RUNX1T1* fusion gene in AML patients confirms its role as a favorable prognostic factor. The low levels of *CEBPA* and the qualitative presence of *RUNX3* protein in only 3 patients confirm that the expression of these proteins in blood serum is extremely reduced. Confirmation of these results requires further analysis.

Understanding the function and full characteristics of genes from the *RUNX* family as well as *CEBPA* and *c-MYC* genes in the group of patients with acute myeloid leukemia can be particularly helpful in assessing prognosis and may be considered as a prognostic factors. This may translate into the development of new targeted therapeutic strategies and an increase in the effectiveness of treatment in patients with acute myeloid leukemia.

ROZDZIAŁ VI

Piśmiennictwo

Abba MC., Laguens RM., Dulout FN., et al. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res.* 2004;557(2):151-158.

Abbate A., Tolomeo D., Cifola I., et al. MYC-containing amplicons in acute myeloid leukemia: genomic structures, evolution, and transcriptional consequences. *Leukemia.* 2018;32(10):2152-2166.

Akhter A., Farooq F., Elyamany G., et al. Acute Myeloid Leukemia (AML): Upregulation of BAALC/MN1/MLLT11/EVI1 Gene Cluster Relate With Poor Overall Survival and a Possible Linkage With Coexpression of MYC/BCL2 Proteins. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26(7):483-488.

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

Asou N. The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;45:129–150.

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

Bae S.C., Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene.* 2004;23:4336–4340.

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., et al. The RUNX3 gene-sequence, structure and regulated expression. *Gene.* 2001;279:221–232.

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

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S., Erpelinck C., Meijer J., et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic

markers in intermediate-risk AML. *Hematol J.* 2003;4(1):31-40.

Barnes GL., Hebert KE., Kamal M., et al. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res.* 2004;64:4506–4513.

Barnes GL., Javed A., Waller SM., et al. Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:2631–2637.

Barr LF., Campbell SE., Diette GB., et al. c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 2000;60(1):143-149.

Batley J., Moulding C., Taub R., et al. The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell.* 1983;34(3):779-787.

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

Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons.*, 3 (2010), 85-95.

Bretones G., Delgado MD., León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(5):506-516.

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

Brunstein C.G., Gutman J.A., Weisdorf D.J., et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood.* 2010; 116 (22); pp. 4693-4699.

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

CEBPA gene. Baza U.S. National Library of Medicine (NIH). Strona internetowa: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CEBPA> dostęp on-line: 08.01.2020r.

CEBPA gene. Genecards. Strona internetowa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEBPA> Dostęp on-line 08.01.2020r.

Chapiro, E. Russell L., Radfort-Weiss I., et al. Overexpression of CEBPA resulting from the translocation t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2006; 108, 3560–3563.

Chen HX., Yuan ZY., Wu KX., et al. The study of methylation and single nucleotide polymorphisms of cancer-related genes in patients with early-stage ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol. 2019;54(4):427-431.

Cheng CK., Li L., Cheng SH., 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;112:3391–3402.

Chi J., Costeas P. The Evolution of Genetics Techniques for Leukemia Diagnosis. Adv Tech Biol Med., 3 (2015), p. 2.

Chuang LS., Ito K., Ito Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. Int J Cancer. 2013;132:1260–1271.

Chung DD., Honda K., Cafuir L., et al. The Runx3 distal transcript encodes an additional transcriptional activation domain. FEBS J. 2007;274(13):3429-3439.

c-MYC gene. Genecards. Strona internetowa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYC> Dostęp on-line: 08.01.2020r.

Dalle Carbonare L., Frigo A., Francia G., et al. Runx2 mRNA expression in the tissue, serum, and circulating non-hematopoietic cells of patients with thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97:E1249–E1256.

Dang CV. MYC on the path to cancer. Cell. 2012;149(1):22-35.

Dang CV., Reddy EP., Shokat KM., et al. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nature Reviews. Cancer*. 2017; 17 (8): 502–508.

De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.

Delgado MD., León J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer*. 2010;1(6):605-616.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424–447.

Döhner H., Estey E.H., Amadori S., et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*. 2010; 115: 453-474.

Dominguez-Sola D., Gautier J. MYC and the control of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(6):a014423.

Dufour A., Schneider F., Metzeler KH., et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28: 570-7.

Eklund EA. Genomic analysis of acute myeloid leukemia: potential for new prognostic indicators. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(2):75-78.

Endo T., Ohta K., Kobayashi T. Expression and function of Cbfa-1/Runx2 in thyroid papillary carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:2409–2412.

Erikson J., ar-Rushdi A., Drwinga HL., et al. Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(3):820-824.

Estey E., Döhner A. Acute myeloid leukaemia. *Lancet.*, 368 (2006), pp. 1894-1907.

Fagnocchi L., Zippo A. Multiple Roles of MYC in Integrating Regulatory Networks of Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:7.

Faoro V., Becker K. F., Stanta G. Visualisation of Proteins. W: Stanta G.: *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues.* Springer, 2011: 265–266.

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

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

Fey M.F., Buske C. Acute myeloblastic leukaemias in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology O.* (2013), pp. 1-6.

Figueiredo J.C., Knight J.A., Cho S., et al. Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis. *BMC Cancer.* 2007; 7; 99.

Forster V.J., Nahari M.H., Martinez-Soria N., et al. *Leukemia.* 2016; 30(1): 251–254.

Friedrich MJ., Rad R., Langer R., et al. Lack of RUNX3 regulation in human gastric cancer. *J Pathol.* 2006;210:141–146.

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

Gao J., Yang PT., Diao Y., et al. Effects of PSCA rs2294008 (C/T) and c-MYC rs9642880 (G/T) polymorphisms on bladder cancer: evidence from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):2156-2164.

Gao QQ., Zhou B., Yu XZ., et al. Transcriptome changes induced by RUNX3 in cervical cancer cells in vitro. *Oncol Lett.* 2020;19(1):651-662.

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

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

Ghozi MC., Bernstein Y., Negreanu V., et al. *Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(5):1935–1940

Gilliland DG., Griffin JD. *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. *Blood*. 2002;100:1532-42.

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

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

Green AR., Aleskandarany MA., Agarwal D., et al. *MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours*. *Br J Cancer*. 2016;114(8):917-928.

Green CL., Koo KK., Hills RK., et al. *Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations*. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2739-47.

Grimwade D., Hills RK., Moorman AV., 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., Bacher U., Kohlmann A. et al. Expression of CEBPA is reduced in RUNX1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2012; 2(8); e86.

Guo C., Ding J., Yao L., et al. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bcl-2, MDR-1 and MRP-1. *Int J Cancer.* 2005;116:155–160.

Guo C., Hu Q., Yan C., et al. Multivalent binding of the ETO corepressor to E proteins facilitates dual repression controls targeting chromatin and the basal transcription machinery. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(10):2644-57.

Habib T., Park H., Tsang M., et al. Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J Cell Biol.* 2007;179(4):717-731.

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

Hai-Xing Chen., Zi-Ying Yuan., Ke-Xiang Wu., et al. The study of methylation and single nucleotide polymorphisms of cancer-related genes in patients with early-stage ulcerative colitis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2019, 54:4: 427-431,

Han R., Wei J., Zhang H., et al. Influence of TS (rs34743033) and RUNX1 (rs2014300) gene polymorphisms on survival outcomes of fluorouracil-based chemotherapy in Chinese advanced gastric cancer patients. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1429-1437.

Hasserjian R.P. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. *Int. Jnl. Lab. Hem.*, 35 (2013), 358-366.

Hirano S. Western blot analysis. *Methods Mol Biol.* 2012;926:87-97.

Hoffman B., Amanullah A., Shafarenko M., et al. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene.* 2002;21:3414-21.

Holowiecki J., Grosicki S., Giebel S., et al. Cladribine, But Not Fludarabine, Added to Daunorubicin and Cytarabine During Induction Prolongs Survival of Patients With

Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter, Randomized Phase III Study. Journal of Clinical Oncology. 30 (2012), pp. 2441-2448.

Holowiecki J., Grosicki S., Robak T. et al. Polish Adult Leukemia Group (PALG). Addition of cladribine to daunorubicin and cytarabine increases complete remission rate after a single course of induction treatment in acute myeloid leukemia. Multicenter, phase III study. Leukemia., 18 (2004), pp. 989-997.

Hołowiecki J. Białaczki ostre. Interna Szczeklika. Podręcznik Chorób Wewnętrznych. W: Hellmann A, red. Medycyna Praktyczna. Kraków; 2013. p. 1640–1654.

Huang SP., Lan YH., Lu TL., et al. Clinical significance of runt-related transcription factor 1 polymorphism in prostate cancer. BJU Int. 2011;107(3):486-492.

Iavarone A., Lasorella A. Myc and differentiation: going against the current. EMBO Rep. 2014;15(4):324-325.

Iba T., Kigawa J., Kanamori Y., et al. Expression of the c-myc gene as a predictor of chemotherapy response and a prognostic factor in patients with ovarian cancer. Cancer Sci. 2004;95(5):418-423.

Imai Y., Kurokawa M., Tanaka 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;252:582–589.

Inoue K., Ozaki S., Shiga T., et al. RUNX3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. Nat Neurosci. 2002;5:946–954.

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

Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. Oncogene. 2004;23(24):4198-4208.

Javadlar M., Dastar S., Gharesouran J., et al. RUNX1 variant as a genetic predisposition factor for acute myeloid leukemia. Exp Mol Pathol. 2020;115:104440.

Javed A., Guo B., Hiebert S., et al. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci.* 2000;113:2221–2231.

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.

Jiang Y., Tong D., Lou G., et al. Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines. *Pathobiology.* 2008;75:244–251.

Ju Y., Sui J., Song M., et al. Relationship between RUNX3 gene rs2236852 polymorphism and gastric cancer. *Chinese Journal of Gastroenterology* 18(8):487-489.

Juin P., Hueber AO., Littlewood T., et al. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev.* 1999;13(11):1367-1381.

Jung M., Russell AJ., Kennedy C., et al. Clinical Importance of Myc Family Oncogene Aberrations in Epithelial Ovarian Cancer. *JNCI Cancer Spectr.* 2018;2(3):pky047. Published 2018 Nov 16.

Kanno T., Takahashi T., Tsujisawa T., et al. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2007;101:1266–1277.

Kassem N., Fahmy Ael-G., Desoky M., et al. CCAAT/enhancer binding protein α gene expression in Egyptian patients with acute myeloid leukemia. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2013;25(3):115-120.

Kata D., Kyrz-Krzemień S. Ostra białaczka szpikowa- współczesne poglądy na patogenezę, postępowanie diagnostyczne, klasyfikację, stratyfikację prognostyczną i leczenie *Post Nauk Med.*, 24 (2011); 601-609.

Kehrl JH. Hematopoietic lineage commitment: role of transcription factors. *Stem*

Cells. 1995;13(3):223-241.

Kihara R., Nagata Y., Kiyoi H., et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014;28(8):1586-1595.

Knezevic K., Bee T., Wilson NK., et al. "A Runx1-Smad6 rheostat controls Runx1 activity during embryonic hematopoiesis". *Molecular and Cellular Biology*. 2011, 31 (14): 2817–26.

Komeno Y., Yan M., Matsuura S., et al. Runx1 exon 6-related alternative splicing isoforms differentially regulate hematopoiesis in mice. *Blood*. 2014;123(24):3760-3769.

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

Krauth MT., Eder C., Alpermann T., et al. . High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome. *Leukemia*. 2014;28(7):1449-1458.

Krygier A., Szmajda D., Żebrowska M., et al. 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.

Kumar R., Cheney K. M., McKirdy R, et al. CBFA2T3-ZNF652 corepressor complex regulates transcription of the E-box gene HEB. *J. Biol. Chem*. 2008: 283:19026-19038.

Kurek KC., Del Mare S., Salah Z., et al. Frequent attenuation of the WWOX tumor suppressor in osteosarcoma is associated with increased tumorigenicity and aberrant RUNX2 expression. *Cancer Res*. 2010;70:5577–5586.

Lacayo NJ., Meshinchi S., Kinnunen P., et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo child-hood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood*. 2004;104:2646–2654.

Lam K., Zhang DE. *RUNX1 and RUNX1-ETO: Roles in hematopoiesis and leukemogenesis. Front Biosci (Landmark Ed) 2012;17:1120–1139.*

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

Lau QC., Raja E., Salto-Tellez M., , et al. *RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer. Cancer Res. 2006;66:6512–6520.*

Lee KS., Kwak Y., Nam KH., et al. *Favorable prognosis in colorectal cancer patients with co-expression of c-MYC and β -catenin. BMC Cancer. 2016;16(1):730.*

Lee TI., Young RA. *Transcriptional regulation and its misregulation in disease. Cell. 2013;152(6):1237-1251.*

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

Levanon D., Groner Y. *Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. Oncogene. 2004;23:4211–4219.*

Li QL., Ito K., Sakakura C., et al. *Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. Cell. 2002;109:113–124.*

Li Z., Van Calcar S., Qu C., et al. *A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8164-8169.*

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

Lin LI., Chen CY., Lin DT., et al. *Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. Clin Cancer Res.*

2005;11(4):1372-1379.

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.

Ławkowicz W., Krzemińska-Ławkowiczowa I. Atlas hematologiczny oraz wytyczne w rozpoznawaniu chorób układu krwiotwórczego. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa, 1952.

Macheta A., Chocholska S., Podhorecka M. Metody genetyczne w diagnostyce hematoonkologicznej. *Postępy Hig Med Dosw.*, 69 (2015), 475-487.

Mahmood T., Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-434.

McMahon SB. MYC and the control of apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(7):a014407.

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., et al. RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development* 2019; 146(17).

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

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

Muellar-Tidow C., Steffen B., Cauvet T., et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24:2890-904.

Mughal, M. K., Akhter, A., Street, L., et al. Acute myeloid leukaemia: expression of MYC protein and its association with cytogenetic risk profile and overall survival. *Hematological Oncology*. 2017; 35: 350– 356.

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

MYC (MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. Strona internetowa: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MYCID27.html> Dostęp on-line: 08.01.2020r.

National Comprehensive Cancer Network, NCCN. <https://www.nccn.org/> Dostęp on-line: 25.05.2020r.

National Library of Medicine: RUNX1 SNP rs2268277. Strona internetowa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2268277#frequency_tab Dostęp on-line: 08.01.2020r.

National Library of Medicine: RUNX3 SNP rs6672420. Strona internetowa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6672420#frequency_tab Dostęp on-line: 08.01.2020r.

Nguyen L., Papenhausen P., Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*. 2017;8(4):116.

Ogawa E., Inuzuka M., Maruyama M., et al. Molecular Cloning and Characterization of PEBP2 Beta, the Heterodimeric Partner of a Novel Drosophila Runt-Related DNA Binding Protein PEBP2 Alpha. *Virology*. 1993a; 194: 314–331.

Ogawa E., Maruyama M., Kagoshima H., 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*, 1993b; 90: 6859–6863.

Ohanian M., Rozovski U., Kanagal-Shamanna R., et al. MYC protein expression is an important prognostic factor in acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2019;60(1):37-48.

Okuda T., Nishimura M., Nakao M., et al. RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. International Journal of Hematology. 2001, 74 (3): 252–7.

Olofsson LE., Orho-Melander M., William-Olsson 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., 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.

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

Osato M., Asou N., Abdalla E., et al. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. Blood. 1999;93(6):1817-1824.

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

Ott G., Rosenwald A., Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013;2013:575-583.

Otto F., Stock M., Fliegauf M., et al. Absence of somatic mutations within the Runt domain of AML2/RUNX3 in acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2003;17:1677–1678.

Pabst T., Mueller B. U. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res.2009: 15(17), 5303–7.

Pan XN., Chen JJ., Wang LX., et al. Inhibition of c-Myc overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid leukemia cells by promoting differentiation. *PLoS One*. 2014;9(8):e105381. Published 2014 Aug 15.

Parkin SE., Baer M., Copeland TD., et al. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (Ig/EBP). *J Biol Chem* 2002; 277: 23563-72.

Paschka P., Dohner K. Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:209-219.

Paz-Priel I., Friedman A. C/EBP α dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):93-102.

Petrie K., Zelent A. AML1/ETO, a promiscuous Fusion oncoprotein, *Blood* (2007) 109:4109-10.

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

Poddighe PJ., Wessels H., Merle P., et al. Genomic amplification of MYC as double minutes in a patient with APL-like leukemia. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):67. Published 2014 Oct 22.

Poloni A., Serrani F., Berardinelli E., et al. Telomere length, c-myc and mad-1 expression could represent prognosis markers of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2013;37(11):1538-1544.

Porse B. T. Pedersen T.A., Xu X., et al. E2F repression by C/EBP α is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell*. 2001: 107, 247–58,

Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene*. 1999;18(19):2967-2987.

Prochorec-Sobieszek M. Klasyfikacja i kryteria diagnostyczne nowotworów układu krwiotwórczego. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2013 Tom II. M. Krzakowski, K. Warzocha (Eds.), Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej, Gdańsk (2013), pp. 670-684.

Puig-Kröger A., Aguilera-Montilla N., Martínez-Nuñez R., 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., et al. 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.

Renneville A., Boissel N., Gachard N., et al. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication. Blood 2009; 113: 5090-3.

Renneville A., Roumier C., Biggio V., et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. Leukemia. 2008;22:915-31.

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

Romanowski T., Markiewicz A., Bednarz N., i wsp. Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR., Postępy Hig Med Dosw, 2007, 61, 500-510

Rosenbauer F., Koschmieder S., Steidl U., et al. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. Blood. 2005;106(5):1519-1524.

Rowe J.M., Kim H.T., Cassileth P.A., et al. Adult patients with acute myeloid leukemia who achieve. Cancer, 116 (2010), pp. 5012-5021.

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

RUNX1 gene, Genecards. strona internetowa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RUNX1> Dostęp on-line 08.01.2020r.

RUNX1T1 gene. Genecards. Strona internetowa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RUNX1T1> Dostęp on-line 08.01.2020r.

RUNX3 gene, Genecards. Strona internetowa: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RUNX3&keywords=RUNX3> Dostęp on-line 08.01.2020r.

Sadikovic B., Thorner P., Chilton-MacNeill S., et al. Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;10:202.

Salarpour F., Goudarzipour K., Mohammadi MH., et al. Evaluation of CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) Alpha (CEBPA) and Runt-Related Transcription Factor 1 (RUNX1) Expression in Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia. *Ann Hum Genet*. 2017;81(6):276-283.

Salvatori B., Iosue I., Djodji Damas N., et al. Critical Role of c-Myc in Acute Myeloid Leukemia Involving Direct Regulation of miR-26a and Histone Methyltransferase EZH2. *Genes Cancer*. 2011;2(5):585-592.

Saultz, J.N., Garzon, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J. Clin. Med*. 2016, 5(3); 33.

Sayyadi M., Safaroghli-Azar A., Rabiemajd S., et al. Contribution Value of Akt, c-Myc, CIP2A, and PP2A Genes Expression in Leukemogenesis: A Bright Perspective on the Molecular Pattern of Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). *International Journal of Cancer Management*. 2020;13 (3); 2538-4422 (print), 2538-497X (online).

Schnittger S., Dicker F., Kern W., et al. . *RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. Blood.* 2011;117(8):2348-2357.

Sewastianik T., Prochorec-Sobieszek M., Chapuy B., et al. *MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(2):457-467.

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

Shimada H., Ichikawa H., Ohki M. *Potential involvement of the AML1-MTG8 fusion protein in the granulocytic maturation characteristic of the t(8;21) acute myelogenous leukemia revealed by microarray analysis. Leukemia,* 16: 874-85, 2002.

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

Simon L., Lavallée VP., Bordeleau ME., et al. *Chemogenomic landscape of RUNX1-mutated AML reveals importance of RUNX1 allele dosage in genetics and glucocorticoid sensitivity. Clinical Cancer Research.*2017. 23 (22), 6969-6981.

Slaterry ML., Lundgreen A., Herrick JS., et al. *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.

Slovak ML., Ho JP., Pettenati MJ., et al. *Localization of amplified MYC gene sequences to double minute chromosomes in acute myelogenous leukemia. Genes Chromosomes Cancer.* 1994;9:62-7.

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

Smith DR., Myint T., Goh HS. *Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. Br J Cancer.* 1993;68(2):407-413.

Smith-Sørensen B., Hijmans EM., Beijersbergen RL., et al. Functional analysis of Burkitt's lymphoma mutant c-Myc proteins. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5513-5518.

Snow EC. The role of c-myc during normal B cell proliferation, and as B cells undergo malignant transformation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997;224:211-220.

Sood R., Kamikubo Y., Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* 2017 Apr 13;129(15):2070-2082.

Sowani A., Ong G., Dische S., et al. c-myc oncogene expression and clinical outcome in carcinoma of the cervix. *Mol Cell Probes.* 1989;3(2):117-123.

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

Suárez-Villanueva S., Ayala-Madrigal ML., Peregrina-Sandoval J., et al. RUNX3 gene polymorphisms and haplotypes in Mexican patients with colorectal cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):15505-15510.

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

Szczepanek J., Styczyński J., Haus O., i wsp. Postępy w kierunku molekularnej klasyfikacji nowotworów u dzieci. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej.* 2008, 62; 222-240.

Szmajda D., Balcerczak E., Krygier A. Standardy diagnostyki oraz nowe trendy w leczeniu ostrej białaczki szpikowej. *Acta Haematologica Polonica*, 2017, 48(4); 291-299.

Szmajda D., Krygier A., Jamroziak K. et al. Expression level of CEBPA gene in acute lymphoblastic leukemia individuals. *Sci Rep.* 2019; 9; 15640.

Takei H., Kobayashi SS. Targeting transcription factors in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2019;109(1):28-34.

Tang JL., Hou HA., Chen CY., et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009;114(26):5352-5361.

Taniuchi I., Osato M., Egawa T., et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*. 2002;111:621–633.

Taub R., Kirsch I., Morton C., et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(24):7837-7841.

Telfer JC., Rothenberg EV. Expression and function of a stem cell promoter for the murine CBFalpha2 gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Dev Biol*. 2001;229(2):363–382.

Tenen DG., Hromas R., Zhang D-E. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 1997; 90: 489–519.

Terry A., Kilbey A., Vaillant F., et al. Conservation and expression of an alternative 3'exon of Runx2 encoding a novel proline-rich C-terminal domain. *Gene*. 2004;336:115–125.

Thoms JAI., Beck D., Pimanda JE. Transcriptional networks in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):859-874.

Tokuhiro S., Yamada R., Chang X., 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.

Tokumasu M., Murata C., Shimada A., et al. . Adverse prognostic impact of KIT mutations in childhood CBF-AML: the results of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05 trial. *Leukemia*. 2015;29(12):2438-2441.

Tonks A., Pearn L., Mills KI., et al. The sensitivity of human cells expressing RUNX1-RUNX1T1 to chemotherapeutic agents. *Leukemia*. 2006;20(10):1883-1885.

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., et al. RUNX3 has an oncogenic role in head and neck cancer. *PLoS One.* 2009; 4(6):e5892.

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

Vaquerizas J.M., Kummerfeld S.K., Teichmann S.A., et al. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet.* 2009;10(4):252-263.

Wang QF., Cleaves R., Kummalue T. et al. 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.

Wen J., Zheng T., Hu K., et al. 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., et al. 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., et al. RUNX3 controls a metastatic switch in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell* 2015; 161(6):1345-60.

Wierzbowska A. Ostra białaczka szpikowa. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2013 Tom II. W: Krzakowski M, Warzocha K, red. Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej. Gdańsk; 2013. p. 753–767.

Wierzbowska A., Pluta A., Robak T. Standardy diagnostyki i leczenia ostrej białaczki szpikowej u dorosłych według wytycznych European LeukemiaNet. *Acta Haematol Pol.*, 41 (2010), pp. 371-379.

Wilkinson AC., Ballabio E., Geng H., 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.

Williams AF., Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:381–405.

Wilson A., Murphy MJ., Oskarsson T., et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2004;18(22):2747-2763.

Wilson NK., Calero-Nieto FJ., Ferreira R., et al. Transcriptional regulation of haematopoietic transcription factors. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(1):6.

Winter P., Hickey G., Fletcher H. Krótkie wykłady-Genetyka. Wydanie trzecie, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2000, 329-332, 336-337.

Wouters BJ., Löwenberg B., Erpelinck-Verschueren CA., et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088-91.

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

Zhang L., Hou Y., Ashktorab H., et al. The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Mol Cell Biochem.* 2010;344(1-2):125-135.

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

Zhang Q., Xu P., Lu Y., et al. Correlation of MACC1/c-Myc Expression in Endometrial Carcinoma with Clinical/Pathological Features or Prognosis. *Med Sci Monit.* 2018;24:4738-4744.

Zhang Y., He X. Evaluating the expression of MACC1 and c-myc in cervical cancer and their correlation. *Int J Clin Exp Med* 2018;11(6):5960-5966

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

Zhao X., Xiang Z., Chen Y., et al. A sequence polymorphism on 8q24 is associated with survival in hepatocellular carcinoma patients who received radiation therapy. *Sci Rep.* 2018; 8: 2264.

Zhu, J., Emerson, S. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene.* 2002: 21, 3295–3313.

Spis Tabel

Tabela 1. Tabela przedstawia klasyfikację ostrych białaczek szpikowych według FAB, str. 20.

Tabela 2. Zaktualizowana w 2016 roku klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych według WHO, str. 22.

Tabela 3. Nowa zaktualizowana w 2016 roku klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych według WHO z uwzględnioną nową kategorią tzw. nowotworów szpiku z predyspozycjami do linii zarodkowej, str. 23.

Tabela 4. Ekspresja powierzchniowych i cytoplazma-tycznych markerów komórkowych według ELN 2017, str. 27.

Tabela 5. Klasyfikacja cytogenetyczno-molekularna zaproponowana przez European Leukemia Net z 2017 roku wraz z oceną rokowania pacjentów, str. 33.

Tabela 6. Tabela przedstawia sekwencje starterów do oceny polimorfizmów SNP badanych genów, str. 71.

Tabela 7. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji PCR przy ocenie polimorfizmów badanych genów, str. 71.

Tabela 8. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji PCR użyte do oceny SNP wybranych genów, str. 72.

Tabela 9. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji RFLP, str. 76.

Tabela 10. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji str. 81.

Tabela 11. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji odwrotnej transkrypcji, str. 81.

Tabela 12. Tabela przedstawia sekwencje starterów dla genu referencyjnego oraz genów badanych, str. 83.

Tabela 13. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji PCR, str. 84.

Tabela 14. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji PCR, str. 85.

Tabela 15. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR, str. 88.

Tabela 16. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla reakcji Real-Time PCR, str. 89.

Tabela 17. Tabela zawiera odczynniki użyte do przeprowadzenie reakcji Real-Time PCR w celu oceny obecności genu fuzyjnego RUNX1/RUNX1T1, str. 92.

Tabela 18. Tabela przedstawia profil temperaturowy dla przeprowadzenie reakcji Real-Time PCR w celu oceny obecności genu fuzyjnego RUNX1/RUNX1T1, str. 92.

Tabela 19. Charakterystyka wybranych danych demograficznych oraz kliniczno-patologicznych pacjentów ze stwierdzoną ostrą białaczką szpikową, str. 101.

Tabela 20. Porównanie częstości występowania genotypów oraz alleli wśród grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*, str. 103.

Tabela 21. Porównanie częstości występowania genotypów oraz alleli wśród grupy badanej w porównaniu do grupy kontrolnej dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, str. 104.

Tabela 22. Częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli dla genu *RUNX1* oraz genu *RUNX3* odpowiednio u kobiet i mężczyzn, str. 105.

Tabela 23. Szczegółowe dane wieku rozpoznania choroby w porównaniu do poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*, str. 106.

Tabela 24. Wyniki analizy Post-hoc. Test Dunn'a z poprawką Benjamini-Hochberg, str. 107.

Tabela 25. Wyniki analizy statystycznej związku poszczególnych alleli polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby przeprowadzonej przy pomocy testu U Manna-Whitneya, str. 109.

Tabela 26. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* a typem AML według klasyfikacji FAB, str. 110.

Tabela 27. Częstości występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3* a przeżywalność pacjentów, str. 112.

Tabela 28. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji genów *RUNX1*, *RUNX3*, *CEBPA* oraz *c-MYC* w grupie badanej, str. 121.

Tabela 29. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji wybranych genów w porównaniu do płci pacjentów, str. 124.

Tabela 30. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji wybranych genów w poszczególnych podtypach AML według klasyfikacji FAB, str. 132.

Tabela 31. Szczegółowe dane dotyczące względnego poziomu ekspresji wybranych genów w podgrupie pacjentów u których stwierdzono zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu, str. 136.

Tabela 32. Ocenę zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1* oraz *RUNX3*, a odpowiednimi genotypami oraz allelami polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* oraz rs6672420 genu *RUNX3*, str. 145.

Spis Rycin

Rycina 1. Rycina przedstawia rozmaz prawidłowego szpiku kostnego pacjenta, str. 13.

Rycina 2. Rycina przedstawia rozmaz szpiku kostnego pacjenta z ostrą białaczką szpikową, str. 14.

Rycina 3. Rycina przedstawia izoformy rodziny genów *RUNX*, str. 44.

Rycina 4. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *RUNX1*, str. 46.

Rycina 5. Rycina przedstawia model białka *RUNX1*, str. 47.

Rycina 6. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *RUNX3*, str. 51.

Rycina. 7. Rycina przedstawia model białka *RUNX3*, str. 52.

Rycina 8. Rycina przedstawia schemat budowy genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1*, str. 54.

Rycina 9. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *RUNX1T1*, str. 55.

Rycina 10. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *CEBPA*, str. 57.

Rycina 11. Rycina przedstawia model białka *CEBPA*, str. 58.

Rycina 12. Rycina przedstawia lokalizację chromosomową genu *c-MYC*, str. 60.

Rycina 13. Rycina przedstawia model białka *c-MYC*, str. 61.

Rycina 14. Rycina przedstawia techniki biologii molekularnej zastosowane przy analizie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz ocenie poziomu ekspresji wybranych genów, str. 67.

Rycina 15. Rycina przedstawia techniki biologii molekularnej zastosowane przy ocenie obecności genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* oraz analizie obecności produktów białkowych wybranych czynników transkrypcyjnych, str. 68.

Rycina 16. Przykładowy rozdział elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs2268277

genu *RUNX1*, str. 74.

Rycina 17. Przykładowy rozdział elektroforezy produktów PCR dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, str. 75.

Rycina 18. Przykładowy rozdział elektroforezy produktów po trawieniu enzymem restrykcyjnym dla polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*, str. 77.

Rycina 19. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia dla polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, str. 77.

Rycina 20. Przykładowy rozdział elektroforetyczny dla genu *GAPDH*, str. 82.

Rycina. 21. Krzywa amplifikacji dla genu referencyjnego *GAPDH*, str. 87.

Rycina. 22 Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu referencyjnego *GAPDH*, str. 88.

Rycina 23. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego surowic pacjentów z rozpoznaną ostrą białaczką szpikową po transferze na membranę nitrocelulozowej wybarwionej barwnikiem Ponceau S, str. 96.

Rycina 24. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *RUNX1*, str. 115.

Rycina 25. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *RUNX3*, str. 115.

Rycina 26 Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *CEBPA*, str. 116.

Rycina 27. Wynik elektroforezy produktów PCR dla genu badanego *c-MYC*, str. 116

Rycina 28. Przykładowa krzywa amplifikacji genu badanego *RUNX1*, str. 117.

Rycina 29. Przykładowa krzywa amplifikacji genu badanego *RUNX3*, str. 117.

Rycina 30. Przykładowa krzywa amplifikacji genu badanego *CEBPA*, str. 118.

Rycina 31. Przykładowa krzywa amplifikacji genu *c-MYC*, str. 118.

Rycina 32. Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu badanego *RUNX1*, str. 119.

Rycina 33. Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu badanego *RUNX3*, str. 119.

Rycina 34. Krzywa topnienia produktu reakcji dla genu badanego *CEBPA*, str. 120.

Rycina 35. Przykładowa krzywa topnienia produktu genu badanego *c-MYC*, str. 120.

Rycina 36. Przykładowy wynik obecności genu fuzyjnego *RUNX1/RUNX1T1*, str. 144.

Rycina 37. Analiza techniką Western blot białka RUNX3 w surowicach pacjentów z AML, str. 148.

Rycina 38. Analiza techniką Western Blot białka CEBPA w surowicach pacjentów z AML, str. 149.

Spis Wykresów

Wykres 1. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu genu *RUNX1*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, str. 108.

Wykres 2. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem allela G polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, str. 109.

Wykres 3. Wykres krzywych przeżycia pacjentów z AML w zależności od występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1*, str. 113.

Wykres 4. Wykres krzywych przeżycia pacjentów z AML w zależności od występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs6672420 genu *RUNX3*, str. 114.

Wykres 5. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *RUNX1*, str. 121.

Wykres 6. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *RUNX3*, str. 122.

Wykres 7. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *CEBPA*, str. 122.

Wykres 8. Log10 względnego poziomu ekspresji genu badanego *c-MYC*, str. 123.

Wykres 9. Wykres zależności względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1* od płci pacjentów, str. 125.

Wykres 10. Wykres zależności względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3* w zależności od płci pacjentów, str. 126.

Wykres 11. Wykres zależności względnego poziomu ekspresji genu *CEBPA* od płci pacjentów, str. 126.

Wykres 12. Względny poziom ekspresji genu *c-MYC* w zależności od płci pacjentów, str. 127.

Wykres 13. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *RUNX1*, a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, str. 128.

Wykres 14. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji mRNA genu *RUNX3* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, str. 128.

Wykres 15. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CEBPA* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, str. 129.

Wykres 16. Wykres korelacji r Pearsona pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *c-MYC* a wiekiem pacjentów w momencie rozpoznania choroby, str. 129.

Wykres 17. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *RUNX1* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki, str. 133.

Wykres 18. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *RUNX3* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej, str. 134.

Wykres 19. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *CEBPA* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej, str. 134.

Wykres 20. Wykres przedstawia względny poziom ekspresji genu *c-MYC* w poszczególnych podtypach ostrej białaczki szpikowej, str. 135.

Wykres 21. Względny poziom ekspresji genu *RUNX3* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu, str. 137.

Wykres 22. Względny poziom ekspresji genu *CEBPA* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu, str. 138.

Wykres 23. Względny poziom ekspresji genu *c-MYC* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu, str. 139.

Wykres 24. Względny poziom ekspresji genu *RUNX1* w grupie pacjentów u których wystąpił zgon oraz w grupie pacjentów u których nie stwierdzono zgonu, str. 139.

Wykres 25. Wykres krzywych przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *RUNX1*, str. 140.

Wykres 26. Wykres krzywych przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *RUNX3*, str. 141.

Wykres 27. Wykres krzywych przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *CEBPA*, str. 141.

Wykres 28. Wykres krzywych przeżycia pacjentów z AML w zależności od względnego poziomu ekspresji genu *c-MYC*, str. 142.

Wykres 29. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych

genotypów polimorfizmu rs2268277 genu *RUNX1* a względnym poziomem ekspresji tego genu, str. 146.

Wykres 30. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu oraz rs6672420 genu *RUNX3* a względnym poziomem ekspresji tego genu, str. 147.

Rozdział VII

Wykaz publikacji, komunikatów zjazdowych oraz nagród

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/s11033-020-05299-5>

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. Klatte Karolina, Kubera Lena, Szmajda Dagmara, **Krygier Adrian**, Jażdżyk Marcin „ABCB1 gene expression level in patients with stomach cancer”. 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
3. **Adrian Krygier**, Dagmara Szmajda „Ustalenie Poziomów Ekspresji Genu ABCB1 w Biopsjach Błony Śluzowej Pochodzących od Pacjentów z Chorobą Wrzodową Żołądka.” I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studentów Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, 14-15 Października 2013
4. **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
5. Karolina Klatte, Dagmara Szmajda, **Adrian Krygier** „Analiza wybranego polimorfizmu w promotorze genu ABCB1 u pacjentów z chorobą wrzodową żołądka”. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studenckiego Towarzystwa Diagnostów Laboratoryjnych w Bydgoszczy. 9 Maj 2015r.
6. **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
7. 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

8. 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
9. **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
10. 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
11. 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
12. **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
13. 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

14. 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
15. 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
16. **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
17. 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
18. 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 Biopsjach 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. **II 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 polimorfizmu w regionie promotora genu ABC1 w chorobie wrzodowej 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.....

Adrian 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: **„Ocena ekspresji i polimorfizmów genów, kodowanych przez nie czynników transkrypcyjnych oraz transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1-RUNX1T1* w ostrej białaczce szpikowej”**

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