

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH I WETERYNARYJNYCH
KATEDRA FIZJOLOGII ROŚLIN I BIOTECHNOLOGII

mgr Joanna Dejewska

**Genomiczny profil oporności na antracykliny w
dziecięcych ostrych białaczkach**

Rozprawa na stopień doktora nauk biologicznych

Promotor główny: prof. dr hab. Andrzej Tretyn

Promotor pomocniczy: dr n. med. Joanna Szczepanek

Składam serdeczne podziękowania

*moim Promotorom **prof. dr hab. Andrzejowi Tretynowi** i **dr n. med. Joannie Szczepanek** za wyrozumiałość oraz liczne rady i niezwykle cenne wskazówki merytoryczne, które sprawiły, że współpraca w trakcie realizacji badań zaowocowała niniejszą rozprawą;*

***Pracownikom Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy** za pomoc w realizacji badań, udostępnienie materiału biopsyjnego oraz realizację testów cytotoksyczności;*

*najbliższej **Rodzinie**, która wykazała dobrą wolę i ogrom cierpliwości, podczas gdy ja realizowałam badania oraz pisałam pracę .*

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	9
1.1.	Czynniki etiologiczne białaczek	9
1.2.	Ostra białaczka limfoblastyczna	10
1.3.	Ostra białaczka mieloblastyczna	16
1.4.	Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej	21
1.5.	Leczenie ostrej białaczki mieloblastycznej	25
1.6.	Leki antracyklinowe	26
1.6.1.	Doksorubicyna	27
1.6.2.	Daunorubicyna	28
1.6.3.	Idarubicyna	29
1.6.4.	Mitoksantron	30
1.7.	Zjawisko lekooporności	30
1.8.	Technika mikromacierzy	35
1.9.	Geny kandydackie	37
2.	CEL PRACY	39
3.	MATERIAŁY I METODY	40
3.1.	Pacjenci	40
3.2.	Izolacja i liza komórek monojądrzastych szpiku kostnego	42
3.3.	Test cytotoksyczności MTT	43
3.4.	Profilowanie genomowe	45
3.4.1.	Izolacja gDNA	45
3.4.2.	Pomiar spektrofotometryczny genomowego DNA	46
3.4.3.	Pomiar fluorometryczny genomowego DNA	46
3.4.4.	Rozdział elektroforetyczny genomowego DNA	47
3.4.5.	Eksperyment mikromacierzowy CGH	48
3.4.5.1.	Restrykcyjna fragmentacja genomowego DNA	48
3.4.5.2.	Fluorescencyjne znakowanie genomowego DNA	49
3.4.5.3.	Oczyszczanie wyznakowanego genomowego DNA	50
3.4.5.4.	Obliczanie stopnia wyznakowania, specyficznej aktywności oraz ilości oczyszczonego genomowego DNA	51
3.4.5.5.	Hybrydyzacja	51
3.4.5.6.	Płukanie mikromacierzy	52
3.4.5.7.	Skanowanie mikromacierzy	53
3.4.5.8.	Analiza obrazu macierzy po skanowaniu	53
3.4.5.9.	Analiza zmian cytogenetycznych	53
3.5.	Profilowanie ekspresji genów	54

3.5.1.	Izolacja całkowitego RNA.....	54
3.5.2.	Pomiar spektrofotometryczny RNA	55
3.5.3.	Pomiar fluorometryczny RNA.....	55
3.5.4.	Bioanaliza całkowitego RNA	56
3.5.5.	Doświadczenie z mikromacierzami ekspresyjnymi.....	58
3.5.5.1.	Synteza cDNA	58
3.5.5.2.	Oczyszczanie dwuniciowego cDNA	60
3.5.5.3.	Synteza znakowanego biotyną cRNA wraz z oceną jakości preparatów	61
3.5.5.4.	Oczyszczanie wyznakowanego cRNA	62
3.5.5.5.	Fragmentacja wyznakowanego cRNA	63
3.5.5.6.	Hybrydyzacja cRNA do mikromacierzy ekspresyjnej	64
3.5.5.8.	Płukanie macierzy	66
3.5.5.9.	Skanowanie macierzy	67
3.5.5.10.	Normalizacja danych	68
3.5.5.11.	Analiza statystyczna	68
3.5.5.12.	Analiza ontologiczna	69
3.5.6.	Weryfikacja wyników	69
3.5.6.1.	Synteza cDNA	69
3.5.6.2.	Sprawdzanie jakości cDNA i specyficzności starterów	70
3.5.6.3.	Analiza produktów PCR.....	74
3.5.6.4.	PCR w czasie rzeczywistym.....	75
3.5.6.5.	Analiza wyników PCR w czasie rzeczywistym	76
4.	WYNIKI.....	77
4.1.	Analiza jakościowa i ilościowa gDNA	77
4.1.1.	Pomiar fluorometryczny i spektrofotometryczny	77
4.1.2.	Rozdział elektroforetyczny	78
4.1.3.	Analiza wyników znakowania	78
4.2.	Analiza jakościowa i ilościowa preparatów RNA	81
4.2.1.	Pomiar spektrometryczny i fluorometryczny	81
4.2.2.	Bioanaliza całkowitego RNA	82
4.3.	Analiza profilu cytogenetycznego.....	83
4.3.1.	Analiza zmian na chromosomie 5.....	85
4.3.2.	Analiza zmian na chromosomie 8.....	85
4.3.3.	Analiza zmian na chromosomie 9.....	86
4.3.5.	Analiza zmian na chromosomie 14.....	86
4.3.6.	Analiza zmian na chromosomie 15.....	86

4.3.7.	Analiza zmian na chromosomie 21	87
4.3.8.	Analiza zmian na chromosomie 22.....	87
4.3.9.	Podsumowanie	87
4.4.	Analiza profili ekspresji genów w opornych limfoblastach i mieloblastach ...	87
4.4.1.	Ogólna charakterystyka profili ekspresji	87
4.4.2.	Analiza ontologiczna	90
4.4.2.1.	Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilu limfoblastów opornych na doksorubicynę	90
4.4.2.2.	Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na daunorubicynę	92
4.4.2.3.	Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na idarubicynę	95
4.4.2.4.	Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na mitoksantron	97
4.4.2.5.	Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilu limfoblastów opornych na doksorubicynę	100
4.4.2.6.	Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na daunorubicynę	102
4.4.2.7.	Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na idarubicynę	104
4.4.2.8.	Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na mitoksantron	105
4.4.2.9.	Analiza szlaków komórkowych w profilu limfoblastów opornych na doksorubicynę	108
4.4.2.10.	Analiza szlaków komórkowych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na daunorubicynę	109
4.4.2.11.	Analiza szlaków komórkowych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na idarubicynę	110
4.4.2.12.	Analiza szlaków komórkowych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na mitoksantron	112
4.4.3.	Analiza genów wspólnych w profilach oporności na antracykliny	114
4.5.	Wyniki PCR w czasie rzeczywistym	116
5.	DYSKUSJA.....	121
6.	WNIOSKI.....	133
7.	STRESZCZENIE	134
8.	LITERATURA	138

WYKAZ NAZW GENÓW

<i>ABHD4</i>	abhydrolase domain containing 4, N-acyl phospholipase B	<i>CFH</i>	complement factor H
<i>ABCG1</i>	ATP binding cassette subfamily G member 1	<i>CHEK2P2</i>	checkpoint kinase 2 pseudogene 2
<i>ABLIM3</i>	actin binding lim protein family member 3	<i>CHD7</i>	chromodomain helicase DNA binding protein 7
<i>ACTB</i>	actin Beta	<i>CLEC2D</i>	C-type lectin domain family 2, member D
<i>ADAM6</i>	ADAM metallopeptidase domain 6 pseudogene	<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain family 7, member A
<i>ADAM9</i>	ADAM metallopeptidase domain 9	<i>CLIC4</i>	chloride intracellular channel 4
<i>ADAM19</i>	ADAM metallopeptidase domain 19	<i>COL5A1</i>	collagen type V alpha 1 chain
<i>AFF1</i>	AF4/FMR2 family, member 1	<i>CP</i>	ceruloplasmin (ferroxidase)
<i>AHL1</i>	abelson helper integration site 1	<i>CR2</i>	complement C3D receptor 2
<i>AIFI</i>	allograft inflammatory factor 1	<i>CRBN</i>	cereblon
<i>AKR1C3</i>	aldo-keto reductase family 1 member C3	<i>CRISP3</i>	cysteine rich secretory protein 3
<i>ALOX5AP</i>	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	<i>CSF3R</i>	colony stimulating factor 3 receptor granulocyte
<i>ANPEP</i>	alanyl (membrane) aminopeptidase	<i>CSTA</i>	cystatin A (stefin A)
<i>ANXA1</i>	annexin A1	<i>CTBP2</i>	C-terminal binding protein 2
<i>ANXA3</i>	annexin A3	<i>CTNNA1</i>	catenin alpha 1
<i>ARAP1</i>	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1	<i>CTSH</i>	cathepsin H
<i>ARHGEF3</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 3	<i>CXCL1</i>	C-X-C motif chemokine ligand 1
<i>ARPC1A</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	<i>CXCL2</i>	C-X-C motif chemokine ligand 2
<i>ARSI</i>	arylsulfatase family member I	<i>CXCL3</i>	C-X-C motif chemokine ligand 3
<i>ATF2</i>	activating transcription factor 2	<i>DPPA4</i>	developmental pluripotency associated 4
<i>AUH</i>	AU RNA binding methylglutaconyl-CoA hydratase	<i>DPY19L2</i>	Dpy-19 Like 2
<i>AZU1</i>	azurocidin 1	<i>DSC2</i>	desmocollin 2
<i>BAGE</i>	B melanoma antigen	<i>DUSP2</i>	dual specificity phosphatase 2
<i>BAG4</i>	BCL2 associated athanogene 4	<i>DUSP6</i>	dual specificity phosphatase 6
<i>BCL2</i>	BCL2 apoptosis regulator	<i>DUSP26</i>	dual specificity phosphatase 26
<i>BCL2A1</i>	BCL2 related protein A1	<i>ELL2</i>	elongation factor for RNA polymerase II 2
<i>BCL2L1</i>	BCL2-like 1	<i>ENPEP</i>	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)
<i>BCLAF1</i>	BCL2 associated transcription factor 1	<i>FAM30A</i>	family with sequence similarity 30, member A
<i>BCR</i>	RhoGEF and GTPase activating protein	<i>FAM76B</i>	family with sequence similarity 76, member B
<i>BLK</i>	BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	<i>FBXO38</i>	F-box protein 38)
<i>BLNK</i>	B cell linker	<i>FCAR</i>	Fc Alpha Receptor
<i>BST2</i>	bone marrow stromal cell antigen 2	<i>FGR</i>	proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
<i>BTG1</i>	BTG anti-proliferation factor 1	<i>FHL1</i>	four and a half LIM domains 1
<i>C5AR1</i>	complement C5a receptor 1	<i>FKBP4</i>	FK506 binding protein 4
<i>CASP1</i>	caspase 1	<i>FOXO1</i>	forkhead box o1
<i>CASP2</i>	caspase 2	<i>FPR1</i>	formyl peptide receptor 1
<i>CCL3L1</i>	C-C motif chemokine ligand 3 like 1	<i>FTO</i>	FTO alpha-ketoglutarate dependent Dioxygenase
<i>CCNL2</i>	cyclin L2	<i>FUT10</i>	fucosyltransferase 10
<i>CD2</i>	CD2 molecule	<i>FZD2</i>	frizzled class receptor 2
<i>CD3D</i>	CD3d molecule	<i>G0S2</i>	G0/G1 switch 2
<i>CD3E</i>	CD3e molecule	<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA damage inducible alpha
<i>CD3G</i>	CD3g molecule	<i>GALNT1</i>	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1
<i>CD7</i>	CD7 molecule	<i>GALNT6</i>	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6
<i>CD9</i>	CD9 molecule	<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>CD19</i>	CD19 molecule	<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2
<i>CD22</i>	CD22 molecule	<i>GNAZ</i>	G protein subunit Alpha Z
<i>CD24</i>	CD24 molecule	<i>GNAQ</i>	G protein subunit Alpha Q
<i>CD69</i>	CD69 molecule	<i>GON4L</i>	Gon-4 Like
<i>CD74</i>	CD74 molecule	<i>GPR12</i>	G protein-coupled receptor 12
<i>CD244</i>	CD244 molecule	<i>GPR153</i>	G protein-coupled receptor 153
<i>CDH2</i>	cadherin 2	<i>GREM1</i>	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)
<i>CDH9</i>	cadherin 9	<i>HBEGF</i>	heparin-binding EGF-like growth factor
<i>CDK14</i>	cyclin dependent kinase 14		
<i>CDKN1A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1A		
<i>CDKN1B</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1B		
<i>CEBPD</i>	CCAAT enhancer binding protein Delta		

<i>HERC2P3</i>	Hect domain and RLD 2 pseudogene 3	<i>NME3</i>	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 3
<i>HK3</i>	hexokinase 3	<i>NPEPPS</i>	aminopeptidase puromycin sensitive
<i>HLA-DMA</i>	major histocompatibility complex, class II, DM Alpha	<i>NPY</i>	neuropeptide Y
<i>HLA-DPA1</i>	major histocompatibility complex, class II, DP Alpha 1	<i>NR1D2</i>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
<i>HLA-DQA1</i>	major histocompatibility complex, class II, DQ Alpha 1	<i>NR3C1</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR Alpha	<i>NRAS</i>	NRAS proto-oncogene, GTPase
<i>HOXA11</i>	homeobox A11	<i>NRXN2</i>	neurexin 2
<i>HSPA5</i>	heat shock protein family A (Hsp70) member 5	<i>OCN</i>	occludin
<i>HTRA4</i>	HtrA serine peptidase 4	<i>OLFM4</i>	olfactomedin 4
<i>ICAM3</i>	intercellular adhesion molecule 3	<i>PADI4</i>	peptidyl arginine deiminase 4
<i>IFIT3</i>	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	<i>PAX5</i>	paired box 5
<i>IFITM1</i>	interferon induced transmembrane protein 1	<i>PCDH9</i>	protocadherin 9
<i>IFNA21</i>	interferon Alpha 21	<i>PDGFC</i>	platelet derived growth factor C
<i>IGHM</i>	immunoglobulin heavy constant Mu	<i>PDLIM1</i>	PDZ and LIM domain 1
<i>IGSF10</i>	immunoglobulin superfamily member 10	<i>PGAP1</i>	post-GPI attachment to proteins 1
<i>IL6ST</i>	interleukin 6 signal transducer	<i>PIK3CG</i>	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, Gamma polypeptide
<i>IL8</i>	interleukin 8	<i>PIK3R1</i>	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
<i>IP6K2</i>	inositol hexakisphosphate kinase 2	<i>PIM2</i>	PIM-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase
<i>IRX3</i>	iroquois homeobox 3	<i>PRAME</i>	PRAME nuclear receptor transcriptional regulator
<i>IRX5</i>	iroquois homeobox 5	<i>PRDM2</i>	PR domain containing 2
<i>ITGAL</i>	integrin subunit Alpha L	<i>PRK CZ</i>	protein kinase C Zeta
<i>ITGAM</i>	integrin subunit Alpha M	<i>PRTN3</i>	proteinase 3
<i>ITGB2</i>	integrin subunit Beta 2	<i>PSTPIP1</i>	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1
<i>ITM2A</i>	integral membrane protein 2A	<i>PTCH1</i>	patched homolog 1
<i>KLF11</i>	KLF transcription factor 11	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene, GTPase	<i>PTK2</i>	protein tyrosine kinase 2
<i>LAMB2</i>	laminin subunit beta 2	<i>PTPN7</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7
<i>LSM1</i>	LSM1 homolog, mRNA degradation associated	<i>PXDN</i>	peroxidase
<i>LST1</i>	leukocyte specific transcript 1	<i>PYGL</i>	phosphorylase, glycogen, liver
<i>LTB</i>	lymphotoxin beta	<i>QRSL1</i>	glutamyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1
<i>MAP2K3</i>	mitogen-activated protein kinase 3	<i>RAB36</i>	member RAS oncogene family
<i>MAPK8</i>	mitogen-activated protein kinase 8	<i>RAD9A</i>	RAD9 checkpoint clamp component A
<i>MAPKAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	<i>RAG1</i>	recombination activating 1
<i>MBTD1</i>	Mbt domain containing 1	<i>RAP1B</i>	member of RAS oncogene family
<i>MDFIC</i>	MyoD family inhibitor domain containing	<i>RETN</i>	resistin
<i>MDK</i>	midkine	<i>RNF122</i>	ring finger protein 122
<i>MEDI3L</i>	mediator complex subunit 13L	<i>RGS10</i>	regulator of G protein signaling 10
<i>MEGF9</i>	multiple EGF like domains 9	<i>RSPH14</i>	radial spoke head 14 homolog
<i>MGAM</i>	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	<i>RUNX1</i>	RUNX family transcription factor 1
<i>MNDA</i>	myeloid cell nuclear differentiation antigen	<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein A9
<i>MSH6</i>	MutS homolog 6	<i>S100A11</i>	S100 calcium binding protein A11
<i>MTAP</i>	methylthioadenosine phosphorylase	<i>S100A12</i>	S100 calcium binding protein A12
<i>MYCN</i>	MYCN proto-oncogene, BHLH transcription factor	<i>S100P</i>	S100 calcium binding protein P
<i>NAMPT</i>	nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>SATB1</i>	SATB homeobox 1
<i>NBEAP1</i>	neurobeachin pseudogene 1	<i>SCARB2</i>	scavenger receptor class B member 2
<i>NCOR1</i>	nuclear receptor corepressor 1	<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
<i>NDN</i>	necdin, MAGE family member	<i>SELL</i>	selectin L
<i>NETO1</i>	neuroligin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	<i>SEPT11</i>	septin 11
<i>NF1</i>	neurofibromin 1	<i>SERPINA1</i>	Serpin family a member 1
<i>NFE2</i>	nuclear factor (erythroid-derived 2)	<i>SH2D1A</i>	SH2 domain containing 1A
<i>NFIL3</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated	<i>SIK3</i>	SIK family kinase 3
<i>NKD2</i>	naked cuticle homolog 2 (Drosophila)	<i>SLAMF1</i>	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
		<i>SLC6A7</i>	solute carrier family 6 member 7

<i>SLC22A4</i>	solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4	<i>ZNF107</i>	zinc finger protein 107
<i>SLC2A4RG</i>	SLC2A4 regulator	<i>ZNF117</i>	zinc finger protein 117
<i>SMAD3</i>	SMAD family member 3	<i>ZNF395</i>	zinc finger protein 395
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4	<i>ZNF703</i>	zinc finger protein 703
<i>SMAD7</i>	SMAD family member 7		
<i>SNCAIP</i>	synuclein Alpha interacting protein		
<i>SOX11</i>	SRY-Box transcription factor 11		
<i>SPAG9</i>	sperm associated antigen 9		
<i>SPINK2</i>	serine peptidase inhibitor kazal type 2		
<i>SPINT2</i>	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 2		
<i>SPOPL</i>	speckle type BTB/POZ protein like		
<i>ST3GAL6</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6		
<i>STK17A</i>	serine/threonine kinase 17a		
<i>STK17B</i>	serine/threonine kinase 17b		
<i>TBL1X</i>	transducin Beta like 1X-linked		
<i>TBL1XR1</i>	transducin Beta like 1X-linked receptor 1		
<i>TBX1</i>	T-box 1		
<i>TCF4</i>	transcription factor 4		
<i>TCF7</i>	transcription factor 7		
<i>TCL1A</i>	TCL1 family Akt coactivator A		
<i>TEKT4P2</i>	transmembrane phosphatase with tensin homology		
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase		
<i>TESC</i>	tescalcin		
<i>TFDP1</i>	transcription factor Dp-1		
<i>TFPI</i>	tissue factor pathway inhibitor		
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, Beta 1		
<i>TGFBR2</i>	transforming growth factor, Beta receptor II		
<i>TLE3</i>	transducin like enhancer of split 3		
<i>TLE4</i>	transducin like enhancer of split 4		
<i>TM2D2</i>	TM2 domain containing 2		
<i>TNFAIP8</i>	tumor necrosis factor		
<i>TNFRSF1A</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A		
<i>TNFRSF1B</i>	TNF receptor superfamily member 1B, BCL2A1		
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10		
<i>TOX</i>	thymocyte selection associated high mobility group box		
<i>TPTE</i>	tektin 4 pseudogene 2		
<i>TRBC1</i>	T cell receptor Beta constant 1		
<i>TRIM24</i>	tripartite motif containing 24		
<i>TRIO</i>	TRIO Rho guanine nucleotide exchange factor		
<i>TSLP</i>	thymic stromal lymphopoietin		
<i>TTI22</i>	TELO2 interacting protein 2		
<i>TTC28</i>	tetratricopeptide repeat domain 28		
<i>TUBA1B</i>	tubulin Alpha 1b		
<i>TWIST1</i>	TWIST family BHLH transcription factor 1		
<i>TYMS</i>	thymidylate synthetase		
<i>UBE2H</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2H		
<i>UIMC1</i>	ubiquitin interaction motif containing 1		
<i>USP44</i>	ubiquitin specific peptidase 44		
<i>WDFY2</i>	WD repeat and FYVE domain containing 2		
<i>WDR26</i>	WD repeat domain 26		
<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1		
<i>XIST</i>	X inactive specific transcript		
<i>ZEB2</i>	zinc finger E-box binding homeobox 2		

1. WSTĘP

Białaczki są heterogenną grupą chorób nowotworowych, stanowiącą około 30% przypadków nowotworów wśród dzieci. Zwykle swój początek mają w szpiku kostnym, gdzie obserwuje się nieprawidłowo wysoką liczbę białych krwinek (blastów białaczkowych) [1]. Pod względem klinicznym wyróżnia się wiele postaci białaczek. W białaczkach przewlekłych dochodzi do gromadzenia się głównie dojrzałych, lecz nieprawidłowych leukocytów. Są one charakterystyczne dla ludzi starszych, ale mogą występować w każdej grupie wiekowej. Ostre białaczki wyróżniają się szybkim namnażaniem niedojrzałych (progenitorowych) komórek krwi, na skutek czego niemożliwa jest efektywna produkcja zdrowych komórek krwi przez szpik kostny. Ostre postaci białaczek są najczęstszą formą u dzieci i wymagają szybkiego podjęcia jak najbardziej skutecznej terapii antynowotworowej [2].

W zależności od linii komórkowej w hematopoezie, wyróżnia się ostrą białaczkę limfoblastyczną (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL) oraz ostrą białaczkę mieloblastyczną (*acute myeloblastic leukemia*, AML). Obecność rearanżacji chromosomowych, zmiany w poziomie ekspresji genów oraz zaburzenia szlaków komórkowych mogą przyczynić się do leukemogenezy, a także bezpośrednio wpływać na efektywność leczenia [3].

1.1. Czynniki etiologiczne białaczek

Etiologia białaczek nadal nie jest w pełni poznana. Jednak można wyróżnić kilka czynników, które z największym prawdopodobieństwem wpływają na proces leukemogenezy [4]. Należą do nich:

a) czynniki genetyczne:

- wrodzone zespoły genetyczne: zespół Downa, zespół Blooma, zespół Klinefeltera, zespół Turnera, ataksja-teleangiektazja, rodzinna monosomia 7 chromosomu, zespół MonoMAC;
- wrodzone zespoły niewydolności szpiku kostnego: anemia Fanconiego, zespół Shwachmana-Diamonda, zespół Blackfana-Diamonda, ciężki złożony niedobór odporności (*severe combined immunodeficiency*, SCID), zespół Zinsser-Cole-Engman (*dyskeratosis congenita*, DKC), agranulocytoza Kostmana, agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X, wrodzona małopłytkowość amegakariocytowa (*congenital amegakaryocytic thrombocytopenia*, CAMT), zespół małopłytkowości i aplazji kości

- promieniowej (wrodzona małopłytkowość hipoplastyczna; *thrombocytopenia with absent radii syndrome*; TAR);
- wrodzone zespoły spowodowane defektami w genach supresorowych: zespół Li-Fraumeni, nerwiakowłókniakowatość typu 1 (zespół Recklinghausena, NF1), zespół Noonan, zaburzenie podobne do zespołu Noonan (*Noonan syndrome-like disorder*);
 - b) czynniki środowiskowe: osłabiają kontrolę przeciwnowotworową, powodują transformację nowotworową, np.: promieniowanie jonizujące, środki chemiczne, zmiany środowiska (zanieczyszczenia);
 - c) czynniki osobnicze: osłabienie mechanizmów kontrolujących proliferację komórek, osłabienie obrony immunologicznej, zaburzenia szlaków komórkowych;
 - d) poprzedzające choroby: zespoły mielodysplastyczne (*myelodysplastic syndrome*, MDS) mogą przerodzić się w AML;
 - e) chemioterapia z powodu innych nowotworów: leki alkilujące i inhibitory topoisomerazy II powodują białaczki wtórne, polekowe;
 - f) wirusy: obecnie nie ma ostatecznie potwierdzonych dowodów na wirusową etiologię białaczek, jednak przypuszczalną rolę przypisuje się głównie retrowirusom, np. wirus ludzkiej białaczki z komórek T (*human T-cell lymphotropic virus*, HTLV), rzadziej wirusom DNA, np. wirus Epstein-Barr [4, 5].

1.2. Ostra białaczka limfoblastyczna

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) stanowi ponad 80% ostrych białaczek u dzieci. Częstość zachorowania szacuje się na 3,9 przypadków na 100 000 dzieci poniżej 19 roku życia rocznie. Najwięcej przypadków obserwuje się między 2. a 5. rokiem życia [1]. Zaawansowane techniki diagnostyczne i prognostyczne umożliwiły osiągnięcie wyleczalności ALL na poziomie 80%. Obecnie 5-letni współczynnik przeżycia wynosi około 90% [3]. Sukces został osiągnięty dzięki prawidłowej stratyfikacji pacjentów, ocenie prawdopodobieństwa choroby resztkowej (jednej z głównych przyczyn niepowodzeń terapii) oraz intensyfikacji chemioterapii pacjentów z grupy najwyższego ryzyka. Mimo tego, nawroty choroby nadal obserwowane są u 25% chorych dzieci. Wznowa choroby w ciągu 2 lat od diagnozy zmniejsza szanse na przeżycie nawet do 20% [5]. Zachorowalność na ostre białaczki częściej obserwuje się u chłopców niż u

dziewczynek. U dzieci wraz z wiekiem maleje, a następnie rośnie w wieku dorosłym. W Tabeli 1 przedstawiono rozkład częstości zachorowań na ostrą białaczkę limfoblastyczną wśród chłopców i dziewczynek w latach 2008-2017 w Polsce. Zachorowalność na ALL wśród dzieci jest około 5-krotnie wyższa niż na AML [3].

Tabela 1. Częstość zachorowania na białaczki limfoblastyczne wśród chłopców i dziewczynek w latach 2008-2017 na terenie całej Polski [6].

	Liczba zachorowań wśród chłopców					Liczba zachorowań wśród dziewczynek				
	0-4 lat	5-9 lat	10-14 lat	15-19 lat	Suma zachorowań w danym roku	0-4 lat	5-9 lat	10-14 lat	15-19 lat	Suma zachorowań w danym roku
2008 rok	56	34	26	14	130	49	30	18	8	105
2009 rok	45	33	25	26	129	46	31	11	9	97
2010 rok	56	33	20	23	132	37	22	10	12	81
2011 rok	51	23	17	21	112	38	23	11	11	83
2012 rok	60	31	14	18	123	36	27	7	12	82
2013 rok	53	20	14	15	112	38	35	10	10	93
2014 rok	44	46	9	11	110	33	18	8	11	70
2015 rok	33	32	15	20	100	51	42	11	11	115
2016 rok	49	42	20	16	127	26	38	7	10	81
2017 rok	35	44	16	15	110	47	28	13	4	92
Suma zachorowań w przedziale wiekowym	482	338	176	179		401	294	106	98	

ALL wywodzi się z limfoidalnej linii hematopoetycznej. Transformacja nowotworowa może dotyczyć zarówno komórek prekursorowych limfocytów typu B oraz T. B-ALL stanowi około 80% przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej, natomiast T-ALL około 20% [3]. Leukemogeneza polega na nieprawidłowościach w procesach regulujących proliferację, różnicowanie oraz śmierć komórki. W konsekwencji dochodzi do klonalnej ekspansji blastów [7]. Zmiany genomowe i transkryptomyczne mogą inicjować sygnały rozrostowe i przeżycia oraz prowadzić do supresji różnicowania lub zwiększenia samoodnowy. Zaburzenia te mogą współistnieć i wpływać na biologiczny oraz kliniczny obraz choroby, w tym na odpowiedź na terapię i przeżycie pacjentów pediatrycznych [1].

Badania morfologiczne, cytochemiczne, immunofenotypowanie, charakterystyka cytogenetyczna oraz molekularna blastów białaczkowych umożliwiają precyzyjną diagnozę ostrej białaczki. Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) w 2016 roku dokonała klasyfikacji ostrej białaczki limfoblastycznej. Wcześniej (przed 2008 rokiem) stosowana była klasyfikacja FAB (*French–American–British classification system*). Zarówno klasyfikacja WHO, jak i FAB nie uwzględniają kryterium wieku [8]. W Tabeli 2 zaprezentowano porównanie obu systemów klasyfikacji.

Tabela 2. Porównanie klasyfikacji FAB i WHO dla ostrej białaczki limfoblastycznej [8].

FAB	WHO
L1 - typ prolimfocytowy L2 - typ prolimfoblastyczny L3 - typ Burkitta	<p>a) białaczki limfoblastyczne z komórek B:</p> <ul style="list-style-type: none"> - białaczka / chłoniak limfoblastyczny typu B, nieokreślony inaczej (<i>not otherwise specified, NOS</i>) - białaczka limfoblastyczna typu B/chłoniak z nawracającymi nieprawidłowościami genetycznymi - białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak z t (9; 22) (q34,1; q11,2); <i>BCR-ABL1</i> - białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak z t (v; 11q23.3); przegrupowanie <i>KMT2A</i> - białaczka limfoblastyczna B/ chłoniak z t (12; 21) (p13,2; q22,1); <i>ETV6-RUNX1</i> - białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak z hiperdiploidią - białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak z hipodiploidią - białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak z t (5; 14) (q31,1; q32,3) <i>IL3-IGH</i> - białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak z t (1; 19) (q23; p13.3); <i>TCF3-PBX1</i> - jednostka tymczasowa: białaczka limfoblastyczna typu B/ chłoniak, <i>BCR-ABL1</i>-like - jednostka tymczasowa: białaczka limfoblastyczna B/ chłoniak z <i>iAMP21</i> <p>b) białaczka / chłoniak limfoblastyczny typu T:</p> <ul style="list-style-type: none"> - jednostka tymczasowa: białaczka limfoblastyczna z prekursorowych komórek T - jednostka tymczasowa: białaczka limfoblastyczna / chłoniak z komórek naturalnej cytotoksyczności (<i>natural killer, NK</i>)

Rearanżacje chromosomowe są jedną z przyczyn genezy ALL. Szacuje się, że około 40% przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej związanych jest ze zmianami genetycznymi [5]. Zalicza się do nich m.in. delecje i amplifikacje regionów chromosomowych, a także mutacje punktowe w obrębie konkretnych genów związanych, np. z różnicowaniem i rozwojem limfocytów (Tabela 3).

W zależności od typu ostrej białaczki limfoblastycznej można wyróżnić charakterystyczne rearanżacje chromosomowe. W pediatrycznej B-ALL najczęstszą zmianą cytogenetyczną jest wysoka hiperdiploidia (w 25% przypadków ALL). Zwykle obserwuje się dodatkowy chromosom X, 4., 6., 10., 14., 17., 18. lub 21., co wiąże się z korzystnym rokowaniem [9]. Dla dzieci pięcioletni czas przeżycia bez nawrotu (*event-free survival, EFS*) waha się od 80 do 90%, natomiast 5-letni całkowity współczynnik przeżycia (*overall survival, OS*) wynosi ponad 90%. Dla dorosłych dane te są gorsze [5]. Posiadanie dodatkowego chromosomu 4., 6., 10. i 17. wiąże się z lepszą prognozą, niż wykrycie dodatkowego chromosomu 5. lub izochromosomu 17., i(17)(q10) [10]. Wysoka hiperdiploidia może współwystępować z mutacjami genów *CDKN2A*, *ETV6*, *FLT3*, *IKZF1*, *KRAS* oraz *PAX5* [11]. Ponadto, w ponad połowie przypadków hiperdiploidii obecne są również mutacje genu *CREBBP* [1].

Tabela 3. Genetyczne zmiany występujące u dzieci z ALL [1, 12].

Podtyp genetyczny	Zmiany genetyczne	Częstotliwość występowania	Prognoza	Komentarz
B-ALL				
hiperdiploidia >50 chromosomów	-	25% ALL	korzystna	5-letni OS 90-95%
hipodiploidia <44 chromosomów	24-31 chromosomów 32-39 chromosomów	1-2% ALL	niekorzystna	związana z mutacjami <i>TP53</i> , delecjami <i>IKZF2</i> i <i>IKZF3</i> , mutacjami w obrębie szlaków Ras i PI3K
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)</i>	20% ALL	korzystna	-
t(1;19)(q23;p13.1)	<i>TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)</i>	4% ALL	pośrednia	-
t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3-HLF</i>	<0,5% ALL	niekorzystna	-
rearanżacje <i>KMT2A (MLL)</i>	-	5-6% ALL	niekorzystna (niemowlęta) pośrednia (pozostałe grupy wiekowe)	wysoka częstotliwość występowania u niemowląt (80%); związane z nadekspresją <i>FLT3</i> oraz zmianami epigenetycznymi
t(1;11)(q21;q23)	<i>KMT2A-MLLT1</i>	-	niekorzystna	rzadko występująca zmiana
t(4;11)(q21;q23)	<i>KMT2A-AFF1 (AF4)</i>	-	niekorzystna	występuje w 50% przypadków niemowląt z ALL z rearanżacjami <i>KMT2A</i>
t(9;11)(p22;q23)	<i>KMT2A-MLLT3 (AF9)</i>	-	-	występuje w 15% przypadków niemowląt z ALL z rearanżacjami <i>KMT2A</i>
t(10;11)(p12;q23)	<i>KMT2A-AF10</i>	-	-	występuje w 5% przypadków niemowląt z ALL z rearanżacjami <i>KMT2A</i>
t(11;19)(q23;p13.3)	<i>KMT2A-ENL</i>	-	-	występuje w 20-25% przypadków niemowląt z ALL z rearanżacjami <i>KMT2A</i>
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	3-5% ALL	niekorzystna	związana z delecją <i>IKZF1</i>
iAMP21 (intrachromosomal amplification of chromosome 21)	wiele kopii genu <i>RUNX1</i>	2% ALL	niekorzystna	-
trisomia 21 chromosomu	mutacje <i>P2RY8-CRLF2, JAK2</i>	-	pośrednia	-
<i>Philadelphia chromosome-like (Ph-like)</i>	<i>IGH-CRLF2, P2RY8-CRLF2</i>	7-8% ALL	niekorzystna	występuje w 50% przypadków ALL Phi-like
	rearanżacje <i>ABL1, ABL2, CSF1R, PDGFRB</i>	5-6% ALL	niekorzystna	występuje w 10-20% przypadków ALL Phi-like
	rearanżacje <i>EPOR, JAK2</i>	2% ALL	niekorzystna	występuje w 10% przypadków ALL Phi-like
delecja <i>ERG</i>	-	3% ALL	korzystna	związana z delecją <i>IKZF1</i> i zmianami w ekspresji <i>CD2</i>
T-ALL				
t(10;14)(q24;q11)	fuzje <i>TLX1 (HOX11)</i>	5-10% T-ALL	korzystna	związana z mutacjami <i>PHF6</i>
t(7;19)(q34;p13)	fuzje <i>LYL1</i>	10% T-ALL	niekorzystna	-
t(1;14)(p32;q11)	fuzje <i>TAL1, LMO1, LMO2</i>	50-60% T-ALL	niekorzystna	związana z mutacjami <i>PHF6</i>
t(1;7)(p32;q34)				
t(11;14)(p15;q11)	<i>TLX3 (HOX11L2)</i>	20-25% T-ALL	niejednoznaczna	związana z mutacjami <i>PHF6</i>
translokacje 7p15	nadekspresja <i>HOXA10, HOXA9</i>	3% T-ALL	niekorzystna	-
rearanżacje <i>KMT2A</i>	<i>KMT2A-AFF1, KMT2A-MLLT1, PICALM-MLLT10</i>	5% T-ALL	korzystna	-
t(8;14)(q24;q11)	<i>TRA-MYC, TRC-MYC</i>	1% T-ALL	niekorzystna	związana z aktywacją <i>MYC</i> i agresywnym przebiegiem choroby
ETP ALL (early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia)	-	10-15% T-ALL	niekorzystna/ pośrednia	związana ze zmianami w szlaku Ras
mutacje <i>NOTCH1</i>	-	50-60% T-ALL	korzystna	związane z delecjami <i>CDKN2A</i> i <i>FBXW7</i>
mutacja <i>FBXW7</i>	-	15% T-ALL	-	związana z regulacją aktywności <i>NOTCH1</i>
t(9;14)(q34;q32)	<i>NUP214-ABL1</i>	5-15% T-ALL	niekorzystna/ pośrednia	związana z nadekspresją <i>HOX11</i> i <i>HOX11L2</i>

Rearanżacje w obrębie genu *MLL* (*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia, KMT2A*) występują u 5-6% przypadków AML, 7-10% ALL oraz 80% niemowlęcych ostrych białaczek [13]. Gen *MLL* uczestniczy w procesie hematopoezy i pełni rolę regulatora transkrypcji genów homeotycznych z rodziny *HOX* (*homeobox*). Co ciekawe, obecność rearanżacji *MLL* pociąga za sobą charakterystyczny schemat ekspresji genów, który został zidentyfikowany również u pacjentów pediatrycznych. Translokacje *MLL* często powodują wczesny nawrót choroby po chemioterapii i wiążą się ze złą prognozą dla pacjenta. Najczęstszymi fuzjami *MLL* u noworodków są *MLL-AF4* (*MLL-AFF1*), *MLL-ENL* (*MLL-MLLT1*), *MLL-AF9* (*MLL-MLLT3*) [14]. Białka fuzyjne oddziałują z DOT1L (*DOT1 like histone H3K79 methyltransferase*) zmieniając wzór metylacji genów docelowych dla *MLL*, tj. *HOXA9*. Inhibitory DOT1L są obiecującym elementem terapii u pacjentów z rearanżacjami *MLL* [15]. Wykrywane są również współwystępujące zmiany w obrębie genów *KRAS*, *NRAS* *FLT3* oraz *NFI* [16].

Translokacja t(12;21)(p13;q22) skutkuje fuzją genów *ETV6* (*TEL*) oraz *RUNX1* (*AML1*). Występuje u około 25% chorych dzieci z B-ALL i wiąże się z dobrą prognozą (EFS 90%) [17]. Prowadzi do aktywacji kinaz oraz reguluje transkrypcję. Głównym celem dla *ETV6/RUNX1* są geny uczestniczące w różnicowaniu komórek macierzystych i hematopoezie. Na podstawie badań sugeruje się, że fuzja ta pojawia się już podczas rozwoju zarodkowego i nie jest wystarczająca do ujawnienia się białaczki [18]. Do progresji choroby potrzeba zwykle innych, wtórnych zmian genetycznych, tj. mutacje punktowe lub zmiana liczby kopii genów (*copy number variation*, CNV) [19]. Obserwuje się współwystępowanie delecji w obrębie genów kodujących czynniki transkrypcyjne (*PAX5*), regulatory cyklu komórkowego (*CDKN2A*) i apoptozy (*BTG1*) [20].

Chromosom *Philadelphia* powstaje w wyniku translokacji między chromosomem 9 i 22. Konsekwencją jest powstanie genu fuzyjnego *BCR-ABL1* występującego u 3-5% dzieci z ALL związanego z niekorzystną prognozą [21]. U dorosłych zmiana ta pojawia się w 25-30% przypadków. Często jest współobecna z delecją genu *IKZF1*, zwiększając ryzyko nawrotu choroby i oporności na leczenie [22]. Wzmożona synteza białka BCR-ABL1 wpływa na proces apoptozy oraz interakcję międzykomórkową, hamuje proces naprawy DNA, co może prowadzić do przełomu blastycznego, w którym wzrasta liczba blastów. W ALL obserwuje się również zmiany podobne do chromosomu *Philadelphia* (*Philadelphia chromosome-like*, Phi-like), w których nie występuje charakterystyczna fuzja *BCR-ABL1* [23]. Mogą pojawić się także fuzje genów *IGH-CRLF2* i *P2RY8-CRLF2*

oraz rearanżacje w obrębie genów *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRB*, *EPOR*, *JAK2*. Wszystkie te zmiany mają niekorzystny charakter dla pacjenta [24].

W procesie leukemogenezy istotne są również mutacje genu *TCF3* (*transcription factor 3*, *E2A*) kodującego czynniki transkrypcyjne E12 oraz E47 [25]. W wyniku rearanżacji chromosomowej $t(1;19)(q23;p13)$ lub jej niezbalansowanej wersji $der(19)t(1;19)(q23;p13)$ dochodzi do fuzji *TCF3-PBX1* (*E2A-PBX1*), która zakłóca działanie celów dla *TCF3* oraz genów homeotycznych *HOX* [26]. Obserwuje się współwystępowanie delecji w chromosomach 6., 9. i 13., gdzie zlokalizowane są geny, tj. *CDKN2A*, *PAX5* i *RBI*. Na skutek rearanżacji chromosomowej $t(17;19)(q22;p13)$ powstaje fuzyjne białko *TCF3-HLF* regulujące geny kontrolujące apoptozę, tj. *LMO2* oraz *BCL2*. Mutacje *TCF3-HLF* wiążą się z niekorzystnym rokowaniem [27].

Pacjenci ze zdiagnozowanym zespołem Downa (trisomia 21 chromosomu) mają do 20 razy większe ryzyko zachorowania na ALL [28]. Do tej pory rola dodatkowego 21 chromosomu w procesie leukemogenezy nie jest w pełni poznana. Obserwuje się częstszą zapadalność na B-ALL niż T-ALL. Najpowszechniejszą rearanżacją wśród pacjentów z zespołem Downa jest *ETV6-RUNX1*. Chorzy są bardziej narażeni na nawroty białaczki i obserwuje się wśród nich większą umieralność. W 50% przypadków wykrywa się fuzję *P2RY8-CRLF2*, która razem z mutacjami *CRLF2* i *JAK2* prowadzi do aktywacji szlaku JAK-STAT promując wzrost niezależny od cytokin [29].

Najczęściej występującymi zmianami genetycznymi wśród pacjentów z T-ALL są mutacje *NOTCH1* (*Notch homolog 1, translocation-associated*), który jest niezbędny w procesie hematopoezy oraz reguluje cykl komórkowy, różnicowanie i dojrzewanie limfocytów T [30]. Obserwuje się wyższy poziom ekspresji u dzieci z T-ALL niż B-ALL. *NOTCH1* jest kontrolowany przez *FBXW7* (*F-box/WD repeat-containing protein 7*) – komponent kompleksu ligazy ubikwityny E3 podczas procesu ubikwitynizacji zależnej od fosforylacji i degradacji białek. Mutacje genu *NOTCH1* występują nawet u 60% chorych na T-ALL i wiążą się z korzystną prognozą, a mutacje genu *FBXW7* u 15% [30].

W ostrych białaczkach gen *ABL1* nie tworzy fuzji tylko z genem *BCR*, ale również z *NUP214* (*nucleoporin 214*). Episomalne amplifikacje *NUP214-ABL1* są często obserwowane w blastach białaczkowych i różnią się ilością u pacjentów od 5 do 50 kopii [31]. Fuzja *NUP214-ABL1* występuje u 5-15% pacjentów z T-ALL i wiąże się z wysokim ryzykiem choroby białaczkowej. Rozwój ostrej białaczki może mieć podłoże w występowaniu *NUP214-ABL1* ze względu na zwiększoną aktywność kinazy

tyrozynowej, w związku z tym ukierunkowana terapia inhibitorami dla tego enzymu może być skuteczna [32].

Ważnym elementem w rozwoju ostrych białaczek są mutacje genów *TLX1* (*T-cell leukemia homeobox 1*) i *TLX3* (*T-cell leukemia homeobox 3*) oraz zmiany w poziomie ich ekspresji. Należą one do grupy represorów transkrypcji. *TLX1* ulega nadekspresji w 5-10% przypadków dziecięcych i 30% dorosłych T-ALL. *TLX3* ulega nadekspresji w wyniku translokacji w 25% pediatrycznych przypadków T-ALL oraz w 5-10% dorosłych [33].

Jednym z bardziej agresywnych typów ostrej białaczki limfoblastycznej jest ETP ALL (*early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*), która wiąże się z wysokim ryzykiem [34]. Szacuje się, że występuje u 15% chorych na ALL. Podłoże genetyczne ETP ALL jest do tej pory bardzo słabo poznane. Podejrzewa się, że charakteryzuje się ono zmianami w szlaku sygnalizacyjnym Ras (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK3*, *BRAF*), regulacji receptorów cytokin, receptorów czynników wzrostu oraz zaburzeniami w epigenetycznej regulacji ekspresji genów [35]. ETP ALL wykazuje również wysoką częstość mutacji w onkogenach i supresorach charakterystycznych dla AML oraz rzadsze występowanie mutacji w sygnalizacji z udziałem *NOTCH1* i *CDKN2A/B* [35].

1.3. Ostra białaczka mieloblastyczna

Ostra białaczka mieloblastyczna stanowi około 15-20% przypadków ostrych białaczek u pacjentów pediatrycznych. Częstość występowania ostrej białaczki szpikowej u niemowląt poniżej 1 roku życia szacuje się na 1,5 przypadku na 100 000 dzieci poniżej 19 roku życia rocznie. U dzieci do 4 roku życia częstość zachorowań utrzymuje się na poziomie 0,9 przypadku na 100 000 dzieci poniżej 19 roku życia, natomiast w wieku 5-9 lat 0,4 przypadku na 100 000 dzieci poniżej 19 roku życia. Więcej przypadków AML wykrywa się u chłopców niż u dziewczynek [4]. W ostatnich kilku dekadach, współczynnik przeżycia dla pacjentów z AML jest na poziomie 60%. Niestety nadal ponad 30% pacjentów pediatrycznych zmaga się z nawrotem choroby. Obecnie 5-letni współczynnik przeżycia wynosi 25% [36]. Nadal niesatysfakcjonujące wyniki efektywności leczenia prowadzą do zwiększenia intensywności cytotoksycznej terapii, podkreślając jednocześnie potrzebę opracowywania nowych ukierunkowanych protokołów przeciwbiałaczkowych [37]. W Tabeli 4 przedstawiono rozkład częstości zachorowań na ostrą białaczkę mieloblastyczną wśród chłopców i dziewczynek w latach 2008-2017 w Polsce.

Tabela 4. Częstość zachorowania na białaczki mieloblastyczne wśród chłopców i dziewczynek w latach 2008-2017 na terenie całej Polski [6].

	Liczba zachorowań wśród chłopców				Suma zachorowań w danym roku	Liczba zachorowań wśród dziewczynek				Suma zachorowań w danym roku
	0-4 lat	5-9 lat	10-14 lat	15-19 lat		0-4 lat	5-9 lat	10-14 lat	15-19 lat	
2008 rok	9	2	7	11	29	6	4	2	12	24
2009 rok	15	7	6	16	44	10	3	6	7	26
2010 rok	11	7	9	14	41	5	3	8	7	23
2011 rok	8	6	5	12	31	7	4	2	10	23
2012 rok	6	6	9	17	38	11	2	5	11	29
2013 rok	7	3	5	6	21	7	3	5	11	26
2014 rok	10	6	2	12	30	13	4	5	3	25
2015 rok	5	7	4	4	20	6	2	5	4	17
2016 rok	4	4	6	8	22	8	4	4	6	22
2017 rok	6	4	5	7	22	10	1	3	6	20
Suma zachorowań w przedziale wiekowym	81	52	58	107		83	30	45	77	

AML wywodzi się z mieloidalnej linii hematopoetycznej. Główna przyczyna leukemogenezy nadal nie jest poznana. Dziecięca postać AML zwykle powstaje *de novo*, w przeciwieństwie do dorosłych, u których AML może wywodzić się z zespołów mielodysplastycznych [38]. W tradycyjnym badaniu kariotypu około 20-25% pediatrycznych przypadków AML jest prawidłowych pod względem cytogenetycznym. Wśród nich 70% pacjentów jest nosicielami zmian genetycznych wykrywalnych tylko za pomocą zaawansowanych narzędzi biologii molekularnej [37].

Światowa Organizacja Zdrowia po raz pierwszy w 2008 roku sklasyfikowała ostrą białaczkę mieloblastyczną. Wcześniej powszechnie stosowano system FAB. Główną różnicą w klasyfikacji ostrej białaczki mieloblastycznej według WHO i FAB jest obniżona wartość blastozy do 20% (WHO) z wcześniejszych 30% (FAB) [39]. W Tabeli 5 zaprezentowano porównanie obu systemów klasyfikacji dla AML.

Tabela 5. Porównanie klasyfikacji FAB i WHO dla ostrej białaczki mieloblastycznej [8, 40].

FAB	WHO
M0 - AML minimalnie zróżnicowana (5%)	Ostra białaczka szpikowa z definiującymi nieprawidłowościami genetycznymi:
M1 - AML bez dojrzewania (20%)	- ostra białaczka promielocytowa z fuzją <i>PML::RARA</i>
M2 - AML z dojrzewaniem (30%)	- ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
M3 - hipergranularna ostra białaczka promielocytowa (10%)	- ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>CBFB::MYH11</i>
M4 - AML mielomonocytowa (20%)	- ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>DEK::NUP214</i>
M5 - ostra białaczka monocytowa (10%)	- ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>RBM15::MRTFA</i>
M6 - erytroleukemia (4%)	- ostra białaczka szpikowa z fuzją <i>BCR::ABL1</i>
M7 - ostra białaczka megakarioblastyczna (1%)	- ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>KMT2A</i>
	- ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>MECOM</i>
	- ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>NUP98</i>
	- ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>NPM1</i>
	- ostra białaczka szpikowa z mutacją <i>CEBPA</i>
	- ostra białaczka szpikowa związana z mielodysplazją
	- ostra białaczka szpikowa z innymi określonymi zmianami genetycznymi
	Ostra białaczka szpikowa, określona przez zróżnicowanie:
	- ostra białaczka szpikowa z minimalnym zróżnicowaniem
	- ostra białaczka szpikowa bez dojrzewania
	- ostra białaczka szpikowa z dojrzewaniem
	- ostra białaczka bazofilowa
	- ostra białaczka mielomonocytowa
	- ostra białaczka monocytowa
	- ostra białaczka erytroidalna
	- ostra białaczka megakaryoblastyczna

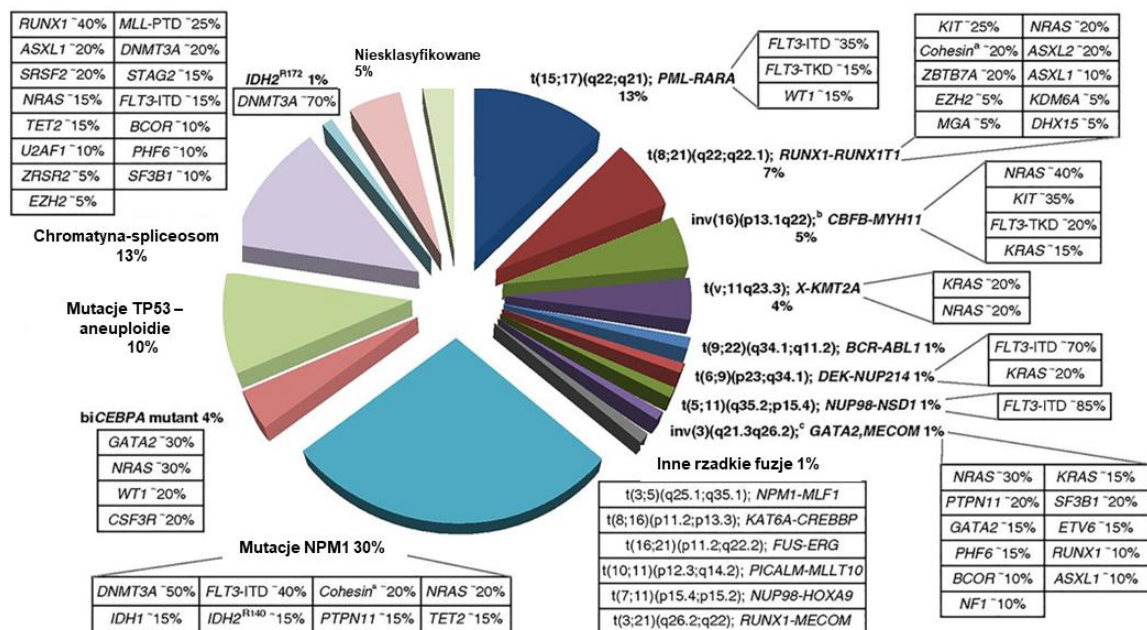
W nawiasach dla FAB podana jest częstotliwość występowania poszczególnych podtypów AML.

W praktyce klinicznej pacjenci mogą być przypisani do konkretnych grup prognostycznych uwzględniając wykryte rearanżacje genetyczne jeszcze przed rozpoczęciem leczenia. Pacjenci mogą być podzieleni na różne typy cytogenetyczne (korzystny, pośredni, niekorzystny) biorąc pod uwagę odpowiedź na leczenie indukcyjne, ryzyko nawrotu choroby oraz OS [41]. W Tabeli 6 przedstawiono klasyfikację aberracji genetycznych przypisanych do poszczególnych grup ryzyka występujących u dziecięcych pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną.

Tabela 6. Stratyfikacja ryzyka według zmian genetycznych u pacjentów z AML [40, 41].

Prognoza	Zmiany cytogenetyczne i molekularne
korzystna	<ul style="list-style-type: none"> - 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> - zmutowany <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> lub z <i>FLT3-ITD</i>^{low} = stosunek alleli < 0,5 - bialleliczna mutacja <i>CEBPA</i>
pośrednia	<ul style="list-style-type: none"> - zmutowany <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i>^{high} = stosunek alleli > 0,5 - <i>NPM1</i> typu dzikiego bez <i>FLT3-ITD</i> lub z <i>FLT3-ITD</i>^{low} (bez niekorzystnych zmian genetycznych) - t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> - nieprawidłowości cytogenetyczne niesklasyfikowane jako korzystne lub niekorzystne
niekorzystna	<ul style="list-style-type: none"> - t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> - t(v;11q23.3); rearanżacja <i>KMT2A</i> - t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> - inv(3)(q21.3q26.2) lub t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i> - -5 lub del(5q); -7; -17/abn(17p) - dziki <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i> - zmutowany <i>RUNX1</i> - zmutowany <i>ASXL1</i> - zmutowany <i>TP53</i> - del(7q) - del(9q) - inv(3); t(3;3) <i>RPN1-EVII</i>

Zmiany genetyczne u dzieci i dorosłych z AML częściowo są podobne, jednak zdecydowanie różni się ich udział procentowy (Rycina 1) oraz znaczenie prognostyczne. Aberracje genetyczne występujące u pacjentów pediatrycznych z AML można podzielić na dwa typy, które zaprezentowane są na Rycinie 2. Pierwszy rodzaj związany jest ze zwiększoną proliferacją komórek (np.: *RAS*, *FLT3-ITD*, *cKIT*), natomiast drugi powoduje zahamowanie dojrzewania komórek (np.: *MLL*, *NPM1*, *CEBPA*). Najczęstszymi cytogenetycznymi nieprawidłowościami II typu są t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(15;17)(q22;q21) oraz 11q23/MLL, które razem stanowią około połowę pediatrycznych przypadków AML. U dorosłych są one znacznie rzadsze. Translokacje prowadzą głównie do zaburzeń działania czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w proces hematopoezy oraz deregulacji ekspresji genów [42].



Rycina 1. Status cytogenetyczny i mutacyjny różnych genów związanych z opornością i powodzeniem protokołu chemioterapii u dorosłych pacjentów z AML [43], zmodyfikowano.

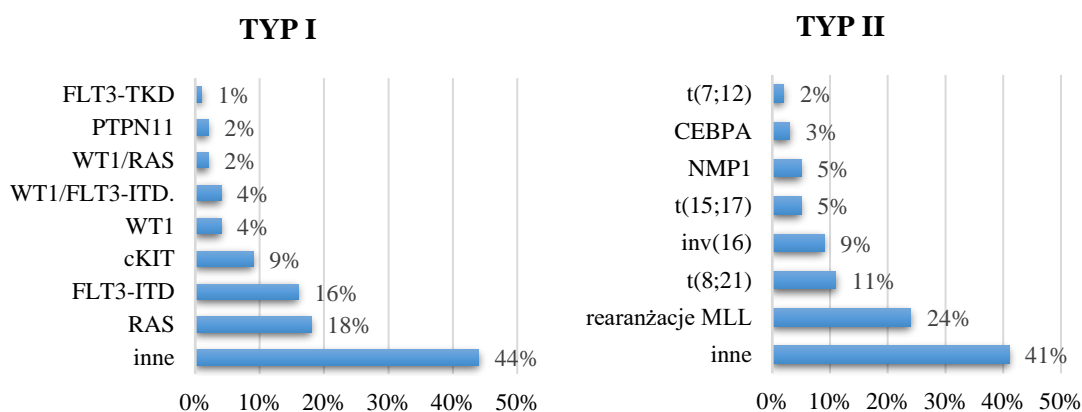
Na podstawie badań, sugeruje się *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) jako bardzo ważny cel w terapii ostrych dziecięcych białaczek. Mutacje tego genu są jednymi z najczęściej występujących zmian genetycznych w AML oraz mają istotne zastosowanie kliniczne w grupie wysokiego ryzyka dziecięcej AML i ALL [44]. *FLT3* uczestniczy w regulacji szlaków sygnalizacyjnych, tj. Ras, PI3K. Poprzez oddziaływanie z ważnymi genami, tj. *STAT5*, *MAPK* i *ERK1/2*, zwiększa proliferację komórek, hamuje ich apoptozę i różnicowanie [45]. Wzmoczoną ekspresję *FLT3* obserwuje się w większości AML, jednak nie jest dla niej charakterystyczna, albowiem nadekspresja *FLT3* wykrywana jest także w ALL, chociaż w mniejszym stopniu. Wyróżnia się dwie podstawowe grupy mutacji aktywujących *FLT3*. Należą do nich wewnątrzrandemowe duplikacje (*internal tandem duplications*, ITD) i mutacje punktowe w domenie kinazy tyrozynowej (*tyrosine kinase domain*, TKD) [46]. Sugeruje się, że ITD mogą powstawać w wyniku błędów podczas replikacji DNA. Różnią się długością i lokalizacją. Zwykle pojawiają się replikaty trójnukleotydowe. Zmiany *FLT3-ITD* wykrywane są w 16% pediatrycznych przypadków AML i wiążą się z wyższą liczbą białych krwinek, starszym wiekiem oraz gorszą przeżywalnością [47]. Zmiany TKD są znacznie rzadsze (1%) i mają mniejsze znaczenie kliniczne niż ITD. Szacuje się, że nawet u 35% dzieci chorych na ostrą białaczkę mieloblastyczną z *FLT3-TKD* współwystępuje rearanżacja w obrębie genu *MLL* [44, 48].

Kolejnym ważnym czynnikiem w AML jest białko opiekuńcze NPM1 (*chaperon protein*). Odgrywa ono kluczową rolę w stabilizacji genomu, progresji cyklu

komórkowego i apoptozy [49]. Mutacje *NMP1* występują w 30% przypadków AML wśród dorosłych, natomiast u dzieci są znacznie rzadsze. Obserwuje się współwystępowanie zmian *FLT3-ITD*. Pacjenci z mutacjami *NMP1* mają 2-krotnie większą szansę na osiągnięcie całkowitej remisji niż pacjenci bez mutacji. Detekcja mutacji *NPM1* jest wykorzystywana w predykcji i monitorowaniu choroby resztkowej [50].

Gen *WT1* (*Wilms tumor 1*) koduje czynnik transkrypcyjny. W zależności od poziomu ekspresji, izoformy oraz przestrzeni komórkowej, w której występuje, może działać jako aktywator bądź inhibitor transkrypcji [51]. Zwiększona ekspresja genu *WT1* jest związana z korzystną prognozą dla pacjentów pediatrycznych z AML. Na podstawie badań można wskazać, że mutacje *WT1* (głównie w 7 i 9 egzonie) wiążą się z krótszym OS i EFS oraz z większym ryzykiem nawrotu białaczki [52].

Receptor kinazy tyrozynowej *cKIT* odgrywa istotną rolę w hematopoezie. Na podstawie badania można wskazać, że mutacje genu *cKIT* są skorelowane z większym ryzykiem nawrotu białaczki oraz krótszym przeżyciem [53]. Mutacje *cKIT* są typowane jako negatywny czynnik prognostyczny u pacjentów z translokacją t(8;21) oraz wiążą się z opornością na chemioterapię i zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby [54].



Rycina 2. Częstość występowania zmian genetycznych typu I i typu II w dziecięcej AML [36, 37, 55].

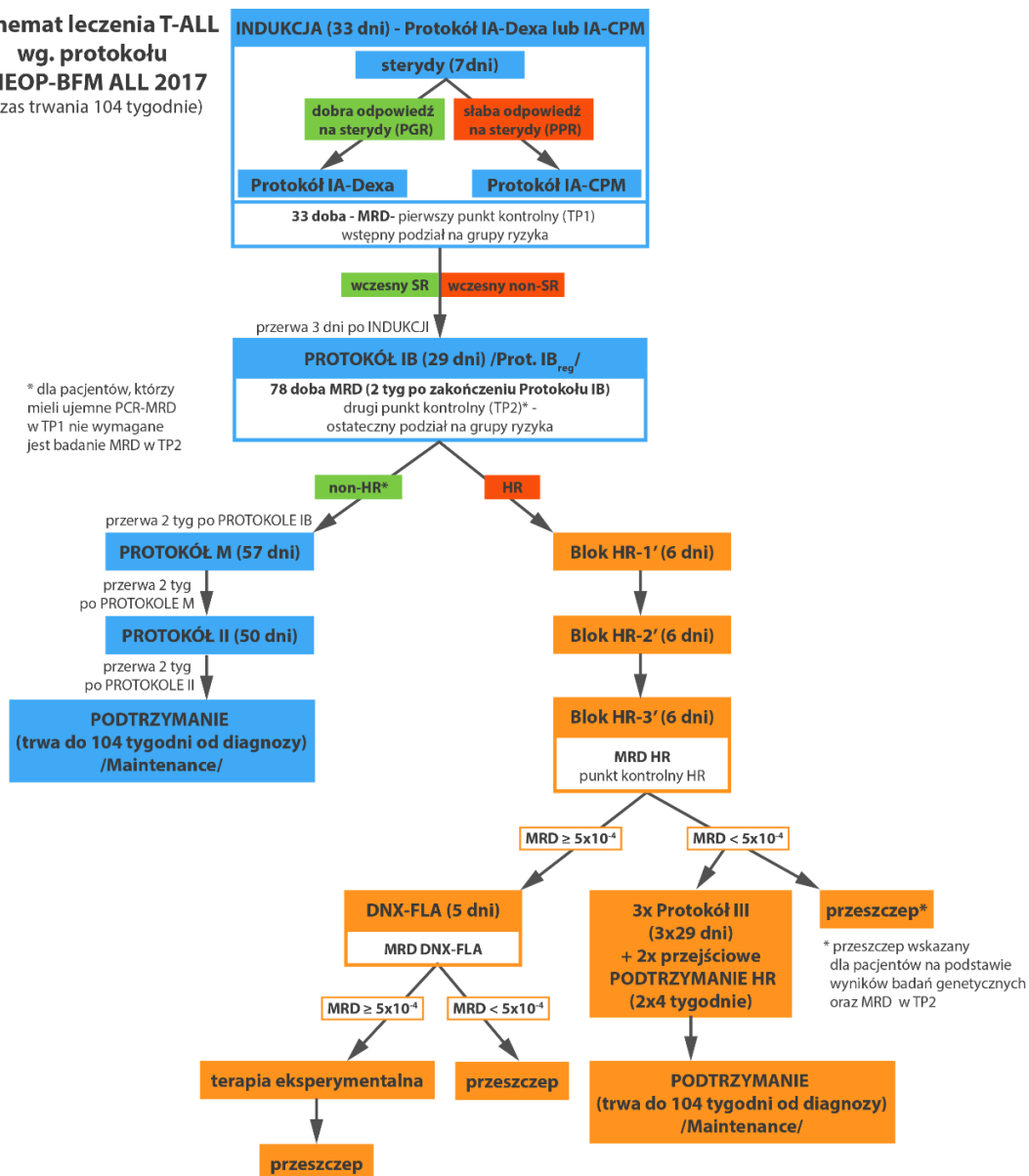
1.4. Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej

Pacjentów, u których stwierdzono ALL, zwykle leczy się protokołem złożonym z kilku etapów. Pierwszym z nich jest faza indukcji remisji, której celem jest zmniejszenie liczebności komórek nowotworowych tak, aby w szpiku pozostało ich mniej niż 5%. Wprowadza się profilaktyczną ochronę ośrodkowego układu nerwowego, która może być osiągnięta poprzez naświetlanie, kombinację cytarabiny i metotreksatu lub podawanie liposomowej cytarabiny. U pacjentów z chromosomem *Philadelphia* intensywność

początkowej fazy terapii może być mniejsza niż tradycyjnie. Kolejnym etapem protokołu leczenia jest faza konsolidacji, której celem jest dalsze zmniejszanie liczby blastów białaczkowych (w tym opornych na terapeutyki). Leczenie ulega intensyfikacji poprzez podawanie wielolekowej chemioterapii. Po stwierdzeniu zajęcia ośrodkowego układu nerwowego może być konieczne dokanałowe podawanie leków (tj. metotreksat i cytarabina) oraz naświetlanie. Leczenie podtrzymujące remisję ma na celu zniszczenie ewentualnej reszty komórek nowotworowych, które nie zostały zlikwidowane w poprzednich etapach terapii. Niepowodzenie leczenia podtrzymującego może objawić się nawrotem choroby. Długość leczenia pokonsolidacyjnego może trwać od 2 do 3 lat. Najczęstszym wskazaniem do przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych jest nawrót ALL. W pierwszej remisji stosowany jest przeszczep autogeniczny u chorych z grupy wysokiego ryzyka i przeszczep allogeniczny u chorych z bardzo wysokim ryzykiem, w kolejnych remisjach wykonywane jest przeszczepienie allogeniczne [53, 56].

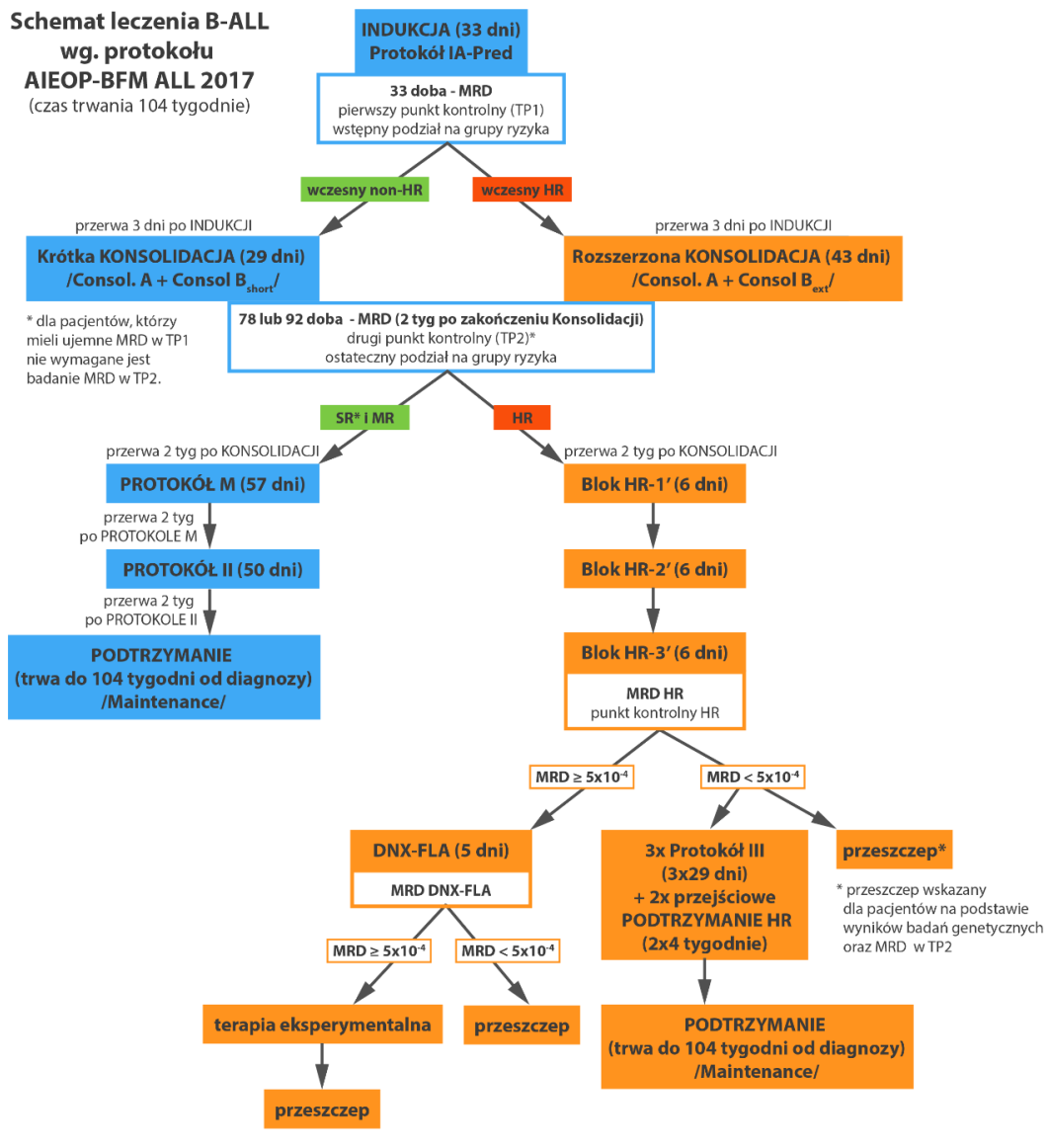
W Polsce jednym z najczęściej stosowanych protokołów leczenia ALL od października 2018 roku jest protokół AIEOP-BFM ALL 2017 zaakceptowany przez Polską Unię Onkologii, w którym plan leczenia zależy od grupy ryzyka, do której zakwalifikuje się pacjenta. W zależności od typu ALL przebieg leczenia jest nieco inny (Rycina 3 i Rycina 4). W protokole leczenia ALL z chromosomem *Philadelphia* (EsPhALL2017) wprowadzono terapię celowaną z zastosowaniem leku imatynib, w celu zwiększenia skuteczności terapii. Imatynib hamuje kinazę BCR-ABL1, co prowadzi do zmniejszenia proliferacji komórek i wzmacnia ich apoptozę. Wznowy ALL leczone są wg protokołu IntReALL SR 2010 [57].

Schemat leczenia T-ALL wg. protokołu AIEOP-BFM ALL 2017
(czas trwania 104 tygodnie)



Rycina 3. Schemat leczenia T-ALL wg protokołu AIEOP-BFM ALL 2017 [57].

**Schemat leczenia B-ALL
wg. protokołu
AIEOP-BFM ALL 2017**
(czas trwania 104 tygodnie)



Rycina 4. Schemat leczenia B-ALL wg protokołu AIEOP-BFM ALL 2017 [57].

Leki rekomendowane przez WHO w leczeniu ALL u dzieci to m.in.: L-asparaginaza, busulfan, cyklofosfamid, cyklosporyna, arabinozyd cytozyny, daunorubicyna, deksametazon, doksorubicyna, etopozyd, hydrokortyzon, imatynib, leucovorin, merkaptopuryna, metotreksat, metyloprednizolon, prednizon, tioguanina oraz winkrystyna. Według zaleceń NCI (*National Cancer Institute*) z 2013 roku, w terapii indukcyjnej stosuje się chemioterapię złożoną z winkrystyny, kortykosteroidów (prednizon, deksametazon), L-asparaginazy oraz antracyklin (doksorubicyna, daunorubicyna). Zgodnie z protokołami COG (*The Children's Oncology Group*) nie podaje się ich w terapii indukcyjnej u chorych o normalnym ryzyku z B-ALL. Czterolekowa terapia jest przeznaczona głównie dla pacjentów z wysokim ryzykiem z

prekursorowych limfocytów B oraz T-ALL. NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) w terapii indukcyjnej zaleca stosowanie kombinacji winkrystyny, kortykosteroidów (prednizon, deksametazon), antracyklin (daunorubicyna, doksorubicyna) z lub bez L-asparaginazy i/lub cyklofosfamidu [3, 56].

Częstą przyczyną niepowodzenia leczenia jest choroba resztkowa (*minimal residual disease*, MRD) [58, 59]. Świadczy ona o małej liczbie przetrwałych komórek nowotworowych, na które nie zadziałały chemioterapeutyki w trakcie leczenia bądź remisji. Ilość blastów białaczkowych zwykle nie jest wystarczająca do wywołania objawów klinicznych choroby, lecz jest przyczyną jej nawrotu [60]. Badania wykrywające MRD należą do czułych metod diagnostycznych, tj. analiza transkryptów genów fuzyjnych metodą PCR, cytometria przepływowa. Wśród czynników prognostycznych MRD dla pacjentów z ALL znajdują się m.in.: *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1* oraz geny receptorów komórek T. Rearanżacje genetyczne występują u około 40% dzieci i dorosłych cierpiących na MDR [61].

1.5. Leczenie ostrej białaczki mieloblastycznej

Pacjenci, u których stwierdzono AML zwykle leczy się protokołem złożonym z kilku etapów. Pierwszym z nich jest faza indukcji remisji. Indukcyjna chemioterapia nazywana jest „7+3”, ponieważ składa się z 7 dni podawania w standardowej dawce cytarabiny i 3 dni antybiotyku antracyklinowego. Mimo osiągnięcia całkowitej remisji, może się okazać, że komórki nowotworowe pozostały w bardzo małej liczbie, trudno oznaczalnej dostępnymi metodami diagnostycznymi. Dlatego też w przypadku wysokiego ryzyka nawrotu AML stosuje się terapię konsolidacyjną. Zależy ona od indywidualnych czynników prognostycznych pacjenta (w tym czynników cytogenetycznych, np. *inv16*) oraz jego ogólnego stanu zdrowia. Leczenie podtrzymujące remisję stosuje się je głównie u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka nawrotu AML. W przypadku zajęcia ośrodkowego układu nerwowego przez komórki białaczkowe podawana może być cytarabina. Najczęstszym wskazaniem do przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych jest nawrót AML. W pierwszej remisji stosuje się zwykle przeszczep allogeniczny u chorych z grupy wysokiego ryzyka, przeszczep autogeniczny u chorych ze standardowym ryzykiem. W kolejnych remisjach zalecane jest przeszczepienie allogeniczne [62, 63].

Powszechnie stosowanym protokołem leczenia ostrej białaczki mieloblastycznej w Polsce jest AML-BFM 2017. Leczenie AML antracyklinami polega na stosowaniu

daunorubicyny w fazie indukcyjnej terapii. Terapia idarubicyną razem z cytarabiną (również w fazie konsolidacji), jest co najmniej tak samo efektywna, a może nawet dawać lepsze wyniki niż leczenie daunorubicyną u pacjentów pediatrycznych. Mitoksantron może być podawany w fazie indukcji oraz konsolidacji, głównie w kombinacji z cytarabiną i etopozydem [64].

W powodzeniu leczenia AML dużą przeszkodą jest choroba resztkowa, świadcząca o przetrwaniu części komórek nowotworowych. Wśród czynników prognostycznych znajdują się m.in.: *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*, *cKIT* [58].

1.6. Leki antracyklinowe

Antracykliny należą do grupy leków działających niespecyficycznie w cyklu komórkowym. Po raz pierwszy zostały wyizolowane z Gram-dodatnich bakterii *Streptomyces*. Stosowane są w terapii przeciwnowotworowej w raku piersi [65], jajnika [66], płuc [67], a także chłoniakach [68] i białaczkach [69]. Antracykliny są jednymi z najbardziej efektywnych chemioterapeutyków. Zbudowane są z aglikonu oraz z pierścienia aminocukrowego [70]. Pierwszy składnik przyłącza się pomiędzy pary zasad DNA, natomiast drugi – znajduje się w mniejszym rowku helisy DNA. Wśród antracyklin wyróżnia się daunorubicynę (DNR), idarubicynę (IDA), dokсорubicynę (DOX) oraz mitoksantron (MIT). Głównym efektem ubocznym działania tych leków jest ich kardiotoxyczność [71, 72].

Do mechanizmów działania antybiotyków antracyklinowych zalicza się:

- a) hamowanie syntezy DNA/RNA poprzez interkalację pomiędzy pary zasad;
- b) hamowanie działania enzymu topoizomerazy II odpowiadającego za poziom skręcenia helisy DNA;
- c) generowanie wolnych rodników w obecności jonów żelaza;
- d) indukowanie rozplecenia chromatyny na histonach [73].

Wielopłaszczyznowe mechanizmy leków antracyklinowych uniemożliwiają poprawne przeprowadzenie procesu transkrypcji oraz replikacji, co zapobiega gwałtownemu wzrostowi i podziałowi komórek nowotworowych. Ponadto wolne rodniki prowadzą do uszkodzeń nie tylko DNA, ale również białek i błon komórkowych [73]. Mimo szerokiego zastosowania klinicznego leków antracyklinowych, nie udało się uniknąć poważnych problemów, tj. rozwój oporności komórek nowotworowych lub efekt toksyczności na zdrowych komórkach. W przeciągu ostatnich 20 lat badacze pracowali

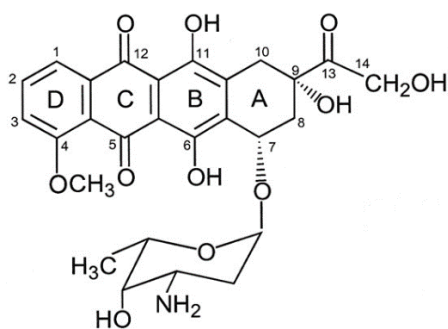
nad syntezą coraz nowszych analogów DOX czy DNR charakteryzujących się zróżnicowaną aktywnością i toksycznością [71].

1.6.1. Doksorubicyna

Doksorubicyna (Rycina 5) jest powszechnie używana w terapii wielu typów nowotworów, podczas gdy daunorubicyna oraz idarubicyna głównie stosowane są w terapii przeciwbiałaczkowej. Doksorubicyna wykazuje zbliżone właściwości do naturalnie występującej daunomycyny [74].

Doksorubicyna oddziałuje z DNA poprzez interkalację. Hamuje działanie topoisomerazy II odpowiedzialnej za rozluźnienie nici DNA konieczne w procesie transkrypcji i replikacji. Uczestniczy w stabilizacji kompleksu topoisomeraza II-DNA [75]. DOX stymuluje również produkcję wolnych rodników, zwiększając jednocześnie jej toksyczność komórkową. DOX może także indukować odplecenie się chromatyny z histonu. W konsekwencji prowadzi to do uszkodzeń DNA, zaburzeń epigenetycznych oraz zmian na poziomie transkryptomu [74].

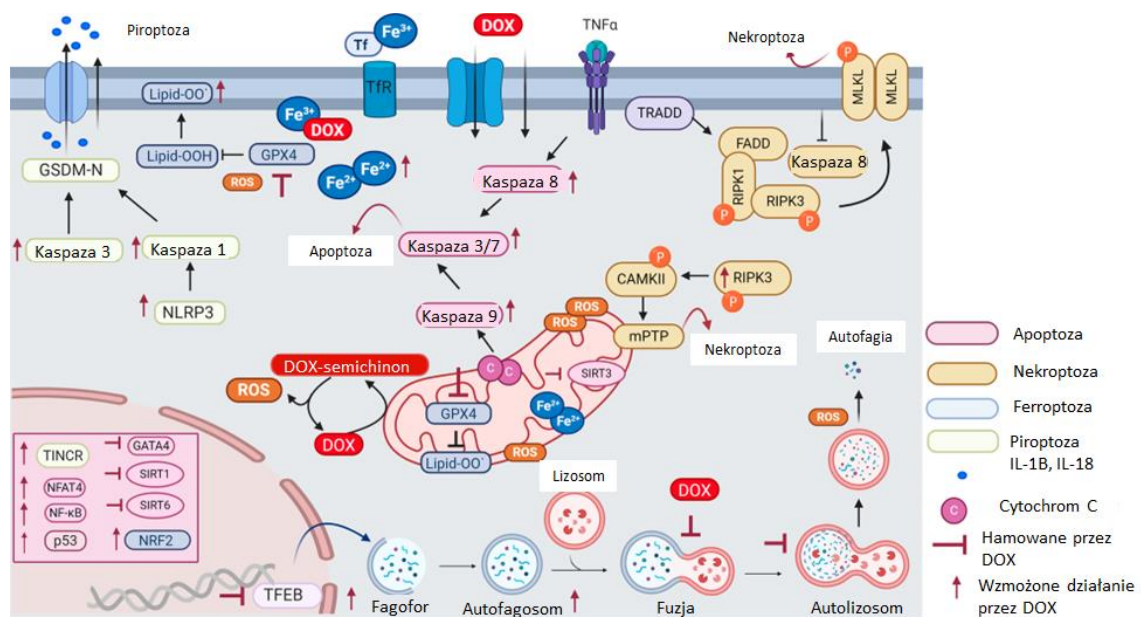
Przypuszcza się, że DOX aktywuje wiązanie p53-DNA w szlaku apoptozy. Fakt ten może pełnić ważną rolę w wytłumaczeniu zjawiska cytotoksyczności antracyklin, jednak nie został on w pełni potwierdzony. Dodatkowo, badacze wysunęli teorię mówiącą, że DOX-zależna aktywacja p53 przyczynia się do indukcji *WAF1/CIP1* (inhibitor kinaz cyklinozależnych związanych z przejściem komórki z fazy G1 do S). Zgodnie z tą koncepcją uważa się, że wysoki poziom białka *WAF1/CIP1* ma związek z opornością na leki w AML [74, 76].



Rycina 5. Struktura chemiczna doksorubicyny [77].

Doksorubicyna aktywuje NLRP (*NLR family pyrin domain containing 3*) indukując uwalnianie interleukin II-1 β i II-18, prowadząc do piroptozy (śmierci komórki związanej ze stanem zapalnym) (Rycina 6). Aktywacja RIPK1 (*receptor interacting serine/threonine kinase 1*) i RIPK3 (*receptor interacting serine/threonine kinase 3*) w

wyniku leczenia doksorubicyną prowadzi do fosforylacji MLKL i nekroptozy (śmierci komórki, będącej odpowiedzią na konkretny sygnał środowiskowy). Doksorubicyna wywołuje nekroptozę poprzez szlak niezależny od RIPK1, aktywując RIPK3 i CAMKII (*calcium/calmodulin dependent protein kinase*), co prowadzi do utraty mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) i potencjału błonowego. Doksorubicyna ulega cyklowi redoks oraz reakcji Fentona. Nadmiar żelaza i peroksydacja lipidów w wyniku leczenia doksorubicyną powoduje ferroptozę (śmierć komórki zależną od żelaza i charakteryzującą się akumulacją nadtlenków lipidów) [74].

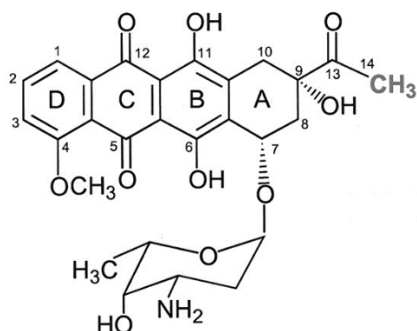


Rycina 6. Mechanizm śmierci komórki regulowany przez doksorubicynę [74], zmodyfikowano.

1.6.2. Daunorubicyna

Daunorubicyna (Rycina 7) stosowana jest przede wszystkim w terapii przeciw białaczkom. Używana jest jako związek wyjściowy dla pozostałych antybiotyków antracyklinowych. Jej największą wadą jest intensywne działanie kardiotoksyczne. DNR charakteryzuje się zbliżonym działaniem na poziomie molekularnym jak doksorubicyna. DNR jest związkiem DNA-reaktywnym. Wykazuje zdolność do interkalacji między pary zasad DNA oraz hamuje enzym topozomerazę II. Działania te uniemożliwiają rozluźnienie podwójnej helisy DNA i w konsekwencji niemożliwa jest prawidłowa transkrypcja [78, 79]. W białaczkach nielimfocytowych wśród dorosłych zaobserwowano, że chlorowodorek daunorubicyny powoduje całkowitą remisję w połowie przypadków, gdy jest stosowany jako pojedynczy lek. W połączeniu z cytarabiną, nawet w 65% przypadków chorzy mogą wyzdrowieć [78]. Badania kliniczne wykazały, że daunorubicyna wydłuża całkowity czas remisji pediatrycznej ALL, gdy jest

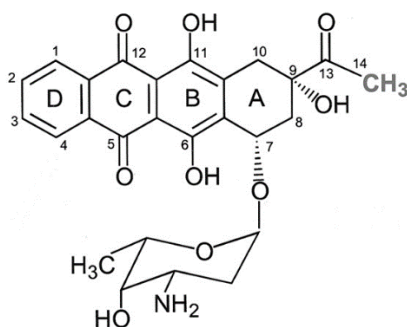
stosowana w skojarzeniu z winkrystyną-prednizonem w porównaniu do stosowania winkrystyny i prednizonu w monoterapii [71].



Rycina 7. Struktura chemiczna daunorubicyny [77].

1.6.3. Idarubicyna

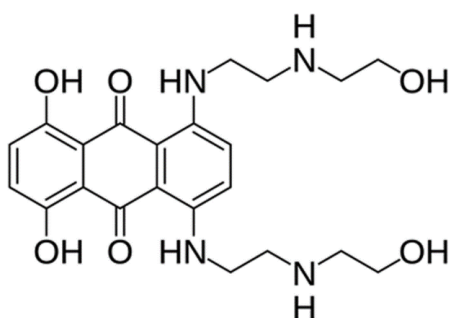
Idarubicyna jest analogiem daunorubicyny (Rycina 8). Syntetyzuje się ją poprzez usunięcie grupy 4-metoksylowej z jednego z pierścieni. Prowadzi to do wzrostu lipofilności w porównaniu z daunorubicyną oraz łatwiejszego wiązania się do DNA. IDA wykazuje wyższą przepuszczalność dla komórek i cytotoksyczność niż daunorubicyna i doksorubicyna. Ponadto jest bardziej skuteczna wobec linii komórkowych raka opornego na doksorubicynę i daunorubicynę. Kardiotoksyczność IDA jest niższa niż doksorubicyny i epirubicyny. IDA może być stosowana w połączeniu z cytarabiną. Idarubicyna wykazuje aktywność antymitotyczną i cytostatyczną. Łączy się z kwasem deoksyrybonukleinowym tworząc kompleksy interkalujące. Wpływa hamująco na aktywność topoisomerazy II. Prowadzi do tworzenia bardzo trwałego kompleksu IDA-DNA-topoisomeraza II. Idarubicyna może również powodować inhibicję polimerazy RNA (przez co reguluje ekspresję genów), produkcję wolnych rodników uszkadzających DNA, membrany komórkowe oraz proteiny. IDA charakteryzuje się własnościami przeciw nowotworom, dlatego też stosowana jest m.in.: w ostrej i przewlekłej białaczce mieloblastycznej, ostrej białaczce limfoblastycznej oraz zespole mielodysplastycznym [77, 80].



Rycina 8. Struktura chemiczna idarubicyny [77].

1.6.4. Mitoksantron

Mitoksantron jest syntetyczną postacią antracykliny pochodzenia antrachinonowego (Rycina 9). Charakteryzuje się większym działaniem przeciwnowotworowym i mniejszą kardiotoxycywnością niż DOX. Mitoksantron wykazuje silne powinowactwo do białek histonowych. Łatwiej wiąże się do nukleosomów lub DNA z histonami niż do DNA ich pozbawionego, co wyróżnia MIT od innych antybiotyków antracyklinowych. Badacze wskazują hamujący wpływ MIT na limfocyty B, limfocyty T i procesy proliferacyjne makrofagów. MIT wchodzi w bezpośrednią interakcję z DNA poprzez tworzenie wiązań wodorowych, powodując pęknięcia oraz przerwy w nici. Oddziałuje także z RNA, powodując zahamowanie transkrypcji, translacji i syntezy łańcuchów aminokwasowych. Jest on także skutecznym inhibitorem topoisomerazy II [81].



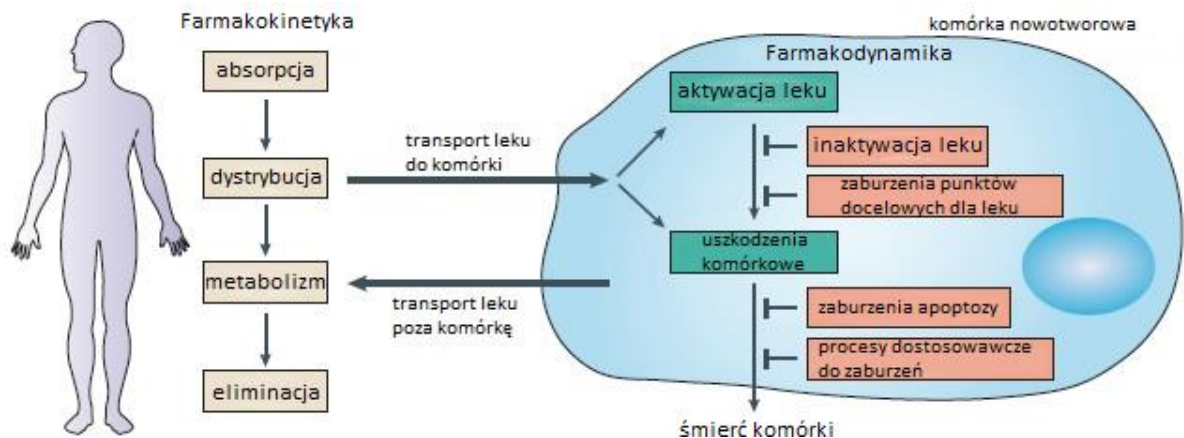
Rycina 9. Struktura chemiczna mitoksantronu [81].

1.7. Zjawisko lekooporności

Oporność lekowa w chemioterapii przeciwnowotworowej jest ważnym problemem w dzisiejszej medycynie i odpowiada za większość nawrotów. Ponadto jest jedną z głównych przyczyn zgonów w przypadku raka. Standardowe chemioterapeutyki zabijają komórki nowotworowe uszkodzając ich DNA, co powoduje nieswoistość i wysoką toksycywność. Dlatego też, duży nacisk kładzie się na opracowanie ukierunkowanych

leków, aby precyzyjnie blokować zmiany odpowiedzialne za wzrost i proliferację raka. Chociaż leki te wykazują niezwykle skuteczne działanie podczas początkowego leczenia, znaczna większość pacjentów rozwija oporność w miarę postępu leczenia. U około 20% pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną rozwija się nawrót choroby [82]. Dlatego też potrzebne jest lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw nabywania lekooporności, które ułatwią opracowanie nowych strategii terapeutycznych i doprowadzą do lepszych wyników klinicznych.

Główne przyczyny braku wrażliwości komórek na leki to m.in.: zmiany w farmakokinetyce (zaburzenia absorpcji, transportu, metabolizmu, eliminacji leku) i farmakodynamice (słaby transport leku do komórki, nadmierny transport leku poza komórkę, aktywacja/podtrzymywanie aktywnej formy leku, uszkodzenia białka będącego celem leku, zahamowanie cyklu komórkowego, indukcja apoptozy) (Rycina 10) [82].



Rycina 10. Podstawy oporności na leki [83], zmodyfikowano.

Wyróżnia się kilka typów lekooporności, w tym:

- oporność farmakokinetyczna – zmniejszenie efektywnego stężenia leku w komórce poprzez zaburzenia w jego transporcie;
- oporność komórkowa – brak reakcji komórki na działający na nią lek;
- oporność pierwotna (wrodzona) – spowodowana zmiennością na poziomie molekularnym i biochemicznym w komórce może być wynikiem (1) wrodzonych mutacji genetycznych, które powodują zmniejszoną reakcję komórek nowotworowych na chemioterapię, (2) heterogeniczności nowotworów, w których wcześniej istniały niewrażliwe subpopulacje, w tym rakowe komórki macierzyste, (3) aktywacji wewnętrznych szlaków wykorzystywanych jako obrona przed toksynami;

- oporność nabyta (wtórna) – spowodowana stosowaniem cytostatyków w terapii przeciwnowotworowej, na których działanie komórki uodparniają się; może być wynikiem (1) aktywacji drugiego protoonkogenu, który staje się nowo powstałym genem głównym odpowiedzialnym za rozwój nowotworu, (2) mutacji lub zmienionego poziomu ekspresji genów docelowych dla leków, (3) zmian w mikrośrodowisku nowotworu po leczeniu;
- oporność selektywna (wybiórcza) – związana zwykle z jednym mechanizmem dla konkretnego leku;
- oporność wielolekowa (plejotropowa) – oporność na wiele leków jednocześnie; może być spowodowana przez usuwanie leków z komórek przez transportery ABC;
- oporność czynna – związana ze wzmożoną aktywnością wybranych białek;
- oporność bierna – związana z obniżoną aktywnością punktów docelowych dla działania leków, np. topoisomerazy II dla antracyklin [82].

Oddziaływania leków z cząsteczkami znajdującymi się w komórce mogą doprowadzić do wzmożonej lub obniżonej aktywności chemioterapeutyku. Wiele leków musi przejść przez proces aktywacji metabolicznej w celu uzyskania skuteczności klinicznej. Uczestniczyć mogą w tym m.in.: cytochrom P450, transferaza GST (*glutathione-S-transferase*) czy UGT (*uridine diphospho-glucuronosyltransferase*). Białka cytochromu CYP450 uczestniczą w metabolizmie substancji endogennych (np. cholesterolu) oraz leków, prowadząc do ich aktywacji lub dezaktywacji [84]. Dzięki zróżnicowanej ekspresji w zależności od tkanek, wykorzystywane są jako markery nowotworowe. GST uczestniczy w detoksykacji komórkowej i hamuje szlak MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) [85]. Zwiększona ekspresja genu kodującego GST w komórkach nowotworowych powoduje wzmożoną detoksykację, przez to cytotoksyczne działanie leku jest słabsze. UGT katalizuje reakcję przyłączenia reszty kwasu glukoronowego do ksenobiotyków, przez co uznawany jest za jeden z ważniejszych punktów w eliminacji leków z organizmu [86].

Wiele białek transportowych jest powszechnie znanych z promowania oporności na chemioterapeutyki. Należą do nich głównie białka transmembranowe z rodziny ABC (*ATP-binding cassette*), zawierające domenę wiążącą ATP [87]. Białka te regulują przepływ aminokwasów, hormonów, leków poprzez błonę komórkową. Uczestniczą także w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Do tej pory zidentyfikowano prawie 50 białek należących do tej rodziny. Najbardziej znane są MDR1 (*multi-drug resistance*

protein 1, P-glikoproteina) oraz MRP1 (*MDR-associated protein 1*, ABCC1). Eliminują one z komórki różne związki hydrofobowe, w tym inhibitory topoizomerazy (np. antracykliny) [88]. Nadekspresja *MDR1* oraz *MRP1* powiązana jest z niepowodzeniami leczenia nowotworów prostaty, wątroby, a także białaczkach i chłoniakach [89, 90]. Literatura potwierdza związek transporterów ABCA2 i ABCB1 z opornością na mitoksantron w AML [91]. ABCB1 ma wiele miejsc wiązania leków, które mogą wiązać i pompować z komórki kilka różnych substratów, takich jak: etopozyd, doksorubicyna, paklitaxel i winblastyna [88]. ABCC1 jest odpowiedzialne za wypompowywanie leków przeciwnowotworowych, takich jak: alkaloidy, antracykliny i metotreksat. ABCG2 może transportować leki naładowane dodatnio i ujemnie, w tym leki chemioterapeutyczne (mitoksantron i inne antracykliny). ABCC2 i ABCC3 mogą transportować wiele leków, tj. cisplatynę, doksorubicynę i etopozyd, a ich nadekspresja powoduje oporność wielolekową. W oparciu o badania, sugeruje się bardziej rozległą funkcję białek ABC niż tylko transport. Obserwacje naukowców wskazują na ich udział także w apoptozie, proliferacji, różnicowaniu i migrowaniu komórek [82, 88].

Odpowiedź na leki może być związana z zaburzeniami szlaku apoptozy. Najbardziej znanymi białkami antyapoptotycznymi są BCL-2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*) oraz IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) [92]. W obrębie genów je kodujących zachodzą mutacje, amplifikacje, uczestniczą w rearanżacjach chromosomowych, a także dochodzi do zmiany ich ekspresji. Ponadto geny te są celami podczas transkrypcji dla czynników transkrypcyjnych promujących mechanizmy przeżyciowe komórki, tj. *NF-κB* (*nuclear factor kappa B*) i *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*) [93].

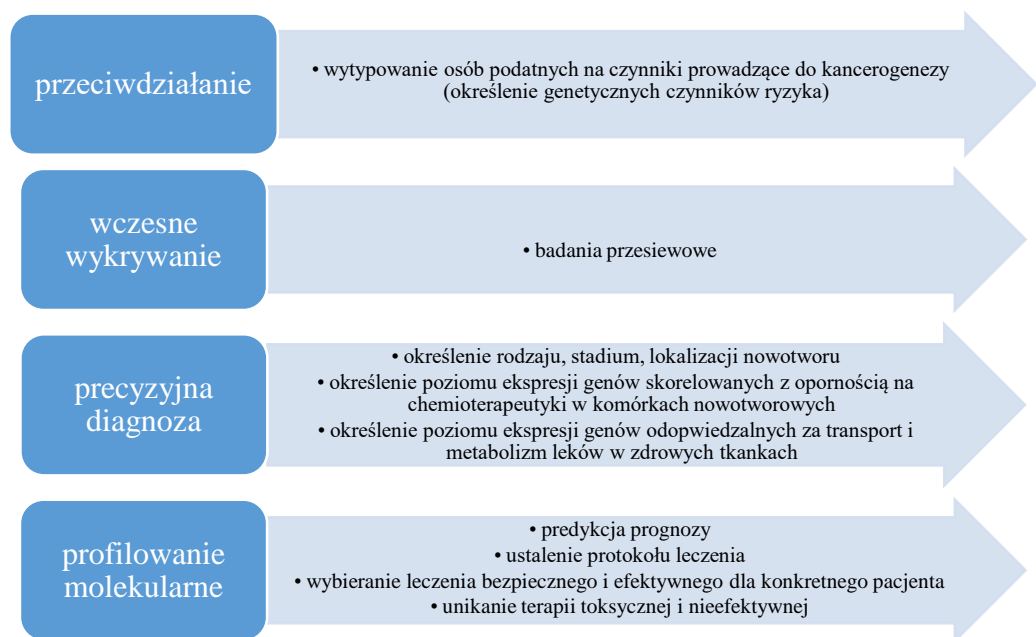
Kluczową rolę w mechanizmie oporności lekowej biorą udział geny uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego i naprawie DNA. Chemioterapeutyki mogą uszkadzać DNA bezpośrednio (leki bazujące na platynie) lub pośrednio (inhibitory topoizomerazy, tj. antracykliny) [94]. Na skutek uszkodzenia DNA, komórka może uruchomić mechanizmy naprawy lub przejść na drogę apoptozy. Dlatego też zdolność komórek nowotworowych do procesów naprawczych ma zasadniczy wpływ na skuteczność leków uszkadzających DNA. Mutacje *p53* są związane nie tylko z zaburzeniami cyklu komórkowego, ale również z opornością na leki [62]. Deregulacja szlaku odpowiedzi na uszkodzenie i naprawy DNA może zwiększać ryzyko nowych mutacji z powodu niestabilności genomowej, której nagromadzenie może zainicjować nowy proces nowotworowy [94].

Komórki nowotworowe mogą uzyskać właściwości komórek macierzystych, co odpowiada za ucieczkę od starzenia się i nawrotu nowotworu. Starzenie się może być wywołane przez nadmierną sygnalizację mitogenną, skracanie telomerów i nietelomerowe uszkodzenia DNA spowodowane przez leki. Dokсорubicyna i cisplatyna, poprzez indukowanie śmierci komórki zaburzając szlaki działania p53 i p16, mogą inicjować starzenie się [82].

W zjawisku oporności pośredniczyć mogą również czynniki wpływające na indukcję transkrypcji genów w komórkach nowotworowych odpowiadających za wydzielanie cytokin, chemokin oraz czynników wzrostu. Jednym z mediatorów oporności jest interleukina 6 (IL-6). Ponadto, istotne są również integriny uczestniczące w adhezji komórkowej oraz zaburzenia równowagi degradacji białek apoptotycznych i wzmocnienie syntezy białek antyapoptotycznych [95]. Ponadto zmiany epigenetyczne (metylacja DNA, modyfikacja histonów, przebudowa chromatyny, niekodujące zmiany związane z RNA) również wpływają na rozwój mechanizmów oporności, w tym zwiększonego wpływu leku, ulepszonej naprawy DNA i upośledzonej apoptozy [96]. Co więcej, mikro RNA regulują oporność na leki poprzez regulację apoptozy i autofagii, kontrolowanie metabolizmu leków przeciwnowotworowych, modulowanie celów leków i naprawę DNA [96, 97].

Przy opisywaniu zjawiska lekooporności można wyróżnić dwa modele: komórki macierzyste nowotworu (*cancer stem cells*, CSC) oraz komórki, które nabywają lekooporność na skutek oddziaływania ze środowiskiem (*environment-mediated drug resistance*, EMDR). Żaden z tych modeli się nie wyklucza, mogą współwystępować [98]. W modelu CSC populacje komórek macierzystych raka inicjują rozwój nowotworu. Uważa się, że komórki CSC mają rozregulowane mechanizmy samoodnawiania, co odróżnia je od tkankowych komórek macierzystych. Ponadto CSC charakteryzują się zwiększoną wydajnością mechanizmów naprawy DNA, zmianami cyklu komórkowego, nadekspresją białek antyapoptotycznych i transporterów leków [99]. Z kolei w modelu EMDR oporność na leki wynikać może z interakcji komórek z otaczającym je mikrośrodowiskiem [100]. Komórki mogą wejść w stan spoczynku lub uśpienia jako sposób na uniknięcie skutków podanej terapii. Ten etap daje komórkom czas na dostosowanie genotypu i fenotypu pozwalającego nabyć oporność. Zarówno odporne komórki CSC i EMDR mogą być przyczyną choroby resztkowej i w konsekwencji nawrotu białaczki [101].

Spersonalizowana terapia przeciwnowotworowa może pomóc w przełamaniu oporności na leki. Znajdowanie nowych markerów oporności i wykorzystywanie ich we wczesnej diagnostyce jest kluczowe. Podczas diagnozy nie tylko niezbędne jest określenie typu nowotworu, stopnia zaawansowania choroby, ale również możliwości prognozowania. Wszystkie te czynniki są konieczne w dopasowaniu bezpiecznej i efektywnej chemioterapii dla pacjenta (Rycina 11) [82, 102]. Niestety terapia celowana może rozwinąć problem oporności. Zmiana celów leku może być wtórną mutacją w białku docelowym lub zmianami poziomów ekspresji z powodu zmian epigenetycznych.



Rycina 11. Spersonalizowane działania terapeutyczne przeciwdziałające oporności lekowej podczas leczenia przeciwnowotworowego [102, 103].

1.8. Technika mikromacierzy

Technika mikromacierzowa jest jednym z narzędzi w nowoczesnej diagnostyce genetycznej. Wyróżnia się m.in. mikromacierze cytogenetyczne oraz ekspresyjne. Mikromacierz ma kształt szklanej płytki z przyłączonymi oligonukleotydowymi fragmentami DNA (sondami), do których mogą specyficznie wiązać się cząsteczki DNA z badanej próby [104].

Mikromacierze porównawczej hybrydyzacji genomowej (*array-based comparative genomic hybridization*, aCGH) umożliwiają wykrycie miejscowych aberracji chromosomowych (delecji, duplikacji), analizę zmienności liczby kopii genów (*copy number variantion*, CNV) oraz detekcję nieprawidłowości w kariokinezie i cytokinezie [105]. Opracowane po raz pierwszy w celu wykrycia zmian liczby kopii w guzach litych,

CGH wykorzystują dwa genomy, badany i kontrolny, które są różnicowo wyznakowane i konkurencyjnie hybrydują z sondami na płycie [105, 106]. Intensywność sygnału fluorescencyjnego znakowanego DNA testowego w stosunku do referencyjnego DNA można następnie liniowo nanieść na każdy chromosom, umożliwiając identyfikację zmian liczby kopii [107]. Analiza aCGH składa się z kilku etapów. Najpierw DNA ekstrahuje się z próbki badanej (np. krwi, skóry). Badany DNA jest znakowany barwnikiem fluorescencyjnym (cyjaniną 3 - zielona lub cyjaniną 5 - czerwona), podczas gdy DNA z próbki kontrolnej (referencyjnej) jest znakowany barwnikiem o innym kolorze [108]. Te dwa genomowe DNA, badane i kontrolne, są następnie mieszane razem i nakładane na mikromacierz. Ponieważ DNA zostało zdenaturowane, w mieszaninie występuje jako pojedyncze nici. Dlatego też po nałożeniu na szkiełko, hybrydują one z sondami na macierzy. Następnie, stosuje się cyfrowe systemy obrazowania do wychwytywania i ilościowego określania względnych intensywności fluorescencji znakowanych sond DNA [109]. Współczynnik fluorescencji sygnałów hybrydyzacji próby badanej i kontrolnej określa się w różnych pozycjach wzdłuż genomu i dostarcza informacji o względnej liczbie kopii sekwencji w genomie badanym w porównaniu do referencyjnego genomu [105]. Zaletami aCGH jest praca z DNA, który jest stabilniejszym materiałem niż RNA, duża rozdzielczość, a także szybki protokół testu. Ponadto można jednocześnie badać wiele sekwencji DNA i kilka prób podczas jednego eksperymentu, co sprawia, że badanie to jest wydajne również pod względem ekonomicznym. Wadą aCGH jest fakt, że niemożliwe jest wykrycie zrównoważonych translokacji oraz disomii jednorodzielskiej (*uniparental disomy*, UPD) [106]. Ponadto chromosomalna rozdzielczość CGH jest ograniczona do 10-20 Mb. Macierze CGH zwiększyły zdolność wykrywania segmentowych genomowych CNV u pacjentów z globalnym opóźnieniem rozwojowym, upośledzeniem umysłowym, autyzmem, z wrodzonymi anomaliami i dysmorfiami. Macierze genomowe są przydatnym narzędziem w odkrywaniu genów związanych z chorobami i diagnostyce prenatalnej [110].

Mikromacierz ekspresyjna to szklana płytka z naniesionymi fragmentami kwasów nukleinowych (sond), do których specyficznie wiążą się cząsteczki DNA. Mikromacierze ekspresyjne wykorzystuje się w profilowaniu ekspresji genów (*gene expression profiling*, GEP) [111]. Umożliwiają monitorowanie jakościowych i ilościowych zmian ekspresji genów na poziomie całego transkryptomu, co pozwala utworzyć globalny obraz zmian zachodzących w komórce [112]. Głównym ograniczeniem GEP, jest fakt, że zmiana poziomu ekspresji genów nie odpowiada bezpośrednio ilości białek przez nie kodujących.

W analizie GEP szczególnie ważna jest precyzyjna analiza statystyczna wyników [110]. Profilowanie składa się z kilku etapów. Z komórek izoluje się mRNA, przeprowadza odwrotną transkrypcję, znakowanie barwnikiem fluorescencyjnym, łączenie transkryptu z sondą, a na koniec płukanie i skanowanie macierzy [113].

Technika mikromacierzowa znajduje szerokie zastosowanie w medycynie. Umożliwia m.in. diagnostykę chorób genetycznych i klasyfikację chorób nowotworowych. Może przyczynić się do identyfikacji charakterystycznego obrazu genomowego i transkryptomocznego wielu procesów biologicznych, w tym podłoża oporności na chemioterapeutyki (odróżnienie komórek opornych i wrażliwych) [110]. Mikromacierze są istotne także podczas opracowywania nowych leków oraz określania ich działania na przebieg choroby i stan pacjenta. Zastosowanie znajdują także podczas prognozowania stopnia ryzyka choroby oraz rokowań przy zachorowaniu. Można je wykorzystać również przy doborze indywidualnego protokołu leczenia dla pacjenta [106, 110].

1.9. Geny kandydackie

Geny kandydackie dają możliwość znalezienia związku między genem a chorobą, np. białaczką, która ma podłoże w zaburzeniach na wielu poziomach hierarchii komórkowej. Są one wybierane do szczegółowych badań w oparciu o wcześniejszą wiedzę o powiązaniach z etiologią i rozwojem choroby [114]. Metody typowania markerów można określić jako identyfikację zmian genomowych i transkryptomocnych w docelowych genach lub w ich pobliżu, które mogą mieć istotny wpływ na ekspresję białek kodujących lub genów. Zasadne jest genotypowanie wariantów w populacji w celu określenia, które warianty są najbardziej powszechne w określonej grupie. Statystycznie określa się korelację pomiędzy wariantami genomowymi a fenotypem [115].

Wskazanie determinantów chorób jest niezbędne w badaniach ich związku z chorobami, wyborze biomarkerów i przewidywania farmakokinetyki leków [116]. Funkcjonalne geny kandydackie kodują białko związane z konkretną chorobą. Polimorfizmy mogą zmieniać ich ekspresję, sekwencję białka lub prowadzić do syntezy nieaktywnego białka. Z kolei pozycyjne geny kandydackie mają swoje *loci* na chromosomie w miejscu o prawdopodobnym związku z chorobą [115].

Niepodważalnymi zaletami identyfikacji biomarkerów przyczyniających się do niewrażliwości na chemioterapię są niskie koszty prostych do przeprowadzenia eksperymentów z krótkim protokołem reakcji [115]. Niestety należy mieć na uwadze

także, że niemożliwe jest jednoczesne zbadanie wszystkich prawdopodobnych genów i ich wariantów. Niewystarczająca wiedza na temat konkretnego szlaku biologicznego również może być przeszkodą w zaplanowaniu eksperymentu, przez co uzyskane wyniki mogą nie spełniać oczekiwań badacza [117].

W wyborze genu kandydackiego najczęściej stosowane techniki to mikromacierze ekspresyjne, porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH) oraz sekwencjonowanie następnej generacji (*next-generation sequencing*, NGS) [118, 119]. Ponadto, PCR w czasie rzeczywistym (*Real-Time PCR*, qPCR) oraz hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) są stosowane w celu sprawdzenia, czy wybrany gen został prawidłowo oznaczony [115, 120].

W ciągu ostatnich kilku lat postępy w technikach biologii molekularnej zrewolucjonizowały podejście do biologii ALL i AML. Jednak bezpośrednie zastosowanie odkryć naukowych w praktyce klinicznej nadal pozostaje poważną barierą.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było określenie genomicznych i transkryptomicznych determinantów oporności na wybrane leki antracyklinowe (daunorubicynę, doksorubicynę, idarubicynę, mitoksantron) w kontekście badań mikromacierzowych wśród pediatrycznych pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Pacjenci

W badaniach uczestniczyli pacjenci zdiagnozowani w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Badania składały się z dwóch etapów. W pierwszym z nich przeprowadzono doświadczenia na mikromacierzach CGH dla 46 pacjentów, wśród których stwierdzono 35 przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej oraz 11 ostrej białaczki mieloblastycznej (Tabela 7). Rozkład pacjentów względem płci obejmował 23 dziewczynki i 23 chłopców. Średni wiek pacjenta wynosił 8 lat (w przedziale wiekowym 8 miesięcy – 20 lat). W drugim etapie przeprowadzono eksperymenty na mikromacierzach ekspresyjnych dla 55 pacjentów (26 dziewczynek i 29 chłopców) w wieku 2-19 lat (średnia wieku 9 lat) (Tabela 7). W tej grupie odnotowano 47 przypadków ALL i 8 AML. Walidacji wyników mikromacierzowych dokonywano metodą qPCR u 155 pacjentów pediatrycznych. Wśród nich zdiagnozowano ALL u 121 osób, a AML u 34 (Tabela 7). Rozkład pacjentów względem płci obejmował 75 dziewczynek i 80 chłopców. Średni wiek pacjenta wynosił 8,5 roku (w przedziale wiekowym 2 miesiące – 20 lat). Od pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką limfoblastyczną lub mieloblastyczną pobrano szpik kostny, z którego izolowano komórki monojądrzaste. Zgodę na badania wydała Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum w Bydgoszczy (KB/384/2006, KB 380/2012).

Tabela 7. Charakterystyka kliniczna pacjentów uczestniczących w poszczególnych etapach badań.

		Etap badania		
		Analiza cytogenetyczna	Analiza ekspresji genów	Walidacja wyników
		Liczebność		
Diagnoza	ALL	15	8	26
	B-ALL	0	0	5
	BCP-ALL	0	0	2
	Common ALL	10	20	36
	pre-B-ALL	3	0	11
	pre-pre-B-ALL	1	0	0
	pre-T-ALL	0	0	1
	pro-ALL	1	0	0
	pro-B-ALL	1	11	7
	T-ALL	2	8	16
	AML	10	0	28
	AML wrodzona	0	0	1
	wznowa ALL	0	2	2
	wznowa Common ALL	0	5	12
	wznowa pre-pre-B-ALL	2	0	0
	wznowa T-ALL	0	1	3
	wznowa AML	1	0	5
Płeć pacjenta	chłopiec	23	29	80
	dziewczynka	23	26	75
Wiek pacjenta (lata)	0-4	17	11	52
	5-9	14	25	39
	9-14	11	8	34
	15-20	4	11	30
Profil oporności na idarubicynę	wrażliwy ($\leq 0,43 \mu\text{g/ml}$)	8	37	91
	oporny ($\geq 0,95 \mu\text{g/ml}$)	38	15	47
Profil oporności na daunorubicynę	wrażliwy ($\leq 0,08 \mu\text{g/ml}$)	7	18	57
	oporny ($\geq 0,23 \mu\text{g/ml}$)	39	34	93
Profil oporności na doksorubicynę	wrażliwy ($\leq 0,04 \mu\text{g/ml}$)	8	15	40
	oporny ($\geq 0,09 \mu\text{g/ml}$)	38	35	100
Profil oporności na mitoksantron	wrażliwy ($\leq 0,02 \mu\text{g/ml}$)	8	42	108
	oporny ($\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$)	38	9	31

3.2. Izolacja i liza komórek monojądrzastych szpiku kostnego

Odczynniki:

- heparyna;
- 1,077 g/ml Gradisol L;
- bufor RLT (Qiagen);
- medium hodowlane RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemie) z dodatkiem 20% cielęcej surowicy płodowej (GIBCO BRL), 2 mM L-glutaminy, 200 µg/ml gentamycyny, 100 µg/ml streptomycyny, 100 IU/ml penicyliny, 5 µg/ml insuliny, 0,125 µg/ml amfoterycyny, 5 µg/ml transferyny i 5 ng/ml selenianu sodowego (ITS media suplement, Sigma-Aldrich Chemie);
- 14,3 M β-merkaptioetanol (Sigma-Aldrich Chemie).

Aparatura:

- wirówka 5804R Concentrator plus (Eppendorf).

Wykonanie:

Około 15-20 U/ml szpiku kostnego pobierano do probówek z heparyną. Metodą wirowania w gradiencie gęstości (1,077 g/ml; Gradisol L) izolowano limfoblasty. Pozyskany osad komórek 2-krotnie przepłukiwano w medium hodowlanym. W celu usunięcia nadmiaru erytrocytów, próbę poddawano lizie w roztworze chlorku amonowego. Uzyskany preparat komórek zawieszano we wzbogaconym medium hodowlanym. Komórki wybarwiano metodą May-Grunwald-Giemsa i zliczano w kamerze. Otrzymane preparaty wykorzystywano w teście cytotoksyczności MTT. Komórki monojądrzaste były poddawane procesowi lizy w buforze RLT (10 µl β-merkaptioetanolu na 1 ml buforu RLT). Miało to na celu zabezpieczanie próbek przed zdegradowaniem oraz ułatwianie izolacji kwasu rybonukleinowego. Do lizy około 6 milionów komórek stosowano 350 µl mieszaniny buforu. Lizaty jak najszybciej zamrażano i przechowywano w temperaturze -80 °C.

Izolacja i liza komórek monojądrzastych szpiku kostnego były wykonywane w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii CM UMK w Bydgoszczy. Próby przewożono do Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w ciekłym azocie.

3.3. Test cytotoksyczności MTT

Odczynniki:

- bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu (MTT, Sigma);
- 1 N HCl;
- izopropanol (POCH);
- płytki mikrotitracyjne (Profilab).

Aparatura:

- czytnik ELISA z oprogramowaniem DigiWin (Asys Hitech).

Wykonanie:

Testy cytotoksyczności wykonywano w Pracowni Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii CM UMK, której kierownikiem jest prof. dr hab. Jan Styczyński. Na podstawie wyników testu MTT określano żywotność komórek, co pozwoliło na podział pacjentów (wrażliwi, oporni) uwzględniając oporność blastów na badane leki antracyklinowe. 4-dobowy test MTT jest kolorymetrycznym testem umożliwiającym ocenę aktywności metabolicznej komórek. Oksydoreuktazy NAD(P)H zdolne są do redukcji żółtego barwnika MTT bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego do nierozpuszczalnego formazanu o barwie fioletowej charakterystycznej dla żywych komórek. Intensywność barwy odczytywano w czytniku ELISA.

Na 96-dołkowe płytki mikrotitracyjne dodawano po 20 μ l roztworu badanych leków w odpowiednich stężeniach (Tabela 8) oraz 80 μ l zawiesiny komórkowej (1 – 2,5 mln komórek). Każde oznaczenie wykonywano 2 razy. Kontrolą pozytywną były komórki w medium bez leku. Mierzono również absorbancję używanych roztworów (medium bez komórek i bez leków). Płytki inkubowano przez 92 godziny w obecności CO₂.

Następnie do każdego dołka dodawano po 10 μ l roztworu MTT. Płytki ponownie inkubowano, tym razem przez 4 godziny. Powstałe kryształki błękitnego formazanu rozpuszczano w kwaśnym izopropanolu z dodatkiem 1 N HCl. Gęstość optyczną (*optical density*, OD) mierzono w czytniku ELISA. Odpowiada ona liniowo ilości żywych komórek. Pomiar odczytywano przy długości fali 550 nm i 720 nm (długość fali referencyjnej). Analizy dokonywano w programie DigiWin. Skorygowana wartość OD w każdym teście wynosiła poniżej 0,05.

Ilość żywych komórek (*leukemic cell survival*, LCS) dla konkretnego stężenia analizowanego leku obliczano na podstawie równania [121]:

$$LCS = \frac{OD \text{ badanego stężenia cytostatyku} - OD \text{ płynów}}{\text{średnie } OD \text{ dołków kontrolnych} - OD \text{ płynów}} \times 100\%$$

Parametr LC50 (*lethal concentration to 50% cells*) określa stężenie leku, w którym apoptozie ulegało 50% badanych komórek. LC50 jest miarą oporności na analizowany cytostatyk. Obliczano go według wzoru [121]:

$$LC50 = [(\% \text{ LCS powyżej } 50 \%) - 50] / [(\% \text{ LCS powyżej } 50 \%) - (\% \text{ LCS poniżej } 50 \%)] \times [\text{stężenie leku poniżej } 50 \% \text{ LCS} - \text{stężenie leku powyżej } 50 \% \text{ LCS}] + [\text{stężenie leku powyżej } 50 \% \text{ LCS}]$$

W oparciu o graniczne stężenia badanych leków, do celów dalszej analizy, wynikom przypisywano wartości 1 (komórki wrażliwe na lek), 2 (komórki o pośredniej wrażliwości) lub 3 (komórki odporne na lek). Testy przeprowadzano na antracyklinach stosowanych w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej i mieloblastycznej (Tabela 8)

Tabela 8. Wartości graniczne stężeń antracyklin, na podstawie których przypisywano pacjentów do poszczególnych profili oporności.

Lek	Producent	Profil wrażliwy [µg/ml] (percentyl 0.-33.)	Profil pośredni [µg/ml] (percentyl 33.-67.)	Profil odporny [µg/ml] (percentyl 67.-100.)	Zakres analizowanych stężeń [µg/ml]
doksorubicyna	Farmitalia, Milan	≤0,43	0,43–0,95	≥0,95	0,0078 – 8
daunorubicyna	Rhône-Poulenc Rhorer, Paris	≤0,08	0,08–0,23	≥0,23	0,0019 – 2
idarubicyna	Farmitalia, Milan	≤0,04	0,04–0,09	≥0,09	0,0019 – 2
mitoksantron	Jelfa, Jelenia Góra	≤0,02	0,02–0,05	≥0,05	0,001 – 1

3.4. Profilowanie genomowe

3.4.1. Izolacja gDNA

Odczynniki:

- lizat komórek monojądrzastych szpiku;
- odczynniki zestawu do izolacji gDNA Blood/Cell Mini Kit (Syngen):
 - o bufor lizujący DLK;
 - o bufor płuczający DP1;
 - o bufor płuczający DP2;
 - o bufor elucyjny DE;
 - o kolumnienki DK;
- 96% etanol (POCH);
- 0,9% roztwór chlorku sodowego buforowany PBS o pH 7.0 (Aqua-med);
- RNaza A o stężeniu 100 mg/ml (Qiagen).

Aparatura:

- termoblok ThermoMixer comfort (Eppendorf);
- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf).

Wykonanie:

Do 1,5 ml próbówki typu Eppendorf dodawano 100 μ l lizatu komórkowego zawierającego białaczkowe, 100 μ l buforu PBS oraz 4 μ l roztworu RNazy. Po mieszanii zawartości próbówki, mieszaninę inkubowano 2 minuty w pokojowej temperaturze. Po tym czasie do próby dodawano 200 μ l buforu DLK. Próbkę inkubowano 10 minut w temperaturze 60 °C intensywnie wytrząsając. Następnie dodawano 200 μ l etanolu 96% i mieszano przez 30 sekund w celu wytrącenia gDNA.

Zawartość próbówki przenoszono na kolumnienkę wiążącą umieszczoną w próbówce i wirowano 1 minutę przy maksymalnej prędkości. Następnie odrzucano przesącz a kolumnienkę przenoszono do nowej próbówki. Na kolumnienkę nanoszono 500 μ l buforu płuczającego DP1, wirowano 1 minutę przy maksymalnej prędkości. Przesącz odrzucano i na kolumnienkę nanoszono 750 μ l buforu płuczającego DP2, wirowano przez 1 minutę przy maksymalnej prędkości. Przesącz odrzucano, a kolumnienkę wirowano 3 minuty przy maksymalnej prędkości. Etap ten pozwalał osuszać membranę kolumnienki i usuwać pozostałości buforów. Następnie kolumnienki przenoszono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf i nanoszono na nie 150 μ l buforu elucyjnego DE. Próby inkubowano 3 minuty

w pokojowej temperaturze i wirowano 2 minuty przy maksymalnej prędkości również w pokojowej temperaturze. W uzyskiwanym przesączu znajdowało się genomowe DNA, które przechowywane było w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. W kolejnym etapie materiał poddawano analizie fluorometrycznej oraz spektrofotometrycznej.

3.4.2. Pomiar spektrofotometryczny genomowego DNA

Odczynniki:

- wyizolowane gDNA;
- bufor DE (Syngen).

Aparatura:

- NanoDrop ND-1000 z oprogramowaniem (Thermo Scientific).

Wykonanie:

Aparat NanoDrop ND-1000 kalibrowano nakładając $1\text{ }\mu\text{l}$ buforu DE na końcówkę pomiarową. Objętość badanego gDNA to $1\text{ }\mu\text{l}$. Absorbancję mierzono dla długości fal A230, A260 oraz A280 nm. Wymagany zakres dla wartości określających jakość, czystość oraz stężenie gDNA w badanych próbach był następujący: $A260/A280\text{ nm} = 1,7-1,9$ oraz $A260/A230\text{ nm} = 1,8-2,2$. Kwasy nukleinowe absorbują maksymalnie przy 260 nm. Białka z kolei absorbują najlepiej przy 280 nm, a związki organiczne i sole maksymalnie przy 230 nm.

3.4.3. Pomiar fluorometryczny genomowego DNA

Odczynniki:

- wyizolowane gDNA;
- Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen):
 - Qubit™ Reagent;
 - Qubit™ Buffer;
 - standardy dsDNA ($0\text{ ng}/\mu\text{l}$; $100\text{ ng}/\mu\text{l}$);
 - bufor DE.

Aparatura:

- fluorometr Qubit® 2.0 (Invitrogen);
- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries).

Wykonanie:

W pierwszym etapie przygotowano roztwór roboczy Qubit™ Working Solution, który dla każdej badanej próby składał się z 199 µl buforu Qubit™ Buffer oraz 1 µl odczynnika Qubit™ Reagent. Do przygotowywania dwóch standardów używano po 190 µl roztworu roboczego Qubit™ Working Solution i po 10 µl odpowiednich standardów dsDNA. Probówka z mieszaniną do pomiaru zawierała 198 µl roztworu roboczego Qubit™ Working Solution oraz 2 µl badanego gDNA. Po 3 sekundach mieszania, próbę inkubowano 2 minuty w pokojowej temperaturze. Najpierw wyznaczano krzywą stężeń dla standardów. W tym celu, po kolei wkładano próbówki ze standardami do komory fluorometru Qubit® 2.0 i wykonywano odczyt. Następnie badane próbówki pojedynczo wkładano do komory i odczytywano fluorescencję dla dwuniciowego genomowego DNA.

3.4.4. Rozdział elektroforetyczny genomowego DNA

Odczynniki:

- wyizolowane gDNA;
- agaroz (Prona);
- woda destylowana;
- 5% TBE (Tris-HCl, H₃BO₃, 0,5 mM EDTA) (AppliChem);
- SybrGreen I (Thermo Scientific);
- obciążnik (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% niebieski bromofenol, 0,03% ksylenocjanol, 60% glicerol, 60 mM EDTA) (Thermo Scientific).

Aparatura:

- aparat do elektroforezy (Bio Rad);
- transiluminator UV (UVP).

Wykonanie:

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano na 1% żelu agarozowym. Do jego przygotowywania w 250 ml kolbie używano 1 g agarozy, 80 ml wody destylowanej i 20 ml 5% buforu TBE. Mieszaninę podgrzewano przez około 2 minuty do momentu rozpuszczenia się agarozy i wylewano do wcześniej przygotowywanych saneczek z grzebieniami. Po około 30 minutach żel się ochładzał i polimeryzował. Po wyciągnięciu grzebienia, żel na saneczkach umieszczano w aparacie do elektroforezy wypełnionego 0,5 % buforem TBE. Do 10 µl gDNA badanej próby dodawano 3 µl obciążnika. Z tak

przygotowanej mieszaniny nanoszono 10 μ l na żel. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano około 30 minut przy stałym napięciu 130 V. Dokumentację w postaci zdjęcia żelu wykonywano z użyciem transiluminatora UV. Na podstawie zdjęcia oceniano ilość i jakość wyizolowanego materiału genomowego DNA. Prążek na żelu powinien być wyraźny na określonej wysokości.

3.4.5. Eksperyment mikromacierzowy CGH

W celu analizy rearanzacji genomowych oraz wrażliwości na wybrane antracykliny (doksorubicynę, daunorubicynę, idarubicynę, mitoksantron) u pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowaną ostrą limfoblastyczną lub mieloblastyczną białaczką przeprowadzono doświadczenia z użyciem mikromacierzowej porównawczej hybrydyzacji genomowej.

3.4.5.1. Restrykcyjna fragmentacja genomowego DNA

Odczynniki:

- matryca:
 - o wyizolowane gDNA;
 - o gDNA referencyjne żeńskie i męskie Human Reference DNA Female or Male (200 ng/ μ l) (Agilent);
- odczynniki SureTag DNA Complete Labeling Kit (Agilent):
 - o 10x stężony bufor dla enzymów restrykcyjnych (Restriction Enzyme Buffer);
 - o albumina surowicy wołowej BSA (10 mg/ μ l) (Promega);
 - o enzym restrykcyjny Alu I (10 U/ μ l);
 - o enzym restrykcyjny Rsa I (10 U/ μ l);
- woda wolna od aktywności nukleazowej (Invitrogen).

Aparatura:

- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- termocykler C1000 TouchTM (Bio Rad).

Wykonanie:

W eksperymencie używano po 0,2 μ g gDNA prób badanych. Objętość końcowa prób badanych nie mogła przekroczyć 10,1 μ l. Stężenie wyjściowe obliczano wcześniej na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego. DNA referencyjne żeńskie (F) oraz męskie (M) przygotowywano poprzez dodawanie do probówek po 1 μ l referencyjnego DNA i

9,1 µl wody wolnej od aktywności nukleazowej. W skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbę wchodziły:

- 10x bufor dla enzymów restrykcyjnych 1,3 µl;
- BSA 0,1 µl;
- Alu I 0,25 µl;
- Rsa I 0,25 µl;
- woda wolna od aktywności nukleazowej 1,0 µl.

Do każdej z prób dodawano po 2,9 µl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej. Zawartość probówek mieszano i wirowano. Próby inkubowano w termocyklerze zgodnie z poniższym programem termicznym:

- trawienie restrykcyjne w 37 °C przez 2 h;
- inaktywacja enzymów w 65 °C przez 20 min.;
- hamowanie reakcji w 4 °C (czas nieograniczony).

3.4.5.2. Fluorescencyjne znakowanie genomowego DNA

Odczynniki:

- pofragmentowane genomowe DNA;
- odczynniki SureTag DNA Complete Labeling Kit (Agilent):
 - o losowe startery (Agilent);
 - o 5x stężony bufor reakcyjny;
 - o trifosforany nukleotydów 10x stężony dNTPs;
 - o cyjanina 3-dUTP;
 - o cyjanina 5-dUTP;
 - o polimeraza Exo(-) Klenow.

Aparatura:

- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- termocykler C1000 Touch™ (Bio Rad).

Wykonanie:

Mieszaninę z pofragmentowanym gDNA poddawano 1 minutowemu wirowaniu przy prędkości 6000 x g. Następnie do każdej z prób dodawano po 2,5 µl losowych starterów. Mieszaninę delikatnie mieszano i inkubowano 3 minuty w 95 °C. Reakcja była zatrzymywana poprzez obniżenie temperatury inkubacji do 4 °C. Do każdej próby dodawano po 9,5 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład był następujący:

- matryca 15,5 μ l;
- 5x bufor reakcyjny 5,0 μ l;
- 10x dNTPs 2,5 μ l;
- cyjanina 3-dUTP (DNA referencyjne)
lub cyjanina 5-dUTP (DNA badane) 1,5 μ l;
- polimeraza Exo(-) Klenow 0,5 μ l.

Próby inkubowano zgodnie z poniższym programem termicznym:

- denaturacja w 95 °C przez 3 min.;
- hamowanie reakcji - dodanie odczynników w 4 °C (czas nieograniczony);
- inkubacja w 37 °C przez 2 h;
- inkubacja w 65 °C przez 10 min.;
- hamowanie reakcji w 4 °C (czas nieograniczony).

3.4.5.3. Oczyszczanie wyznakowanego genomowego DNA

Odczynniki:

- 1x TE (pH 8,0) (Promega).

Aparatura:

- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- kolumnienki z zestawu SureTag DNA Labeling Kit (Agilent);
- wirówka 5804R Concentrator plus (Eppendorf).

Wykonanie:

Po etapie fluorescencyjnego znakowania genomowego DNA, próby wirowano przez 1 minutę przy prędkości 6000 x g. Do prób dodawano po 430 μ l buforu TE. Mieszaninę nanoszono na kolumnienki do oczyszczania umieszczane w 2 ml probówkach. Próby wirowano 10 minut przy prędkości 14000 x g w pokojowej temperaturze. Przesącz odrzucano. Następnie na kolumnienkę nakładano 480 μ l buforu TE. Próby wirowano 1 minutę przy prędkości 1000 x g w temperaturze pokojowej. Uzyskiwany przesącz o objętości około 30 μ l, osuszano w systemie próżniowym przez około 20-25 minut. Suchy osad rozpuszczano w 9,5 μ l buforu TE. Inkubacja prób na lodzie trwała 5 minut. Do pomiaru ilości i jakości genomowego DNA z każdej próby pobierano po 1,5 μ l.

3.4.5.4. Obliczanie stopnia wyznakowania, specyficznej aktywności oraz ilości oczyszczonego genomowego DNA

Pomiaru stężenia oczyszczonego i wyznakowanego fluorescencyjnie genomowego DNA dokonywano metodą spektrofotometryczną przy użyciu aparatu NanoDrop. Aparat kalibrowano 1 μl buforu DE. Absorbancję mierzono przy długości fal A260 nm (DNA), A550 nm (cyjanina 5) oraz A650 nm (cyjanina 3). Otrzymane wartości wykorzystywano do obliczeń następujących parametrów stosując poniższe wzory:

$$\text{- stopień wyznakowania gDNA} = \frac{340 \times \frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \text{ cyjaniny}}{\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \text{ gDNA} \times 1000} \times 100\% ;$$

$$\text{- specyficzna aktywność wyznakowanego gDNA} = \frac{\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \text{ cyjaniny}}{\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \text{ gDNA}} ;$$

$$\text{- ilość oczyszczonego gDNA} = \frac{\text{stężenie DNA} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times \text{objętość próby} (\mu\text{l})}{1000 \frac{\text{ng}}{\mu\text{g}}} .$$

3.4.5.5. Hybrydyzacja

Odczynniki:

- ludzkie Cot-1 DNA (1,0 mg/ml) (Agilent);
- 10x stężony aCGH Blocking Agent (Agilent);
- 2x stężony bufor hybrydyzacyjny HI-RPM Hybrydyzation Buffer (Agilent);
- woda wolna od aktywności nukleazowej (Invitrogen).

Aparatura:

- macierz CGH SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8x60K (Agilent);
- termocykler C1000 Touch™ (Bio Rad);
- piec hybrydyzacyjny (Shellab).

Wykonanie:

W eksperymencie mikromacierzowym używano macierz CGH SurePrint G3 Human CGH służącą do badania genomu człowieka. Macierze oligonukleotydowe składały się z sond 60-merowych zaprojektowanych na podstawie sekwencji ludzkiego genomu h18.

W skład mieszaniny hybrydyzacyjnej wchodziło 8 μl referencyjnego DNA zależnie od płci pacjentów oraz 8 μl DNA badanego. Godzinę przed rozpoczęciem procedury hybrydyzacyjnej przygotowywano czynnik blokujący dodając 1350 μl wody wolnej

od aktywności nukleazowej do liofilizowanego 10x stężonego odczynnika aCGH Blocking Agent i inkubowano go 60 minut w temperaturze pokojowej. Przed użyciem mieszano go i wirowano. Do przygotowywania mieszaniny reakcyjnej używano:

- Cot-1 DNA 2 µl;
- 10x aCGH Blocking Agent 4,5 µl;
- 2x HI-RPM Hybrydyzation Buffer 22,5 µl.

Do każdej z prób dodawano po 29 µl mieszaniny reakcyjnej. Próby poddawano 3 minutowej inkubacji w temperaturze 95 °C. Następnie pobierano po 40 µl gDNA każdej z prób i przenoszono na osobne miejsce na uszczelce macierzy CGH. Uszczelkę przykrywano szkiełkiem mikromacierzy i umieszczano w komorze hybrydyzacyjnej. Właściwy proces hybrydyzacji przebiegał po umieszczeniu komory hybrydyzacyjnej w piecu hybrydyzacyjnym na 24 godziny w temperaturze 65 °C przy stałych obrotach 20 rpm.

3.4.5.6. Płukanie mikromacierzy

Odczynniki:

- zestaw Oligo aCGH Wash Buffer Kit:
 - o bufor płuczący Oligo aCGH Wash Buffer 1;
 - o bufor płuczący Oligo aCGH Wash Buffer 2.

Aparatura:

- mieszadło magnetyczne C-MAG HS7 (IKA);
- naczynka do płukania mikromacierzy.

Wykonanie:

Po okresie hybrydyzacji mikromacierz została zdemontowana oraz wypłukana zgodnie z poniższym opisem:

- naczynie 1 – demontaż w buforze Oligo aCGH Wash Buffer 1 w temperaturze pokojowej;
- naczynie 2 – płukanie w buforze Oligo aCGH Wash Buffer 1 w temperaturze pokojowej przez 5 minut;
- naczynie 3 – płukanie w buforze Oligo aCGH Wash Buffer 2 w temperaturze 37 °C przez 1 minutę.

Bufory w naczyniach cały czas mieszano na mieszadle magnetycznym.

3.4.5.7. Skanowanie mikromacierzy

Aparatura:

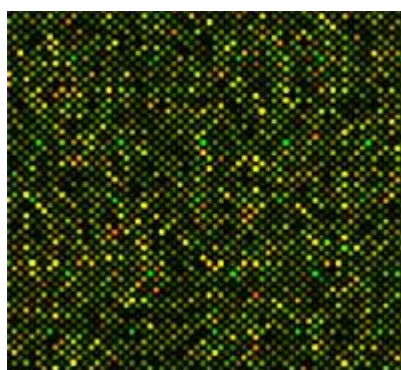
- laserowy skaner (SureScan Microarray Scanner) z oprogramowaniem Microarray Scan Control Software (Agilent);
- macierz CGH SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8x60K (Agilent);
- kasetka do skanowania mikromacierzy (Agilent).

Wykonanie:

Opłukaną macierz w kasetce umieszczano w skanerze SureScan Microarray Scanner. Macierz skanowano przy długości fali 532 nm (DNA referencyjne wyznakowane cyjaniną 3) oraz 640 nm (DNA badane wyznakowane cyjaniną 5). Do odczytu fluorescencji podczas skanowania używano protokołów AgilentG3 oraz rozdzielczość 3 μm .

3.4.5.8. Analiza obrazu macierzy po skanowaniu

Obrazy macierzy analizowano pod względem jakości biorąc pod uwagę intensywność sygnałów pochodzących z sond. Na Rycinie 12 przedstawiono przykładowy obraz mikromacierzy CGH.



Rycina 12. Obraz po skanowaniu macierzy CGH.

Surowe dane normalizowano w obrębie poszczególnych macierzy, a także między macierzami poszczególnych pacjentów. Analizowano intensywność sygnału sond referencyjnych dla genów podstawowego metabolizmu, a także sekwencji kontrolnych tzw. *spike in*.

3.4.5.9. Analiza zmian cytogenetycznych

Analizę zmian cytogenetycznych wykonywano z użyciem programu Agilent CGH-CytoGenomic Edition 2.9.2.0 oraz Agilent Feature Extraction Version 10.7. Badany materiał porównywano do ludzkiego genomu h19. Generowano raport cytogenetyczny, na podstawie którego uzyskano informacje o kluczowych rearanżacjach i genach

leżących w ich obrębie, a także o rozmiarze zmian wyrażanych w kb, miejscu startu-stopu (bp), prążku i typie mutacji (delecja/duplikacja). Adnotacje sugerowały jakie geny mają swoje *loci* w rearanżowanych fragmentach chromosomów. Wszystkie zmiany były istotne statystycznie (p -value < 0,05). Korzystano również z kilku specjalistycznych narzędzi bioinformatycznych i baz danych takich jak: UCSC Genome Browser [59] do wizualizacji i analizowania genomu z danymi, tj. identyfikacja genów i białek, ich ekspresja, interakcja i regulacja, oraz GeneCards [122] w celu pozyskania informacji o genomie, transkryptomie i ludzkich genach.

3.5. Profilowanie ekspresji genów

3.5.1. Izolacja całkowitego RNA

Odczynniki:

- lizat komórkowy;
- zestaw Blood/Cell RNA Mini Kit (Syngen):
 - o etanol (70 %);
 - o bufor płuczający RP1;
 - o bufor płuczający RP2;
 - o woda wolna od aktywności rybonukleaz;
- DNaza I (Qiagen).

Aparatura:

- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- kolumnienki klarujące KL i kolumnienki wiążące R (Syngen);
- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries).

Wykonanie:

W celu usunięcia stałych cząstek lizatu na kolumnienkę klarującą KL umieszczaną w 2 ml probówce nanoszono 100 μ l lizatu z komórek blastycznych. Próbę wirowano 2 minuty z maksymalną prędkością. Przesącz przenoszono do nowej 2 ml probówki i dodawano 800 μ l 70% etanolu. Po mieszaniu zawartość probówki nanoszono na kolumnienkę R umieszczaną w probówce do płukania. Wirowano przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Kolumnienkę R przenoszono do nowej probówki o pojemności 2 ml. Przesącz oraz starą probówkę odrzucano. Na centralną część kolumnienki R nanoszono 250 μ l buforu płuczającego RP1. Próbę wirowano przez 1 minutę z maksymalną prędkością. Przesącz odrzucano, natomiast probówkę pozostawiano. Na kolumnienkę R

nanoszono 100 μ l roztworu DNazy I, co miało na celu enzymatyczne usunięcie zanieczyszczeń w postaci DNA. Próbę inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie na kolumnkę R nanoszono 250 μ l buforu płuczącego RP1 i wirowano 1 minutę z maksymalną prędkością. Przesącz odrzucano. Na kolumnkę R nanoszono 700 μ l buforu płuczącego RP2 i wirowano 1 minutę z maksymalną prędkością. Przesącz odrzucano i zostawiano probówkę. Następnie ponownie na kolumnkę nanoszono 700 μ l buforu płuczącego RP2 i wirowano 1 minutę z maksymalną prędkością. Przesącz odrzucano. Probówkę poddawano 3 minutowemu wirowaniu z maksymalną prędkością, aby osuszyć membranę kolumnki i usunąć pozostałość buforów zawierających etanol. Kolumnkę przenoszono do próbki elucyjnej o objętości 1,5 ml. Na kolumnkę nanoszono 50 μ l wody wolnej od aktywności rybonukleaz. Probówki inkubowano 3 minuty w pokojowej temperaturze aż do wsiąknięcia wody w membranę. Probówki wirowano 2 minuty z maksymalną prędkością w pokojowej temperaturze. W przesączu otrzymywano całkowite RNA, które przechowywano w temperaturze -80 °C. W kolejnym etapie materiał poddawano analizie fluorometrycznej oraz spektrofotometrycznej.

3.5.2. Pomiar spektrofotometryczny RNA

Odczynniki:

- wyizolowane całkowite RNA,
- woda wolna od aktywności rybonukleaz (Invitrogen).

Aparatura:

- NanoDrop ND-1000 wraz z oprogramowaniem (Thermo Scientific).

Wykonanie:

Aparat NanoDrop ND-1000 kalibrowano nakładając 1 μ l wody wolnej od aktywności rybonukleaz na ramię pomiarowe. Objętość badanego całkowitego RNA to 1 μ l. Absorbancję mierzono dla długości fal A230, A260 oraz A280 nm. Wymagany zakres dla wartości określających jakość, czystość oraz stężenie RNA w badanych próbach był następujący: A_{260}/A_{280} nm = 1,9-2,1 oraz A_{260}/A_{230} nm = 1,8-2,2.

3.5.3. Pomiar fluorometryczny RNA

Odczynniki:

- wyizolowane całkowite RNA;
- Qubit® RNA BR Assay Kit (Invitrogen):

- Qubit™ Buffer;
- Qubit™ Reagent;
- standardy RNA (0 ng/μl i 100 ng/μl).

Aparatura:

- fluorometr Qubit® 2.0 (Invitrogen);
- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries).

Wykonanie:

W pierwszym etapie przygotowano roztwór roboczy Qubit™ Working Solution, który dla każdej badanej próby składał się z 199 μl buforu Qubit™ Buffer oraz 1 μl odczynnika Qubit™ Reagent. Do przygotowywania dwóch standardów w celu wyznaczenia krzywej standardowej używano po 190 μl roztworu roboczego Qubit™ Working Solution i po 10 μl odpowiednich standardów RNA. Probówka z mieszaniną do pomiaru zawierała 198 μl roztworu roboczego Qubit™ Working Solution oraz 2 μl badanego RNA. Po 3 sekundach mieszania, próby inkubowano 2 minuty w pokojowej temperaturze. Najpierw wyznaczano krzywą stężeń dla standardów. W tym celu, po kolei wkładano probówki ze standardami do komory fluorometru Qubit® 2.0 i wykonywano odczyt. Następnie badane probówki pojedynczo wkładano do komory i odczytywano fluorescencję dla RNA.

3.5.4. Bioanaliza całkowitego RNA

Odczynniki:

- wyizolowane całkowite RNA;
- RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent):
 - barwnik Nano Dye Concentrate;
 - marker wielkości Nano Ladder;
 - obciążnik Nano Marker;
 - żel do elektroforezy Nano Gel Matrix.

Aparatura:

- RNA Nano Chip (Agilent);
- wytrząsarka MS3 Vortexer (IKA);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- strzykawka (Agilent);

- bioanalyzer 2100 (Agilent) z oprogramowaniem 2100 Expert Software (Agilent).

Wykonanie:

Wszystkie odczynniki wyjmowano 30 minut przed użyciem, aby osiągnęły temperaturę pokojową. Barwnik chroniono przed światłem. W celu przefiltrowania żelu do elektroforezy nanoszono 550 μ l Nano Gel Matrix na kolumnę filtrującą i wirowano 10 minut przy prędkości 1500 x g w pokojowej temperaturze. Do 0,5 ml próbki wolnej od RNaz dodawano 65 μ l przefiltrowanego żelu i 1 μ l barwnika Nano Dye Concentrate. Probówkę mieszano i wirowano 10 minut przy prędkości 13000 x g. Badane próbki RNA oraz marker wielkości inkubowano w 70 °C przez 2 minuty w celu przeprowadzenia ich denaturacji.

Na umieszczony w stacji dozującej RNA Nano Chip nanoszono 9 μ l mieszaniny żelu i barwnika w miejsce oznaczone na chipie jako „G”. Strzykawkę ustawiano na poziomie 1 ml. Tłok naciskano jednostajnym ruchem, odczekiwano dokładnie 30 sekund, a następnie zwalniano tłok. Po 5 sekundach odciągano tłok do pozycji 1 ml. Na chipie znajdowały się 3 miejsca opisane jako „G” i z każdym z nich postępowano tak samo. Następnie napipetowywano po 5 μ l obciążnika Nano Marker do studzienek oznaczonych od 1 do 12 oraz nanoszono 1 μ l markera wielkości Nano Ladder w miejsce oznaczone symbolem drabiny. Do studzienek 1-12 nanoszono po 1 μ l badanego RNA. Chip umieszczano w wytrząsarce na 60 sekund i mieszano przy 2400 rpm. W ciągu 5 minut chip poddawano analizie w bioanalyzerze. Używano protokołu do analizy RNA. Na podstawie wyników oceniano stopień integralności RNA (*RNA integrity number*; RIN). Do eksperymentów mikromacierzowych wykorzystywano próby RNA o wartości RIN wyższym niż 7. Bioanaliza RNA wskazywała również pule 18S i 28S rRNA. Obecność dwóch pików na elektroforegramie świadczyła o wysokiej integralności materiału.

3.5.5. Doświadczenie z mikromacierzami ekspresyjnymi

W celu analizy poziomu ekspresji genów oraz wrażliwości na wybrane antracykliny (doksorubicynę, daunorubicynę, idarubicynę, mitoksantron) u pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowaną ostrą białaczką limfoblastyczną lub mieloblastyczną przeprowadzono doświadczenia z użyciem macierzy ekspresyjnych.

3.5.5.1. Synteza cDNA

Procedurę postępowania oparto na protokole syntezy cDNA w jednym cyklu korzystając z zestawu One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix).

3.5.5.1.1. Przygotowywanie kontroli poly-A

Odczynniki:

- całkowite RNA;
- Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix):
 - o Poly-A Control Dil Buffer;
 - o Poly-A Control Stock.

Wykonanie:

Pozytywną kontrolą odwrotnej transkrypcji były syntetyzowane *in vitro* poly-RNA (Poly-A Control Stock). Zawierała ona geny *Bacillus subtilis*: *dap* (kwas diaminopimelinowy), *lys* (lizyna), *phe* (fenyloalanina), *thr* (treonina). Zastosowanie różnych stężeń transkryptów pozwoliło na wewnętrzną kontrolę jakości znakowania.

Przygotowywano serię rozcieńczeń poszczególnych transkryptów: 1:20, 1:50, 1:100. Stężenia wyjściowe wynosiły odpowiednio: *dap* 114 nM, *lys* 7,6 nM, *phe* 15,2 nM, *thr* 30,4 nM. W pierwszym rozcieńczeniu do 38 μ l Poly-A Control Dil Buffer dodawano 2 μ l Poly-A Control Stock. Następnie 2 μ l uzyskanego rozcieńczenia dodawano do 98 μ l Poly-A Control Dil Buffer. Trzecie rozcieńczenie przygotowywano przez dodawanie 2 μ l mieszaniny drugiej serii do 18 μ l Poly-A Control Dil Buffer. Następnie przygotowywano próby z 5 μ g całkowitego RNA i dodawano do nich po 2 μ l mieszaniny z ostatniego rozcieńczenia. Kontrole oraz próby badane amplifikowano i znakowano jednocześnie. Ostateczne stężenia poszczególnych kontroli poly-A w próbach określano stosunkiem liczby kopii transkryptu w kontroli do całkowitej ilości mRNA w próbce badanej. Wartości te wynosiły dla *dap* 1:6667, *lys* 1: 100000, *phe* 1:50000 oraz *thr* 1:25000.

3.5.5.1.2. Synteza pierwszej nici cDNA

Odczynniki:

- całkowite RNA;
- First Strand Master Mix:
 - o 10 mM dNTP (Invitrogen);
 - o 0,1 M DTT;
 - o 5X 1st Strand Reaction Mix;
- SuperScript II:
 - o 50 μ M T7 Oligo(dT) Primer;
- woda wolna od aktywności rybonukleaz (Invitrogen);
- rozcieńczone kontrolne transkrypty poly-A RNA.

Aparatura:

- termocykler C1000 TouchTM (Bio Rad);
- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf).

Wykonanie:

Do probówki z całkowitym RNA dodawano po 2 μ l rozcieńczonej kontroli poly-A RNA oraz 2 μ l 50 μ M T7 Oligo(dT) Primer. Następnie dodawano odpowiednią objętość wody wolnej od RNaz, tak, aby dopełnić do 12 μ l. Mieszaninę mieszano i wirowano przez 5 sekund. Próby inkubowano przez 10 minut w 70 °C, a następnie przez 2 minuty w 4 °C.

Mieszanina First Strand Master Mix na jedną próbę zawierała 4 μ l 5X Strand Reaction Mix, 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l 10 mM dNTP. Mieszano ją i wirowano przez 5 sekund. Następnie po 7 μ l mieszaniny First Strand Master Mix dodawano do każdej z prób RNA. Całość mieszano, wirowano przez 15 sekund i inkubowano 2 minuty w 42 °C. Następnie do każdej z prób dodawano po 2 μ l SuperScript II oraz odpowiednią objętość wody wolnej od RNaz, tak aby dopełnić do 20 μ l. Całość mieszano i wirowano przez 5 sekund. Probówki umieszczano w termocyklerze i poddawano godzinnej inkubacji w 42 °C. W tym czasie zachodziła reakcja odwrotnej transkrypcji. Reakcję zatrzymywano poprzez obniżenie temperatury do 4 °C na 2 minuty. Próby wirowano.

3.5.5.1.4. Synteza drugiej nici cDNA

Odczynniki:

- jednoniciowy cDNA;
- Second Strand Master Mix:
 - o 10 mM dNTP (Invitrogen);
 - o 5X 2st Strand Reaction Mix;
 - o ligaza DNA *E.coli* (Invitrogen);
 - o polimeraza I DNA *E. coli* (Invitrogen);
 - o RNaza H (Invitrogen);
- woda wolna od aktywności rybonukleaz (Invitrogen);
- 0,5 M EDTA (Invitrogen);
- polimeraza T4 DNA (Invitrogen).

Aparatura:

- termocykler C1000 Touch™ (Bio Rad);
- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf).

Wykonanie:

Przygotowywano mieszaninę na odpowiednią ilość prób według następujących objętości poszczególnych odczynników przypadających na 1 próbę: 91 µl wody wolnej od aktywności rybonukleaz, 30 µl 5X 2st Strand Reaction Mix, 3 µl 10 mM dNTP, 4 µl polimerazy I DNA z *E. coli*, 1 µl RNazy H oraz 1 µl ligazy DNA z *E.coli*. Do każdej próby z zsyntetyzowaną już pierwszą nicią cDNA dodawano 130 µl przygotowywanej mieszaniny. Próby wirowano 5 sekund i inkubowano 2 godziny w 16 °C. Próby chłodzono na lodzie, dodawano do nich po 2 µl polimerazy T4 DNA i inkubowano 5 minut w 16 °C. Następnie hamowano reakcję poprzez dodawanie do prób po 10 µl 0,5 M EDTA.

3.5.5.2. Oczyszczanie dwuniciowego cDNA

Odczynniki:

- dwuniciowy cDNA;
- GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix):
 - o cDNA Binding Buffer;
 - o cDNA Elution Buffer;

- cDNA Wash Buffer;
- 96% etanol (POCH);
- 3 M octan sodu (Sigma-Aldrich).

Aparatura:

- wytrząsarka Vortex Gene 2 (Scientific Industries);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- cDNA Cleanup Spin Column;
- Collection Tube.

Wykonanie:

Do prób z zsyntetyzowanym dwuniciowym cDNA dodawano po 600 μ l cDNA Binding Buffer. Próby mieszano około 3 sekundy do uzyskania żółtego koloru. W przypadku, gdy zabarwienie mieszaniny było pomarańczowe lub fioletowe dodawano do niej 10 μ l 3 M octanu sodu w celu poprawy wydajności wytrącania DNA. Na kolumnę cDNA Cleanup Spin umieszczaną w 2 ml próbówce nanoszono 500 μ l cDNA. Próby wirowano 1 minutę przy 10 000 rpm. Etap ten powtarzano dopóki nie została naniesiona cała objętość cDNA na kolumnę. W celu przygotowywania cDNA Wash Buffer do użycia, dodawano do koncentratu 24 ml 96% etanolu. Kolumnę przekładano do nowej 2 ml próbówki. Nanoszono na nią 750 μ l cDNA Wash Buffer i wirowano 1 minutę przy 10 000 rpm. Następnie próby z otwartymi wieczkami kolumn wirowano 5 minut przy maksymalnych obrotach. Kolumny z suchymi membranami umieszczano w nowych 1,5 ml próbówkach i nanoszono na nie po 14 μ l cDNA Elution Buffer. Próby inkubowano 1 minutę w temperaturze pokojowej i wirowano 1 minutę przy maksymalnych obrotach. Objętość mieszaniny elucyjnej z cDNA wynosiła około 12 μ l.

3.5.5.3. Synteza znakowanego biotyną cRNA wraz z oceną jakości preparatów

Odczynniki:

- dwuniciowy cDNA;
- woda wolna od aktywności rybonukleaz (Invitrogen);
- IVT Labeling Kit:
 - IVT Labeling NTP Mix;
 - IVT Labeling Enzyme Mix;
 - 10X IVT Labeling Buffer.

Aparatura:

- termocykler C1000 Touch™ (Bio Rad).

Wykonanie:

6 µl cDNA przenoszono do sterylnych probówek. Następnie dodawano do każdej z nich 34 µl odpowiednio przygotowanej mieszaniny: 24 µl wody wolnej od aktywności rybonukleaz, 12 µl IVT Labeling NTP Mix, 4 µl 10X IVT Labeling Buffer oraz 4 µl IVT Labeling Enzyme Mix. Całą mieszaninę mieszano i wirowano przez 5 sekund. Próby inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37 °C. Próby cRNA wyznakowanego biotyną przechowywano w temperaturze -70 °C lub poddawano kolejnemu etapowi doświadczenia.

3.5.5.4. Oczyszczanie wyznakowanego cRNA

Odczynniki:

- wyznakowany biotyną cRNA;
- 96% etanol (POCH);
- GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix):
 - o IVT cRNA Binding Buffer;
 - o IVT cRNA Wash Buffer;
 - o cDNA Elution Buffer;
- woda wolna od aktywności rybonukleazowej (Invitrogen).

Aparatura:

- wirówka miniSpin plus (Eppendorf);
- Collection Tube;
- IVT cRNA Cleanup Spin Column;
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000 z oprogramowaniem (Thermo Scientific);
- bioanalyzer 2100 (Agilent) z oprogramowaniem 2100 Expert Software (Agilent);
- termoblok ThermoMixer comfort (Eppendorf).

Wykonanie:

Przed rozpoczęciem procedury oczyszczania cRNA, przygotowywano odczynniki. Do IVT cRNA Wash Buffer dodawano 20 ml 96% etanolu, natomiast IVT cRNA Binding Buffer ogrzewano do 30 °C w celu rozpuszczenia się precypitatów.

Do probówki z mieszaniną uzyskaną po syntezie znakowanego biotyną cRNA, dodawano 60 µl wody wolnej od aktywności rybonukleazowej, 350 µl IVT cRNA Binding Buffer i 250 µl 96% etanolu. Zawartość próby mieszano. Na kolumny IVT cRNA Cleanup Spin umieszczanej w 2 ml probówce, наносono kolejno 700 µl próby. Kolumny wirowano przez 15 sekund z prędkością 10 000 rpm. Następnie kolumny umieszczano w nowych 2 ml probówkach, a na membranę наносono po 500 µl IVT cRNA Wash Buffer. Próby wirowano przez 15 sekund przy 10 000 rpm. Na kolumny наносono 500 µl 80% etanolu. Próby wirowano przez 5 sekund. Membranę kolumny osuszano poprzez 5 minutowe wirowanie przy maksymalnej prędkości z otwartymi wieczkami kolumn.

W celu wypłukania cRNA związanego na złożu kolumn, наносono na membranę kolumny 11 µl wody wolnej od aktywności rybonukleazowej. Kolumny wirowano przez 1 minutę przy maksymalnych obrotach. Następnie ponownie przemywano kolumny наносząc 10 µl wody wolnej od aktywności rybonukleazowej i wirowano. Ostatecznie otrzymywano 21 µl eluatu.

W celu oceny jakościowej i ilościowej uzyskiwanych preparatów oczyszczonego biotynylowanego cRNA dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego. Próby rozcieńczano 100- i 200-krotnie. Ilość biotynylowanego cRNA obliczano korzystając z poniższego wzoru:

$$\text{Ilość znakowanego cRNA} = \text{RNA}_m - \text{całkowity RNA}_i * y$$

gdzie:

RNA_m – ilość cRNA mierzona po reakcji IVT (µg)

RNA_i – początkowa ilość całkowitego RNA (µg)

y – frakcja cDNA użyta do reakcji IVT

Pomiar jakościowy RNA wykonywano z wykorzystaniem bioanalyzera 2100 (Agilent).

3.5.5.5. Fragmentacja wyznakowanego cRNA

Odczynniki:

- wyznakowany cRNA;
- Sample Cleanup Module (Affymetrix);
- 5X Fragmentation Buffer (Affymetrix);
- woda wolna od aktywności rybonukleazowej (Invitrogen).

Aparatura:

- termoblok ThermoMixer comfort (Eppendorf);
- bioanalyzer 2100 (Agilent) z oprogramowaniem 2100 Expert Software (Agilent).

Wykonanie:

Do mieszaniny z 15 µg wyznakowanego cRNA dodawano 6 µl 5X Fragmentation Buffer. Objętość próby dopełniano wodą wolną od aktywności nukleazowej do 30 µl. Następnie próby inkubowano w 94 °C przez 35 minut i ochładzano je na lodzie. Przebieg fragmentacji oceniano podczas bioanalizy materiału. Próby przechowywano w temperaturze – 20 °C lub używano od razu do kolejnego etapu reakcji.

3.5.5.6. Hybrydyzacja cRNA do mikromacierzy ekspresyjnej

Odczynniki:

- pofragmentowany wyznakowany biotyną cRNA;
- woda destylowana Molecular Biology Grade (Gibco);
- MES Hydrate (Sigma-Aldrich);
- MES Sodium Salt (Sigma-Aldrich);
- 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich);
- 5 M NaCl (Ambion);
- 10 % Tween-20 (Pierce Chemical);
- 10 mg/ml DNA spermy śledzia (Promega Corporation);
- GeneChip Eucaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix):
 - o 20X Eucaryotic cRNA Hybridization Controls;
 - o 3 nM Control Oligonucleotide B2;
- 50 mg/ml BSA (Invitrogen);
- DMSO (Sigma-Aldrich);
- woda wolna od aktywności rybonukleazowej (Invitrogen).

Aparatura:

- mikromacierz GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array (Affymetrix);
- piec hybrydyzacyjny Hybridization Oven 640 (Affymetrix);
- termoblok ThermoMixer comfort (Eppendorf);
- wirówka miniSpin plus (Eppendorf).

Wykonanie:

W reakcji używano pozytywnych kontroli (hybrydyzacji, oczyszczania buforami, barwienia) w postaci biotynylowanych antysensownych transkryptów genów *bioB* (stężenie wyjściowe roztworu kontroli 30 pM), *bioC* (100 pM), *bioD* (500 pM) uczestniczących w szlaku syntezy biotyny u bakterii *E. coli* oraz genu *cre* (2000 pM) kodującym rekombinazę bakteriofaga P1, a także syntetyczne wyznakowane biotyną oligonukleotydy (50 pM). Przed użyciem, kontrole ogrzewano w temperaturze 65 °C do rozpuszczenia się precypitatów, a następnie stężone roztwory kontroli rozcieńczano 20-krotnie.

Przygotowanie buforu 12X MES Stock Buffer polegało na rozpuszczaniu 64,61 g MES Hydate i 193,3 g MES Sodium Salt w 800 ml wody destylowanej. Wartość pH ustalano między 6,5 a 6,7. Dodawano wody destylowanej do uzyskania końcowej objętości 1000 ml. Tak przygotowywany bufor filtrowano korzystając z filtra o wielkości porów 0,2 µm. Końcowe stężenia odczynników to 1,22 M MES oraz 0,89 M [Na⁺].

W celu przygotowania odczynnika 2X Hybridization Buffer do 19,9 ml wody destylowanej dodawano 8,3 ml 12X Mes Stock Buffer, 17,7 ml 5 M NaCl, 4 ml 0,5 M EDTA oraz 0,1 ml 10% Tween-20. Końcowe stężenia odczynników były następujące: 100mM MES, 1 M [Na⁺], 20 mM EDTA, 0,01% Tween-20. Przed użyciem bufory przechowywano w temperaturze 4 °C w ciemności.

Do każdej próby zawierającej 10 µg pofragmentowanego biotynylowanego cRNA dodawano następujące odczynniki: 3,3 µl 50 pM Control Oligonucleotide B2, po 10 µl kontroli *bioB* (1,5 pM), *bioC* (5 pM), *bioD* (25 pM), *cre* (100 pM), 2 µl 0,1 mg/ml DNA spermy śledzia, 2 µl 0,5 mg/ml BSA, 100 µl 1X Hybridization Buffer, 20 µl 10% DMSO oraz dopełniano wodą destylowaną do uzyskania 200 µl objętości. Tak przygotowywaną mieszaninę hybrydyzacyjną inkubowano w 99 °C przez 5 minut, następnie wirowano ją przez 5 minut przy maksymalnej prędkości.

Na macierz nanoszono 130 µl 1X Hybridization Buffer i obracając inkubowano w 45 °C przez 10 minut. Bufor z kartridża mikromacierzy usuwano i nanoszono 130 µl mieszaniny hybrydyzacyjnej. Płytki mikromacierzy umieszczano w piecu hybrydyzacyjnym na 16 godzin w 45 °C. Płytki obracały się z prędkością 60 rpm.

3.5.5.7. Płukanie macierzy

Odczynniki:

- 20X SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTS) (Cambrex Corporation);
- 10 % Tween-20 (Pierce Chemical);
- 5 M NaCl (Ambion);
- 12X MES Stock Buffer;
- przeciwciała IgG (Sigma-Aldrich);
- 1 mg/ml SAPE (Molecular Probes);
- 50 mg/ml BSA (Invitrogen);
- 0,5 mg/ml kompleks biotylna – streptawidyna (Vector Laboratories);
- woda destylowana (Gibco).

Aparatura:

- mikromacierz GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array (Affymetrix);
- stacja płuczająca Affymetrix Fluides Station 450/250 z oprogramowaniem GCOS 1.4 (GeneChip Operating Software 1.4).

Wykonanie:

W celu otrzymania buforu Non-Stringent Wash Buffer do 699 ml wody destylowanej dodawano 300 ml 20X SSPE, 1 ml 10 % Tween-20. Końcowe stężenie reagentów wynosiło 6X SSPE oraz 0,01% Tween-20. Stringent Wash Buffer otrzymywano poprzez dodanie do 910,5 ml wody destylowanej następujących odczynników: 83,3 ml 12X MES Stock Buffer, 5,2 ml 5 M NaCl oraz 1 ml 10 % Tween-20. Końcowe stężenie reagentów wynosiło 100 mM MES, 0,1 M [Na⁺] oraz 0,01 % Tween-20. 2X Stain Buffer przygotowywano dodając 41,7 ml 12X MES Stock Buffer, 92,5 ml 5M NaCl i 2,5 ml 10% Tween-20 do 113,3 ml wody destylowanej. Końcowe stężenia reagentów wynosiły 100 mM MES, 1 M [Na⁺] oraz 0,01% Tween-20. Każdy bufor filtrowano przepuszczając przez filtr o średnicy porów 0,2 μm i przechowywano je w temperaturze między 2 a 8 °C w ciemnym miejscu.

W celu przygotowywania roztworu przeciwciał IgG do 5 ml 150 mM NaCl dodawano 50 mg przeciwciał IgG. Końcowe stężenie reagenta wynosiło 10 mg/ml. Przechowywano go w temperaturze 4 °C.

Do przygotowania roztworu przeciwciał Antibody Solution Mix używano następujących odczynników: 300 μl 2X Stain Buffer, 24 μl 50 mg/ml BSA, 6 μl 10 mg/ml

Goat IgG Stock, 3,6 µl 0,5 mg/ml biotynylowane przeciwciała oraz 266,4 µl woda destylowana.

Roztwór z kompleksem streptawidyna-fikoerytryna (SAPE Solution Mix) przygotowywano łącząc następujące odczynniki: 600 µl 2X Stain Buffer, 48 µl 50 mg/ml BSA, 12 µl 1 mg/ml SAPE oraz 540 µl woda destylowana.

Po zakończeniu procesu hybrydyzacji, mikromacierze przenoszono do stacji płuczącej, która umożliwiała zautomatyzowane płukanie i jego monitorowanie. Proces barwienia i płukania kontrolowano w programie Affymetrix® Microarray Suite 5.0 stosując poniższy protokół:

- przemywanie pohybrydyzacyjne 1:
130 µl Non-Stringent Wash Buffer; 30 °C; 10 cykli (2 mieszania/cykl);
- przemywanie pohybrydyzacyjne 2:
130 µl Stringent Wash Buffer; 50 °C; 6 cykli (15 mieszań/cykl);
- barwienie 1:
600 µl roztworu SAPE; 35 °C; 1 cykl; 5 min.;
- przemywanie po znakowaniu:
130 µl Non-Stringent Wash Buffer; 30 °C; 10 cykli (4 mieszania/cykl);
- barwienie 2:
600 µl roztworu przeciwciał; 35 °C; 1 cykl; 5 min.;
- barwienie 3:
600 µl roztworu SAPE; 35 °C; 1 cykl; 5 min.;
- końcowe płukanie:
130 µl Non-Stringent Wash Buffer; 30 °C; 15 cykli (4 mieszania/cykl).

3.5.5.8. Skanowanie macierzy

Macierz oświetlano światłem o długości fali 488 nm. Długość fali wzbudzenia fluorescencji wynosiła 570 nm. W analizie wykorzystano zależność, że natężenie światła jest proporcjonalne do stężenia cRNA przyłączonego do macierzy.

Aparatura:

- laserowy skaner (GeneChip® Scanner 3000) razem z oprogramowaniem Affymetrix® Microarray Suite 5.0 (Affymetrix);
- macierz HG-U133A 2.0.

Wykonanie:

Przeplukane macierze umieszczano w kieszonce skanera. Fluorescencję odczytywano przy długości fali 570 nm, odpowiadającej maksimum absorpcji fikoerytryny. Bazując na danych z oprogramowania można było wskazywać pozycje sond na macierzy i na tej podstawie możliwe było określanie odczytów dla poszczególnych genów. Dane poddawano analizie statystycznej oraz bioinformatycznej. Przeprowadzono normalizację danych. Analizę ontologiczną genów przeprowadzono z wykorzystaniem bazy Panther (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) wersja 7.0 (SRI International, Menlo Park, California, USA) [123], KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics) [124] oraz GeneCards The Human Gene Database [122].

3.5.5.9. Normalizacja danych

Etap ten przeprowadza się w celu zmniejszenia prawdopodobieństwa błędów pomiarowych poziomu ekspresji genów. Porównywano sygnały w obrębie każdej pary sond. cRNA silniej hybryduje z sondą idealnie komplementarną (*perfect match*, sonda PM) niż z różniącą się pojedynczym nukleotydem (*mismatch*, sonda MM). Ponadto, na macierzy umieszczono transkrypty genów metabolizmu podstawowego (*housekeeping genes*): *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *ISGF-3* (*interferon-stimulated gene factor 3*) oraz *STAT1* (*signal transducer and activator of transcription 1*). Kontrolami wewnętrznymi było również 100 transkryptów (synteza *in vitro*) o znanych stężeniach. Hybrydyzowano je razem z badanym RNA.

3.5.5.10. Analiza statystyczna

Wiarygodność uzyskanych wyników oceniano na podstawie wartości poniższych parametrów:

- moc – odsetek genów, których ekspresja uległa istotnej zmianie; im wynik bliższy 100% tym więcej genów ze zmienioną ekspresją;
- współczynnik zafałszowania błędów (*false discovery rate*, FDR) wyliczany za pomocą testu Benjamini-Hochberg; określa odsetek genów nieprawidłowo sklasyfikowanych jako różniące się statystycznie; pożądany jest wynik jak najbliższy 0%; za graniczną akceptowalną wartość przyjęto FDR < 10%; FDR 1% wiarygodnie wskazywała na związek danego genu z analizowaną cechą;

- test Wilcozona – nieparametryczny test rang; pożądaną wartością testu określono na p -value $< 0,05$; geny różniące się ekspresją więcej niż 2 razy są potencjalnymi genami regulatorowymi;
- test Spearmana – permutacyjny test korelacji; określa związek zmiany w poziomie ekspresji genów z badaną cechą.

3.5.5.11. Analiza ontologiczna

W pierwszym kroku dane ze skanowania macierzy ekspresyjnych normalizowano, co pozwoliło zminimalizować ryzyko błędów w pomiarze poziomu ekspresji genów. Następnie z użyciem programu Panther wersja 7.0 [123] profile poddano analizie pod kątem funkcji molekularnych genów, ich udziału w procesach biologicznych i szlakach komórkowych. W analizie uwzględniano tylko geny, dla których wykazano krotność zmiany (*Fold Change*, FC) powyżej 2 oraz istotność statystyczną (p -value $\leq 0,05$).

3.5.6. Weryfikacja wyników

Analizując wyniki eksperymentów mikromacierzowych wybrano 21 genów do weryfikacji wyników metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Zmiany w poziomie ekspresji badano zarówno w grupie pacjentów oraz w niezależnej grupie.

Walidacji poddawano geny związane z profilem oporności na badane leki antracyklinowe: *ABCG1*, *ANXA1*, *ARAP1*, *CASP1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *DUSP2*, *FGR*, *HK3*, *IFIT3*, *ITGAM*, *ITGB2*, *PCDH9*, *RETN*, *RUNX1*, *SERPINA1*, *TBL1XR1*, *TCF7*, *TTC28*, *WDR26* oraz *WNK1*. Reakcje przeprowadzono w obecności genów referencyjnych *ACTB*, *TUBA1B*, *SDHA* oraz *GAPDH*.

3.5.6.1. Synteza cDNA

Odczynniki:

- całkowity RNA;
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics):
 - o Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase;
 - o Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5X;
 - o 40 U/ μ l Protector RNase Inhibitor;
 - o dNTP mix, PCR-grade; 10 mM każdy;
 - o 600 pmol/ μ l losowe heksamery;
 - o 100 mM ditiotreitol;
 - o woda wolna od aktywności nukleazowej.

Aparatura:

- termoblok ThermoMixer comfort (Eppendorf)

Profil termiczny:

- 65 °C 10 min.;
- 4 °C dodawanie odczynników;
- 55 °C 30 min.;
- 85 °C 5 min.;
- 4 °C hamowanie reakcji.

Wykonanie:

Bazując na całkowitym RNA syntetyzowano cDNA. Na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru stężenia obliczano objętość roztworu zawierającego 4 µg całkowitego RNA. Do odpowiedniej objętości RNA dodawano 2 µl losowych heksamerów. Próbkę uzupełniano wodą wolną od aktywności nukleazowej do 11,4 µl. W celu denaturacji drugorzędowych struktur, próbkę inkubowano w 65 °C przez 10 min. Następnie dla próby przygotowywano mieszaninę reakcyjną dodając poszczególnych odczynników: 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl dNTP mix, 1 µl DTT oraz 1,1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase. Do próby dodawano 8,6 µl mieszaniny i inkubowano ją w 55 °C przez 30 minut. Następnie w celu zahamowania reakcji, temperaturę zmieniano na 85 °C przez 5 minut. Próby przechowywano w temperaturze -20 °C.

3.5.6.2. Sprawdzanie jakości cDNA i specyficzności starterów

Przeprowadzając PCR dla każdego genu sprawdzano jakość cDNA, specyficzność starterów oraz ustalano warunki reakcji (np. temperaturę topnienia (*melting temperature*, T_m)). Sekwencje starterów ustalano korzystając z programu Universal ProbeLibrary Assay Design Center Roche Diagnostics (Tabela 9). Startery analizowano także pod względem tworzenia struktur drugorzędowych (homodimery, heterodimery, struktury szpilek do włosów) w programach Primer Blast [125] oraz OligoAnalyzer 3.1 [126].

Odczynniki:

- cDNA;
- polimeraza Phusion High-Fidelity DNA (Finzymes):
 - o 100 U Phusion® DNA Polymerase;

- 5X Phusion HF Buffer;
- 50 mM MgCl₂;
- startery (oligo.pl);
- woda do PCR (Fermentas).

Aparatura:

- termocykler C1000 Touch™ (Bio Rad).

Profil termiczny:

1. denaturacja wstępna: 95 °C 5 min.
 2. denaturacja matrycy: 95 °C 30 s
 3. hybrydyzacja starterów: 60 °C 15 s
 4. wydłużanie startera: 72 °C 30s
- kroki od 2 do 4 – 35 cykli
5. końcowe wydłużanie: 72 °C 10 min.

Wykonanie:

Do amplifikacji wykorzystywano 1 µl cDNA. Do każdej próby dodawano 19 µl mieszaniny reakcyjnej, przygotowywanej zgodnie poniższym protokołem. Próby poddawano działaniu wyżej opisanemu profilowi termicznemu.

Mieszanina reakcyjna:

- cDNA 1 µl;
- 5X Phusion HF Buffer 4 µl;
- mieszanina dNTP 0,4 µl;
- 100 mM starter prawy 0,1 µl;
- 100 mM starter lewy 0,1 µl;
- 100 U Phusion® DNA Polymerase 0,2 µl;
- wody do PCR 14,2 µl.

Tabela 9. Charakterystyka starterów do PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Sekwencja starterów (5'→ 3')	Długość (pz)	T _m	% GC	Sekwencja amplikonu	Wielkość amplikonu (pz)
<i>ABCG1</i>	L:accttcctattcgggtcctg	21	59	48	accttcctattcgggtcctgaaggacacctggaggagaagaagatacaagacctcctgaaaggaattccgggaagtcaatagtggtgagttggtgg	102
	R:ccaccaactcaccactattgaac	23	60	48		
<i>ANXA1</i>	L:cgatctgaggactttggtgtg	21	60	52	cgatctgaggactttggtgtgaatgaagactggctgattcagatgccagggcctgtatgaagcaggagaaaggagaaaggggacagacgtaaac	96
	R:gtttacgtctgtcccttttc	22	59	50		
<i>ARAP1</i>	L:cgtcacaccagtcatcaag	20	60	55	ccgtcacaccagtcatcaaggctggctggctggacaagaaccaccgcaggatcttatcatatcagaaacgatgggtgagactg	86
	R:cagctcaccatcgtttctg	21	61	63		
<i>CASP1</i>	L:ggggtacacgtagatgtgaa	20	59	52	ggggtacacgtagatgtgaaaaaaaaatctcactgcttcggacatgactacagagctggagggcatttcacaccgcccagagcacaagacctctgacagca	101
	R:cttcccgaataccatgagaca	21	57	47		
<i>CDKN1A</i>	L:tgctactgtctgtacctgtg	23	60	48	tgctactgtctgtacctgtgctctcaggggagcaggctgaagggtcccaggtggacctggagactctcagggtcgaaacggcgagaccagcatg	130
	R:cggcgtttggagtgtagaa	18	60	61		
<i>CDKN1B</i>	L:ctagagggcaagtagcagtg	21	59	57	ctagagggcaagtagcagtgcaagaggtggagaaggcagctgcccagtttctactacagacccccgcg	71
	R:cggggggctgtgtag	18	59	67		
<i>DUSP2</i>	L:taccctgtggaggacaacc	20	59	55	taccctgtggaggacaaccagatggtggagatcagctgctgttccaggagccatagccttcaactgactggg	74
	R:cccagtaatgaagcctatg	20	59	50		
<i>FGR</i>	L:atgggctgctactacatcac	20	59	55	atgggctgctactacatcaccacacgggtcagttcaactcgtgctcaggagctggtcagcactacatggaggtgaatgacgggctg	87
	R:cagccgtcattcacctc	18	60	61		
<i>HK3</i>	L:ggagcaccctcatttcctg	19	60	58	ggagcaccctcatttcctggaccaaggttttagtgcagtggtgtggaagccagatggtgccagctgctgagagatgccattcggagcagggggcctac	132
	R:cgttcaccacagcaaccac	19	61	58		
<i>IFIT3</i>	L:ggaagaaaagcccaacaacc	20	60	50	ggaagaaaagcccaacaaccagaattctcctctggactggcaattgcgatgtaccatctgataatcaccagagaacagttctctactgatgtttgaaagcagg	111
	R:atggcctgctcaaacatc	20	60	45		
<i>ITGAM</i>	L:agtccaacgctaagtcaagg	21	60	61	agtccaacgctaagtcaaggcaccagatcggcgcctactctcgggctcctctgctccgtggagctggacagcaacggcagcaccgacctgtcctcatc	134
	R:tcgggtctgctctagtaag	21	59	58		
<i>ITGB2</i>	L:agctgtccccacaaaagtg	20	58	50	agctgtccccacaaaagtgacgtttacctgcgaccagggccagcagcagcgttaacagctgacctccggcgggccaagggtaccctcagacctgtactat	126
	R:tggagtaggagaggtccatcag	22	60	54		
<i>PCDH9</i>	L:caactctgatcccaactctgatg	23	61	48	caactctgatcccaactctgatggcctttgggtccccagggattagctgaagctacagagatgtgactcaagagtgctgttttgggtcactctgataattgctg	132
	R:tatggaccaagccagga	18	59	56		
<i>RETN</i>	L:ccaccgagaggatgaaag	19	60	58	ccaccgagaggatgaaagctctctgtctcctcctcctcctctgctgggctgtgtgcttagcaaacacctgtgctccatg	84
	R:catggagcacagggtctg	19	60	58		
<i>RUNX1</i>	L:gacagcccaactctctctct	19	59	58	gacagcccaactctctctctctctctcactgcactgcgctgcaacaagacctcctccatccttcaaggtgtggcctaggggatgtccagatggc	134
	R:tcattgccagccatcaca	18	60	50		
<i>SERPINA1</i>	L:caactgggcatcactaaggtc	21	59	52	caactgggcatcactaaggtcctcagcaatggggctgacctcctcggggtcacagagaggcaccctgaagctcctcaagggcgtgataaaggctgtgctgac	128
	R:gcttcagtccttctctg	20	59	55		

cd. Tabela 9. Charakterystyka starterów do PCR w czasie rzeczywistym.

<i>TBLXR1</i>	L:acatctggaacacgcagaca	20	59	50	acatctggaacacgcagacaggtgctcttagttcacagctataggggaacaggtggaatattgaagtttctggaatgcagcaggagacaaagttggagccagtgc catca	110
	R:tgatgcactggctccaact	19	59	52		
<i>TCF7</i>	L:ccgcaacctgaagacacaa	19	60	53	ccgcaacctgaagacacaaagcagagtcgaagcagagaaggaggccaagaagccaacctcaagaagcccctcaatgccttcagctgtacatgaaggagatg agagccaaggtca	116
	R:tgacctggctctcatctcc	20	60	55		
<i>TTC28</i>	L:tctcccttgggctagtgg	19	58	57	tctcccttgggctagtggaaactggaggaggccaacaccagctttataggcatcagcctgtttgaaacaatccgacatgagg	87
	R:cctcatgtcggattgttca	20	55	45		
<i>WDR26</i>	L:gcattctcctcatgctattgtg	22	59	45	gcattctcctcatgctattgtgagatgaagttttgctgctgcagcagaagtacctaagaatcctggaggatggca	77
	R:tgccatcctccaggtattct	20	59	50		
<i>WNK1</i>	L:ccagaaagccgattacgagaga	20	60	50	ccagaaagccgattacgagaatcaaagtttccccagtgaaataacagatacagttgctgcctctacagctcagagccctggaatgaactgtctcactctgcatcat cc	111
	R:ggatgatgcagagtgagacaag	22	59	50		
<i>ACTB</i>	L:ccaaccgcgagaagatga	18	60	56	ccaaccgcgagaagatgaccagatcatgtttgagacctcaacccccagccatgtacgttgcctaccagctgtgctatccctgtacgcctctgg	97
	R:ccagagcgttacagggatag	20	59	60		
<i>TUBA1B</i>	L:tgcgttacttacctcgactctt	22	58	45	tgcgttacttacctcgactcttagcttgcggggacggaaccgggaccgggtgtctgctcctgccttcgctcctaaccctagccatgctgagtgcatctc catccagttgg	122
	R:ccaacgtggatggagatg	18	58	56		
<i>SDHA</i>	L:cagaccatctacggagcagag	21	60	57	cagaccatctacggagcagagcagcgaaggagtcacggggcgcgcagccaggaagactacaaggtgcggattgatga	80
	R:tcataatccgcacctgt	19	60	47		
<i>GAPDH</i>	L:agccacatcgctcagacac	19	60	58	agccacatcgctcagacacctggggaaggtgaaggtcggagtcaacggattgtgctgattgggc	66
	R:gccaatacagccaaatcc	19	60	53		

L – lewy starter; R – prawy starter

3.5.6.3. Analiza produktów PCR

Odczynniki:

- agarozą Basica Le GQT (Prona);
- bufor 10X TBE (pH 8,4):
 - o 0,89 mM Tris (Sigma-Aldrich);
 - o 0,22 mM EDTA (Sigma-Aldrich);
 - o 0,89 mM kwas borowy (Sigma-Aldrich);
- O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 10-300 bp (Fermentas):
 - o O'GeneRuler™ Storage and Loading Buffer ;
 - o 6X Orange DNA Loading Dye;
 - o O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA ladders (wielkości markera: 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10 pz);
- bufor 1X TBE;
- SybrGreen I (ThermoScientific).

Aparatura:

- aparat do elektroforezy (BioRad);
- transiluminator UV (Multi Doc-It Digital Imaging System UVP) z oprogramowaniem.

Wykonanie:

Do przygotowywania 3% żelu agarozowego używano 50 ml 1X TBE oraz 1,5 g agarozy. Mieszaninę ogrzewano do rozpuszczenia się agarozy. Lekko przestudzoną mieszaninę wylewano na przygotowane wcześniej saneczki z grzebieniami i pozostawiano na około 20 minut w celu polimeryzacji żelu. Wyciągano grzebienie z żelu i wkładano go do aparatu zalanego buforem 1X TBE. Do prób z amplifikowanym materiałem po qPCR dodawano po 3 µl obciążnika i na żel наносzono 10 µl mieszaniny. Elektroforezę prowadzono przez 30 minut pod napięciem 130 V. Następnie wykonywano zdjęcie z transiluminatora UV, na podstawie którego oceniano jakość i ilość produktu PCR.

3.5.6.4. PCR w czasie rzeczywistym

Wykorzystując technikę ilościowej PCR określono względny poziom ekspresji 21 genów badanych w obecności 4 genów referencyjnych. W qPCR używano starterów Universal ProbeLibrary Roche Diagnostics.

Odczynniki:

- Universal ProbeLibrary Set, Human (Roche Diagnostics):
 - o cDNA;
 - o 20 μ M starter prawy (osobne startery dla każdego z genów);
 - o 20 μ M starter lewy (osobne startery dla każdego z genów);
 - o 10 μ M próba UPL (osobne sondy dla każdego z genów);
 - o 2X LightCycler® 480 Probes Master;
 - o woda do PCR.

Aparatura:

- termocykler LightCycler® 480 z oprogramowaniem LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (Roche Diagnostics);
- białe płytki 96-dołkowe LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche Diagnostics);
- folie do płytek LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics).

Profil termiczny:

- inkubacja wstępna: 1 cykl, 95 °C, 10 min., tempo wzrostu temperatury 4,4 °C/s
- amplifikacja: 45 cykli
 - o 95 °C, 10 s, tempo wzrostu temperatury 4,4 °C/s,
 - o 60 °C, 20 s, tempo wzrostu temperatury 2,2 °C/s,
 - o 72 °C, 1 s, tempo wzrostu temperatury 4,4 °C/s, - odczyt sygnału
- ochładzanie: 1 cykl, 40 °C, 30 s, tempo wzrostu temperatury 2,2 °C/s.

Wykonanie:

Dla genów referencyjnych oraz dla każdego z analizowanych genów przygotowywano krzywe wzorcowe (regresji) dla różnych rozcieńczeń matrycy. Badano próbę nierozcieńczoną oraz rozcieńczoną 5-, 25-, 125- i 625-krotnie. W każdej reakcji badano również próbę zerową niezawierającą cDNA. Mieszanina reakcyjna zawierała: 10 μ l 2X LightCycler® 480 Probes Master, 0,1 μ l starter prawy, 0,1 μ l starter lewy, 0,25 μ l próby UPL, 8,55 μ l wody do PCR oraz 1 μ l cDNA wyjściowego lub rozcieńczonego.

Na podstawie uzyskiwanych wartości C_T dla poszczególnych rozcieńczeń, otrzymywano wykres z równoległymi sigmoidalnymi krzywymi o takim samym nachyleniu. Bazując na uzyskanej krzywej standardowej wyliczano współczynnik regresji (R^2) oraz określano wydajność reakcji E (*efficiency*). Etap optymalizacji reakcji miał na celu uzyskiwanie jak najwyższej wydajności reakcji bliskiej 100%, wtedy wartość E równa się 1. W takim przypadku współczynnik kierunkowy prostej wynosił -3,32. Świadczy to o dobrze dobranych proporcjach składników mieszaniny reakcyjnej, a krzywa informuje o podwojeniu ilości produktu każdym cyklu reakcji.

Dla 155 pacjentów ze zdiagnozowaną AML lub ALL przeprowadzono PCR w czasie rzeczywistym. Dla każdego genu i prób zerowych bez cDNA przeprowadzono 2 niezależne powtórzenia. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano zgodnie z wyżej opisanym protokołem. Próby nakładano na 96-dołkowe płytki przeznaczone do qPCR. Płytki zaklejało się folią. Reakcję przeprowadzano zgodnie z powyższym profilem termicznym uwzględniając T_m starterów.

3.5.6.5. Analiza wyników PCR w czasie rzeczywistym

Wyniki qPCR odczytywano w oprogramowaniu LightCycler® 480 Software. Na ich podstawie obliczono zmianę poziomu ekspresji genów. Podczas analizy danych korzystano z programu REST© (Relative Expression Software Tool, QIAGEN). Dzięki niemu możliwe było przeprowadzenie normalizacji wyników, analizy istotności statystycznej różnic w porównywanych genach (test randomizacji realokacji par skojarzonych, *Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test*©) oraz obliczeń względnego poziomu ekspresji z uwzględnieniem efektywności reakcji. Ponadto, dla uzyskanych wyników względnego poziomu ekspresji policzono istotność statystyczną testem Manna-Whitneya.

4. WYNIKI

4.1. Analiza jakościowa i ilościowa gDNA

4.1.1. Pomiar fluorometryczny i spektrofotometryczny

Z komórek białaczkowych pozyskanych od dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną lub mieloblastyczną wyizolowano genomowe DNA, które było poddawane analizie spektrofotometrycznej (Nanodrop) i fluorometrycznej (Qubit). Uzyskane parametry pozwoliły na ocenę jakości oraz ilości wyizolowanego genomowego DNA (Tabela 10).

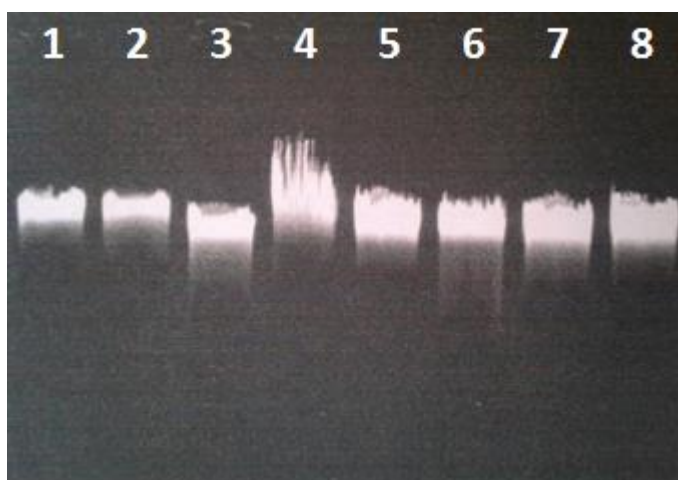
Tabela 10. Wyniki pomiaru spektrofotometrycznego oraz fluorometrycznego genomowego DNA.

Numer próby	ilość DNA [$\frac{ng}{\mu l}$]	ilość DNA [$\frac{ng}{\mu l}$]	A260	A260
	(Nanodrop)	(Qubit)	A280	A230
1	120,94	82,60	1,89	2,12
2	135,55	100,00	1,85	1,75
3	35,99	19,60	1,89	1,72
4	61,05	42,30	1,87	2,10
5	40,60	25,17	1,87	1,83
6	59,91	38,40	1,94	2,03
7	80,22	50,40	1,85	2,21
8	98,82	94,50	1,89	2,23
9	73,60	81,70	1,78	1,77
10	49,19	81,70	1,83	1,76
11	107,73	70,33	1,89	2,16
12	123,89	63,40	1,86	2,23
13	45,71	35,20	1,94	2,20
14	41,64	32,71	1,89	2,07
15	163,92	78,16	1,80	1,90
16	24,23	20,30	1,80	2,10
17	130,37	78,00	1,82	2,25
18	137,55	80,90	1,92	1,83
19	435,56	210,7	1,83	2,22
20	40,31	31,60	1,77	2,15
21	90,57	71,30	1,81	1,73
22	43,93	25,00	1,88	2,28
23	79,47	45,73	1,79	2,05
24	63,50	33,60	1,89	2,23
25	54,07	38,80	1,91	2,22
26	48,26	28,00	1,81	2,06
27	100,47	75,90	1,96	2,27
28	37,00	25,11	2,00	1,73
29	563,32	510,00	1,83	2,20
30	66,58	33,00	2,00	2,25
31	12,76	4,91	1,61	2,20
32	29,31	24,33	1,84	2,15
33	55,85	39,10	1,87	2,06
34	84,60	42,10	1,81	2,07
35	86,14	44,90	1,84	2,27
36	143,51	58,50	1,92	2,07
37	64,19	35,50	1,87	2,20
38	49,69	33,29	1,95	1,94
39	49,51	33,17	1,93	2,08
40	111,67	62,12	1,96	2,10
41	50,42	27,50	1,86	1,95
42	52,90	35,18	1,81	2,12
43	220,78	135,63	1,91	1,96
44	422,42	240,78	1,94	1,76
45	41,26	22,87	1,79	2,05
46	34,90	25,23	1,90	2,22

Jakość wyizolowanego genomowego DNA określono przy absorbancji 230, 260 oraz 280 nm. Oczekiwane wartości to $A_{260}/A_{280} \text{ nm} = 1,7-1,9$ oraz $A_{260}/A_{230} \text{ nm} = 1,8-2,2$. Średnia oraz mediana dla parametru $A_{260}/A_{280} \text{ nm}$ wynosiła 1,87, natomiast dla $A_{260}/A_{230} \text{ nm}$ wynosiła 2,1. Kilka prób przekroczyło pożądane parametry dla $A_{260}/A_{280} \text{ nm}$ o wartość 0,1, natomiast dla A_{260}/A_{230} o wartość 0,08. Nieznaczne odstępstwa mogą sugerować niewielką pozostałość odczynników wykorzystanych na tym etapie doświadczenia. Pomimo tego, zdecydowano się na wykorzystanie tych prób w analizie ze względu na zadowalające parametry w kolejnych etapach eksperymentu.

4.1.2. Rozdział elektroforetyczny

Jakość wyizolowanego gDNA (stopień degradacji, zanieczyszczenia) sprawdzano podczas elektroforezy na żelu agarozowym. Na Rycinie 13 przedstawiono przykładowy rozdział elektroforetyczny prób genomowego DNA, których jakość określono jako dobrą. Zaobserwowano frakcję gDNA na tej samej wysokości. Brak długich, pionowych smug w poszczególnych studzienkach świadczy o niezdegradowanym DNA. Nie odnotowano obecności dodatkowych prążków 18S oraz 28S, świadczące o zanieczyszczeniu materiału rRNA.



Rycina 13. Elektroforegram przykładowych prób gDNA przed fragmentacją.

4.1.3. Analiza wyników znakowania

Kolejnym etapem po fragmentacji restrykcyjnej gDNA było jego wyznakowanie. Referencyjne DNA wyznakowano cyjaniną 3, natomiast badane DNA cyjaniną 5. Parametry wyznakowanego DNA oznaczano podczas pomiaru spektrofotometrycznego z wykorzystaniem NanoDrop ND-1000. Wyniki przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Parametry gDNA wyznakowanego cyjaniną 3 i cyjaniną 5.

Numer próby	Cyjanina 3 $\left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}\right]$	Cyjanina 5 $\left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}\right]$	Stężenie $\left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right]$	$\frac{A260}{A280}$	Numer próby	Cyjanina 3 $\left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}\right]$	Cyjanina 5 $\left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}\right]$	Stężenie $\left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right]$	$\frac{A260}{A280}$
F ₂₆	18,30	-	536,19	1,81	13	-	2,16	70,50	1,83
F ₈	19,07	-	562,35	1,80	43	-	2,64	96,30	1,85
F ₂₇	19,03	-	599,75	1,81	F ₃₃	3,31	-	102,77	1,85
F ₁₉	17,44	-	543,44	1,81	F ₅	2,31	-	80,04	1,87
M ₂₅	13,31	-	434,57	1,82	F ₃₈	2,83	-	90,81	1,80
M ₁₇	18,13	-	571,51	1,81	F ₄₂	3,33	-	95,91	1,89
M ₁₂	21,03	-	570,29	1,74	M ₃₂	3,54	-	114,95	1,80
M ₂₉	14,82	-	481,00	1,80	M ₃₉	2,48	-	104,35	1,87
26	-	6,41	333,47	1,84	33	-	7,75	427,73	1,85
8	-	7,83	395,60	1,84	5	-	2,56	93,42	1,89
27	-	1,33	605,81	1,69	38	-	6,77	414,47	1,93
19	-	3,72	157,64	1,82	42	-	8,88	488,59	1,89
25	-	7,92	377,37	1,87	32	-	8,54	448,46	1,94
17	-	8,83	440,50	1,86	39	-	6,77	400,18	1,88
12	-	6,81	385,01	1,81	F ₆	3,41	-	123,28	1,79
29	-	5,24	289,74	1,86	F ₁₁	1,98	-	95,53	1,80
F ₄₁	9,80	-	523,35	1,86	M ₁₅	1,87	-	131,70	1,85
F ₃₄	36,52	-	697,34	1,68	M ₂₈	2,56	-	131,00	1,84
F ₂₄	31,00	-	746,05	1,76	M ₃₆	2,92	-	100,39	1,81
F ₃₀	20,44	-	634,45	1,68	M ₃₉	1,88	-	86,09	1,82
F ₃₇	30,23	-	637,31	1,73	M ₄₅	1,94	-	99,84	1,82
M ₂₂	31,93	-	757,39	1,76	M ₄₆	1,53	-	53,34	1,75
M ₃₁	8,02	-	377,74	1,83	6	-	10,04	527,27	1,84
M ₃₅	8,97	-	433,05	1,79	11	-	9,86	535,29	1,82
41	-	18,49	637,43	1,77	15	-	7,56	484,73	1,83
34	-	6,78	444,05	1,88	28	-	10,33	543,32	1,82
24	-	10,08	552,99	1,87	36	-	10,04	547,34	1,79
30	-	13,36	822,97	1,76	39	-	9,46	501,09	1,81
37	-	7,09	483,25	1,83	45	-	9,43	516,91	1,81
22	-	9,20	535,74	1,79	46	-	10,88	519,76	1,77
31	-	6,12	442,78	1,88	M ₁	25,77	-	425,52	1,75
35	-	23,67	650,55	1,69	F ₂	35,20	-	470,90	1,73
F ₁₄	13,87	-	488,32	1,86	M ₃	20,61	-	363,89	1,75
F ₂₃	25,48	-	607,35	1,80	F ₉	23,42	-	407,95	1,76
F ₇	17,07	-	564,18	1,92	F ₁₀	15,62	-	299,41	1,82
M ₄	8,54	-	346,19	1,82	M ₁₈	18,36	-	411,57	1,73
M ₁₆	8,52	-	358,56	1,89	F ₂₀	25,54	-	607,19	1,63
M ₄₄	30,88	-	596,72	1,80	F ₂₁	9,31	-	384,24	1,68
M ₁₃	26,93	-	586,14	1,72	1	-	3,44	131,10	1,88
M ₄₃	21,58	-	565,21	1,75	2	-	5,93	245,13	1,84
14	-	5,47	373,71	1,90	3	-	4,42	175,05	1,88
23	-	1,96	67,18	1,88	9	-	8,06	315,14	1,83
7	-	2,09	71,10	1,83	10	-	13,99	296,12	1,86
4	-	3,82	169,53	1,86	18	-	20,88	409,12	1,79
16	-	3,38	150,76	1,83	20	-	12,37	185,32	1,84
44	-	2,89	89,18	1,90	21	-	12,00	404,36	1,79

F – żeńskie DNA, M – męskie DNA

Na podstawie uzyskanych wyników określono czystość badanych prób. Wartości A260/A230 wskazywały na wysoką czystość preparatów, a ich parametry mieściły się w zakresie 1,69-1,94. Zarówno średnia, jak i mediana dla A260/A230 wynosiły 1,82. Kilka prób przekroczyło pożądane parametry o wartość 0,07. Niewielkie odchylenia mogą świadczyć nieznacznej pozostałości odczynników użytych na tym etapie doświadczenia. Niemniej jednak, zdecydowano o pozostawieniu tych prób w analizie ze względu na dobre parametry w dalszych etapach eksperymentu. Stężenie badanego DNA było w zakresie 67,18-822,97 ng/μl. Dla prób kontrolnych stężenie DNA otrzymano w zakresie 53,34-757,39 ng/μl.

Wydajność reakcji znakowania określono na podstawie stopnia wyznakowania, specyficznej aktywności oraz ilości DNA (Tabela 12). Bazując na zaleceniach zawartych w protokole reakcji, specyficzna aktywność dla cyjaniny 3 powinna wynosić 20-25 pmol/ μ g, dla cyjaniny 5 powinna zawierać się w zakresie 15-25 pmol/ μ g, natomiast ilość DNA powinno być od 3 do 5 μ g. Mediana wartości uzyskanych dla specyficznej aktywności cyjaniny 3 i 5 wynosiła odpowiednio 32,75 pmol/ μ g oraz 19,67 pmol/ μ g. Z kolei mediana ilości DNA referencyjnego i badanego wynosiła 3,85 μ g.

Tabela 12. Wydajność reakcji znakowania.

Numer próby	Stopień wyznakowania [pmol/ μ l]	Specyficzna aktywność [pmol/ μ l]	Ilość DNA [μ g]	Numer próby	Stopień wyznakowania [pmol/ μ l]	Specyficzna aktywność [pmol/ μ l]	Ilość DNA [μ g]
F ₂₆	1,16	34,10	4,29	13	1,04	30,64	0,67
F ₈	1,15	33,90	4,50	43	0,93	27,41	0,92
F ₂₇	1,07	31,73	4,80	F ₃₃	1,10	32,21	0,98
F ₁₉	1,09	32,09	4,34	F ₅	0,99	28,86	0,76
M ₂₅	1,04	30,62	3,38	F ₃₈	1,06	31,16	0,86
M ₁₇	1,09	31,72	4,57	F ₄₂	1,19	34,87	0,91
M ₁₂	1,25	36,87	4,56	M ₃₂	1,05	30,80	1,09
M ₂₉	1,05	30,81	3,85	M ₃₉	0,81	23,77	0,99
26	0,65	19,22	2,67	33	0,62	18,12	4,06
8	0,67	19,79	3,16	5	0,94	27,72	0,89
27	0,63	19,55	3,24	38	0,56	16,33	3,94
19	0,80	23,59	1,26	42	0,62	18,18	4,64
25	0,71	20,72	3,02	32	0,65	19,04	4,26
17	0,68	20,04	3,52	39	0,58	16,92	3,80
12	0,60	17,69	3,08	F ₆	0,94	27,66	1,17
29	0,61	18,08	2,32	F ₁₁	0,71	20,73	0,91
F ₄₁	0,64	18,73	4,97	M ₁₅	0,48	14,20	1,25
F ₃₄	1,78	52,37	6,63	M ₂₈	0,66	19,542	1,25
F ₂₄	1,41	41,55	7,09	M ₃₆	0,99	29,09	0,95
F ₃₀	1,09	32,22	6,03	M ₃₉	0,74	21,84	0,82
F ₃₇	1,61	47,43	6,05	M ₄₅	0,66	19,43	0,95
M ₂₂	1,43	42,16	7,20	M ₄₆	0,98	28,68	0,51
M ₃₁	0,72	21,23	3,59	6	0,65	19,04	5,01
M ₃₅	0,70	20,71	4,11	11	0,63	18,42	5,89
41	0,99	29,01	6,06	15	0,53	15,60	4,61
34	0,52	15,27	4,22	28	0,65	19,01	5,16
24	0,62	18,23	5,25	36	0,62	18,34	5,20
30	0,55	16,23	7,82	39	0,64	18,88	4,76
37	0,50	14,67	4,59	45	0,62	18,24	4,91
22	0,58	17,17	5,09	46	0,71	20,93	4,94
31	0,47	13,82	4,21	M ₁	2,06	60,59	4,04
35	1,24	36,39	6,18	F ₂	2,49	73,49	4,47
F ₁₄	0,97	28,40	4,64	M ₃	1,93	56,64	3,46
F ₂₃	1,43	41,95	5,77	F ₉	1,95	57,41	3,87
F ₇	1,03	30,26	5,36	F ₁₀	1,77	52,17	2,84
M ₄	0,84	24,67	3,29	M ₁₈	1,52	44,63	3,91
M ₁₆	0,81	23,76	3,41	F ₂₀	1,43	42,06	5,76
M ₄₄	1,76	51,75	5,67	F ₂₁	0,82	24,23	3,65
M ₁₃	1,56	45,95	5,57	1	0,89	26,17	1,25
M ₄₃	1,30	38,18	5,37	2	0,82	24,11	2,33
14	0,50	14,64	3,55	3	0,86	25,19	1,66
23	0,99	29,18	0,64	9	0,89	26,20	2,99
7	1,00	29,40	0,68	10	1,61	47,35	2,81
4	0,77	22,53	1,61	18	1,73	50,88	3,89
16	0,76	22,42	1,43	20	2,27	66,76	1,76
44	1,10	32,41	0,85	21	1,01	29,68	3,84

F – żeńskie DNA, M – męskie DNA

Mimo iż, kilka prób podczas reakcji znakowania wykazywało odstępstwa względem wartości oczekiwanych w sprawdzanych parametrach, ich wykorzystanie w dalszych etapach eksperymentu macierzowego było uzasadnione z kilku powodów. Po pierwsze, wyznakowanie preparatów DNA było złożonym i trudnym procesem, który zależy w dużej mierze od jakości i czystości materiału genetycznego. Podczas znakowania nawet niewielkie różnice w warunkach reakcji mogły wpłynąć na ostateczny wynik. Ponadto, decyzja o wykorzystaniu preparatów DNA, które nie spełniły wszystkich kryteriów, wynikała z faktu, że w eksperymencie macierzowym badanych jest wiele próbek jednocześnie. Dlatego też konieczne było posiadanie odpowiedniej ilości prób w celu zminimalizowania strat materiału i możliwości przeprowadzenia eksperymentu na większej liczbie próbek. Wykorzystanie niewielkich ilości preparatu DNA nieznacznie odbiegającego od wartości rekomendowanych było wystarczające do uzyskania precyzyjnych wyników, co potwierdzono w dalszych etapach eksperymentu.

4.2. Analiza jakościowa i ilościowa preparatów RNA

4.2.1. Pomiar spektrometryczny i fluorometryczny

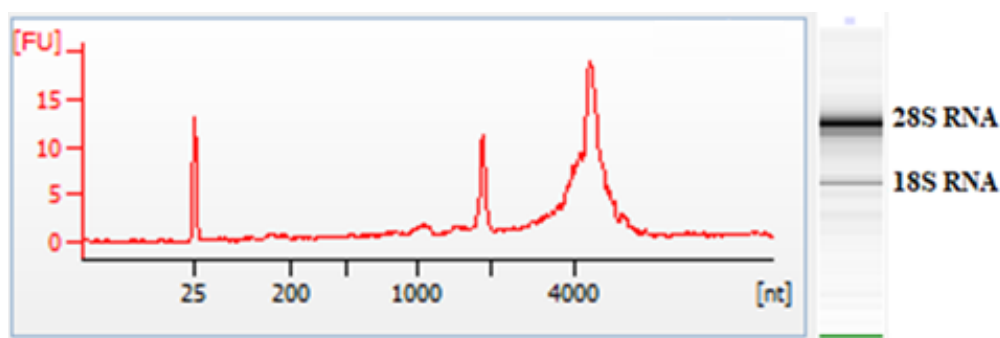
Z komórek białaczkowych od dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną lub mieloblastyczną wyizolowano całkowite RNA, które było poddawane analizie spektrofotometrycznej (Nanodrop) i fluorometrycznej (Qubit). Uzyskane parametry pozwoliły na ocenę jakości oraz ilości wyizolowanego RNA. Do dalszych badań wyselekcjonowano próby charakteryzujące się czystością 1,9-2,1 dla A260/A280 oraz 1,8-2,2 dla A260/A230. Wyniki przedstawiono w Tabeli 13 .

Tabela 13. Ilość i jakość wyizolowanego całkowitego RNA.

Numer próby	ilość RNA [$\frac{ng}{\mu l}$] (Nanodrop)	ilość RNA [$\frac{ng}{\mu l}$] (Qubit)	$\frac{A260}{A280}$	$\frac{A260}{A230}$	Numer próby	ilość RNA [$\frac{ng}{\mu l}$] (Nanodrop)	ilość RNA [$\frac{ng}{\mu l}$] (Qubit)	$\frac{A260}{A280}$	$\frac{A260}{A230}$
1	120,94	82,60	1,90	2,20	24	63,50	33,60	1,97	2,03
2	135,55	100,00	1,92	2,10	25	54,07	38,80	2,00	2,20
3	35,99	19,60	1,94	2,15	26	48,26	28,00	1,98	1,87
4	61,05	42,30	1,90	2,20	27	100,47	75,90	2,10	2,05
5	40,60	25,17	1,98	1,82	28	37,00	25,11	1,95	2,20
6	59,91	38,40	2,04	1,93	29	563,32	510,00	1,91	2,07
7	80,22	50,40	1,97	2,15	30	66,58	33,00	1,94	2,17
8	98,82	94,50	1,97	1,83	31	12,76	4,91	1,91	1,93
9	73,60	81,70	1,99	2,05	32	29,31	24,33	1,99	2,18
10	49,19	81,70	1,99	2,07	33	55,85	39,10	1,96	2,07
11	107,73	70,33	1,98	2,18	34	84,60	42,10	1,99	2,16
12	123,89	63,40	1,94	2,06	35	86,14	44,90	1,96	2,10
13	45,71	35,20	1,91	2,06	36	143,51	58,50	2,10	2,12
14	41,64	32,71	1,93	1,86	37	64,19	35,50	1,96	2,13
15	163,92	78,16	1,93	2,08	38	49,69	33,29	1,92	2,15
16	24,23	20,30	1,95	1,94	39	49,51	33,17	1,95	1,81
17	130,37	78,00	1,96	1,95	39	111,67	62,12	1,92	1,83
18	137,55	80,90	1,91	2,12	41	50,42	27,50	1,92	2,07
19	435,56	210,70	1,91	2,20	42	52,90	35,18	1,90	1,90
20	40,31	31,60	1,97	2,06	43	220,78	135,63	1,91	1,96
21	90,57	71,30	1,94	2,03	44	422,42	240,78	2,10	1,96
22	43,93	25,00	1,97	2,10	45	41,26	22,87	1,93	2,20
23	79,47	45,73	1,99	2,13	46	34,90	25,23	1,93	2,03

4.2.2. Bioanaliza całkowitego RNA

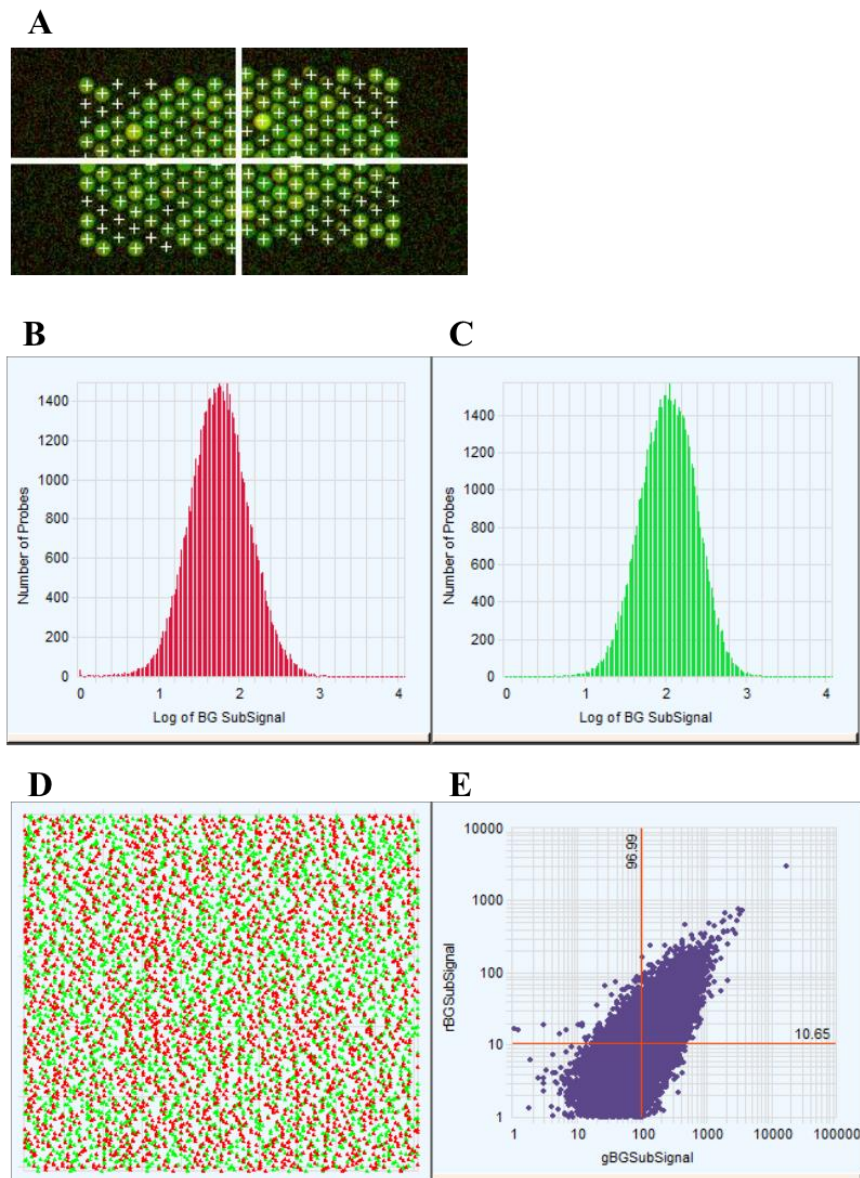
Zarówno bezpośrednio po etapie izolacji, jak i po enzymatycznym trawieniu zanieczyszczenia białkami, oceniono jakość prób RNA na podstawie rozdziału elektroforetycznego. RNA, który nie uległ degradacji na żelu, był widoczny jako dwa prążki wielkości 4 500 pz i 1 900 pz. Próby całkowitego RNA poddano także analizie elektroforezy kapilarnej. Jakość oceniono podczas analizy elektroforegramu, wykresu rozdziału elektroforetycznego oraz współczynnika integralności (RIN). RNA wysokiej jakości wyróżniało się dwoma pikami na wykresie symbolizującymi 18S i 28S RNA, co na elektroforegramie odpowiadało dwóm prążkom. Zanieczyszczenie preparatów TRIzolom można było zaobserwować dzięki obecności pików odpowiadających puli 5S RNA. Do hybrydyzacji wybierano próby RNA o wysokim współczynniku integralności, powyżej 7 (Rycina 14).



Rycina 14. Rozdział elektroforetyczny cRNA ze współczynnikiem RIN 9,3.

4.3. Analiza profilu cytogenetycznego

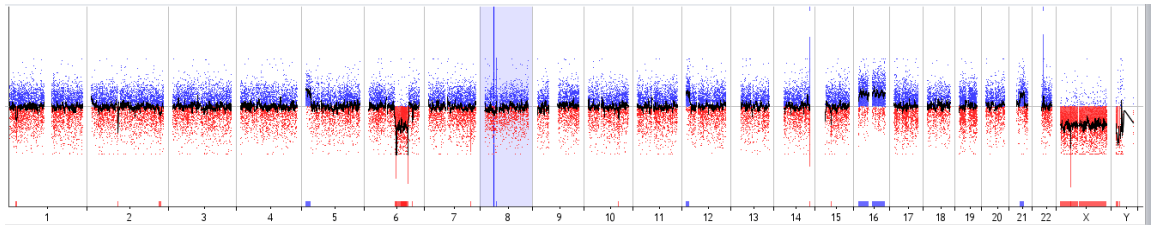
Po przeprowadzonym eksperymencie macierzowym CGH otrzymano raport, na podstawie którego oceniono czy reakcja miała prawidłowy przebieg (Rycina 15). Szukano punktów na czterech rogach macierzy, co sugerowało hybrydyzację do sond na całej powierzchni. Sprawdzone przestrzenne rozkład dodatnich i ujemnych współczynników logarytmicznych. Oczekiwano jak najbardziej równomiernego rozłożenia sygnałów zielonych i czerwonych. Ponadto, oceniono także intensywność sygnałów pochodzących od zhybrydowanego materiału. Prawidłowy wykres miał kształt funkcji gęstości rozkładu normalnego. Zanalizowano również sygnały pochodzące z tła.



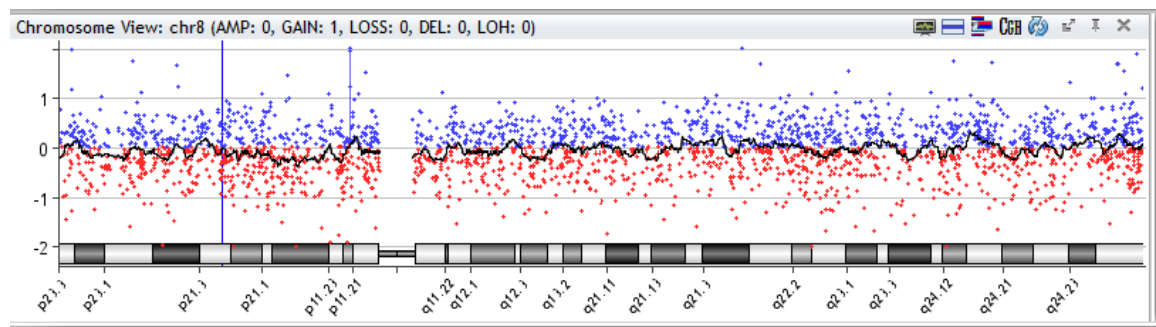
Rycina 15. Ocena jakości hybrydyzacji: A. Ocena hybrydyzacji sond na powierzchni macierzy; B. Przestrzenne rozkład dodatnich współczynników logarytmicznych; C. Przestrzenne rozkład ujemnych współczynników logarytmicznych; D. Histogram intensywności sygnałów z sond; E. Analiza korekcji tła.

Korzystając z programu Agilent CytoGenomics Edition 2.9.2.0 przeanalizowano rearanżacje cytogenetyczne dla 46 prób gDNA pochodzących od pacjentów pediatrycznych z ALL lub AML. Na Rycinie 16 przedstawiono wizualizację rearanżacji genomowych u przykładowego pacjenta.

A



B



Rycina 16. Wizualizacja przykładowych rearanżacji cytogenetycznych w DNA występujących u badanego pacjenta. A. Rozkład zmian z uwzględnieniem wszystkich chromosomów. Jasnym niebieskim paskiem zaznaczono chromosom 8. B. Rozkład zmian na chromosomie 8 z uwzględnieniem pozycji p21.2. Cienką niebieską linią zaznaczono fragment chromosomu, który uległ duplikacji.

Do szczegółowej analizy wyselekcjonowano powtarzające się delecje i duplikacje na chromosomach 5., 8., 9., 14., 15., 21. oraz 22. Dla tych zmian wykazano istotność statystyczną $p\text{-value} < 0,05$. W Tabeli 14 przedstawiono najczęstsze zmiany cytogenetyczne zidentyfikowane w grupie badanej pacjentów.

Tabela 14. Najczęstsze zmiany cytogenetyczne zidentyfikowane wśród grupy badanej pacjentów.

Aberracje chromosomowe	DNR	p-value	DOX	p-value	IDA	p-value	MIT	p-value	Geny
Del5q35.3-q32	S	0,033	-	-	S	0,035	-	-	<i>FBXO38, ABLIM3, SLC6A7, ARSI, ADAM19</i>
Amp8p11.21-p12	R	0,039	R	0,023	S	0,035	S	0,047	<i>FUT10, TTI2, RNF122, DUSP26, ZNF703, ADAM9, TM2D2, HTRA4, BAG4, LSM1</i>
Del9p21.3	S	0,033	R	0,029	S	0,035	S	0,034	<i>IFNA21, MTAP, CDKN2A, CDKN2B</i>
Amp14q32.33	S	0,049	-	-	S	0,022	S	0,049	<i>ADAM6, FAM30A</i>
Del15q11.2-q11.1	S	0,033	-	-	S	0,025	S	0,003	<i>HERC2P3, NBEAP1, CHEK2P2</i>
Del21p11.1-p11.2	S	0,019	-	-	S	0,025	-	-	<i>TEKT4P2, TPTE, BAGE</i>
Amp22q11.23-q11.22	S	0,049	R	0,027	S	0,035	-	-	<i>RSPH14, RAB36, GNAZ, BCR</i>

Del - delecja; Amp - amplifikacja; p - krótkie ramię chromosomu; q - długie ramię chromosomu; S - wrażliwość na lek; R - oporność na lek; DNR - daunorubicyna; DOX - doksorubicyna; IDA - idarubicyna; MIT - mitoksantron; p-value - istotność statystyczna

4.3.1. Analiza zmian na chromosomie 5.

Delecję fragmentu q23.1-q15 na chromosomie 5 zaobserwowano u dwóch pacjentów. W tym odcinku zlokalizowane są geny kodujące cytokiny uczestniczące w procesie dojrzewania limfocytów T (*TSLP*), a także geny kontrolujące przebieg apoptozy (*TNFAIP8*) [122, 127].

U pacjentów wrażliwych na daunorubicynę i idarubicynę stwierdzono występowanie delecji w obrębie odcinka q35.3-q32 na chromosomie 5. Na skutek tej zmiany utracone zostały geny uczestniczące w procesie ubikwitynizacji białek (*FBXO38*), a także geny zawierające domenę LIM o strukturze palca cynkowego, promujące interakcję pomiędzy białkami oraz uczestniczące w procesie karcenogenezy (*ABLIM3*) [128]. W wyniku delecji w obrębie chromosomu 5 utracone zostały także geny uczestniczące w selektywnym transporcie substancji przez błonę komórkową (*SLC6A7*), kodujące sulfatazy uczestniczące w sygnalizacji komórkowej i degradacji makrocząsteczek (*ARSI*), a także geny z rodziny ADAM kodujące metalopeptydazy odpowiedzialne za procesy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe, tj. adhezja, migracja komórek oraz transdukcja sygnałów istotnych w procesach zapalnych i chorobach nowotworowych (*ADAM19*) [122, 129, 130].

4.3.2. Analiza zmian na chromosomie 8.

Zarówno u pacjentów opornych na DNR i DOX, jak i wrażliwych na IDA i MIT zaobserwowano amplifikację fragmentu p11.21-p12 chromosomu 8. W tym regionie znajdują się między innymi geny kodujące białka posiadające aktywność fukozylotransferazy (*FUT10*) oraz regulujące odpowiedź na uszkodzenie DNA jako komponent potrójnego kompleksu T (*triple T complex*) uczestniczącego w regulacji

długości telomerów (*TTI22*) [122]. W zamplifikowanym fragmencie znajdują się także geny kodujące białka z domeną RING ważne w interakcjach białko-DNA (*RNF122*) oraz geny uczestniczące w defosforylacji (*DUSP26*) supresorów nowotworów, tj. p53, a także wiązaniu kwasów nukleinowych i oddziaływaniach z czynnikami transkrypcyjnymi (*ZNF703*) [131, 132].

W wyniku aberracji chromosomu 8. nadekspresjonowane mogły być geny kodujące białka zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy uczestniczące w procesach obejmujących interakcje między- i wewnątrzkomórkowe (*ADAM9*) oraz regulujące proces apoptozy i kaskadę sygnałów proliferacyjnych (*TM2D2*) [122, 133].

Rearanżacja w obrębie 8 chromosomu mogła spowodować nadekspresję genów odgrywających ważną rolę w transformacji komórkowej i progresji nowotworów (*LSMI*), powiązanych z działaniem hamującym rozwój nowotworów, uczestnictwem w odpowiedzi na stres (*HTRA4*) oraz kodujących białka antyapoptotyczne (*BAG4*) [122].

4.3.3. Analiza zmian na chromosomie 9.

Delecję fragmentu p21.3 w obrębie 9. chromosomu wykryto u pacjentów wrażliwych na daunorubicynę, idarubicynę i mitoksantron oraz opornych na doksorubicynę. Rearanżacja ta spowodowała utratę genów kodujących inhibitory kinaz cyklinozależnych (*CDKN2A*, *CDKN2B*), które regulują działanie kinazy CDK4 i p53 w progresji cyklu komórkowego kontrolując fazę G1 [122]. Delecji uległy także geny kodujące enzymy (*MTAP*) odpowiedzialne za metabolizm poliaminy, których deficyt często obserwuje się razem z współistniejącą delecją *CDKN2A* [134]. Utracone zostały również geny kodujące cytokiny uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej na wirusy (*IFNA21*) [122].

4.3.4. Analiza zmian na chromosomie 14.

Amplifikację regionu q32.33 chromosomu 14. wykryto u pacjentów wrażliwych na daunorubicynę, idarubicynę i mitoksantron. W tym fragmencie znajdują się geny związane z klasą niekodujących RNA (*FAM30A*) oraz pseudogeny (niedziałające kopie genu) z rodziny metaloproteinaz (*ADAM6*) [122].

4.3.5. Analiza zmian na chromosomie 15.

Na podstawie wyników eksperymentów mikromacierzowych wykazano obecność delecji 15q11.2-11.1 u pacjentów wrażliwych na daunorubicynę, idarubicynę i mitoksantron. W usuniętym regionie znajdują się głównie pseudogeny (*NBEAP1*, *CHEK2P2*), a część z nich może mieć potencjalny udział w procesie ubikwitylizacji

białek (*HERC2P3*) [122]. Do niedawna rola pseudogenów w jakichkolwiek szlakach komórkowych była bagatelizowana i uznawana za wątpliwą. Dopiero w ostatnich latach przypisuje się im ważną funkcję w działaniu komórek. Naukowcy dowiedli deregulację pseudogenów w progresji nowotworowej [135].

4.3.6. Analiza zmian na chromosomie 21.

Delecja p11.1-p11.2 w obrębie 21 chromosomu została wykryta u pacjentów wrażliwych na daunorubicynę i idarubicynę. Na skutek tej rearanżacji utracone zostały geny zaangażowane w odporność komórkową (*BAGE*), transdukcję sygnałów (*TEKT4P2*) oraz pseudogeny (*TPTE*) [122].

4.3.7. Analiza zmian na chromosomie 22.

Amplifikację 22q11.22 wykryto u pacjentów wrażliwych na daunorubicynę i idarubicynę oraz opornych na doksorubicynę. W tym odcinku znajdują się geny kodujące białka o aktywności GTPaz (*BCR*, *RAB36*) oraz zaangażowane w transdukcję sygnałów (*GNAZ*) [122, 136]. Funkcja genu *RSPH14* zlokalizowanego w zamplifikowanym fragmencie chromosomu do tej pory nie została poznana [122].

4.3.8. Podsumowanie

W oparciu o analizę cytogenetyczną pacjentów pediatrycznych wykazano, że amplifikacje najczęściej dotyczyły chromosomu 8. Obejmowały one geny supresorowe i uczestniczące w transformacji nowotworowej, a także geny odpowiedzialne za defosforylację białek. Ponadto wśród genów zduplikowanych znajdowały się geny odpowiedzialne za indukcję sygnałów i czynniki transkrypcyjne. Natomiast delecji ulegały fragmenty zawierające geny kodujące cytokiny, regulatory procesu apoptozy, ubikwitynizacji i cyklu komórkowego.

4.4. Analiza profili ekspresji genów w opornych limfoblastach i mieloblastach

Analizie poddano w sumie 7 transkryptomicznych profili oporności na poszczególne antracykliny osobno dla ostrej białaczki limfoblastycznej i mieloblastycznej. Profil pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną dla doksorubicyny nie był analizowany, ponieważ lek ten nie jest rutynowo stosowany w protokole leczenia.

4.4.1. Ogólna charakterystyka profili ekspresji

Najwięcej zestawów sond (669) i genów (472) odnotowano w profilu oporności na daunorubicynę w ostrej białaczce mieloblastycznej (Tabela 15, Tabela 16), z kolei

najmniej w profilu oporności na doksorubicynę (145/120) oraz na idarubicynę (132/103) w ostrej białaczce limfoblastycznej. W Tabeli 16 zaprezentowano przykłady genów z największym wzrostem i spadkiem poziomu ekspresji dla każdego z badanych leków zarówno w ostrej białaczce limfoblastycznej, jak i mieloblastycznej u pacjentów pediatrycznych.

W profilach oporności na doksorubicynę i daunorubicynę w limfoblastach aż ~75% wyselekcjonowanych genów było nadekspymowanych. Z kolei największy udział genów ze spadkiem ekspresji odnotowano dla profilu oporności na idarubicynę w mieloblastach (~74%). Genami, którym przypisano najwięcej zestawów sond, były np. *TCF4* (7 sond) i *HLA-DRB1* (4 sondy) w profilu oporności na idarubicynę w komórkach pobranych od pacjentów pediatrycznych z ALL oraz *LST1* (5 sond) w profilu oporności na idarubicynę w mieloblastach.

Tabela 15. Charakterystyka profili ekspresji uwzględniająca podział na poszczególne leki antracyklinowe i ostre białaczki.

Lek	DOX	DNR		IDA		MIT	
Białaczka	ALL	ALL	AML	ALL	AML	ALL	AML
Liczba sond	145	169	669	132	160	167	208
Liczba sond ze wzrostem poziomu ekspresji	108	121	218	69	46	75	109
Liczba sond ze spadkiem poziomu ekspresji	37	48	451	63	114	92	99
Krotność zmiany dla genów wykazujących wzrost poziomu ekspresji	R= 2,690 (2,003-4,277)	R= 2,747 (2,010-4,826)	R= 6,703 (2,003-51,747)	R= 2,377 (2,007-3,487)	R= 5,136 (2,107-17,842)	R= 2,474 (2,000-5,096)	R= 4,795 (2,006-25,944)
Krotność zmiany dla genów wykazujących spadek poziomu ekspresji	R=0,380 (0,105-0,498)	R=0,354 (0,116-0,500)	R=0,312 (0,013-0,499)	R=0,400 (0,164-0,500)	R=0,363 (0,031-0,498)	R=0,386 (0,168-0,498)	R= 0,380 (0,025-0,499)
p-value dla genów wykazujących wzrost poziomu ekspresji	< 0,05 (zakres od 1,27E-05 do 9,91E-03)	< 0,05 (zakres od 1,30E-06 do 9,97E-03)	< 0,05 (zakres od 6,66E-06 do 9,94E-03)	< 0,05 (zakres od 1,79E-02 do 6,42E-03)	< 0,05 (zakres od 8,74E-04 do 9,96E-03)	< 0,05 (zakres od 6,05E-05 do 4,91E-02)	< 0,05 (zakres od 1,67E-04 do 4,89E-02)
p-value dla genów wykazujących spadek poziomu ekspresji	< 0,05 (zakres od 1,19E-04 do 9,75E-03)	< 0,05 (zakres od 1,49E-04 do 9,83E-03)	< 0,05 (zakres od 1,09E-12 do 9,99E-03)	< 0,05 (zakres od 1,61E-02 do 4,03E-03)	< 0,05 (zakres od 1,56E-04 do 9,96E-03)	< 0,05 (zakres od 1,71E-04 do 4,98E-02)	< 0,05 (zakres od 2,24E-04 do 4,99E-02)

Tabela 16. Lista genów z największą zmianą (wzrostem ↑ i spadkiem ↓) poziomu ekspresji dla poszczególnych antracyklin i ostrych białaczek. Geny uszeregowano zgodnie z wartościami istotności statystycznej *p*-value i krotnością zmiany poziomu ekspresji (*Fold Change*, FC).

Lek	Ostra białaczka limfoblastyczna					Ostra białaczka mieloblastyczna				
	Liczba genów	Geny z największą zmianą ekspresji	Nazwa genu	<i>Fold change</i>	<i>p</i> -value	Liczba genów	Geny z największą zmianą ekspresji	Nazwa genu	<i>Fold change</i>	<i>p</i> -value
DOX	120 (89↑, 31↓)	<i>MNDA</i>	<i>myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	4,2765	0,0013	-	-	-	-	-
		<i>CD7</i>	<i>CD7 molecule</i>	4,2648	0,0051		-	-	-	-
		<i>SH2D1A</i>	<i>SH2 domain containing 1A</i>	4,2057	0,0088		-	-	-	-
		<i>IGHM</i>	<i>immunoglobulin heavy constant mu</i>	-4,1286	0,0028		-	-	-	-
		<i>CD9</i>	<i>CD9 molecule</i>	-5,1824	0,0082		-	-	-	-
		<i>NPY</i>	<i>neuropeptide Y</i>	-9,5023	0,0019		-	-	-	-
DNR	145 (109↑, 36↓)	<i>TSPAN7</i>	<i>tetraspanin 7</i>	4,8256	0,0015	472 (157↑, 315↓)	<i>S100A9</i>	<i>S100 calcium binding protein A9</i>	41,6258	0,0042
		<i>MNDA</i>	<i>myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	4,7061	0,0007		<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2-related protein A1</i>	40,2794	0,0098
		<i>SCD</i>	<i>stearoyl-CoA desaturase</i>	4,6363	0,0004		<i>HLA-DRB1 /// HLA-DRB3 /// HLA-DRB4 /// HLA-DRB5</i>	<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 /// major histocompatibili</i>	40,2477	0,0095
		<i>CD19</i>	<i>CD19 molecule</i>	-4,8009	0,0054		<i>SNCAIP</i>	<i>synuclein, alpha interacting protein</i>	-47,3735	0,0000
		<i>SOX11</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 11</i>	-7,8746	0,0060		<i>DPPA4</i>	<i>developmental pluripotency associated 4</i>	-53,8953	0,0000
		<i>PCDH9</i>	<i>protocadherin 9</i>	-8,6202	0,0001		<i>MAMDC2</i>	<i>MAM domain containing 2</i>	-78,1021	0,0020
IDA	103 (61↑, 42↓)	<i>NLGN4X</i>	<i>neuroligin 4 X-linked</i>	3,4871	0,0064	117 (30↑, 87↓)	<i>HOPX</i>	<i>HOP homeobox</i>	14,5295	0,0102
		<i>SH2D1A</i>	<i>SH2 domain containing 1A</i>	3,2731	0,0296		<i>ADM</i>	<i>adrenomedullin</i>	8,7594	0,0218
		<i>SCD</i>	<i>stearoyl-CoA desaturase</i>	3,2431	0,0066		<i>NFIL3</i>	<i>nuclear factor, interleukin 3 regulated</i>	4,6522	0,0152
		<i>HLA-DQA1 /// HLA-DQA2 /// LOC100294224 /// LOC100294317</i>	<i>HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 2 chain, HLA-DQA2, ortholog</i>	-4,2435	0,0071		<i>LPPR3</i>	<i>phospholipid phosphatase related 3</i>	-4,3512	0,0041
		<i>NPY</i>	<i>neuropeptide Y</i>	-4,4485	0,0392		<i>NRXN2</i>	<i>neurexin 2</i>	-4,9550	0,0116
		<i>SOX11</i>	<i>SRY-box transcription factor 11</i>	-6,1066	0,0161		<i>TTC28</i>	<i>tetratricopeptide repeat domain 28</i>	-5,7575	0,0191
MIT	129 (61↑, 68↓)	<i>SH2D1A</i>	<i>SH2 domain containing 1A</i>	5,0957	0,0026	149 (72↑, 77↓)	<i>PROM1</i>	<i>prominin 1</i>	25,9442	0,0115
		<i>DAPK1</i>	<i>death associated protein kinase 1</i>	3,5557	0,0053		<i>IL8</i>	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>	16,7442	0,0002
		<i>CD7</i>	<i>CD7 molecule</i>	3,2623	0,0072		<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2 related protein A1</i>	15,4416	0,0013
		<i>SOX11</i>	<i>SRY-box transcription factor 11</i>	-4,5141	0,0429		<i>ZNF503</i>	<i>zinc finger protein 503</i>	-8,8040	0,0377
		<i>TCL1A</i>	<i>TCL1 family AKT coactivator A</i>	-4,9010	0,0262		<i>IRX3</i>	<i>Iroquois homeobox 3</i>	-13,1454	0,0480
		<i>NPY</i>	<i>neuropeptide Y</i>	-5,9680	0,0136		<i>XIST</i>	<i>X inactive specific transcript (non-protein coding)</i>	-39,8287	0,0286

4.4.2. Analiza ontologiczna

W celu klasyfikacji genów pod względem pełnionych funkcji, udziału w procesach metabolicznych i szlakach komórkowych dokonano analizy ontologicznej z wykorzystaniem bazy danych Panther wersja 7.0. Analizy przeprowadzono dla wszystkich wyselekcjonowanych genów, dla których odnotowano co najmniej 2-krotną zmianę w poziomie ekspresji oraz p -value $< 0,05$ w poszczególnych profilach oporności na antracykliny.

4.4.2.1. Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilu limfoblastów opornych na dokсорubicynę

W limfoblastach opornych na dokсорubicynę, na podstawie analizy wyselekcjonowanych genów pod kątem funkcji molekularnych (Rycina 17) wykazano, że najwięcej genów zaangażowanych było w wiązanie białek (69%) i kwasów nukleinowych (20%). Zróznicowany poziom ekspresji wykazano również dla genów o aktywności hydrolaz (54%) oraz transferaz (31%).

Ponad 2-krotną zmianę poziomu ekspresji zaobserwowano dla 20 genów odpowiedzialnych za wiązanie białek, tj. *CLEC2D* (FC=-2,33) i *CSF3R* (FC=2,64). Około 56% z nich posiada funkcję receptorową. Jedną z wyższych wartości wzrostu poziomu ekspresji wykazano dla *TSPAN7* (FC=3,72). Białko kodowane przez ten gen uczestniczy w transdukcji sygnałów, odgrywającą kluczową rolę w regulacji rozwoju komórek, ich aktywacji, wzrostu oraz ruchliwości. Ponadto oddziałuje z integrzynami. Dowiedziono, że nadekspresja *TSPAN7* jest bezpośrednio związana z diagnozą szpiczaka mnogiego oraz jego progresją [137], a także promuje migrację i proliferację komórek raka płuca [138]. Oporność limfoblastów na dokсорubicynę może być związana z nadekspresją genami z rodziny S100 (*S100A11* (FC=2,72), *S100P* (FC=2,81), *S100A9* (FC=2,81), *S100A12* (FC=3,87), *S100A8* (FC=2,60)). Białka przez nie kodowane wiążą wapń i biorą udział w regulacji postępowania cyklu komórkowego. Ich zmieniona ekspresja obserwowana jest w przerzutach nowotworowych. Nadekspresja *S100A11* została odnotowana w chłoniaku anaplastycznym [139], natomiast podwyższona ekspresja *S100A9* powoduje oporność na glikokortykosteroidy w niemowlęcej ostrej białaczce limfoblastycznej z rearanżacjami *MLL* [140].

W analizowanym profilu zaobserwowano najwyższy wzrost poziomu ekspresji dla genów, tj. *MNDA* (FC=4,28) *CD7* (FC=4,26) i *SH2D1A* (FC=4,21). Gen *MNDA* może być potencjalnie związany z różnicowaniem się komórek w przebiegu białaczki ostrej i

przewlekłej. Nadekspresja jest szczególnie charakterystyczna dla typu M3 [141]. Białka transbłonowe będące immunoglobulinami (np. CD7) znajdują się na komórkach T i uczestniczą w interakcjach między komórkami T i B [142]. Gen *SH2D1A* koduje białko uczestniczące w stymulowaniu funkcji komórek T i B [143]. Białko to może również wiązać się z innymi cząsteczkami powierzchniowymi np. na komórkach NK i tym samym modyfikować szlak sygnalizacji międzykomórkowej.

Największy spadek ekspresji odnotowano dla genów, tj. *BLK* (FC=-3,02), *HBEGF* (FC=-3,03), *IGHM* (FC=-4,13), *GREM1* (FC=-4,11), *CD9* (FC=-5,18), *NPY* (FC=-9,50). Gen *BLK* koduje kinazę tyrozynową i jest zaangażowany w proliferację oraz różnicowanie komórek. Odgrywa ważną rolę w sygnalizacji receptorowej komórek B i w ich rozwoju [144]. HBEGF jest czynnikiem wzrostu, który odpowiada m.in. za proliferację komórek i w literaturze jest wspominany jako potencjalny punkt docelowy w terapii T-ALL [145]. Gen *IGHM* koduje immunoglobulinę rozpoznającą cząsteczki znajdujące się na powierzchni komórek B. Pełni ona istotną funkcję w eliminowaniu zaburzeń prowadzących do zmian przednowotworowych i nowotworowych [146]. Białko kodowane przez *CD9* uczestniczy w adhezji, transdukcji sygnału oraz zmiany w ekspresji tego genu odgrywają kluczową rolę w osłabianiu ruchliwości komórek nowotworowych wpływającej na przerzuty. *CD9* reguluje oporność na leki i rozwój ostrej białaczki szpikowej [147]. Jego wyciszenie hamuje postęp pediatricznej B-ALL i zwiększa chemowrażliwość [148].

Wśród genów uczestniczących w wiązaniu kwasów nukleinowych największą grupę stanowiły geny skorelowane z interakcjami z DNA. Ponad 2-krotny spadek ekspresji odnotowano dla *TERT* (FC=-2,24), *TLE4* (FC=-2,22), *MSH6* (FC=-2,18) i *NR3C1* (FC=-2,14). Telomeraza TERT jest polimerazą rybonukleoproteinową, która utrzymuje końce telomeru przez dodanie powtórzenia telomerów TTAGGG. Telomeraza odgrywa ważną rolę w starzeniu się komórek i może być zaangażowana w onkogenezę [149]. Ponadto ma działanie przeciwapoptotyczne, a wzmożona aktywność telomerazy pomaga komórkom nowotworowym być odpornymi na indukowaną chemioterapeutycznie śmierć komórek. Hipomorficzne warianty genu *TERT* (*hTERT*) występują z częstością 3-5% w ostrej białaczce mieloblastycznej. TERT jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u dziecięcych pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną i wydaje się predysponować tych pacjentów do toksyczności związanej z leczeniem [150]. Ponadto, nadmierna ekspresja *hTERT* sprzyja rozwojowi oporności na imatynib

[151]. Korelację *TERT* wykazano także w chemioterapii innych nowotworów, tj. rak wątroby [152], gelajki [153] oraz rak piersi [154].

Niewrażliwość limfoblastów na doksorubicynę może mieć związek z zaburzeniami ekspresji genów odpowiedzialnych za wiązanie receptorów. W tej grupie aż 14 genów wykazywało ponad 2-krotny wzrost ekspresji (np.: *ICAM3* (FC=2,47), *LTB* (FC=2,56), *TGFB1* (FC=2,00)), a 6 genów wykazywało ponad 2-krotny spadek (np.: *CLIC4* (FC=-2,48), *CLEC2D* (FC=-2,33), *HBEGF* (FC=-3,04)). Podobne obserwacje wykazano w limfoblastach opornych na daunorubicynę, gdzie większość genów mających aktywność receptorową wyróżniała się wzrostem poziomu ekspresji (podrozdział 4.4.2.2.). Natomiast przeciwnie sytuacja wyglądała w profilach oporności na idarubicynę w limfoblastach i mieloblastach, gdzie geny z tej grupy były wyciszane. Międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna *ICAM3* jest najbardziej eksprymowana przez leukocyty i uczestniczy w inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Funkcjonuje także jako ważna cząsteczka sygnalizacyjna. Wyciszenie *ICAM3* zmniejsza oporność na chemioterapię w raku piersi i raku płuc [155]. Kanały chlorkowe kodowane m.in. przez *CLIC4* regulują podstawowe procesy komórkowe (stabilizację potencjału błony komórkowej, transport przez błonę komórkową, utrzymanie pH wewnątrzkomórkowego, regulację objętości komórek). *CLIC4* odgrywa rolę w angiogenezie i utrzymywaniu polarności błony podczas mitozy i cytokinezy. Może także promować proliferację komórek [156].

4.4.2.2. Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na daunorubicynę

W oparciu o analizę wyselekcjonowanych genów w profilu oporności na daunorubicynę dla limfoblastów i mieloblastów pod kątem funkcji molekularnych (Rycina 17) wykazano, że najwięcej genów zaangażowanych było w wiązanie białek (odpowiednio w limfoblastach 63% i mieloblastach 44%) i kwasów nukleinowych (20% i 55%). Zróznicowany poziom ekspresji wykazano również dla genów o aktywności hydrolaz (48% i 36%) oraz transferaz (23% i 33%).

W analizowanym profilu dla komórek opornych pozyskanych od pacjentów z ALL zaobserwowano najwyższy wzrost poziomu ekspresji dla genów, tj. *CXCL2* (FC=4,46), *AKR1C3* (FC=4,11), *BCL2A1* (FC=3,87) i *AZU1* (FC=3,81). Natomiast w mieloblastach nadeksprymowane były geny, tj. *S100A9* (FC=41,62), *BCL2* (FC=40,28), *HLA-DRA* (FC=32,29), *SPINT2* (FC=28,66), *RGS10* (FC=27,16), *IFITM1* (FC=27,03), *TYMS*

(FC=25,48), *BST2* (FC=23,85). Wykazywały one najwyższy wzrost poziomu ekspresji spośród wszystkich analizowanych profili w niniejszej pracy. *AKR1C3* uczestniczy w kontroli wzrostu i różnicowania się komórek. Występowanie polimorfizmów *AKR1C3* może być ważnym markerem predykcyjnym określającym zwiększone ryzyko białaczek u dzieci [157]. Ponadto indukcja działania aldo-keto reduktaz znosi skuteczność działania chemioterapii z użyciem daunorubicyny dla komórek białaczkowych [158]. Wśród szlaków powiązanych z *IFITM1* znajduje się przetwarzanie i prezentacja antygeny za pośrednictwem głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*, MHC) klasy I i sygnalizacja interferonu gamma. *IFITM1* ma również wpływ na adhezję, kontrolę wzrostu oraz migracji komórek. Odgrywa kluczową rolę w antyproliferacyjnym działaniu IFN- γ (*interferon gamma*) poprzez hamowanie aktywacji ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) lub hamowanie wzrostu komórek w fazie G1 w sposób zależny od p53. Ważnym paralogiem *IFITM1* jest *IFITM3*, którego wysoka ekspresja może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym dla AML [159].

Największy spadek ekspresji genów w limfoblastach opornych na daunorubicynę odnotowano dla genów, tj. *CD24* (FC=-3,67), *BLNK* (FC=-4,33), *PAX5* (FC=-4,77), *CD19* (FC=-4,80), *SOX11* (FC=-7,87), *PCDH9* (FC=-8,62). Natomiast dla mieloblastów inhibicję ekspresji zaobserwowano dla *GATA2* (FC=-65,33), *DPPA4* (FC=-53,90), *SNCAIP* (FC=-47,37), *USP44* (FC=-47,21), *MYCN* (FC=-32,68), *HOXA11* (FC=-23,28) i *FTO* (FC=-17,80). Gen *CD24* reguluje sygnały wzrostu i różnicowania się granulocytów i limfocytów typu B. *CD24* koreluje z opornością na sorafenib poprzez aktywację autofagii w raku wątroby [160]. Uważa się, że wzrost ekspresji *CD24* ma związek z gorszym przeżyciem całkowitym i czasem wolnym od nawrotu po leczeniu taksanami w raku piersi [161]. Białko kodowane przez *BLNK* odgrywa istotną rolę w aktywacji NF- κ B oraz w indukcji apoptozy komórek B z udziałem BCR (*breakpoint cluster region protein*). Obniżoną ekspresję zaobserwowano w pre-B ALL. *BLNK* uczestniczy w szlaku oporności na ibrutinib w chemioterapii chłoniaka z komórek płaszczka [162]. Czynnikiem transkrypcyjnym *PAX5* koduje białko aktywujące komórki B, którego obecność jest charakterystyczna w późniejszych fazach rozwoju limfocytów B. *PAX5* promuje aktywację szlaku NF- κ B i wzmacnia lekooporność w zaburzeniach limfoproliferacyjnych typu B [163]. Zmiany w ekspresji *PAX5* prowadzą do transformacji nowotworowej, w tym białaczek [164]. Kolejny ważny czynnik transkrypcyjny to *GATA2*, który odgrywa istotną rolę w regulacji transkrypcji genów zaangażowanych w rozwój i proliferację linii komórek hematopoetycznych i endokrynych. Mutacje *GATA2* są związane z

dziedzicznymi i nabytymi zaburzeniami immunologicznymi, w tym z zespołem mielodysplastycznym [165] i ostrą białaczką szpikową [166]. Ponadto nadekspresja *GATA2* obserwowana jest w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca (*non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC) spowodowanego przez *KRAS*, w którym modele przedkliniczne wskazały korzyści terapeutyczne z ukierunkowania na szlaki z udziałem *GATA2* [167]. Zmniejszona ekspresja *GATA2* koreluje ze zwiększoną wrażliwością komórek ostrej białaczki szpikowej na chemioterapię [168]. Czynn timeranskrypcyjny *HOXA11* może regulować ekspresję genów, morfogenezę i różnicowanie komórek. W oparciu o najnowsze badania sugeruje się, że reguluje on także oporność na chemioterapię poprzez interakcje z p53. Spadek ekspresji *HOXA11* koreluje ze spadkiem ekspresji *p53* oraz zwiększoną wrażliwością komórek białaczkowych na leczenie [169].

W limfoblastach opornych na daunorubicynę dla wszystkich genów uczestniczących w wiązaniu kalmoduliny wykazano ponad 2-krotny wzrost ekspresji względem komórek wrażliwych. W tej grupie można było wyróżnić: *PRKCH* (FC=2,46), *S100A11* (FC=3,32), *S100P* (FC=3,16), *AIF1* (FC=2,03) oraz *TESC* (FC=3,08). Kinaza białkowa C kodowana przez *PRKCH*, fosforyluje szereg różnych celów białkowych, które są zaangażowane w szlaki sygnalizacji komórkowej. Stanowi ona główny receptor dla promotorów nowotworowych. Reguluje przekazywanie sygnału NF- κ -B i zapewnia ochronę przed apoptozą indukowaną przez DNA. Promuje onkogeniczne funkcje *ATF2*, blokując jego funkcję apoptotyczną w mitochondriach. *PRKCH* reguluje czynność hematopoetycznych komórek macierzystych i koreluje ze złym rokowaniem w ostrej białaczce szpikowej [170].

W mieloblastach zaobserwowano wyciszenie wszystkich genów wykazujących aktywność czynnimeranskrypcyjnego wiążącego białko. Do tej grupy należą, m.in.: *SLC2A4RG* (FC=-6,14), *MED13L* (FC=-3,61), *SPOPL* (FC=-2,15), *NCOR1* (FC=-2,88), *ELL2* (FC=-2,52), *GON4L* (FC=-4,73), *OCNLN* (FC=-8,33) oraz *CCNL2* (FC=-3,43). Gen *NCOR1* pośredniczy w niezależnej od liganda replikacji transkrypcyjnej receptorów kwasu retinowego poprzez promowanie kondensacji chromatyny i zapobieganie dostępu do maszyny transkrypcyjnej. Jest on częścią kompleksu, który obejmuje również deacetylazy histonowe i regulatory transkrypcji. *NCOR1* uczestniczy w odpowiedzi molekularnej na dazatynib w nawrotowej ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci z fuzją *NCOR1-LYN* [171].

Zróznicowany poziom ekspresji genów o aktywności transferaz m.in.: *QRSLL1* (FC=-2,65), *SLAMF1* (FC=-2,44), *FGR* (FC=2,58) i *PYGL* (FC=2,50), było cechą

charakterystyczną limfoblastów opornych na daunorubicynę. Natomiast, w profilu dla mieloblastów odnotowano tłumienie ekspresji dla zdecydowanej większości genów z tej grupy, np.: *PDGFC* (FC=-2,28), *DPY19L2* (FC=-27,58), *RAD9A* (FC=-3,34), *IP6K2* (FC=-3,04), *SIK3* (FC=-2,75) oraz *AUH* (FC=-2,51). Istotną obserwacją był fakt, że dla genów o aktywności transferaz wykazano inhibicję ekspresji także w profilu oporności na mitoksantron dla obu typów blastów białaczkowych (podrozdział 4.4.2.4.) Interesującym genem jest *RAD9A*, wymagany do zatrzymania cyklu komórkowego i naprawy uszkodzeń DNA. Białko *RAD9A* posiada aktywność egzonukleazy 3' do 5', co może przyczyniać się do jego roli w wykrywaniu i naprawianiu uszkodzeń DNA. Naukowcy dowiedli, że poziom metylacji regionu chromosomu 2. obejmującego *RAD9A* ma wpływ na przeżycie komórek białaczkowych [172].

W opornych limfoblastach większość genów mających aktywność receptorową była nadekspresjonowana (np.: *CSF3R* (FC=2,62), *SELL* (FC=3,05), *FCAR* (FC=2,07), *TNFSF10* (FC=2,23), *FPR1* (FC=2,30), *CLEC7A* (FC=2,03), *CD7* (FC=4,31)). Tłumienie ekspresji odnotowano dla genów receptorowych, tj. *CD22* (FC=-2,50), *NR1D2* (FC=-2,20), *SLAMF1* (FC=-2,44), *PTCH1* (FC=-3,38). Choroby związane z *CD22* obejmują odporne na leczenie nowotwory hematologiczne i oporną białaczkę włochatokomórkową. Wśród powiązanych szlaków jest linia komórkowa hematopoetyczna i szlak sygnałowy receptora komórek B. Poziom ekspresji *CD22* jest związany z reakcją na leczenie moxetumomabem i inotuzumabem w pediatrycznej ALL [173, 174].

4.4.2.3. Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na idarubicynę

Szczegółowa analiza wyselekcjonowanych genów w profilu oporności na idarubicynę dla limfoblastów i mieloblastów pod kątem funkcji molekularnych (Rycina 17) pokazała, że najwięcej genów zaangażowanych było w wiązanie białek (limfoblasty 67% i mieloblasty 44%) i kwasów nukleinowych (22% i 42%). Zróznicowany poziom ekspresji wykazano również dla genów o aktywności hydrolaz (44% i 51%) i transferaz (22% i 26%).

W limfoblastach niewrażliwych na idarubicynę zaobserwowano najwyższy wzrost poziomu ekspresji dla genów, tj. *CXCL1* (FC=2,69), *S100A12* (FC=2,90), *CRISP3* (FC=2,92), *ITGAM* (FC=2,98) i *OLFM4* (FC=2,99). Z kolei w mieloblastach najwyższy wzrost poziomu ekspresji wykazano dla genów, tj. *LST1* (FC=2,65), *ANPEP* (FC=3,12),

BST2 (FC=3,45), *CCL3L1* (FC=4,06), *NFIL3* (FC=4,65). Istotnym czynnikiem antyapoptotycznym jest *OLFM4*. Promuje on wzrost guza i jest pozakomórkową glikoproteiną macierzy ułatwiającą przyleganie komórek najprawdopodobniej poprzez interakcje z lektynami powierzchniowymi i kadheryną. Może promować proliferację komórek nowotworowych przez faworyzowanie przejścia z fazy S do fazy G2/M. W białaczce szpikowej hamuje wzrost komórek i indukuje ich różnicowanie oraz apoptozę. *OLFM4* może odgrywać rolę w hamowaniu fosforylacji lub dezaktywacji EIF4EBP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) [175]. Poziom białka EIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) jest podwyższony w większości przypadków niemowlęcej ALL. Na podstawie badań sugeruje się, że *OLFM4* może być genem celowanym w terapii rybawiryną, która ma właściwości przeciwnowotworowe poprzez hamowanie EIF4E [176].

Największy spadek ekspresji podczas analizy funkcji molekularnych w limfoblastach opornych na idarubicynę odnotowano dla genów, tj. *MDK* (FC=-2,60), *KLF11* (FC=-2,61), *TCF4* (FC=-3,32), *NPY* (FC=-4,45), *SOX11* (FC=-6,12), natomiast w mieloblastach, tj. *GPR153* (FC=-2,65), *ZNF117* (FC=-2,90), *PRAME* (FC=-2,91), *TWIST1* (FC=-3,31). Czynnikiem transkrypcyjnym *SOX11* zaangażowany jest w regulację rozwoju embrionalnego i w określanie losu komórek. Kodowane białko może działać jako regulator transkrypcji po utworzeniu kompleksu białkowego z innymi białkami. Hipometylacja DNA w *locus* genu *SOX11* koreluje ze złą prognozą na wyzdrowienie z B-ALL u pacjentów pediatrycznych [177]. Uważa się, że ekspresja genów *SOX* może mieć znaczenie prognostyczne w AML u dorosłych [178]. Kolejnym ważnym czynnikiem transkrypcyjnym jest *TCF4*, który jest nadekspresjonowany w komórkach z mutacjami *RUNX1*, natomiast obniżona ekspresja jest obserwowana w komórkach z aberracją t(8;21) w AML [179]. *TWIST1* również koduje czynnik transkrypcyjny. Jest on hipermetylowany i nadmiernie ekspresjonowany w wielu nowotworach, a kodowane białko sprzyja inwazji komórek nowotworowych i przerzutom [180, 181]. Zmiany genetyczne w obrębie *TWIST1* korelują z opornością wielolekową w raku jelita grubego poprzez wymuszanie wzrostu ekspresji transporterów z rodziny ABC, a także związane są z opornością na cisplatynę w raku jajnika [182, 183]. Czynniki wzrostu sprzyjają wzrostowi komórek, migracji i angiogenezie, głównie podczas nowotworzenia. *MDK* uczestniczy w aktywacji kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK). *MDK* został uznany jako cel w terapii dla wielu różnych zaburzeń, w tym w dziecięcej ALL [184]. Gen *PRAME* działa jako represor receptora kwasu retinowego i prawdopodobnie

dzięki tej funkcji zapewnia komórkom rakowym przewagę wzrostu. Z danych literaturowych wynika, że nadekspresja *PRAME* koreluje z dobrą prognozą wyzdrowienia z B-ALL [185].

Jedną z cech wspólnych obu profili białaczkowych było wyciszenie genów o aktywności receptorów (limfoblasty: *CD22* (FC=-2,26), *SCARB2* (FC=-2,13), *FZD2* (FC=-2,27); mieloblasty: *GPR12* (FC=-1,77), *NRXN2* (FC=-4,96), *IGSF10* (FC=-1,94)). Natomiast w komórkach pobranych od pacjentów z ALL obserwowano wzrost poziomu ekspresji peptydaz (np. *CR2* (FC=2,41), *CTSH* (FC=2,10) w przeciwieństwie do AML (np. *CASP2* (FC=-2,33), *ABHD4* (FC=-2,35)).

4.4.2.4. Klasyfikacja genów pod względem funkcji molekularnych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na mitoksantron

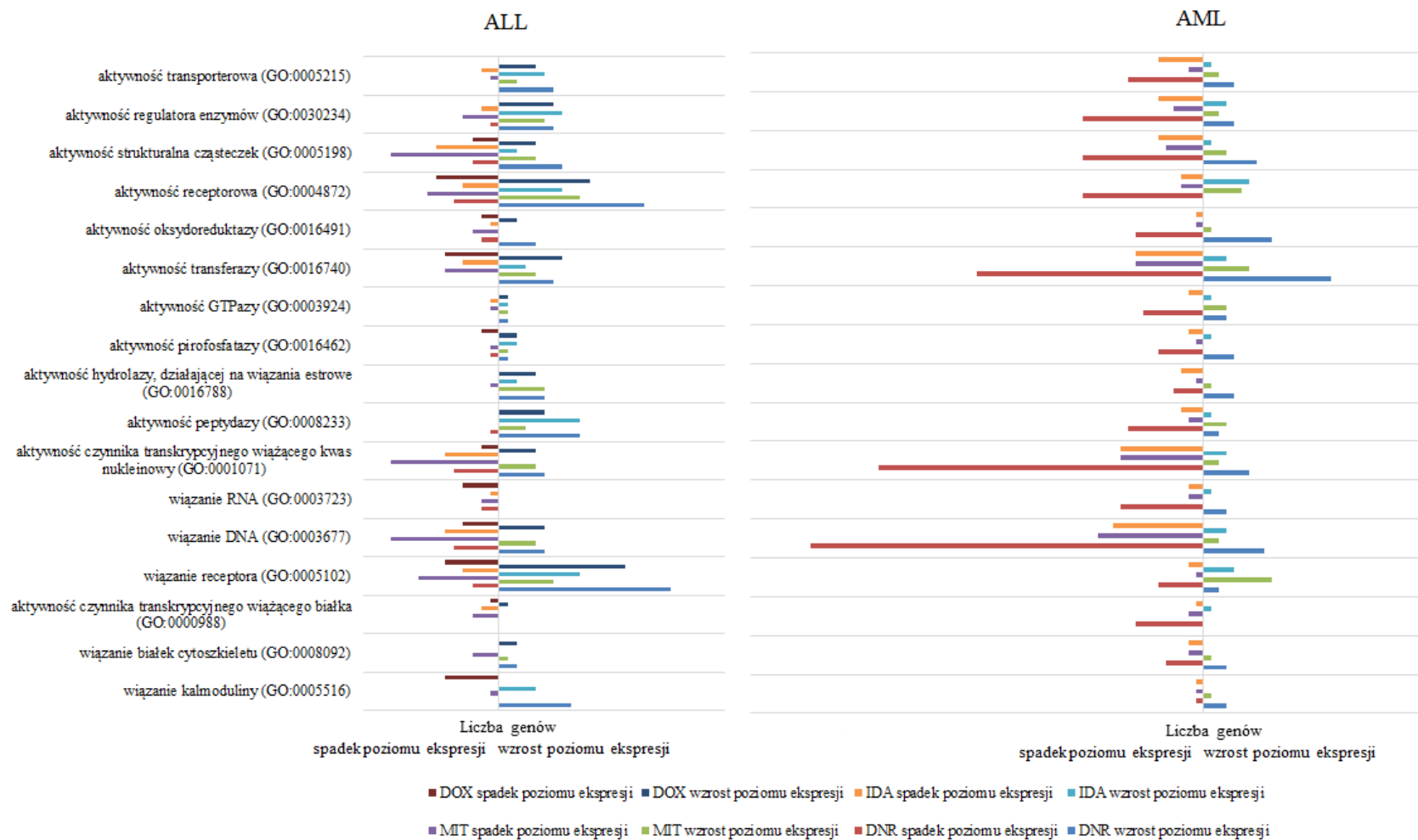
Na podstawie analizy wybranych genów w limfoblastach i mieloblastach opornych na mitoksantron w pod kątem funkcji molekularnych (Rycina 17) wykazano, że najwięcej genów uczestniczyło w wiązaniu białek (limfoblasty 59% i mieloblasty 55%) oraz kwasów nukleinowych (23% i 26%). Aktywność katalityczną wykazano dla 31% genów w limfoblastach i 43% w mieloblastach, w tym zdecydowanie najwięcej o aktywności hydrolaz (59% i 34%) i transferaz (24% i 32%).

Największy wzrost ekspresji podczas analizy funkcji molekularnych w limfoblastach niewrażliwych na mitoksantron odnotowano dla genów, tj. *TRBC1* (FC=2,57), *SPINK2* (FC=2,82), *TOX* (FC=3,13), *ITM2A* (FC=3,19) oraz *CD7* (FC=3,47), natomiast w mieloblastach, tj. *CXCL2* (FC=8,02), *CXCL3* (FC=9,07), *ANXA3* (FC=9,11), *CD69* (FC=9,12) i *IL8* (FC=13,73). Gen *TOX* koduje białko zawierające domenę HMG (*high-mobility group*) wiążącą DNA. Sekwencje HMG zaangażowane są w składanie, transkrypcję i replikację chromatyny. Białko *TOX* reguluje wzrost komórek, naprawę DNA i odpowiada za niestabilność genomu w ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek T [186]. Ciekawą grupę genów stanowią aneksyny, np. *ANXA3*. Odgrywają one ważną rolę w regulacji wzrostu komórkowego i szlaków transdukcji sygnału. Niski poziom ekspresji obniża skuteczność szlaków oporności na leki w raku piersi [187]. Ponadto delecja *ANXA3* hamuje oporność na oksaliplatynę w nowotworze płuc [188].

W analizowanym profilu oporności na mitoksantron w komórkach pobranych od pacjentów z ALL zaobserwowano największy spadek poziomu ekspresji dla genów, tj. *RAG1* (FC=-3,32), *BLNK* (FC=-3,78) *PAX5* (FC=-3,94), *SOX11* (FC=-4,62) oraz *TCL1A* (FC=-4,98), natomiast z AML, tj. *DSC2* (FC=-4,39), *PXDN* (FC=-7,65), *IRX5* (FC=-

13,15), *IRX3* (FC=-24,63) oraz *XIST* (FC=-39,83). Nadekspresja genu *TCL1A* wiąże się z rozwojem białaczki dojrzałych limfocytów T, w której rearanżacje chromosomalne przenoszą gen *TCL1* w pobliżu receptora antygenowego komórki T (*T-cell antigen receptor*, TCR) [189]. *TCL1* działa jako koaktywator kinazy przeżycia komórki AKT. Ponadto uczestniczy we wzmacnianiu wielu szlaków sygnałowych, w tym PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) i NF-κB (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) [190]. RAG1 jest katalitycznym składnikiem wielobiałkowego kompleksu RAG, który pośredniczy w fazie cięcia DNA podczas rekombinacji V(D)J. Rekombinacja V(D)J składa się z różnorodnego układu genów receptorów immunoglobulin i receptorów komórek T w rozwijających się limfocytach B i T. W kompleksie RAG, RAG1 pośredniczy w wiązaniu DNA z zachowanymi sekwencjami sygnałowymi rekombinacji (*recombination signal sequences*, RSS) i katalizuje aktywność cięcia [136, 191]. Wysoka ekspresja *RAG1* i delecja *IKZF1* są związane z niekorzystnym rokowaniem w B-ALL z ujemnym wynikiem dla chromosomu *Philadelphia*. *RAG1* może być stosowany jako cel terapeutyczny w leczeniu B-ALL [192].

Ponadto, w limfoblastach i mieloblastach niewrażliwych na mitoksantron dla genów posiadających aktywność czynnika transkrypcyjnego wiążącego kwas nukleinowy wykazano supresję ekspresji (np. limfoblasty: *SMAD7* (FC=-2,06), *ZEB2* (FC=-2,45), *TCF4* (FC=-4,91); mieloblasty: *RUNX1* (FC=-2,03), *SMAD3* (FC=-2,97), *IRX3* (FC=-13,15)). Podobne wyniki uzyskano w profilu oporności na daunorubicynę dla obu typów blastów białaczkowych (podrozdział 4.4.2.2.). Białko jądrowe *SMAD7* wiąże ligazę ubikwitynową E3 *SMURF2*. Kompleks ten ulega translokacji do cytoplazmy, gdzie oddziałuje z receptorem czynnika wzrostu TGF-beta typu 1 (*TGFBR1*). Na podstawie danych literaturowych sugeruje się, że poziom ekspresji zarówno *SMAD3*, jak i *SMAD7* koreluje z prognozą wyzdrowienia w AML [191]. Dodatkowo, geny *SMAD* współdziałają z *ZEB2*, który jako represor transkrypcyjny wiąże DNA. Do powiązanych szlaków należą sygnalizacja receptora i szlak sygnałowy TGF-beta. *Locus ZEB2* jest zlokalizowany w translokacji chromosomowej t(2;14)(q22;q32) występującej w T-ALL [193].



Rycina 17. Porównanie klasyfikacji genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na DOX, DNR, IDA i MIT pod względem funkcji molekularnych.

W opornych na mitoksantron limfoblastach i mieloblastach dla większości genów o aktywności transferaz wykazano ponad 2-krotny spadek poziomu ekspresji względem komórek wrażliwych (np. limfoblasty: *CLIC4* (FC=-2,17), *CDK14* (FC=-2,51), *PRKCZ* (FC=-2,57); mieloblasty: *WDFY2* (FC=-2,03), *NME3* (FC=-2,06), *SPAG9* (FC=-2,12)). Białko szkieletowe *SPAG9* strukturalnie organizuje kinazy białkowe aktywowane mitogenem i pośredniczy w przekazywaniu sygnałów przez kinazy c-Jun [194]. Białko to wiąże się także z kinezyną-1 i może uczestniczyć w transporcie membranowym na bazie mikrotubul. Ponadto, może odgrywać rolę w rozwoju guza. Fuzja genów *SPAG9-JAK2* koreluje ze wzrostem wrażliwości na ruksolitynib w B-ALL [195]. W literaturze *SPAG9* jest często wspominany jako gen celowany w terapiach wielu nowotworów, tj. rak wątroby, kostniakomięsak, rak jajnika [196, 197].

Znaczącą różnicą w obu profilach białaczkowych był spadek poziomu ekspresji większości genów skorelowanych z wiązaniem receptorów w niewrażliwych na mitoksantron limfoblastach (np.: *MDK* (FC=-2,39), *NPY* (FC=-5,97), *TRIO* (FC=-2,09)), zaś wzrost w mieloblastach (np.: *CXCL3* (FC=11,34), *FCAR* (FC=3,13), *ICAM3* (FC=2,66)). Natomiast jedną z wspólnych cech było tłumienie ekspresji większości genów uczestniczących w wiązaniu DNA (np.: *CTBP2*, *FOXO1*, *FHL1*).

4.4.2.5. Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilu limfoblastów opornych na doksorubicynę

W oparciu o analizę zidentyfikowanych genów dla profilu transkryptomycznego limfoblastów (Rycina 18) stwierdzono, że najwięcej genów zaangażowanych było w procesy komórkowe (27,5%) oraz procesy metaboliczne (18%). W pierwszej grupie zdecydowanie przeważały geny zaangażowane w komunikację komórkową (53,8%) oraz cykl komórkowy (23,1%). Natomiast, w drugiej grupie dominowały geny biorące udział w metabolizmie kwasów nukleinowych (41,9%) oraz białek (29%).

Większość genów uczestniczących w komunikacji komórkowej była związana z transdukcją sygnałów (91,3%) oraz sygnalizacją międzykomórkową (8,7%). Dla wielu genów odpowiedzialnych za komunikację komórkową odnotowano ponad 2-krotny spadek poziomu ekspresji. Warto zauważyć, że podobną tendencję zaobserwowano w mieloblastach niewrażliwych na daunorubicynę (podrozdział 4.4.2.6.) i idarubicynę (podrozdział 4.4.2.7.) oraz limfoblastach opornych na mitoksantron (podrozdział 4.4.2.8.). Natomiast przeciwną obserwację wykazano dla limfoblastów w profilu oporności na daunorubicynę (podrozdział 4.4.2.6.) i idarubicynę (podrozdział 4.4.2.7.)

oraz dla mieloblastów opornych na mitoksantron (podrozdział 4.4.2.8.), gdzie geny odpowiedzialne za komunikację komórkową były nadekspresjonowane. W grupie genów uczestniczących w transdukcji sygnałów w profilu oporności na dokсорubicynę znajdowały się m.in.: *NR3C1* (FC=-2,14), *NPY* (FC=-9,50), *HBEGF* (FC=-3,04), *TGFBR2* (FC=-2,06). *NR3C1* może działać zarówno jako czynnik transkrypcyjny oraz jako regulator innych czynników transkrypcyjnych. Bierze udział w odpowiedziach zapalnych, proliferacji komórkowej i różnicowaniu w tkankach docelowych. Mutacje w tym genie wiążą się z ogólną opornością na glukokortykoid. *NR3C1* zaangażowany jest także w przebudowę chromatyny i może działać jako supresor guza [198, 199]. Ważnym genem promującym proliferację jest *HBEGF*. Jest on zdolny do wiązania receptora EGF/EGFR z większym powinowactwem niż sam EGF (*epidermal growth factor*). Opierając się na doniesieniach literaturowych wykazano, że zwiększa oporność na cisplatinę w nowotworach jajnika [200]. Gen *TGFBR2* kodujący białko transbłonowe kinazę, tworzy kompleks z receptorem TGF-beta, który reguluje transkrypcję genów związanych z proliferacją komórek, zatrzymaniem cyklu komórkowego, immunosupresją i nowotworzeniem. Mutacje w tym genie zostały powiązane z rozwojem różnych typów nowotworów, tj. rak płuc i pęcherza moczowego [201, 202]. Aktywowany TGFBR1 fosforyluje SMAD2, który dysocjuje z receptora i współdziała z SMAD4. Kompleks SMAD2-SMAD4 jest następnie przemieszczany do jądra, gdzie moduluje transkrypcję genów regulowanych przez TGF-beta. Jest to kaskada sygnalizacyjna TGF-beta zależna od SMAD. Z doniesień literaturowych wynika, że obniżenie poziomu ekspresji *TGFBR2* w osteoblastach powoduje lekooporność w przerzutach raka prostaty do kości [203].

Brak wrażliwości limfoblastów na dokсорubicynę może mieć związek z deregulacją genów odpowiedzialnych za modyfikacje białek komórkowych (55,6%) oraz proteolizę (33,3%). W obu grupach zauważono znaczący wzrost ekspresji. W proteolizie biorą udział m.in.: *SELL* (FC=3,08), *ANPEP* (FC=2,24), *CFH* (FC=2,14), *CSTA* (FC=2,92) oraz *TFPI* (FC=3,70), natomiast w modyfikacjach białek komórkowych np.: *MAPKAPK3* (FC=2,22), *PADI4* (FC=2,69), *FKBP4* (FC=2,14), *PTPN7* (FC=2,37) oraz *MGAM* (FC=2,19). Kinaza białkowa serynowo-treoninowa MAPKAPK3 zaangażowana jest w wytwarzanie cytokin, endocytozę, migrację komórek, przebudowę chromatyny i regulację transkrypcji, a także w regulację czynnika martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor*, TNF) i produkcję IL6. Prowadzi do stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej [204].

4.4.2.6. Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na daunorubicynę

Na podstawie analizy zidentyfikowanych genów dla profili niewrażliwych na daunorubicynę limfoblastów i mieloblastów stwierdzono, że najwięcej genów było zaangażowanych w procesy komórkowe (limfoblasty 26,9% i mieloblasty 31,3%) oraz procesy metaboliczne (18,1% i 23,5%). Wśród genów uczestniczących w procesach komórkowych (Rycina 18) zdecydowanie przeważały geny zaangażowane w komunikację komórkową (55,1% i 56,3%) oraz cykl komórkowy (16,3% i 28,1%). Natomiast, w grupie genów odpowiedzialnych za podstawowe procesy metaboliczne dominowały geny biorące udział w metabolizmie kwasów nukleinowych (46,9% i 52,3%) oraz białek (18,8% i 26,7%).

Najwięcej genów uczestniczących w komunikacji komórkowej związanych było z transdukcją sygnałów (89,7% i 86,2%) oraz sygnalizacją międzykomórkową (10,3% i 13,8%). W opornych na daunorubicynę limfoblastach dla większości genów odpowiedzialnych za komunikację komórkową odnotowano ponad 2-krotny wzrost poziomu ekspresji względem komórek wrażliwych. Do tej grupy genów należą m.in.: *SLC22A4* (FC=2,15), *CSF3R* (FC=2,62), *PSTPIP1* (FC=2,21) oraz *FCAR* (FC=2,07). Natomiast w profilu dla mieloblastów większość genów była wyciszana, np.: *SPAG9* (FC=-3,72), *RAP1B* (FC=-2,23), *AFF1* (FC=-2,02), *NF1* (FC=-2,67). Białko szkieletowe *SPAG9* pośredniczy w przekazywaniu sygnałów komórkowych. Może uczestniczyć w transporcie membranowym i odgrywać rolę w różnicowaniu i rozwoju guza [194]. Błasty białaczkowe z genem fuzyjnym *SPAG9-JAK2* wykazują wysoką wrażliwość na ruksolitynib [205]. *RAP1B* reguluje wiele procesów komórkowych, w tym adhezję i wzrost komórek oraz ich różnicowanie [206]. Może być wykorzystany jako potencjalny biomarker rokowania klinicznego w raku jelita grubego i czerniaka [207]. Natomiast *AFF1* działa jako regulator transkrypcji za pośrednictwem polimerazy RNA II poprzez wydłużanie i przebudowę chromatyny. Promuje także ekspresję *CD133*, kodującego glikoproteiny błony komórkowej wymaganej do przeżycia komórek białaczkowych [208].

Niewrażliwość limfoblastów na daunorubicynę może korelować ze wzrostem ekspresji genów zaangażowanych w procesy metaboliczne białek, w tym odpowiedzialnych za modyfikacje białek komórkowych (40% i 51%) oraz proteolizę (60% i 23,5%). Natomiast w mieloblastach większość z tych genów była wyciszana. W modyfikacji białek komórkowych w opornych limfoblastach uczestniczą geny *GALNT6*

(FC=2,96), *ST3GAL6* (FC=2,61), *MGAM* (FC=2,34), *TESC* (FC=3,07). A dla mieloblastów charakterystyczne były geny, tj. *UBE2H* (FC=-3,01), *UIMC1* (FC=-3,20), *FAM76B* (FC=-2,70). *TESC* pełni funkcję integralnego kofaktora w regulowaniu pH komórki przez kontrolowanie aktywności wymiany Na^+/H^+ na błonie komórkowej. Wspomaga dojrzewanie, transport i stabilność powierzchni komórkowej [209]. Natomiast *UBE2H* odpowiada za modyfikację białek za pomocą ubikwityny. Jest to ważny mechanizm komórkowy do znakowania nieprawidłowych białek w celu ich degradacji [137]. Na uwagę zasługuje fakt, iż wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za modyfikacje białek komórkowych zaobserwowano także w limfoblastach opornych na doksorubicynę (podrozdział 4.4.2.5.), idarubicynę (podrozdział 4.4.2.7.) i mitoksantron oraz mieloblastach niewrażliwych na mitoksantron (podrozdział 4.4.2.8.). W profilu dla limfoblastów w proteolizę zaangażowane były geny wykazujące wzrost poziomu ekspresji, np.: *SELL* (FC=3,05), *ANPEP* (FC=2,03), *PRTN3* (FC=3,22), *CTSH* (FC=2,20), *CSTA* (FC=3,71), *NFE2* (FC=2,91). Z kolei w profilu dla komórek pobranych od pacjentów pediatrycznych z AML geny z tej grupy były wyciszane, np.: *CRBN* (FC=-3,23), *PGAP1* (FC=-2,23), *ENPEP* (FC=-6,39), *CP* (FC=-3,38), *NPEPPS* (FC=-2,56), *NETO1* (FC=-4,28). Peptydaza serynowa kodowana przez *PRTN3* jest związana z sygnalizacją cytokin w układzie odpornościowym [210]. Cystatyna kodowana przez *CSTA* pełni ważną rolę w adhezji komórkowej [211]. Natomiast *NPEPPS* bierze udział w procesach proteolitycznych regulujących cykl komórkowy [212].

Większość genów metabolizmu kwasów nukleinowych zaangażowanych była w regulację transkrypcji pod promotorem polimerazy RNA II. Poziom ekspresji genów w tej grupie był zróżnicowany. W profilu dla limfoblastów niewrażliwych na daunorubicynę obserwowano zarówno ponad 2-krotny wzrost (np.: *CEBPD* (FC=2,43), *TFDP1* (FC=2,92), *MDFIC* (FC=2,83)), jak i spadek poziomu ekspresji (np.: *PAX5* (FC=-4,77), *SOX11* (FC=-7,87), *PRDM2* (FC=2,20), *NR1D2* (FC=-2,20)). Natomiast w profilu dla mieloblastów geny metabolizmu kwasów nukleinowych były wyciszane. Wśród nich wyróżniono *CHD7* (FC=-4,59), *SLC2A4RG* (FC=-6,14), *TBX1* (FC=-4,45), *ETV6* (FC=-5,40). Czynniki transkrypcyjne *CEBPD* uczestniczy w regulacji genów zaangażowanych w odpowiedzi immunologiczne i zapalne [213]. Supresor nowotworu *PRDM2* może działać jako aktywator transkrypcji [214]. Z kolei *ETV6* reguluje geny krwiotwórczych komórek macierzystych oraz odgrywa ważną rolę w transformacji nowotworowej [215].

4.4.2.7. Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na idarubicynę

W oparciu o analizę profili transkryptomycznych dla idarubicyny odnotowano, że najwięcej genów zaangażowanych było w procesy komórkowe (limfoblasty 25% i mieloblasty 28,2%), wśród których przeważały geny zaangażowane w komunikację komórkową (54,2% i 50%) i cykl komórkowy (20,8% i 28,1%), oraz w procesy metaboliczne (18,9% i 22,1%) gdzie dominowały geny biorące udział w metabolizmie białek (40% i 26,2%) oraz kwasów nukleinowych (35% i 45,2%) (Rycina 18).

Większość genów uczestniczących w komunikacji komórkowej była związana z transdukcją sygnałów (85,7% i 88,9%) oraz z sygnalizacją międzykomórkową (14,3% i 11,1%). W opornych na idarubicynę limfoblastach, geny odpowiedzialne za komunikację komórkową wykazywały ponad 2-krotny wzrost poziomu ekspresji względem komórek wrażliwych. Do tej grupy genów należą m.in.: *SH2D1A* (FC=2,41), *ARHGEF3* (FC=2,17), *ANXA1* (FC=2,45), *GOS2* (FC=2,21). Natomiast w profilu dla mieloblastów zaobserwowano tłumienie ekspresji, m.in.: *TRIO* (FC=-2,36), *GPR12* (FC=-2,76), *NRXN2* (FC=-4,96), *TTC28* (FC=-5,76). Aneksyna 1 ma działanie przeciwzapalne. Utratę jej funkcji wykryto w wielu nowotworach, np. raku piersi [216]. Ekspresja *ANXA1* jest związana z proliferacją komórek, rokowaniem i odpowiedzią na lek w raku trzustki [217]. Przyczynia się do adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej, wzmacniając kaskady sygnałowe. Tak jak *TRIO*, promuje polaryzację i migrację komórek [218]. Z kolei *GOS2* promuje apoptozę, wiążąc się z *BCL2*, a tym samym zapobiega tworzeniu ochronnych heterodimerów *BCL2-BAX* (*BCL2-associated X protein*) [219].

W profilu opornych blastów pozyskanych od pacjentów z ALL, w grupie genów zaangażowanych w procesy metaboliczne białek wyróżniono geny odpowiedzialne za modyfikacje białek komórkowych (42,9%) oraz proteolizę (42,9%). W obu grupach zauważono znaczącą nadekspresję. W modyfikacji białek komórkowych uczestniczą m.in.: *GALNT6* (FC=2,44), *PDGFC* (FC=2,40), *FGR* (FC=2,15), *PADI4* (FC=2,52), *MGAM* (FC=2,27). W profilu mieloblastów, w grupie genów zaangażowanych w procesy metaboliczne białek wyróżniono geny odpowiedzialne za modyfikacje białek komórkowych (50%) oraz geny, których białka tworzą złożone kompleksy (25%). W obu grupach zauważono znaczący spadek poziomu ekspresji genów. W modyfikacji białek komórkowych uczestniczą m.in.: *MBTD1* (FC=-2,68), *SEPT11* (FC=-2,21), *NDN* (FC=-2,79). Czynniki transkrypcyjny *NDN* ułatwia zatrzymanie cyklu komórkowego oraz oddziałuje z *p53* hamując wzrost komórek i wiąże się bezpośrednio ze specyficznymi

sekwencjami DNA [220]. Tłumienie ekspresji genów odpowiedzialnych za modyfikacje białek zaobserwowano także w opornych na daunorubicynę mieloblastach (podrozdział 4.4.2.6.)

Większość genów metabolizmu kwasów nukleinowych zaangażowanych była w regulację transkrypcji pod promotorem polimerazy RNA II. Poziom ekspresji genów w tej grupie był w znacznej części obniżony w profilach obu typów blastów opornych na idarubicynę. Wśród nich można wyróżnić dla limfoblastów: *TBLIX* (FC=-2,21), *ZNF395* (FC=-2,14), *TCF4* (FC=-3,32); dla mieloblastów: *BCLAF1* (FC=-2,30), *AH11* (FC=-2,00), *TRIM24* (FC=-2,79). Białko kodowane przez *TBLIX* bierze udział w transdukcji sygnału, regulacji genów, transporcie pęcherzykowym oraz montażu cytoszkieletu, a *BCLAF1* to represor transkrypcyjny indukujący apoptozę [113, 221].

4.4.2.8. Klasyfikacja genów pod względem procesów biologicznych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na mitoksantron

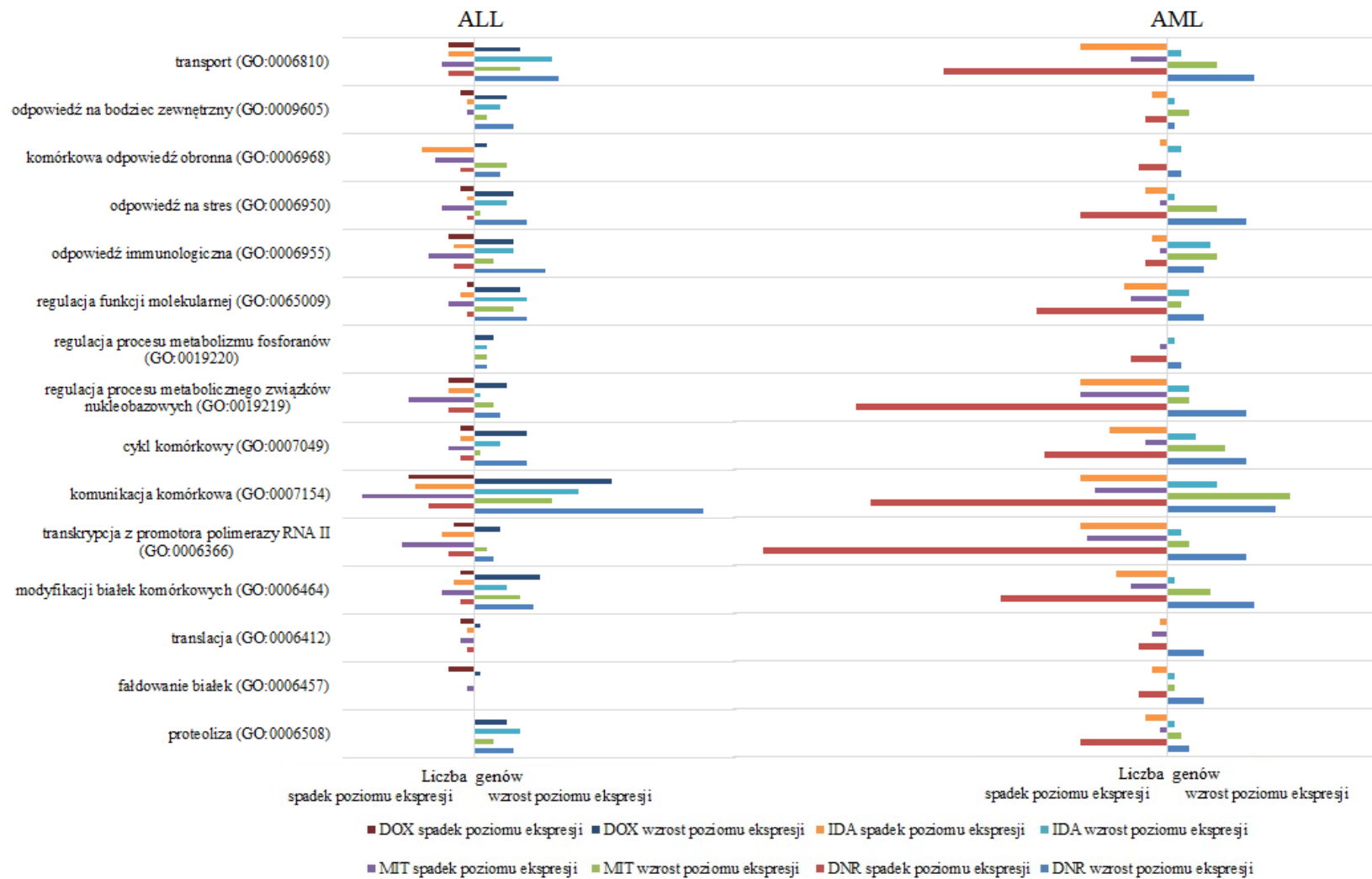
Na podstawie analizy genów w opornych blastach białaczkowych wykazano, że najwięcej genów zaangażowanych było w procesy komórkowe (limfoblasty 24,1% i mieloblasty 29,2%), wśród których zdecydowanie przeważały geny zaangażowane w komunikację komórkową (60% i 54,3%) i ruch komponentów komórkowych (14,3% i 15,2%), oraz w procesy metaboliczne (15,7% i 18,5%) gdzie dominowały geny biorące udział w metabolizmie białek (50% i 33,3%) oraz kwasów nukleinowych (27,3% i 24,2%). Na Rycinie 18 przedstawiono podsumowanie analizy genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na mitoksantron pod względem procesów biologicznych.

Większość genów uczestniczących w komunikacji komórkowej była związana z transdukcją sygnałów (84% i 88,9%) oraz z sygnalizacją międzykomórkową (16% i 11,1%). W profilu opornych limfoblastów dla większości genów odpowiedzialnych za komunikację komórkową odnotowano ponad 2-krotne obniżenie poziomu ekspresji względem blastów wrażliwych. Do tej grupy genów należą m.in.: *PTK2*, *CDK14*, *IL6ST*, *TTC28*, *CTNNA1*. Natomiast w mieloblastach zaobserwowano ponad 2-krotny wzrost ekspresji dla genów, tj. *NAMPT*, *BTG1*, *DUSP6*, *GADD45A*. Kinaza tyrozynowa *PTK2* uczestniczy w regulacji migracji komórek, adhezji, reorganizacji cytoszkieletu aktyny, progresji cyklu komórkowego, proliferacji komórek i apoptozy. Zaangażowana jest również w transdukcję sygnału integryny. Promuje aktywację MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1 i kaskady sygnalizacyjnej kinaz MAP. Reguluje aktywność ubikwityny

p53 [222]. Z kolei kinaza CDK14 działa jako regulator proliferacji komórek oraz szlaku sygnałowego Wnt podczas fazy G2/M cyklu komórkowego. Ważnym genem o właściwościach antyproliferacyjnych jest *BTG1*, który reguluje wzrost i różnicowanie komórek. Ekspresja tego genu jest najwyższa w fazach G0/G1 cyklu komórkowego i jest obniżana, gdy komórki przechodzą przez G1 [223].

W grupie genów zaangażowanych w procesy metaboliczne białek wyróżniono geny odpowiedzialne za modyfikacje białek komórkowych (37,5% i 66,7%). W profilu limfoblastów 37,5% stanowiły geny, których białka tworzą złożone kompleksy. W opornych na mitoksantron limfoblastach tylko 12,5% genów było zaangażowanych w proteolizę, a w mieloblastach 25%. W obu profilach geny były nadekspresjonowane. W modyfikacji białek komórkowych w opornych na mitoksantron limfoblastach uczestniczą m.in.: *GALNT6* (FC=2,66), *CD2* (FC=2,46), *CD244* (FC=2,21), *PTPN7* (FC=2,47), a w mieloblastach *STK17A* (FC=2,12), *STK17B* (FC=2,66), *PIM2* (FC=2,44). Receptory powierzchniowe CD2 i CD244 ulegają ekspresji w komórkach NK i komórkach T [224]. *PTPN7* reguluje różne procesy komórkowe, w tym wzrost komórek, różnicowanie, cykl mitotyczny i transformację onkogeną [225]. *PIM2* uczestniczy w zapobieganiu apoptozy, promowaniu przeżycia komórek oraz proliferacji komórek [226].

Większość genów metabolizmu kwasów nukleinowych zaangażowana była w regulację transkrypcji pod promotorem polimerazy RNA II. Poziom ekspresji genów w tej grupie był w znacznej części obniżony (podobnie jak w mieloblastach opornych na daunorubicynę (podrozdział 4.4.2.6.)). W limfoblastach niewrażliwych na mitoksantron można wyróżnić *CHD7* (FC=-2,42), *ZNF395* (FC=-2,08), *PDLIM1* (FC=-2,91), *FHL1* (FC=-2,26), *ZNF107* (FC=-2,16), a w mieloblastach *RUNX1* (FC=-2,02), *SATB1* (FC=-2,50), *CCNL2* (FC=-2,04). Warto zauważyć, że przeciwną tendencję w poziomie ekspresji genów (wzrost) spod promotora RNA II odnotowano w limfoblastach opornych na daunorubicynę (podrozdział 4.4.2.6.).



Rycina 18. Porównanie klasyfikacji genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na DOX, DNR, IDA i MIT pod względem procesów biologicznych.

4.4.2.9. Analiza szlaków komórkowych w profilu limfoblastów opornych na doksorubicynę

Na podstawie analizy szlaków komórkowych (Rycina 19) wykazano, że najwięcej zidentyfikowanych genów brało udział w szlaku sygnalizacyjnym Wnt (5,6%), w szlaku procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (5,6%) oraz aktywacji komórek B (5,6%).

W szlaku Wnt uczestniczą *TLE3* (FC=2,37) oraz *TLE4* (FC=-2,22). Członkowie rodziny białek wzmacnianych przez transducynę funkcjonują w szlaku sygnalizacji Notch, który reguluje determinację losu komórek podczas rozwoju. Wiąże się także z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi [227].

Niewrażliwość na doksorubicynę blastów uzyskanych od pacjentów z ALL może mieć związek z zaburzeniami szlaku sygnalizacyjnego procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin, który był reprezentowany przez nadekspresjonowane geny, tj. *GNAQ* (FC=2,48) oraz *ITGAM* (FC=3,42). Selekcję komórek B i ich przeżycie reguluje *GNAQ*. Wymagany jest on również, aby zapobiegać autoimmunizacji zależnej od limfocytów B. Powiązanymi ścieżkami są szlak sygnalizacji wapniowej i sygnalizacja ADP (*adenosine-induced pathways*) [228]. Integryna *ITGAM* jest zaangażowana w różne interakcje monocytów, makrofagów i granulocytów. W oparciu o dane literaturowe sugeruje się związek wysokiej ekspresji *ITGAM* ze złym rokowaniem w AML [229].

Cechą charakterystyczną limfoblastów opornych na doksorubicynę było wyciszenie genów zaangażowanych w aktywację komórek B, tj. *CD22* (FC=-2,84) oraz *BLK* (FC=-3,03), przy jednoczesnym wzroście ekspresji genów uczestniczących w szlaku sygnalizacyjnym apoptozy, tj. *BCL2A1* (FC=2,95) oraz *LTB* (FC=2,56). Istotną obserwacją była również nadekspresja *MAPKAPK3*, który uczestniczy w szlaku sygnałowym Ras oraz szlaku p38 MAPK [230]. Podobną tendencję spadkową dla genów aktywujących komórki typu B odnotowano w profilu oporności na daunorubicynę w limfoblastach (podrozdział 4.4.2.10.).

4.4.2.10. Analiza szlaków komórkowych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na daunorubicynę

W oparciu o analizę szlaków komórkowych (Rycina 19) w limfoblastach opornych na daunorubicynę wykazano, że najczęściej zidentyfikowanych genów brało udział w procesach zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (11,8%) oraz aktywacji komórek B (7,4%). W niewrażliwych na daunorubicynę mieloblastach najczęściej zidentyfikowanych genów brało udział w szlaku sygnałowym z udziałem integrzyn (4,2%), szlaku sygnałowym Wnt (3,8%), szlaku sygnałowym apoptozy (3,3%) oraz szlaku procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (3,3%).

W obu profilach blastów białaczkowych szlak sygnalizacyjny procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin był reprezentowany przez geny o ponad 2-krotnym wzroście poziomu ekspresji (limfoblasty: *C5AR1* (FC=2,19), *PTGS2* (FC=3,70), *FPR1* (FC=2,30), *ALOX5AP* (FC=2,29) i *ITGB2* (FC=2,42); mieloblasty: *NRAS* (FC=2,06), *ITGAL* (FC=15,10), *PIK3CG* (FC=4,35) i *ARPC1A* (FC=7,02)). W odpowiedzi immunologicznej biorą udział zarówno *C5AR1*, jak i *PIK3CG*. Za promowanie fagocytozy i wyzwalanie stanu zapalnego odpowiedzialny jest *C5AR1*. Natomiast *PIK3CG* odpowiada za koordynację różnorodnych funkcji komórek, w tym proliferację i przeżycie. *PIK3CG* znajduje się w często usuwanym fragmencie chromosomu 7 obserwowanym w białaczkach szpikowych [231]. Nadekspresję chemokin i cytokin zaobserwowano także w profilu oporności na doksorubicynę w limfoblastach (podrozdział 4.4.2.9.) oraz na idarubicynę (podrozdział 4.4.2.11.) i mitoksantron (podrozdział 4.4.2.12.) w limfoblastach i mieloblastach.

W komórkach pobranych od dzieci z ALL odnotowano tłumienie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w aktywację komórek B, tj. *CD19* (FC=-4,80), *CD22* (FC=-2,50), *BLNK* (FC=-4,33), *BLK* (FC=-3,09). Natomiast ponad 2-krotnie wzrost ekspresji wykazano dla genów uczestniczących w szlaku sygnalizacyjnym apoptozy (tj. *PRKCH*, *TNFSF10*, *TNFRSF1B*), szlaku sygnałowym Wnt (tj. *GNAQ*) oraz szlaku sygnałowym integryny (tj. *MEGF9*, *ITGB2*, *ITGAM*). Integryny są heterodimerycznymi integralnymi białkami błonowymi. Zbudowane są one z łańcucha alfa i łańcucha beta. *ITGAL* koduje łańcuch integryny alfa L. Pierwsza domena zawierająca integrynę alfa łączy się z łańcuchem beta 2 (*ITGB2*), aby utworzyć integrynowy antygen 1 związany z limfocytom (LFA-1), który ulega ekspresji na wszystkich leukocytach. LFA-1 odgrywa główną rolę w adhezji międzykomórkowej leukocytów poprzez interakcje z jej ligandami, do których należą ICAM-1, -2, -3. *ITGAL* zaangażowany jest w zjawiska immunologiczne takie jak

interakcje leukocytów i śródbłónka, cytotoksyczne zabijanie z udziałem komórek T oraz zależne od przeciwciał zabijanie przez granulocyty i monocyty. Przyczynia się do cytotoksyczności komórek NK (*natural killer*) [232]. Zaangażowany jest w adhezję leukocytów i transmigrację leukocytów, w tym limfocytów T i neutrofilii. [233].

Mieloblasty odporne na daunorubicynę charakteryzowały się inhibicją ekspresji genów uczestniczących w szlaku sygnałowym Wnt (*CDH2* (FC=-8,11), *CDH9* (FC=-13,85), *SMAD4* (FC=-2,67), *NKD2* (FC=-3,00)) oraz w szlaku sygnalizacyjnym apoptozy (*BCL2L1* (FC=-2,24), *MAPK8* (FC=-4,02), *ATF2* (FC=-2,96), *TNFRSF1A* (FC=-2,58)). Kadheryna *CDH2* uczestniczy w alternatywnym składaniu prowadząc do utworzenia wielu wariantów transkryptów [234]. Z kolei kadheryna *CDH9* pośredniczy w adhezji komórkowej komórek zależnej od wapnia. Kadheryny mogą przyczyniać się do sortowania heterogenicznych typów komórek [122]. Czynniki transkrypcyjne *ATF* uczestniczy w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Reguluje transkrypcję genów zaangażowanych w przeciwdziałanie apoptozie, wzrost komórek. Może wywoływać działania onkogenne lub supresorowe guza w zależności od rodzaju tkanki lub komórki [235]. Szlak sygnalizacyjny z udziałem integryn w blastach AML jest reprezentowany przez geny o zróżnicowanym poziomie ekspresji, tj. *KRAS* (FC=-2,51), *MAP2K3* (FC=3,33), *NRAS* (FC=2,06). Mutacje onkogenów RAS są często obserwowane w różnych typach raka, np. jelita grubego i trzustki [236, 237]. Odgrywają ważną rolę w regulacji proliferacji komórek. Uczestniczą w promowaniu zjawisk onkogennych poprzez indukowanie wyciszenia transkrypcyjnego genów supresorowych nowotworów. Mają wewnętrzną aktywność GTP-azy. Stwierdzono, że ekspresja onkogenu *RAS* powoduje akumulację aktywnej postaci kinazy *MAP2K3*, co nadaje onkogenną transformację pierwotnym komórkom [238].

4.4.2.11. Analiza szlaków komórkowych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na idarubicynę

W oparciu o analizę szlaków komórkowych (Rycina 19) w niewrażliwych na idarubicynę limfoblastach wykazano, że najwięcej zidentyfikowanych genów brało udział w aktywacji limfocytów T (16,7%) i limfocytów B (5,6%), szlaku sygnałowym z udziałem integryny (5,6%), szlaku sygnałowym Wnt (5,6%) oraz szlaku procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (5,6%). Z kolei w mieloblastach przeważały geny uczestniczące w szlaku sygnałowym apoptozy (6,9%), szlaku sygnałowym z

udziałem integryny (6,9%) oraz szlaku procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (6,9%).

W opornych limfoblastach szlak sygnalizacyjny związany z aktywacją limfocytów typu T był reprezentowany przez geny o obniżonym poziomie ekspresji, tj. *HLA-DQA1* (FC=-4,23), *HLA-DPA1* (FC=-3,00), *HLA-DRA* (FC=-2,42), *HLA-DMA* (FC=-2,40), *CD74* (FC=-2,29). Uważa się, że zmienność genetyczna *HLA-DPA1*, powoduje modyfikacje odporności i wpływa na ryzyko ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci [239]. Ponadto, naukowcy wskazują na ogromne znaczenie dokładnego dopasowania alleli HLA-DRB1 w transplantacji komórek krwiotwórczych dawcy niespokrewnionego z powodu przewlekłej białaczki szpikowej [240]. *CD74* wiąże się z głównym kompleksem zgodności tkankowej klasy II i jest ważnym białkiem opiekuńczym, które reguluje prezentację antygenów w odpowiedzi immunologicznej. Uczestniczy w szlakach regulujących przeżywalność i proliferację komórek. Wykazano, że wysoka ekspresja *CD74* jest dodatnio skorelowana z bardziej zaawansowanym stadium przewlekłej białaczki limfocytowej z limfocytów B [241].

Brak wrażliwości limfoblastów na idarubicynę może mieć związek z zaburzeniami szlaku sygnałowego Wnt. Zauważono, że w komórkach opornych na ten lek antracyklinowy dochodziło do wyciszenia ekspresji genów, tj. *TBLIX* (FC=-2,21), *FZD2* (FC=-2,27). *FZD2* jest sprzężony ze ścieżką sygnałową beta-kateniny, co prowadzi do hamowania kinazy GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*), akumulacji jądrowej beta-kateniny i aktywacji genów docelowych Wnt. Uczestniczy także w szlaku sygnałowym PKC. *FZD2* może brać udział w transdukcji i międzykomórkowej transmisji informacji o polarności podczas morfogenezy tkanki [242]. Podobną tendencję obniżenia poziomu ekspresji genów szlaku Wnt zaobserwowano w opornych na daunorubicynę mieloblastach (podrozdział 4.4.2.10.)

Szlak sygnalizacyjny z udziałem integryn w limfoblastach był reprezentowany przez geny o zróżnicowanym poziomie ekspresji, tj. *COL5A1* (FC=-2,26), *ITGAM* (FC=2,98), natomiast w mieloblastach przeważało wyciszenie ekspresji, np. *ITGB2* i *PIK3R1* (FC=-2,01). Ponadto, geny szlaku sygnałowego apoptozy w mieloblastach (np. *LTB* (FC=2,06) i *HSPA5* (FC=-2,05)) wykazywały zróżnicowany poziom ekspresji. Przeciwnie do profilu oporności na daunorubicynę, dla którego odnotowano zmniejszoną ekspresję genów związanych z programowaną śmiercią komórki (podrozdział 4.4.2.10.). Cytokina LTB może odgrywać szczególną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Wśród powiązanych szlaków są m.in. ścieżki sygnalizacji NF- κ -B. Zaobserwowano, że

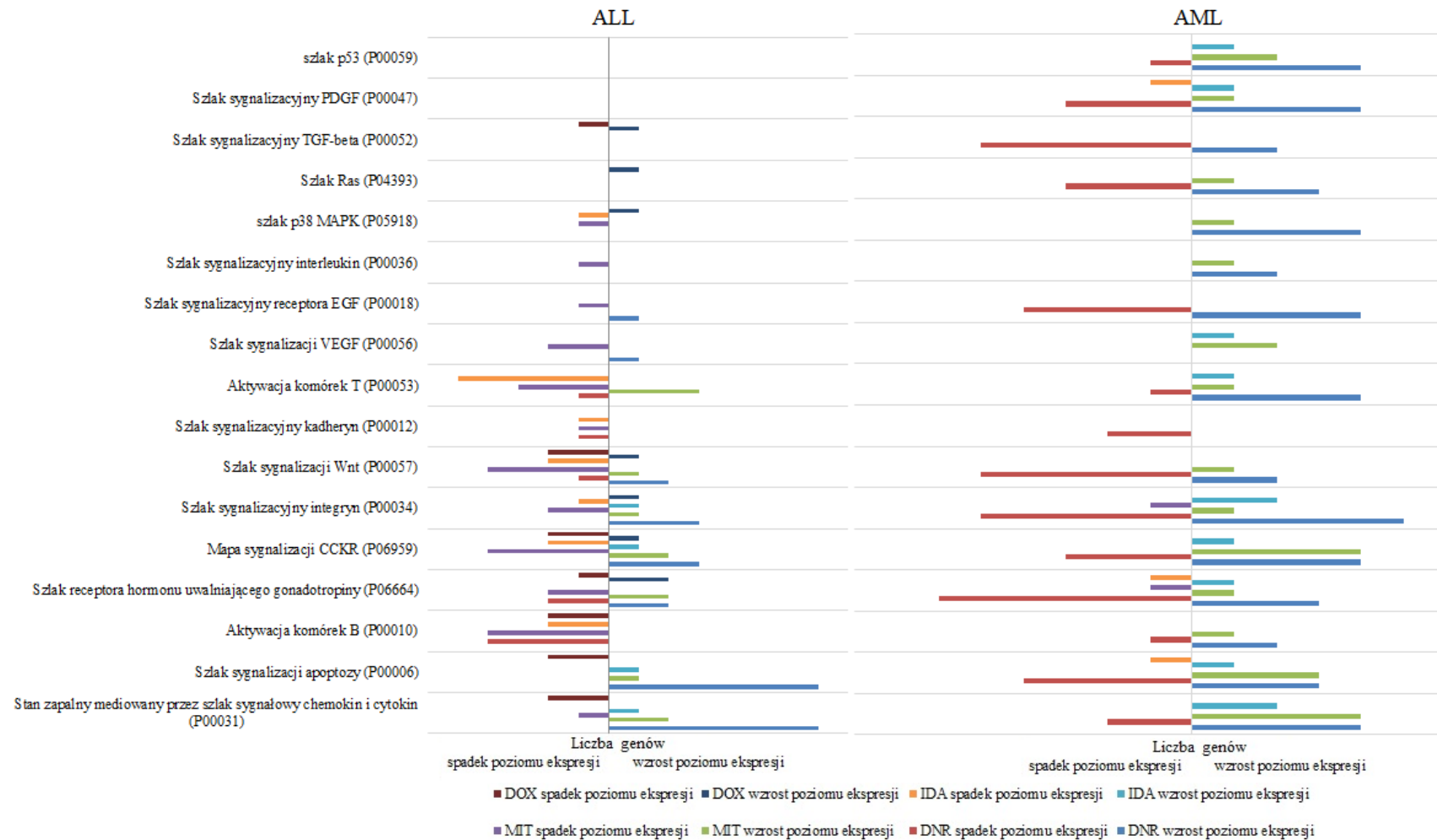
ekspresja beta limfotoksyny jest wysoka w przewlekłej białaczce limfatycznej, ale niska w chłoniaku limfocytowym [243]. *HSPA5* bierze udział w fałdowaniu oraz składaniu białek. Oddziałuje z wieloma białkami retikulum endoplazmatycznego i dlatego może odgrywać kluczową rolę w monitorowaniu transportu białek przez komórkę. Na podstawie badań sugeruje się, że odpowiedź niesfałdowanego białka jest aktywowana w niektórych liniach komórek rakowych i bierze udział w rozwoju nowotworu. Pacjenci z AML z aktywną niesfałdowaną formą białka wykazują specyficzne cechy kliniczne i korzystniejszy przebieg choroby [244].

Oporność komórek białaczkowych na idarubicynę może być związana z szlakiem procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin. W profilach dla obu typów blastów zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji genów (limfoblasty: *ITGAM* (FC=2,98); mieloblasty: *CCL3L1* (FC=4,06)).

4.4.2.12. Analiza szlaków komórkowych w profilach limfoblastów i mieloblastów opornych na mitoksantron

Na podstawie analizy szlaków komórkowych (Rycina 19) wykazano, że najczęściej scharakteryzowanych genów w opornych na mitoksantron limfoblastach brało udział w szlaku aktywacji limfocytów T (8,1%), limfocytów B (5,8%), szlaku sygnałowym Wnt (5,8%) oraz szlaku sygnałowym z udziałem integryn (3,5%). W niewrażliwych mieloblastach przeważały geny zaangażowane w szlak sygnałowy apoptozy (6,1%), szlak procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (6,1%) oraz szlak sygnałowy z udziałem integryn (4,5%).

W szlaku sygnałowym z udziałem integryn w profilach dla obu typów komórek białaczkowych zaobserwowano zróżnicowany poziom ekspresji (limfoblasty: *PTK2* (FC=-2,42), *COL5A1* (FC=-2,18) i *ITGAM* (FC=2,77); mieloblasty: *LAMB2* (FC=-2,51) i *PIK3CG*). Lamininy, tj. *LAMB2*, zaangażowane są w wiele procesów biologicznych, w tym adhezję komórek, różnicowanie, migrację, przekazywanie sygnałów [245]. Warto wspomnieć, że z kolei w limfoblastach opornych na daunorubicynę odnotowano wzrost poziomu ekspresji genów kodujących integryny (podrozdział 4.4.2.10.).



Rycina 19. Porównanie klasyfikacji genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na DOX, DNR, IDA i MIT pod względem szlaków komórkowych.

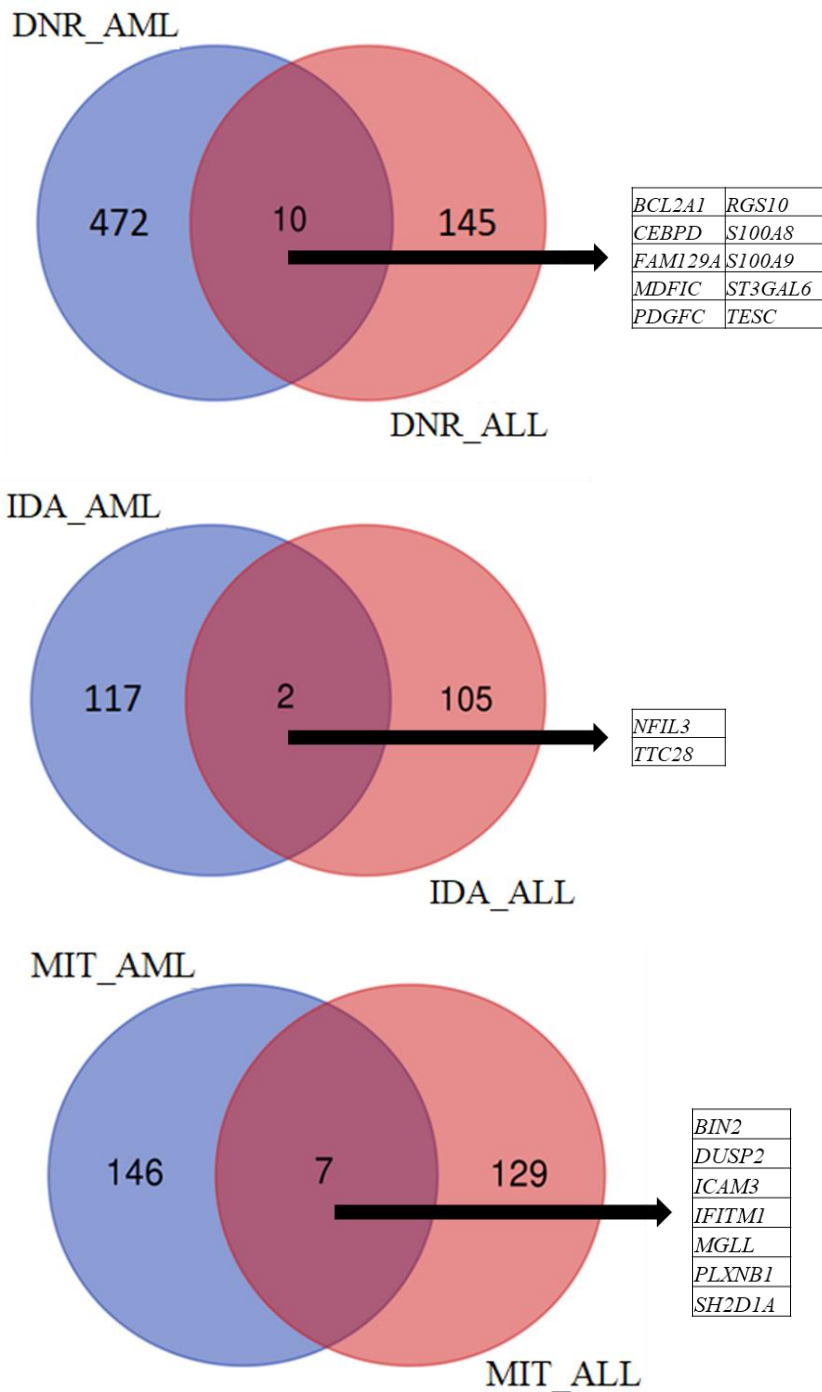
Brak wrażliwości limfoblastów na mitoksantron może być skorelowany z deregulacją szlaku aktywacji limfocytów T. Zauważono, że w komórkach opornych na ten cytostatyk dochodzi do supresji genów, tj. *HLA-DQA1* (FC=-3,13), *HLA-DRA* (FC=-2,31), *CD74* (FC=-2,07) przy równoczesnej nadekspresji cząsteczek *CD3E* (FC=2,42), *CD3D* (FC=3,02) oraz *CD3G* (FC=2,59). Ponadto geny uczestniczące w aktywacji limfocytów B, tj. *CD19* (FC=-3,20), *CD22* (FC=-2,14), *BLNK* (FC=-3,78) i *BLK* (FC=-2,94) wykazywały obniżony poziom ekspresji. *CD3G* oraz *CD3E* uczestniczą w wewnątrzkomórkowych szlakach przekazywania sygnałów. Odgrywają istotną rolę w rozwoju limfocytów T. Mutacje tych genów powodują niedobór odporności [246].

Geny zaangażowane w szlak sygnałowy Wnt w limfoblastach w zdecydowanej większości odznaczały się tłumieniem ekspresji, np.: *CTBP2* (FC=-2,57), *PRKCZ* (FC=-2,57), *TLE4* (FC=-2,10) i *CTNNA1* (FC=-2,10). Ponadto, profile oporności na mitoksantron dla obu typów komórek białaczkowych wyróżniały się nadekspresją genów uczestniczących w szlaku procesów zapalnych z udziałem chemokin i cytokin (limfoblasty: *PLCBI* (FC=2,02), *ITGAM* (FC=2,77); mieloblasty: *PTGS2* (FC=8,66), *ALOX5AP* (FC=4,74), *PIK3CG*, *IL8* (FC=16,74)) oraz szlaku apoptozy (limfoblasty: *HSPA1A* (FC=2,14); mieloblasty: *BCL2A1* (FC=15,44)). Istotną obserwacją był fakt, iż geny związane z programowaną śmiercią komórki były również nadekspresjonowane w limfoblastach opornych na doksorubicynę (podrozdział 4.4.2.9.).

4.4.3. Analiza genów wspólnych w profilach oporności na antracykliny

W celu porównania zależności pomiędzy grupami genów charakterystycznych dla poszczególnych profili oporności blastów białaczkowych przygotowano diagramy *Venna* (Rycina 20) z wykorzystaniem oprogramowania UGent [247]. Na podstawie tej analizy wytypowano geny wspólne wykazujące istotną statystycznie ponad 2-krotną zmianę poziomu ekspresji w każdym z porównywanych profili. W profilach oporności na daunorubicynę dla limfoblastów i mieloblastów 10 genów było wspólnych. Należą do nich m.in.: *CEBPD* (odpowiednio dla limfoblastów FC=2,43 i dla mieloblastów FC=8,92), *RGS10* (FC=3,28 i FC=27,16), *S100A8* (FC=2,90 i FC=17,04), *PDGFC* (FC=2,72 i FC=-2,28), *BCL2A1* (FC=3,87 i FC=40,28) i *S100A9* (FC=2,90 i FC=41,62). Dla zdecydowanej większości genów wykazano taką samą tendencję w zmianie poziomu ekspresji w obu profilach białaczkowych. W profilach limfoblastów i mieloblastów niewrażliwych na idarubicynę powtórzyły się zaledwie 2 geny. Poziom ekspresji regulatora transkrypcji *NFIL3* był zróżnicowany w obu profilach białaczkowych

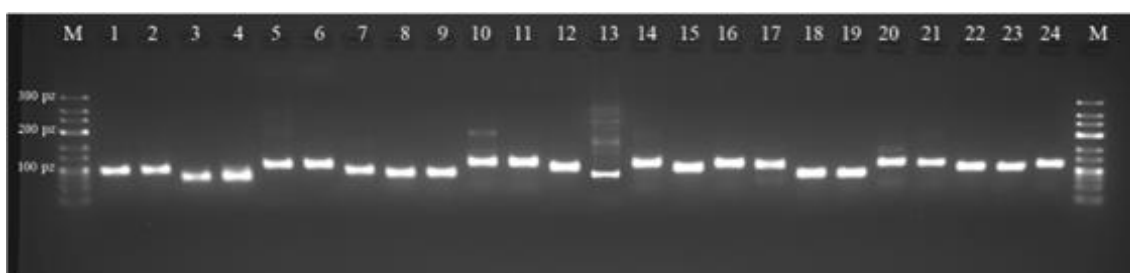
(limfoblasty: FC=-2,33; mieloblasty: FC=4,65). Natomiast dla *TTC28* zaangażowanego w interakcje z kinazami wykazano tendencje spadkową (limfoblasty: FC=-3,10; mieloblasty: FC=-5,76). W profilach oporności na mitoksantron było 7 genów wspólnych. Obserwowano takie same tendencje zmian poziomu ich ekspresji. Dla większości odnotowano około 2-krotny wzrost, tylko *PLXNB1* zaangażowany w sygnalizację międzykomórkową wykazywał około 2-krotny spadek.



Rycina 20. Diagramy *Venna* dla genów profili oporności na daunorubicynę (DNR), idarubicynę (IDA) i mitoksantron (MIT) w limfoblastach (ALL) i mieloblastach (AML).

4.5. Wyniki PCR w czasie rzeczywistym

W pierwszym etapie przeprowadzono klasyczny PCR, aby ocenić specyficzność dobranych starterów oraz jakość zsyntetyzowanego matrycowego cDNA. Ustalono również najbardziej optymalne warunki termiczne reakcji. Produkty reakcji analizowano na żelu agarozowym. Na Rycinie 21 zobrazowano wynik rozdziału produktów reakcji dla wybranych analizowanych genów. Nie stwierdzono obecności struktur będących efektem dimeryzacji starterów. W próbach 10, 13, 20 zaobserwowano produkty niespecyficzne, jednak na innych wysokościach niż badane amplikony. W przypadku stwierdzenia produktów niespecyficznych dokonywano optymalizacji reakcji lub wymieniano startery i sondy.



Rycina 21. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR.

Studzienki M – marker wielkości DNA; 1 i 2 – amplikon genu *ABCG1*; 3 i 4 – amplikon genu *CDKN1B*; 5 – amplikon genu *ACTB*; 6 – amplikon genu *GAPDH*; 7 – amplikon genu *ANXA1*; 8 – amplikon genu *ARAPI1*; 9, 18 i 19 – amplikon genu *FGR*; 10, 14, 20 i 21 – amplikon genu *HK3*; 11, 16 i 24 – amplikon genu *ITGAM*; 12, 22 i 23 – amplikon genu *IFIT3*; 13 – amplikon genu *RETN*; 15 – amplikon genu *IFIT3*; 17 – amplikon genu *PCDH*.

W kolejnym etapie przeprowadzono qPCR, który miał na celu weryfikację wyników otrzymanych metodą mikromacierzy ekspresyjnych. W walidacji uczestniczyły geny potencjalnie związane z profilem oporności na badane leki antracyklinowe w obecności czterech genów referencyjnych (*ACTB*, *GAPDH*, *SDHA*, *TUBA1B*). Uzyskane wyniki zaprezentowano w Tabeli 17. Na podstawie krzywych standardowych oceniono efektywność reakcji. Z kolei krzywe amplifikacji umożliwiły wyznaczenie wartości cykli progowych (*cycle threshold*, C_T). Wartości *p*-value wyliczono testem Manna-Whitneya.

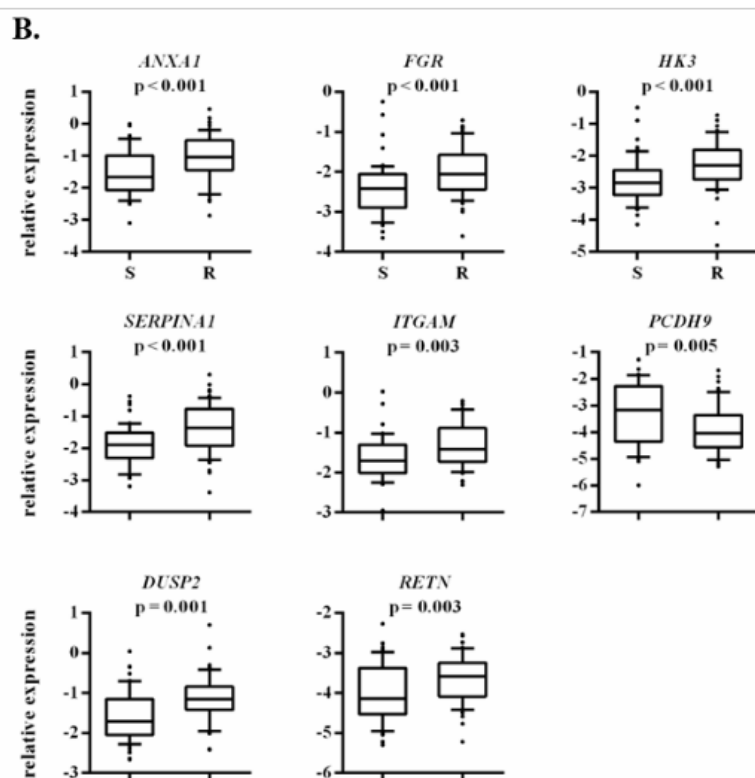
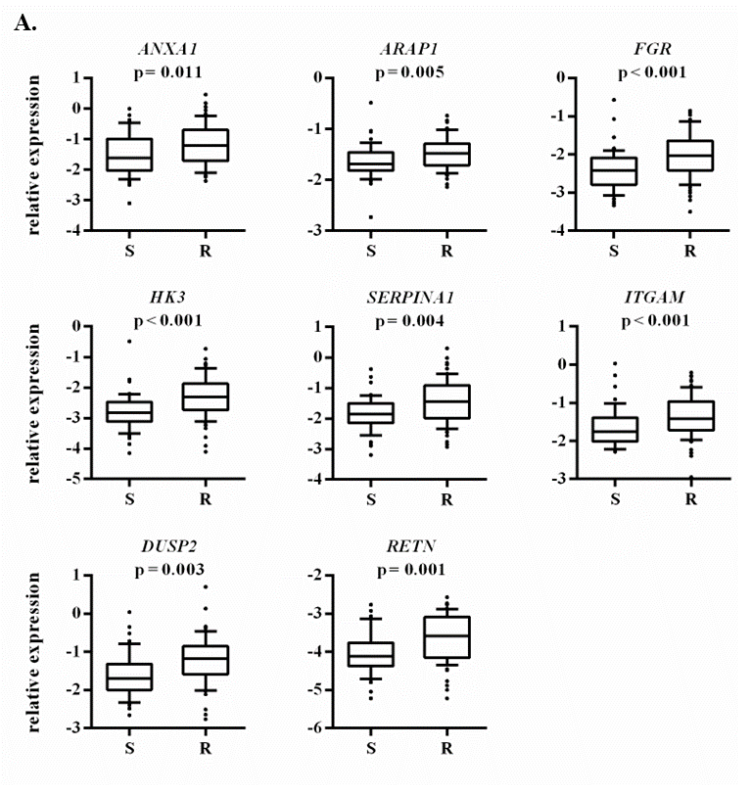
Zdecydowana większość genów była nadeksprymowana. Tylko *TBL1XR1* w profilach oporności na doksorubicynę i daunorubicynę oraz *TTC28* w profilu oporności na daunorubicynę wyróżniały się istotną inhibicją ekspresji. Warto wspomnieć, że najwyższą krotność (ponad 3) zmiany poziomu ekspresji odnotowano dla genu *RETN* dla wszystkich analizowanych leków. Zmiany względnego poziomu ekspresji analizowanych genów przedstawiono na wykresach na Rycinie 22.

Podczas porównywania wyników uzyskanych z wykorzystaniem macierzy i w PCR w czasie rzeczywistym (Tabela 17) potwierdzono dla kilku genów istotność statystyczną zmian ekspresji w obu eksperymentach. Dla *ANXA1*, *FGR* i *ITGAM* odnotowano wzrost poziomu ekspresji w profilach dla wszystkich badanych antracyklin. Dla genów *ARAP1* i *HK3* potwierdzono wzrost poziomu ekspresji w profilu braku wrażliwości na doksorubicynę. Ponad 2-krotny wzrost poziomu ekspresji wykazano w profilach oporności na doksorubicynę i daunorubicynę dla genu *ITGB2* oraz *RETN* zarówno w eksperymencie mikromacierzowym, jak i qPCR. Ponadto, potwierdzono ponad 2-krotny wzrost poziomu ekspresji dla genu *SERPINA1* w profilu oporności na idarubicynę. Oprócz tego, dla *DUSP2* wykazano nadekspresję w profilach braku wrażliwości na daunorubicynę, idarubicynę i mitoksantron. Potwierdzona została także korelacja *TBL1XR1* i *TTC28* z profilem oporności na daunorubicynę. Brak związku z opornością na którykolwiek z badanych cytostatyków wykazano dla genów *CDKN1A*, *CDKN1B*, *WDR26* oraz *WNK1* w obu eksperymentach.

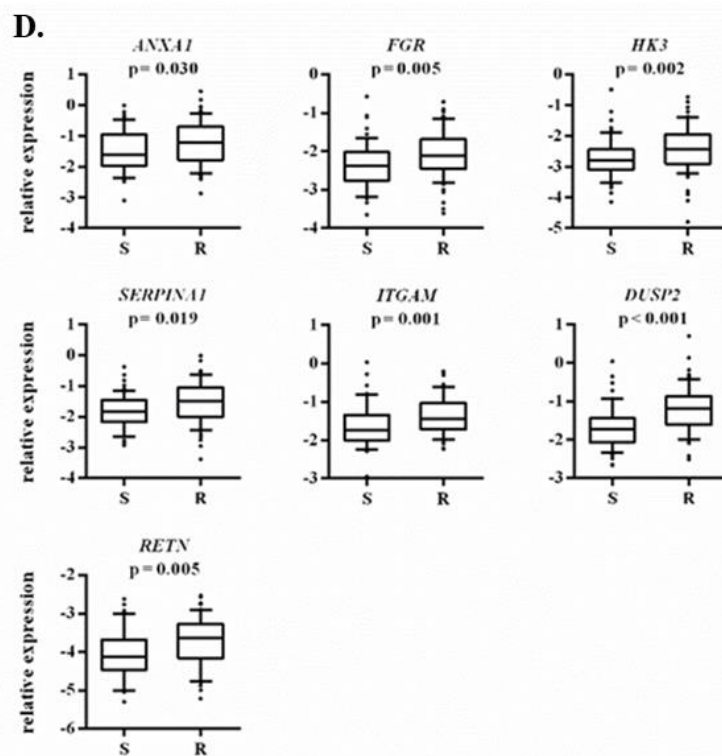
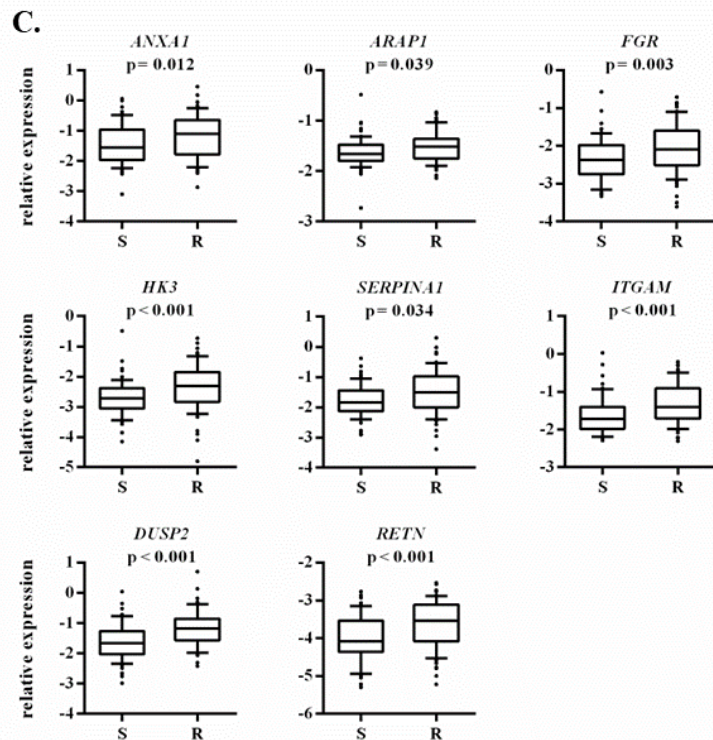
Tabela 17. Porównanie wyników macierzy ekspresyjnych i PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Macierz ekspresyjna								PCR w czasie rzeczywistym								
	DNR		DOX		IDA		MIT		Wydajność reakcji	DNR		DOX		IDA		MIT	
	Krotność zmiany	p-value	Krotność zmiany	p-value	Krotność zmiany	p-value	Krotność zmiany	p-value		Krotność zmiany	p-value	Krotność zmiany	p-value	Krotność zmiany	p-value	Krotność zmiany	p-value
GENY KANDYDACKIE																	
<i>ABCG1</i>	3,631	0,036	1,147	0,629	1,351	0,066	0,528	1,144	1,87	0,965	0,984	1,116	0,623	0,975	0,994	0,967	0,911
<i>ANXA1</i>	3,278	0,003	3,481	0,001	2,445	0,027	2,357	0,039	1,91	2,789	0,012	2,600	0,011	2,799	0,022	2,574	0,030
<i>ARAP1</i>	1,161	0,451	1,298	0,008	1,354	0,347	1,160	0,131	1,97	1,406	0,039	1,612	0,005	1,401	0,049	1,264	0,210
<i>CASP1</i>	1,107	0,367	0,826	0,481	2,778	0,029	2,215	0,050	1,86	1,940	0,949	1,826	0,015	1,501	0,694	1,389	0,579
<i>CDKN1A</i>	0,703	0,366	0,673	0,310	2,350	0,112	0,703	0,366	1,88	1,090	0,202	1,059	0,371	1,095	0,302	0,974	0,468
<i>CDKN1B</i>	0,744	0,200	0,896	0,639	1,260	0,602	0,743	0,200	1,94	1,008	0,877	1,118	0,463	1,067	0,977	1,117	0,898
<i>DUSP2</i>	2,137	0,011	1,603	0,113	2,022	0,016	5,248	0,037	1,95	2,521	0,003	2,391	0,003	2,532	0,0003	3,016	0,00007
<i>FGR</i>	2,584	0,0003	2,154	0,004	6,074	0,034	1,744	0,043	1,95	1,918	0,003	2,420	0,0004	1,891	0,003	1,816	0,005
<i>HK3</i>	1,438	0,069	1,596	0,019	3,117	0,136	1,439	0,069	1,95	2,573	0,0008	3,193	0,00002	2,736	0,001	2,168	0,002
<i>IFIT3</i>	0,537	0,047	0,698	0,246	0,498	0,024	0,537	0,047	1,89	1,132	0,142	1,465	0,204	1,231	0,152	0,892	0,345
<i>ITGAM</i>	2,584	0,002	3,423	0,00005	2,983	0,0002	2,769	0,0009	1,90	2,036	0,003	2,184	0,0005	2,307	0,0003	1,951	0,001
<i>ITGB2</i>	2,417	0,006	2,136	0,022	1,496	0,451	1,973	0,037	1,85	3,399	0,019	2,224	0,004	2,431	0,029	1,738	0,939
<i>PCDH9</i>	0,116	0,0001	0,363	0,088	1,099	0,075	0,368	0,078	1,98	0,404	0,280	0,606	0,532	0,506	0,290	0,247	0,053
<i>RETN</i>	2,385	0,0004	2,261	0,0009	0,763	0,571	1,401	0,170	1,91	3,519	0,0005	3,421	0,001	3,616	0,0005	3,136	0,005
<i>RUNX1</i>	0,837	0,146	1,327	0,384	0,125	0,026	0,494	0,046	1,91	1,065	0,952	1,013	0,933	1,077	0,962	0,972	0,557
<i>SERPINA1</i>	0,476	0,004	1,678	0,059	2,069	0,018	1,638	0,118	1,93	2,122	0,034	2,580	0,004	2,322	0,035	2,228	0,019
<i>TBLXR1</i>	0,517	0,029	0,981	0,922	0,831	0,033	0,713	0,092	1,96	0,967	0,034	0,583	0,027	0,724	0,296	1,044	0,120
<i>TCF7</i>	2,033	0,022	1,637	0,116	1,084	0,786	1,835	0,054	2,1	0,575	0,174	0,911	0,517	0,622	0,184	0,969	0,546
<i>TTC28</i>	0,486	0,018	0,762	0,478	0,395	0,051	0,425	0,018	1,95	0,563	0,017	2,059	0,510	1,092	0,652	0,601	0,053
<i>WDR26</i>	0,228	0,869	0,950	0,660	1,486	0,097	0,228	0,869	1,88	1,041	0,569	1,140	0,660	1,055	0,579	0,994	0,940
<i>WNK1</i>	1,340	0,066	1,283	0,107	1,171	0,670	1,340	0,067	1,92	0,967	0,653	0,855	0,492	0,978	0,654	0,943	0,860
GENY REFERENCYJNE																	
<i>ACTB</i>	1,696	0,081	1,172	0,118	0,943	0,530	1,133	0,215	1,95	1	Nd	1	Nd	1	Nd	1	Nd
<i>GAPDH</i>	0,841	0,134	1,089	0,236	0,948	0,641	0,905	0,279	1,91	1	Nd	1	Nd	1	Nd	1	Nd
<i>SDHA</i>	6,188	0,013	0,905	0,437	1,050	0,370	0,874	0,175	1,93	1	Nd	1	Nd	1	Nd	1	Nd
<i>TUBA1B</i>	3,201	0,0002	1,163	0,158	1,303	0,289	1,094	0,393	1,91	1	Nd	1	Nd	1	Nd	1	Nd

Zielonym kolorem zaznaczono wyniki $p\text{-value} \leq 0,05$; czerwonym kolorem zaznaczono wyniki $p\text{-value} \leq 0,001$



Rycina 22. Porównanie wartości median względnych poziomów ekspresji pomiędzy blastami wrażliwymi i opornymi na poszczególne leki. A. doksorubicyna, B. daunorubicyna, C. idarubicyna, D. mitoksantron. S - wrażliwe, R – oporne. Na wykresach przedstawiono wyłącznie geny, dla których uzyskano wyniki istotne statystycznie.



cd. Rycina 22. Porównanie wartości median względnych poziomów ekspresji pomiędzy blastami wrażliwymi i opornymi na poszczególne leki. A. doksorubicyna, B. daunorubicyna, C. idarubicyna, D. mitoksantron. S - wrażliwe, R – oporne. Na wykresie przedstawiono wyłącznie geny, dla których uzyskano wyniki istotne statystycznie.

5. DYSKUSJA

Białaczka jest najczęstszym rodzajem raka dziecięcego, stanowiąc 30% wszystkich nowotworów zdiagnozowanych u dzieci poniżej 15 roku życia. Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) występuje 5 razy częściej niż ostra białaczka szpikowa (AML) i stanowi 80% wszystkich rozpoznań białaczki dziecięcej. Szczyt zachorowalności na ALL obserwuje się w wieku około 2-5 lat, a na AML w pierwszym roku życia [1]. Genetyczne czynniki ryzyka mogą obejmować zespół Downa oraz zespół Li-Fraumeni. Do środowiskowych czynników ryzyka leukemogenezy zalicza się wcześniejszą chemioterapię. Mechanizm leżący u podstaw onkogenezy obejmuje wiele zmian genomowych wewnątrz krwiotwórczych komórek macierzystych i komórek progenitorowych wpływając na różnicowanie, proliferację i wzrost [7]. Zmiany genetyczne to nie tylko złożone rearanżacje, amplifikacje czy delecje, ale nawet mutacje punktowe mogą mieć ogromne znaczenie w rozwoju choroby i dla prognozy wyleczenia. Zgodnie z najnowszą wiedzą nieustannie aktualizowane są protokoły leczenia w celu jak najlepszego dostosowania do typu białaczki, wieku pacjenta, czynników ryzyka, zmian genetycznych i chorób współistniejących. Dzięki prowadzonym badaniom naukowym, wyleczalność ALL obserwuje się na poziomie 80%, a AML 60%. Niestety nadal dużym problemem klinicznym są wznowy, spowodowane wykształceniem się oporności na stosowane leki przeciwbiałaczkowe [3].

Antracykliny są jednymi z najskuteczniejszych leków przeciwnowotworowych. Zastosowanie znalazły w leczeniu ostrych białaczek, także pediatrycznych. Ogólne właściwości leków należących do tej grupy obejmują oddziaływanie z DNA, RNA i enzymem topoizomerazą II. Antracykliny mają zdolność do odwracalnego wiązania się z DNA poprzez włączanie się w łańcuch między zasadami (kompleksy interkalujące). Może to skutkować blokowaniem transkrypcji [73]. Cytostatyki antracyklinowe hamują wydłużanie łańcucha RNA przez zmianę nukleotydów, co ostatecznie zatrzymuje polimerazę RNA i przerywa syntezę nici. Interakcja z topoizomerazą II skutkuje rozluźnieniem struktury helisy DNA, które jest niezbędne w wielu procesach wewnątrzkomórkowych, tj. replikacja DNA, rekombinacja, transkrypcja i procesy naprawcze [71]. Antracykliny indukują uszkodzenia DNA przez reaktywne formy tlenu (reakcja redoks). Idarubicyna zapewnia większe korzyści kliniczne w wyniku szybszego wchłaniania przez komórki, zwiększonej retencji i zmniejszonej wrażliwości na glikoproteinę P, która usuwa substancje obce (np. leki) dla organizmu z wnętrza komórek,

zapobiegając ich kumulacji i utrudniając osiągnięcie miejsc docelowych [248]. Mitoksantron jest stosowany w leczeniu białaczek ze względu na jego mniejszą kardiotoxycywność w porównaniu z pozostałymi antracyklinami [249]. Prowadzone badania nad nowymi pochodnymi antracyklin, mają na celu znalezienie bardziej skutecznej i mniej szkodliwej (mniej kardiotoxycywnych) alternatywy. Modyfikacje aglikonu lub aminocukru doprowadziły do syntezy pochodnych, tj. doksorubicyny, daunorubicyny, idarubicyny i mitoksantronu [250].

Główną przyczyną niepowodzenia leczenia jest oporność na chemioterapeutyki. Ze względu na heterogeniczność nowotworów i złożoność procesów progresji guza, określenie najlepszej strategii przezwyciężenia oporności na leki jest niezwykle trudne [251]. Wraz z rozwojem genomiki, proteomiki i metabolomiki, możliwe jest zidentyfikowanie genów, które najbardziej przyczyniają się do oporności na leki na każdym etapie nowotworzenia. Ze względu na indywidualne różnice w mutacjach genów powodujących raka, niezbędne są terapie skojarzone i spersonalizowane. Terapie skojarzone są zwykle skuteczniejsze, ponieważ nowotwory są często wieloklonalne i genetycznie niejednorodne [82]. Strategie leczenia z wykorzystaniem pojedynczych leków mogą zakończyć się niepowodzeniem leczenia z powodu oporności. Chemioterapeutyki niszczą wrażliwe komórki nowotworowe, lecz pozostają odporne, aby przetrwać i rozmnażać się. Komórki białaczkowe wytwarzają mechanizmy obronne przed działaniem antracyklin [102]. Wyróżnia się oporność komórkową, farmakokinetyczną i minimalną chorobę resztkową. Lekooporność jest zjawiskiem złożonym (plejotropowym). Może dotyczyć pojedynczego leku lub, w przypadku oporności wielolekowej, kilku leków o zróżnicowanej budowie przestrzennej, składzie chemicznym oraz mechanizmie działania. Ponadto może rozwinąć się dla każdego chemioterapeutyku na każdym poziomie jego aktywności [252].

Na podstawie wieloletnich badań wyodrębniono różnice we wrażliwości na terapię między chorymi na ALL i AML. Komórki u pacjentów ze zdiagnozowaną AML *de novo* i ze wznową ALL charakteryzują się większą opornością niż z ALL *de novo* [12, 36]. W ustalaniu protokołu leczenia chemioterapeutycznego niezwykle ważne jest dobranie go w taki sposób, aby jak najbardziej uchronił pacjenta przed długoterminowymi skutkami ubocznymi i toksycznością metabolitów leku, lecz jednocześnie dawał jak największe szanse na całkowite wyleczenie [55]. U wielu pacjentów skojarzony profil oporności na leki przeciwnowotworowe koreluje z profilem ekspresji genów oraz zmianami

cytogenetycznymi. Dlatego też tak ważne jest, aby poznać złożony obraz genomiczny i transkryptomiczny pacjenta przed rozpoczęciem terapii [253].

Technika mikromacierzy była krokiem milowym w diagnostyce, monitorowaniu przebiegu choroby nowotworowej i leczenia. Pozwala ona na globalne spojrzenie na transkryptom i genom populacji komórek białaczkowych. Jest źródłem informacji o zmienionej biologii blastów pod wpływem chemioterapeutyków, a także pozwala na indywidualizację leczenia pacjentów [118]. Istnieje wiele badań potwierdzających, że w ostrych białaczkach można opracować profil ekspresji genów skorelowany z odpowiedzią na lek, a także odkrycie nowych interakcji między genami i powiązań między ścieżkami sygnalizacyjnymi. Jednym z najważniejszych eksperymentów mikromacierzowych przeprowadzonych na blastach białaczkowych jest badanie Holleman i wsp. [254]. Scharakteryzowano w nim profile pacjentów pediatrycznych dla 4 leków antybiałaczkowych, w tym dla idarubicyny. Kolejne ważne badanie zostało przeprowadzone przez Cheok i wsp. [255], którzy wyróżnili 124 geny (m.in. odpowiedzialne za apoptozę i kontrolę cyklu komórkowego) zaangażowane w indukcję oporności na metotreksat i merkaptopurynę. We wcześniejszych badaniach prowadzonych w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK [256] również zdefiniowano zestaw genów korelujących z opornością na leki stosowane w leczeniu przeciwbiałaczkowym. Wśród nich można wyróżnić gen *PIP4K2A* (kodujący kinazę) w profilu oporności na doksorubicynę oraz gen *UBE2I* zaangażowany w ubiquitytację (degradację białek) w profilu oporności na idarubicynę.

Nie tylko zmiany w ekspresji genów występują u chorych na białaczki. Równie istotne są rearanżacje genomowe. Techniki analizy genomu o wysokiej rozdzielczości, np. CGH (*comparative genomic hybridization*), dają szerokie spojrzenie na leukemogenezę i oporność lekową, u których podłoża leżą nieprawidłowości genomowe związane z zaburzeniem różnicowania, regulacją cyklu komórkowego i apoptozy. Zmiany chromosomowe stanowią ważny aspekt w klasyfikacji ostrych białaczek. Wyróżnia się dwie główne grupy nieprawidłowości białaczkowych: zmiany w obrębie pojedynczych genów (aktywują kinazy białkowe, tj. *FLT3*) oraz fuzje genów na skutek translokacji chromosomalnych, np. t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1::RUNX1* [19, 40, 44]. Pacjenci z t(8;21) wykazują oporność na idarubicynę. Translokacja (9;11) w AML jest skorelowana z wrażliwością na daunorubicynę, doksorubicynę i mitoksantron [257]. Na podstawie danych literaturowych wskazano na związek delekcji 7q z opornością wielolekową w AML [258]. Chorzy z rearanżacją inv(3)(q21q26) lub t(3;3)(q21q26)

wyróżniają się brakiem wrażliwości na różne antybiotyki antracyklinowe [259]. Translokacja t(12;21)(p13;q22) powodująca translokację genową *ETV6-RUNX1* jest związana z wysoką wrażliwością komórek nowotworowych na doksorubicynę u chorych z B-ALL [260].

Celem niniejszej pracy była identyfikacja markerów lekooporności. Przeprowadzono analizę zmian w poziomie ekspresji genów, analizę ontologiczną pod względem funkcji molekularnych, procesów biologicznych i szlaków komórkowych oraz identyfikację rearanżacji chromosomowych skorelowanych z odpowiedzią na leki antracyklinowe w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej i ostrej białaczce mieloblastycznej.

Na podstawie zebranych wyników eksperymentu mikromacierzowego wykazano, że uszkodzony szlak sygnalizacyjny apoptozy (w który zaangażowane są geny *LTB* i *HSPA5*) może być jednym z mechanizmów oporności komórek białaczkowych związanych z antybiotykami antracyklinowymi. Holleman i wsp. [254] wytypowali 70 genów apoptotycznych, wśród nich *BCL2L13*, który jest odpowiedzialny za oporność na L-asparaginazę u dzieci z B-ALL. Bazując na wynikach analizy, wykazano również różnice w ekspresji genów związanych z apoptozą w liniach komórkowych B i T. Badacze zaobserwowali wzrost poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego κ B, (odpowiedzialnego za oporność na leki) i nadekspresję białek regulujących apoptozę: FAS, CASP8 i CASP10. Na podstawie analizy wyników niniejszej pracy, wykazano, że nastąpiło zmniejszenie ekspresji genów odpowiedzialnych za indukcję apoptozy. Geny *BCLAF1* (FC=-2,18), *IGSF10* (FC=-2,94), *MAGED4* (FC=-2,17) są charakterystyczne dla mieloblastów opornych na idarubicynę. Z kolei ekspresja genu *BLK* jest wyciszana dla wszystkich analizowanych antracyklin, ale tylko w limfoblastach (DOX (FC=-3,03), DNR (FC=-3,09), IDA (FC=-2,18), MIT (FC=-2,94)). Jednocześnie obserwowano wzrost ekspresji genów negatywnie regulujących apoptozę. Gen *BCL2A1* jest nadeksprymowany w limfoblastach opornych na doksorubicynę (FC=2,95) i daunorubicynę (FC=3,87) oraz w mieloblastach opornych na daunorubicynę (FC=40,23; jeden z najwyższych wzrostów poziomu ekspresji z całego profilu) i mitoksantron (FC=15,24). Gen *FKBP11* (FC=2,05) jest unikatowy dla profilu oporności na mitoksantron w mieloblastach. Ponadto *PIK3CG* jest nadeksprymowany w mieloblastach w profilach dla DNR (FC=4,35) i MIT (FC=2,42).

Na podstawie danych literaturowych dotyczących markerów lekooporności wskazano kaspazy, jako niezbędny element w szlaku apoptozy oraz regulacji wydzielania interleukin i cytokin [261]. W niniejszej pracy stwierdzono, że ekspresja *CASP1* jest

znacząco podwyższona w limfoblastach opornych na idarubicynę (FC=2,60) i mitoksantron (FC=2,42). Nadekspresja *CASP1* odpowiada za regulację odpowiedzi immunologicznej w białaczkach i zwiększenie oporności na glukokortykoidy. W oparciu o badania sugeruje się, że inflamasom NLRP3/CASP1 reguluje poziom receptora glukokortykoidowego i zmniejsza wrażliwość komórek na glukokortykoidy, które są stosowane w leczeniu ALL. Wykazano, że nadekspresja nieaktywnych form kaspaz *CPP32* (kaspaza 3) i *ICH-1* (kaspaza 2) jest obserwowana w blastach pacjentów z AML i ALL [262]. W niniejszej pracy odnotowano także zmianę ekspresji dla innych kaspaz. Wyciszenie *CASP12* (FC=-2,46) i *CASP4* (FC=-3,75) charakterystyczne jest dla profilu oporności na DNR oraz *CASP2* (FC=-1,33) dla profilu oporności na IDA w mieloblastach, co może sugerować związek z wrażliwością na antracykliny tylko w tej linii komórkowej.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że limfoblasty z opornością na mitoksantron charakteryzowały się zwiększoną ekspresją genów zaangażowanych w kaskadę sygnalizacyjną kinazy białkowej aktywowanej mitogenami. Geny z kaskady MAPK wyróżnione dla limfoblastów opornych na mitoksantron to: *CD2* (FC=2,46), *CD244* (FC=2,22), *DUSP5* (FC=2,60) i *PTPN7* (FC=2,47), natomiast dla mieloblastów to: *BTG1* (FC=3,86), *DUSP6* (FC=3,10), *IL8* (FC=16,74), *GADD45A* (FC=2,78) i *RGL4* (FC=5,52). Szczególnie interesujące są chemokiny *CXCL2*, *CXCL3* i *IL8*. Chemokiny *CXCL2* i *CXCL3* są charakterystyczne dla limfoblastów opornych na daunorubicynę oraz mieloblastów opornych na mitoksantron (*CXCL2*: MIT AML (FC=12,91), DNR ALL (FC=4,46); *CXCL3*: MIT AML (FC=11,74), DNR ALL (FC=2,67)). Stanowią one grupę cytokin wykazujących aktywność chemotaktyczną. Regulują procesy biologiczne i patologiczne. Wzrost poziomu ekspresji *CXCL2* wiąże się ze złym rokowaniem u pacjentek z rakiem jajnika [263], a także hamuje proliferację komórek i sprzyja apoptozie w raku wątroby [264]. Nadekspresja *IL8* w komórkach raka piersi może korelować z opornością wielolekową [265]. *IL8* może zmniejszać ekspresję genu oporności wielolekowej *MDR1*, podczas gdy nie ma wpływu na ekspresję *MRP1* w komórkach raka jelita grubego opornych na doksorubicynę [266]. Ponadto Zhai i wsp. [267] wykazali, że IL-8 pochodząca z fibroblastów pośredniczy w oporności na cisplatynę w raku żołądka. Komórki unikały apoptozy indukowanej środkami chemoterapeutycznymi, co sugeruje związek IL8 z przeżyciem pacjentów. Co więcej, *CXCL3* jest skorelowany ze słabym przeżyciem u pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki. Jego nadekspresję obserwuje się w makrofagach stymulowanych przez IL-33 [268].

Na szczególną uwagę zasługują geny *DUSP5* (profil limfoblastów opornych na MIT, FC=2,60) i *DUSP6* (profil mieloblastów opornych na MIT, FC=3,10). Kodują one fosfatazy białkowe o podwójnej specyficzności. Negatywnie regulują kinazy aktywowane mitogenem (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), które są związane z proliferacją i różnicowaniem komórek. Produkt genowy *DUSP5* inaktywuje ERK1 (*extracellular signal-regulated kinase 1*), a *DUSP6* inaktywuje ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*). Supresja ekspresji *DUSP5* koreluje z opornością na paklitaxel i złym rokowaniem w raku piersi [269]. James i wsp. wykazali, że hamowanie *DUSP6* uwrażliwia komórki raka jajnika na środki chemioterapeutyczne poprzez regulację genów odpowiedzi sygnalizacyjnej ERK [270]. Zaś Gao i wsp. sugerują, że nadekspresja *DUSP6* zwiększa oporność na chemioterapię w raku nabłonka jajnika [271]. Warto zwrócić uwagę także na fakt, że wzmożona ekspresja genu *DUSP2* została potwierdzona zarówno w eksperymencie mikromacierzowym jak i qPCR, w profilach oporności na daunorubicynę, idarubicynę oraz mitoksantron. Co więcej, w oparciu o analizę CGH w obecnym badaniu wykazano amplifikację regionu 8p11.21-p12, w którym zlokalizowany jest gen z rodziny DUSP (*DUSP26*). Gen ten koduje fosfatazę tyrozynową i wykazuje podwójną specyficzność poprzez defosforylację tyrozyny, a także reszt serynowych i treoninowych. *DUSP26* może regulować proliferację komórek i oddziaływać z supresorem nowotworu TP53 poprzez defosforylację [122]. Ponadto, geny *BAG4*, *HTRA4* i *TM2D2* mające swój *locus* w obrębie amplifikowanego regionu 8p11.21-p12, są zaangażowane w programowaną śmierć komórek. Rola *HTRA4* i *TM2D2* w oporności na terapeutyki i leukemogenezie wciąż jest nieznana. Natomiast w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci wykazano korelację *BAG4* z odpowiedzią na chemioterapię oraz z apoptozą komórek białczkowych. Istotnie podwyższony wskaźnik ekspresji *BAG4* obserwuje się w grupach opornych i z nawrotami choroby białczkowej w porównaniu z grupami w początkowej fazie leczenia i remisji. Leki ukierunkowane na mikrotubule, takie jak np. winkrystyna i taksol mogą znacząco obniżyć ekspresję *BAG4* w szlaku apoptozy, podczas gdy daunorubicyna i cytarabina nie mogą [272]. Nadekspresja *BAG4* może być skorelowana z klasyfikacją kliniczną, efektem leczniczym i rokowaniem w ALL [273].

Na podstawie badań sugeruje się, że oporność blastów białczkowych może wynikać z zaburzeń szlaku integrzyn. W niniejszej pracy, w oparciu o dane mikromacierzowe wykazano wzrost poziomu ekspresji dla genu *ITGB2* w profilach oporności na DNR (FC=2,42) i IDA (FC=2,50) w mieloblastach oraz *PIK3CG* w profilach oporności na

DNR (FC=4,35) i MIT (FC=2,42) w mieloblastach. Ponadto, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu ekspresji genu *ITGB2* w odniesieniu do analizy względnego poziomu ekspresji z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym w profilu daunorubicyny i idarubicyny. Zaburzenia w szlaku sygnalizacji integryn wpływają na ważne procesy biologiczne, tj. intensyfikacja proliferacji, adhezja komórek czy unikanie apoptozy, co w konsekwencji może skutkować opornością blastów białaczkowych u pacjentów pediatrycznych [274]. W nowotworach hematologicznych *ITGB2* jest powiązany z przewlekłą białaczką limfocytową (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL) i szpiczakiem mnogim. Ekspresja *ITGB2* w CLL jest regulowana przez mechanizmy zależne lub niezależne od metylacji DNA, a wzrost ekspresji *ITGB2* promuje namnażanie komórek CLL [275]. Wei i wsp. wykazali, że *ITGB2* istotnie koreluje z chemioterapią i schematami terapii celowanej w AML. Analiza prognostyczna ujawniła, że nadekspresja *ITGB2* prowadzi do skrócenia czasu życia u pacjentów z AML i promuje wrażliwość na cytarabinę [274]. Wzmoczona ekspresja genu *PIK3CG*, kodującego kinazę ze szlaku sygnałowego PI3K/Akt, indukuje wielolekową oporność komórek ostrej białaczki szpikowej, m.in. na etopozyd. Prowadzi do zwiększenia przeżywalności komórek, naprawy dwuniciowego DNA i ominięcia szlaku apoptozy. Udział szlaku sygnałowego PI3K/Akt w wykształceniu oporności na doksorubicynę w komórkach raka piersi wykazali Mei i wsp. [276].

Docelowym enzymem, który wchodzi w interakcje z antracyklinami, jest topoizomeraza II kodowana przez gen *TOP2B*. Ma ona zdolności hydrolizujące dwa wiązania. Nacięcie obu nici, odpowiada za dodanie do cząsteczki DNA superskrętów [277]. Deregulacja osi mikro-RNA-23a/TOP2B powoduje oporność na cytarabinę w ostrej białaczce mieloblastycznej [278]. W żadnym analizowanym profilu oporności nie wykryto istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *TOP2B*.

Analizując wyniki macierzy CGH warto skupić się na delecji w obrębie 5 chromosomu del5q32q-q35.3, gdzie zlokalizowany jest gen *SLC6A7*. Skuteczność terapii przeciwnowotworowej może w znacznym stopniu zależeć od działania transporterów, takich jak członkowie nadrodziny SLC (*solute carrier group of membrane transport proteins*) reprezentowani przez gen *SLC6A7*. Jest on niezbędny podczas kierowania leków do komórek nowotworowych. Regulacja transportu przez wiele rodzajów transporterów jest niezbędna dla komórek nowotworowych, które potrzebują więcej glukozy i aminokwasów do wzrostu oraz do usuwania produktów ich metabolizmu [279]. Delecja genów *SLC* może prowadzić do inicjacji programowanej śmierci komórki

białaczkowej. Geny *SLC* mogą odgrywać rolę w procesach farmakokinetycznych leków przeciwnowotworowych. Mogą być zaangażowane we wchłanianie, metabolizm, eliminację i dystrybucję chemioterapeutyków [280]. Transportery *SLC* wykazują antagonistyczną funkcję względem transporterów *ABC*. *SLC* pobierają substancje do wnętrza komórki nowotworowej, a transportery *ABC* transportują na zewnątrz. Usunięcie transporterów *SLC* i wzmożona praca transporterów *ABC* może skutkować nabyciem oporności na stosowane leki antybiałaczkowe [281]. Bazując na wynikach analizy mikromacierzowej wykazano obniżony poziom ekspresji transporterów w mieloblastach opornych na daunorubicynę (*SLC2A4RG* (FC=-6,14)), idarubicynę (*SLC17A9* (FC=-2,13)), *SLC25A29* (FC=-2,24), *SLC44A1* (FC=-2,32)) i mitoksantron (*SLC25A1* (FC=-2,64), *SLC2A9* (FC=-3,03)). Ponadto, gen *FBXO38* (zlokalizowany w obrębie delecji 5q35.3-q32) zaangażowany jest w ubiquitynację białek, tj. *MDR1* w opornym na chemioterapię raku piersi, białka programowanej śmierci komórki *PDCD1* (*programmed cell death protein 1*). *FBXO38* reguluje także odporność przeciwnowotworową limfocytów T [282]. Pomimo obecności na zastosowanej macierzy (HG-U133A 2.0) sond dla znanych genów powiązanych z opornością (np. transporterów *ABC*, w tym *MDR1* i *MRP1*) nie wykazano znaczących zmian w ich ekspresji korelujących z opornością na analizowaną grupę leków.

Na podstawie badań wykazano również delecję w obrębie 9 chromosomu 9p21.3 jako ważną rearanżację genomową dla rozwoju wielu nowotworów, w tym ostrych białaczek. W oparciu o wyniki eksperymentu mikromacierzowego CGH w niniejszej pracy, sugeruje się korelację z opornością na doksorubicynę. Gen *MTAP* znajduje się w regionie 9p21.3 i koduje fosforylazę metyloadenozyny. Enzym ten może być alternatywnym źródłem nukleotydów purynowych, gdy synteza *de novo* puryn jest hamowana przez antymetabolity (np. metotreksat). W oparciu o wyniki badań sugeruje się, że gen *MTAP*, którego działanie jest powiązane z supresorem *p16*, często ulega homozygotycznej delecji w 30 % - 50 % nowotworów złośliwych z komórek T [283]. Delecja *MTAP* koreluje ze złym rokowaniem w T-ALL i krótszym przeżyciem w B-ALL [284]. *MTAP* może być celem chemioterapii w ALL i białaczkach z dojrzałych komórek T, która jest wywoływana przez wirus HTLV-I (*human T-cell leukemia virus type-1*) [285]. Należy również zauważyć, że geny *MTAP*, *p15* i *p16* są zlokalizowane na chromosomie 9p21.3, a ich jednoczesna delecja jest powszechnie opisywana nie tylko w białaczkach, ale również w glejaku i raku trzustki [286, 287]. Delecja genów supresorowych *p15/p16* (*CDKN2A/B*) regulujących cykl komórkowy wiąże się ze złym rokowaniem w

białaczkach, bardziej agresywnym przebiegiem choroby i krótszym czasem przeżycia. Utrata kontroli nad proliferacją i cyklem komórkowym są kluczowe w rozwoju nowotworów [288]. Delecje *CDKN2* są częste w ALL indukowanej przez BCR-ABL i prowadzą do gorszych wyników leczenia wśród pacjentów pediatrycznych [289]. Rokowanie związane z delecją 9p21.3 może się różnić w zależności od stopnia delecji (usunięcie jednego lub dwóch alleli genów). W niniejszej pracy, w oparciu o eksperymenty z użyciem mikromacierzy ekspresyjnych oraz Real-Time PCR, nie potwierdzono korelacji innych genów z grupy CDKN (*CDKN1A*, *CDKN1B*) z brakiem wrażliwości na analizowane cytostatyki.

Kolejnym mechanizmem lekooporności komórek białaczkowych jest nadekspresja cytochromu P450 kodowanego przez gen *CYP*. W profilu dla doksorubicyny i daunorubicyny w limfoblastach zaobserwowano ponad 2-krotny wzrost poziomu ekspresji dla *CYP4F3*, która może mieć związek ze wzmożonym katabolizmem leków. Przyspieszony rozkład leków jest mechanizmem obronnym blastów przed cytostatykami. Bazując na najnowszych badaniach naukowych, podkreśla się ważną rolę enzymów cytochromu P450 w metabolicznej aktywacji inhibitorów kinazy tyrozynowej w ALL [290].

Z danych literaturowych wynika, że aneksyny mają związek z opornością lekową komórek białaczkowych. Aneksyna A1 (*ANXA1*) jest endogennym białkiem, które hamuje cyklooksygenazę 2 (*COX-2*) i fosfolipazę A2 (*PLA2*). Wykazuje aktywność przeciwdziałającą stanom zapalnym obserwowanym w procesie nowotworzenia. Aneksyna A1 jest opisywana jako potencjalny czynnik wykorzystywany w terapii antynowotworowej, ze względu na jej hamujące działanie w przekazywaniu sygnałów w szlaku NF- κ B, który jest wykorzystywany przez komórki nowotworowe w procesie proliferacji i jednocześnie unikaniu apoptozy. *ANXA1* zaburza szlak NF- κ B poprzez wiązanie czynnika transkrypcyjnego p65 (*nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit*). Aneksyna A1 wykazuje działania mające chronić DNA przed uszkodzeniem. W komórkach raka piersi zaobserwowano wzmożoną skłonność do nieprawidłowości w obrębie DNA, zaburzając w ten sposób integralność genomu. Nieprawidłowości w mechanizmach, w które zaangażowany jest *ANXA1*, m.in.: szlak apoptozy, szlak NF- κ B oraz regulacja ekspresji genów, zaburzenia transdukcji sygnału, replikacji DNA, mogą być podstawą zjawiska oporności na leki [291]. Podwyższona ekspresja *ANXA1* koreluje ze spadkiem oporności na winkrystynę i wzmacnia niepożądane działanie leku w białaczkach [292, 293]. W niniejszym eksperymencie mikromacierzowym odnotowano

wzrost ekspresji *ANXA1* dla wszystkich czterech analizowanych leków antracyklinowych, ale tylko w limfoblastach (DOX (FC=3,48), DNR (FC=3,28), IDA (FC=2,45), MIT (FC=2,36)). Warto zwrócić uwagę, że na podstawie wyników qPCR potwierdzono korelację nadekspresji genu *ANXA1* z opornością blastów białaczkowych na badane cytostatyki. Dodatkowo w profilach oporności na DOX i DNR w limfoblastach zaobserwowano ponad 2-krotny wzrost ekspresji *ANXA3*, który jest ściśle związany z rozwojem, progresją, przerzutami, opornością na leki oraz rokowaniem w wielu złośliwych nowotworach, takich jak: rak piersi, rak płuc i rak wątroby [294-296]. *ANXA3* odgrywa swoją rolę poprzez regulację proliferacji komórek, migracji i apoptozy poprzez PI3K/Akt i NF-κB. Na podstawie danych literaturowych wykazano, że *ANXA3* może stanowić nowy cel dla wczesnej diagnostyki i leczenia nowotworów [297].

W profilach dla limfoblastów znaczna liczba genów koduje białka pełniące funkcję receptorów, tj. *CD2*, *CD7*, *CD22*, *CD24* i *CD300A*. W profilu oporności na MIT dla limfoblastów cząsteczki CD najliczniej wyróżniają się zwiększonym poziomem ekspresji, podczas gdy w pozostałych profilach był on zróżnicowany. Dla genu *CD2* zaobserwowano ponad 2-krotną nadekspresję w limfoblastach opornych na MIT. Koduje on transmembranową glikoproteinę. Ekspresja *CD2* występująca w limfocytach T i komórkach NK pozwala na rozpoznanie kliniczne T-ALL. Może wpływać na aktywację, proliferację i apoptozę limfocytów T i komórek NK. W oparciu o badania sugeruje się korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją *CD2* w komórkach odpowiedzialnych za nawrót białaczki T komórkowej z korzystnym rokowaniem u pacjentów pediatrycznych [298].

Geny receptorowe uczestniczące w organizacji cytoszkieletu, związane są z łączeniem jonów wapnia i kalmoduliny. Ponad 2-krotny wzrost poziomu ekspresji wykazano dla genów *S100A8*, *S100A9*, *S100A11* i *S100A12* kodujących białka sygnałowe wiążące jony wapnia w cytozolu monocytów i neutrofilii. W analizowanych wzorcach deregulacja ekspresji genów *S100* jest charakterystyczna dla limfoblastów opornych na DOX, DNR i IDA oraz mieloblastów opornych na DNR. Regulują one wiele procesów komórkowych, tj. proliferacja, apoptoza, migracja i stan zapalny. Mają wysokie powinowactwo do Ca^{2+} [140]. Przyczyniają się do zwiększonej ekspresji genu oporności wielolekowej-1 (*MDR1*) poprzez regulację cytozolowego poziomu wapnia. Ponadto, zwiększają rakotwórczość poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Mogą promować przerzuty nowotworów i oporność na leki poprzez aktywację szlaków sygnałowych Wnt i PI3K/Akt. Z danych literaturowych wynika, że geny *S100* mają

szeroki udział w oporności na różne grupy leków w wielu nowotworach. Oporność na daunorubicynę jest związana nadekspresją *S100A8/A9* w AML [299]. Oporność na doksorubicynę koreluje ze wzrostem poziomu ekspresji *S100A8/A9* w raku piersi, *S100A4* w AML, *S100P* w raku jelita grubego oraz *S100A6* w raku żołądka [140, 300-303]. Celowana terapia w kierunku genów *S100* stanowi potencjalne podejście do przezwyciężenia oporności na leki w wielu nowotworach.

Podsumowując, potencjalne szlaki i markery skorelowane ze zjawiskiem oporności na leki zostały wskazane przez wyniki eksperymentów w niniejszej pracy. Zakłada się, że oporność na antracykliny może być pogłębiana poprzez zaburzenia w szlaku integryn, np. przez wzmożoną aktywność genu *ITGB2* jako prawdopodobny marker oporności na daunorubicynę w limfoblastach oraz idarubicynę w mieloblastach. Toksyczność chemioterapeutyków jest spowodowana inicjacją zaprogramowanej śmierci komórki. Apoptoza obejmuje kaskadę zdarzeń proteolitycznych promowanych przez kaspazy. Nieprawidłowości w szlaku apoptozy oraz udział kaspaz w oporności na leki zostały potwierdzone w raku piersi [304] i szpiczaku mnogim [94]. Te doniesienia naukowe i niniejsze wyniki pozwalają zaproponować nadekspresję kaspaz jako markera oporności na idarubicynę i mitoksantron w limfoblastach (*CASP1*) oraz daunorubicynę (*CASP4*) i idarubicynę (*CASP2*) w mieloblastach. Przypuszcza się, że zaburzenia genów receptorowych, tj. *S100* czy *CD*, mogą odpowiadać za kształtowanie mechanizmu oporności lekowej. Deregulację ekspresji genów z rodziny *S100* zaobserwowano w limfoblastach opornych na DOX, DNR i IDA oraz w mieloblastach opornych na DNR. Natomiast w profilu MIT dla limfoblastów charakterystyczny jest zróżnicowany poziom ekspresji genów *CD*. Fosforylacja białek jest regulowana przez fosfatazy (np. *DUSP*), które są ważne w sieci sygnalizacji komórkowej. Bazując na niniejszych wynikach wskazano na nadekspresję *DUSP* jako prawdopodobny marker oporności na idarubicynę i mitoksantron. Ponadto, sugeruje się amp8p11.21-p12 (lokalizacja *DUSP26*) jako potencjalną aberrację chromosomową skorelowaną z odpowiedzią na IDA i MIT. Zmniejszona akumulacja leku w komórce może wynikać ze zmniejszenia napływu leku przez transportery SLC. Na podstawie wyników pracy sugeruje się del5q35.3-q32 (lokalizacja *SLC6A7*) jako marker związany z brakiem wrażliwości na daunorubicynę i idarubicynę. Co więcej, bazując na otrzymanych wynikach wskazano del9p21.3 (loci *MTAP*, *p15*, *p16*) jako marker oporności na doksorubicynę. Dodatkowo wydaje się, że geny zaangażowane w aktywację komórek T również są ważne w ścieżkach oporności na leki. Zmniejszona ekspresja została zaobserwowana w profilach MIT i IDA dla

limfoblastów. Ponadto, wzrost ekspresji szlaku sygnałowego integryn był charakterystyczny dla limfoblastów opornych na DNR oraz mieloblastów opornych na DNR, MIT i IDA. Co więcej, limfoblasty oporne na DNR i mieloblasty oporne na MIT wyróżniały się wzrostem poziomu ekspresji chemokin. Oprócz tego, spadek poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za indukcję apoptozy zaobserwowano w profilach oporności na DOX, DNR, IDA, MIT w limfoblastach oraz IDA w mieloblastach. Z kolei wzrost poziomu ekspresji genów negatywnie regulujących szlak zaprogramowanej śmierci komórkowej odnotowano w profilach oporności na DOX i DNR w limfoblastach oraz DNR i MIT w mieloblastach. Istotna w kształtowaniu oporności na antracykliny wydaje się również kaskada sygnalizacji kinazy białkowej aktywowanej mitogenami, dla której wzrost ekspresji zaobserwowano w niewrażliwych na MIT blastach białaczkowych.

Zrozumienie mechanizmów oporności na leki oraz identyfikacja nowych genów docelowych w chemioterapii (np.: *CASP*, *CD*, *DUSP*, *ITGB2*, *SLC6A7*, *S100*) i rearanżacji chromosomowych (np.: del5q35.3-q32, amp8p11.21-p12, del9p21.3), które można uznać jako molekularne markery oporności na antracykliny, są pomocne w opracowywaniu skutecznej ścieżki leczenia. Opierając się na niniejszych wynikach wnioskowano, że możliwa jest identyfikacja charakterystycznych markerów oporności na leki na poziomie transkryptomu i genomu. Globalny wzorzec zmian genomowych i transkryptomocnych w ostrych białaczkach jest pomocny w zrozumieniu szlaków molekularnych, co ma bezpośredni wpływ na diagnostykę i stratyfikację ryzyka.

6. WNIOSKI

1. Oporność blastów na antracykliny w ostrej białaczce limfoblastycznej i ostrej białaczce mieloblastycznej u pacjentów pediatrycznych jest skorelowana z rearanżacjami cytogenetycznymi i zmianami w ekspresji genów, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń wielu mechanizmów komórkowych.
2. W zjawisku oporności lekowej uczestniczą zróżnicowane grupy genów kodujące przede wszystkim czynniki transkrypcyjne, białka pro- i antyapoptotyczne, chemokiny, kaspazy, integryny, regulatory enzymatyczne oraz geny odpowiedzialne za metabolizm chemioterapeutyków.
3. Potencjalne nowe markery oporności na antracykliny, które zostały wskazane na podstawie uzyskanych wyników badań to:
 - wzrost poziomu ekspresji ***ITGB2*** (kodującego integrynę) w limfoblastach i mieloblastach opornych na daunorubicynę oraz mieloblastach opornych na idarubicynę;
 - wzrost poziomu ekspresji ***CASP1*** (kodującego kaspazę) w limfoblastach niewrażliwych na idarubicynę i mitoksantron;
 - wzrost poziomu ekspresji genów receptorowych ***S100*** w limfoblastach opornych na doksorubicynę, daunorubicynę i idarubicynę oraz mieloblastach opornych na daunorubicynę;
 - wzrost poziomu ekspresji genów receptorowych ***CD*** (np. ***CD2***) w profilu oporności na mitoksantron dla limfoblastów;
 - wzrost poziomu ekspresji genów z kaskady MAPK: ***DUSP5*** w limfoblastach oraz ***DUSP6*** w mieloblastach niewrażliwych na mitoksantron;
 - spadek poziomu ekspresji genów ***SLC*** kodujących białka transportowe w mieloblastach opornych na daunorubicynę, idarubicynę oraz mitoksantron;
 - **del5q35.3-q32** (lokalizacja genu ***SLC6A7***) w profilu oporności na daunorubicynę i idarubicynę;
 - **amp8p11.21-p12** (lokalizacja genu ***DUSP26***) w profilu oporności na idarubicynę i mitoksantron;
 - **del9p21.3** (lokalizacja genów ***MTAP***, ***p15***, ***p16***) w profilu oporności na doksorubicynę.

7. STRESZCZENIE

Ostre białaczki (AL), w tym ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) i ostra białaczka mieloblastyczna (AML) są najczęstszymi nowotworami wieku dziecięcego. ALL stanowi 80% zachorowań poniżej 18. roku życia, natomiast na AML choruje około 15% dzieci z AL. W protokołach chemioterapeutycznych stosuje się leki antracyklinowe (doksorubicyna, daunorubicyna, idarubicyna, mitoksantron). Jednym z poważniejszych problemów leczenia przeciwbiałaczkowego jest zjawisko oporności na cytostatyki. Technologia mikromacierzowa umożliwia szczegółowe poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zróżnicowaną odpowiedź na leki na wielu płaszczyznach, w tym genomu oraz transkryptomu.

Celem niniejszej pracy było wskazanie potencjalnych determinantów braku wrażliwości na wybrane antracykliny w kontekście badań z wykorzystaniem technik mikromacierzowych (CGH oraz ekspresyjnych).

W badaniach uczestniczyli pacjenci pediatryczni ze zdiagnozowaną ALL lub AML, od których pobrano szpik. Z komórek jednojądrzastych materiał do badań izolowano metodami kolumnkowymi. DNA potrzebne było do przeprowadzenia eksperymentów metodą aCGH, natomiast RNA do macierzy ekspresyjnych. Próby analizowano pod względem jakościowym i ilościowym, znakowano, poddawano reakcji fragmentacji i oczyszczaniu. Preparaty hybrydowano do odpowiednich macierzy. Wszystkie etapy doświadczeń laboratoryjnych przeprowadzono zgodnie z protokołami producentów odczynników. Wyniki uzyskane w eksperymentach mikromacierzowych z sondami fluorescencyjnymi poddawano szczegółowej analizie bioinformatycznej oraz statystycznej. Wyniki z analizy mikromacierzowej zweryfikowano metodą qPCR dla wybranej grupy genów. Zidentyfikowano charakterystyczne rearanżacje cytogenetyczne i geny o zróżnicowanym poziomie ekspresji. Przeprowadzono także analizę ontologiczną.

Na podstawie wyników analiz wykazano, że podłoże oporności na antracykliny w ostrych białaczkach pediatrycznych jest zjawiskiem złożonym. U podstaw leżą nie tylko delecje czy duplikacje fragmentów chromosomów, ale również bardziej subtelne zmiany w poziomie ekspresji wielu genów. Najliczniej reprezentowane były geny odpowiedzialne za metabolizm kwasów nukleinowych, w tym czynniki transkrypcyjne. Ponadto znaczące były także geny regulujące apoptozę, szlaki sygnałowe integryn i chemokin oraz geny uczestniczące w aktywacji limfocytów B i T. Wspomniane zaburzenia mechanizmów wewnątrzkomórkowych prowadzą głównie do ominięcia

apoptozy komórek białaczkowych, ich wzmożonej proliferacji, zaburzenia adhezji międzykomórkowej, a także zahamowania aktywacji limfocytów B i T.

Analizowane profile cytogenetyczne i ekspresyjne umożliwiły identyfikację nowych markerów braku wrażliwości na antracykliny. Na podstawie uzyskanych wyników można wytypować nowe cele kolejnych badań naukowych, które mogą wspomóc efektywność terapii przeciwbiałaczkowej. Wśród wskazanych nowych potencjalnych markerów są receptory limfocytów B i T (geny *CD*), geny odpowiedzialne za wiązanie receptorów (geny *SI100*) i transport komórkowy (geny *SLC*), szlak sygnalizacji komórkowej (geny *DUSP*) oraz szlaki sygnałowe integryn (*ITGB2*) i kaspaz (geny *CASP*). Istotne w przełamaniu zjawiska lekooporności na antracykliny wydają się również rearanżacje chromosomowe, tj. del5q35.3-q32, amp8p11.21-p12 oraz del9p21.3.

Zestawienie danych transkryptomicznych i genomowych uzyskanych przy użyciu zaawansowanych technik molekularnych, daje wielowymiarowe spojrzenie na problem oporności na leki. Na podstawie wyników stwierdzono, że ekspozycja białaczkowych blastów na antracykliny inicjuje złożoną odpowiedź komórkową, która jest odzwierciedleniem globalnych zmian w ekspresji wyżej opisanych biologicznie istotnych genów.

SUMMARY

Acute leukemias (AL), including acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML), are the most common childhood cancers. ALL accounts for 80% of cases under the age of 18, while AML affects about 15% of children with AL. Chemotherapeutic protocols use anthracycline drugs (doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, mitoxantrone). One of the most serious problems of leukemia treatment is the phenomenon of cytostat resistance. Microarray technology makes it possible to gain a detailed understanding of the mechanisms responsible for differential drug response at multiple levels, including the genome and transcriptome.

The aim of this study was to identify potential determinants of insensitivity to selected anthracyclines in the context of studies using microarray (CGH and expression) techniques.

The study included pediatric patients diagnosed with ALL or AML from whom marrow was harvested. Material for the study was isolated from mononuclear cells, using columnar methods. DNA was needed for aCGH experiments, while RNA was needed for expression arrays. Samples were analyzed qualitatively and quantitatively, labeled, subjected to fragmentation reactions and purified. Preparations with the highest quality were hybridized to the corresponding arrays. All steps of laboratory experiments were carried out according to the protocols of reagent manufacturers. The results, obtained in microarray experiments with fluorescent probes, were subjected to detailed bioinformatics and statistical analysis. The results from microarray analysis were verified by qPCR for a selected group of genes. Characteristic cytogenetic rearrangements and genes with differential expression levels were identified. An ontological analysis was also carried out.

Based on the results of the analyses, it was indicated that the basis of anthracycline resistance in pediatric acute leukemia is a complex phenomenon. Underlying it are not only deletions or duplications of chromosome fragments, but also more subtle changes in the expression levels of a number of diverse genes. Genes responsible for nucleic acid metabolism, including transcription factors, were the most abundantly represented. In addition, genes regulating apoptosis, integrin and chemokine signaling pathways, as well as genes involved in the activation of B and T lymphocytes were also significant. The aforementioned perturbations of intracellular mechanisms mainly lead to bypassed

apoptosis of leukemic cells, their increased proliferation, disruption of intercellular adhesion, as well as inhibition of B and T lymphocyte activation.

The cytogenetic and expression profiles analyzed enabled the identification of new markers of anthracycline insensitivity. Based on the results, it is possible to identify new targets for further scientific research, which can support the effectiveness of anti-leukemia therapy. Among the identified new potential markers are B and T lymphocyte receptors (*CD* genes), genes responsible for receptor binding (*SI100* genes) and cellular transport (*SLC* genes), cell signaling pathway (*DUSP* genes), integrin (*ITGB2*) and caspase (*CASP* genes) signaling pathways. Chromosomal rearrangements, i.e. del5q35.3-q32, amp8p11.21-p12 and del9p21.3, also appear to be important in breaking the phenomenon of drug resistance to anthracyclines.

The compilation of transcriptomic and genomic data obtained using advanced molecular techniques, provides a multidimensional view of the problem of drug resistance. Based on the results, exposure of leukemic blasts to anthracyclines initiates a complex cellular response that reflects global changes in the expression of the biologically relevant genes described above.

8. LITERATURA

1. Inaba H, Mullighan CG: **Pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Haematologica* 2020, 105:2524.
2. Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S i wsp.: **Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update.** *Journal of Clinical Oncology* 2011, 29:551.
3. Kato M, Manabe A: **Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Pediatrics International* 2018, 60:4-12.
4. Tebbi CK: **Etiology of acute leukemia: A review.** *Cancers* 2021, 13:2256.
5. Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK: **Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2020, 10.
6. www.onkologia.org.pl: dostep 05.01.2023 r.
7. Inaba H, Pui C-H: **Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Journal of Clinical Medicine* 2021, 10:1926.
8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R i wsp.: **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood* 2016, 127:2391-2405.
9. Shallis RM, Wang R, Davidoff A i wsp.: **Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges.** *Blood Reviews* 2019, 36:70-87.
10. Koczkodaj D, Muzyka-Kasietczuk J, Chocholska S i wsp.: **Prognostic significance of isochromosome 17q in hematologic malignancies.** *Oncotarget* 2021, 12:708.
11. Lee JW, Kim S, Jang P-S i wsp.: **Differing outcomes of patients with high hyperdiploidy and ETV6-RUNX1 rearrangement in Korean pediatric precursor B cell acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer Research and Treatment* 2021, 53:567-575.
12. Malard F, Mohty M: **Acute lymphoblastic leukaemia.** *The Lancet* 2020, 395:1146-1162.
13. El Chaer F, Keng M, Ballen KK: **MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia.** *Current Hematologic Malignancy Reports* 2020, 15:83-89.
14. Brown P, Pieters R, Biondi A: **How I treat infant leukemia.** *Blood* 2019, 133:205-214.
15. Sarno F, Nebbioso A, Altucci L: **DOT1L: a key target in normal chromatin remodelling and in mixed-lineage leukaemia treatment.** *Epigenetics* 2020, 15:439-453.
16. Matsuo H, Yoshida K, Nakatani K i wsp.: **Fusion partner-specific mutation profiles and KRAS mutations as adverse prognostic factors in MLL-rearranged AML.** *Blood Advances* 2020, 4:4623-4631.
17. Lejman M, Kuśmierczuk K, Bednarz K i wsp.: **Targeted therapy in the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia—therapy and toxicity mechanisms.** *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22:9827.
18. Hurtado R, Tello S, Juarez J i wsp.: **Amplification of RUNX1 in a patient with AML.** *Journal of the Association of Genetic Technologists* 2022, 48:107-109.
19. Ampatzidou M, Papadhimitriou S, Paterakis G i wsp.: **ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): The spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis.** *Cancer Genetics* 2018, 224:1-11.
20. Okuyama K, Strid T, Kuruvilla J i wsp.: **PAX5 is part of a functional transcription factor network targeted in lymphoid leukemia.** *PLoS Genetics* 2019, 15:e1008280.
21. Harvey RC, Tasian SK: **Clinical diagnostics and treatment strategies for Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia.** *Blood Advances* 2020, 4:218-228.
22. Marke R, van Leeuwen FN, Scheijen B: **The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** *Haematologica* 2018, 103:565-574.
23. Abou Dalle I, Jabbour E, Short NJ i wsp.: **Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.** *Current Treatment Options in Oncology* 2019, 20:1-13.
24. Ratti S, Lonetti A, Follo MY i wsp.: **B-ALL complexity: is targeted therapy still a valuable approach for pediatric patients?** *Cancers* 2020, 12:3498.
25. Escherich CS, Chen W, Miyamoto S i wsp.: **Identification of TCF3 germline variants in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Blood Advances* 2022.
26. Lee SHR, Qian M, Yang W i wsp.: **Genome-wide association study of susceptibility loci for TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia in children.** *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2021, 113:933-937.
27. Huang Y, Bourquin J-P: **Targeting the oncogenic activity of TCF3-HLF in leukemia.** *Molecular & Cellular Oncology* 2020, 7:1709391.
28. Brown AL, De Smith AJ, Gant VU i wsp.: **Inherited genetic susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome.** *Blood* 2019, 134:1227-1237.

29. Okamoto Y: **Acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome.** *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia* 2020:101-108.
30. Bellavia D, Palermo R, Felli MP i wsp.: **Notch signaling as a therapeutic target for acute lymphoblastic leukemia.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2018, 22:331-342.
31. Tsujimoto S-i, Nakano Y, Osumi T i wsp.: **A cryptic NUP214-ABL1 fusion in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2018, 40:e397-e399.
32. Steimlé T, Dourthe M-E, Alcantara M i wsp.: **Clinico-biological features of T-cell acute lymphoblastic leukemia with fusion proteins.** *Blood Cancer Journal* 2022, 12:1-8.
33. Olender T, Brand M: **Characterizing the role of TLX1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Experimental Hematology* 2018, 64:S91.
34. Sin C-f, Man P-hM: **Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Diagnosis, updates in molecular pathogenesis, management, and novel therapies.** *Frontiers in Oncology* 2021, 11:750789.
35. Castaneda Puglianini O, Papadantonakis N: **Early precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia: current paradigms and evolving concepts.** *Therapeutic Advances in Hematology* 2020, 11:2040620720929475.
36. Pelcovits A, Niroula R: **Acute myeloid leukemia: a review.** *Rhode Island Medical Journal* 2020, 103:38-40.
37. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C i wsp.: **Acute myeloid leukemia: current progress and future directions.** *Blood Cancer Journal* 2021, 11:1-25.
38. Nichol JN, Kinal M, Miller WH: **The etiology of acute leukemia.** *Neoplastic Diseases of the Blood* 2018:161-177.
39. Arber DA: **Acute myeloid leukemia.** w: *Hematopathology.* Elsevier; 2018: 429-466. e425.
40. Khoury JD, Solary E, Abla O i wsp.: **The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms.** *Leukemia* 2022, 36:1703-1719.
41. Elgarten CW, Aplenc R: **Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy.** *Current Opinion in Pediatrics* 2020, 32:57-66.
42. Estey EH: **Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management.** *American Journal of Hematology* 2018, 93:1267-1291.
43. Estey EH: **Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management.** *American Journal of Hematology* 2020, 95:1368-1398.
44. Ambinder AJ, Levis M: **Potential targeting of FLT3 acute myeloid leukemia.** *Haematologica* 2021, 106:671.
45. Zhao JC, Agarwal S, Ahmad H i wsp.: **A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia.** *Blood Reviews* 2022, 52:100905.
46. Wu M, Li C, Zhu X: **FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia.** *Journal of Hematology & Oncology* 2018, 11:1-11.
47. Staudt D, Murray HC, McLachlan T i wsp.: **Targeting oncogenic signaling in mutant FLT3 acute myeloid leukemia: the path to least resistance.** *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19:3198.
48. Patnaik MM: **The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia.** *Leukemia & Lymphoma* 2018, 59:2273-2286.
49. Chen Y, Hu J: **Nucleophosmin1 (NPM1) abnormality in hematologic malignancies, and therapeutic targeting of mutant NPM1 in acute myeloid leukemia.** *Therapeutic Advances in Hematology* 2020, 11:2040620719899818.
50. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P i wsp.: **NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside.** *Blood* 2020, 136:1707-1721.
51. Lazzarotto D, Candoni A: **The role of wilms' tumor gene (WT1) expression as a marker of minimal residual disease in acute myeloid leukemia.** *Journal of Clinical Medicine* 2022, 11:3306.
52. Chapuis AG, Egan DN, Bar M i wsp.: **T cell receptor gene therapy targeting WT1 prevents acute myeloid leukemia relapse post-transplant.** *Nature Medicine* 2019, 25:1064-1072.
53. Cioccio J, Claxton D: **Therapy of acute myeloid leukemia: therapeutic targeting of tyrosine kinases.** *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2019, 28:337-349.
54. Shafik NF, Ibraheem D, Selim MM i wsp.: **The prognostic significance of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia.** *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2022, 22:e363-e375.
55. Shallis RM, Wang R, Davidoff A i wsp.: **Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges.** *Blood Reviews* 2019, 36:70-87.

56. Malczewska M, Kosmider K, Bednarz K i wsp.: **Recent advances in treatment options for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Cancers* 2022, 14.
57. www.bialaczka.org: dostęp 02.02.2023 r.
58. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN i wsp.: **Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia.** *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21:1054.
59. <https://genome.ucsc.edu>: dostęp 01.11.2022 r.
60. Della Starza I, Chiaretti S, De Propriis MS i wsp.: **Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical and clinical advances.** *Frontiers in Oncology* 2019, 9:726.
61. Contreras Yametti GP, Ostrow TH, Jasinski S i wsp.: **Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: current practice and future directions.** *Cancers (Basel)* 2021, 13.
62. Thol F, Heuser M: **Treatment for relapsed/refractory acute myeloid leukemia.** *Hemasphere* 2021, 5:e572.
63. Rasche M, Zimmermann M, Borschel L i wsp.: **Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012.** *Leukemia* 2018, 32:2167-2177.
64. Waack K, Schneider M, Walter C i wsp.: **Improved outcome in pediatric AML-the AML-BFM 2012 study.** *Blood* 2020, 136:12-14.
65. Hurvitz SA, McAndrew NP, Bardia A i wsp.: **A careful reassessment of anthracycline use in curable breast cancer.** *Breast Cancer Latest Journal* 2021, 7:134.
66. Ferrero A, Borghese M, Restaino S i wsp.: **Predicting response to anthracyclines in ovarian cancer.** *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, 19:4260.
67. Xu C, Wang Y, Guo Z i wsp.: **Pulmonary delivery by exploiting doxorubicin and cisplatin co-loaded nanoparticles for metastatic lung cancer therapy.** *Journal of Controlled Release* 2019, 295:153-163.
68. Etrych T, Daumová L, Pokorná E i wsp.: **Effective doxorubicin-based nano-therapeutics for simultaneous malignant lymphoma treatment and lymphoma growth imaging.** *Journal of Controlled Release* 2018, 289:44-55.
69. Caru M, Corbin D, Périé D i wsp.: **Doxorubicin treatments induce significant changes on the cardiac autonomic nervous system in childhood acute lymphoblastic leukemia long-term survivors.** *Clinical Research in Cardiology* 2019, 108:1000-1008.
70. Megias-Vericat JE, Martinez-Cuadron D, Herrero MJ i wsp.: **Pharmacogenetics of metabolic genes of anthracyclines in acute myeloid leukemia.** *Current Drug Metabolism* 2018, 19:55-74.
71. Sawicki KT, Sala V, Prever L i wsp.: **Preventing and treating anthracycline cardiotoxicity: new insights.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2021, 61:309-332.
72. Bhagat A, Kleinerman ES: **Anthracycline-induced cardiotoxicity: causes, mechanisms, and prevention.** *Current Advances in Osteosarcoma* 2020:181-192.
73. Bayles CE, Hale DE, Konieczny A i wsp.: **Upcycling the anthracyclines: New mechanisms of action, toxicology, and pharmacology.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 2022:116362.
74. Christidi E, Brunham LR: **Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity.** *Cell Death & Disease* 2021, 12:1-15.
75. Sritharan S, Sivalingam N: **A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin.** *Life Sciences* 2021, 278:119527.
76. van der Zanden SY, Qiao X, Neefjes J: **New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin.** *The FEBS Journal* 2021, 288:6095-6111.
77. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E i wsp.: **Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity.** *Pharmacological Reviews* 2004, 56:185-229.
78. Saleem T, Kasi A: **Daunorubicin.** 2020.
79. Al-Aamri HM, Ku H, Irving HR i wsp.: **Time dependent response of daunorubicin on cytotoxicity, cell cycle and DNA repair in acute lymphoblastic leukaemia.** *BMC Cancer* 2019, 19:1-12.
80. Mizutani H, Shiga C, Imai M i wsp.: **Idarubicin, an anthracycline, induces oxidative DNA damage in the presence of copper (II).** *Anticancer Research* 2020, 40:5399-5404.
81. Park SH, Lee J, Kang M i wsp.: **Mitoxantrone induces apoptosis in osteosarcoma cells through regulation of the Akt/FOXO3 pathway.** *Oncology Letters* 2018, 15:9687-9696.
82. Wang X, Zhang H, Chen X: **Drug resistance and combating drug resistance in cancer.** *Cancer Drug Resistance* 2019, 2:141.
83. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB i wsp.: **Cancer drug resistance: an evolving paradigm.** *Nature Reviews Cancer* 2013, 13:714-726.

84. Zhao M, Ma J, Li M i wsp.: **Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans.** *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22:12808.
85. Kaur G, Gupta S, Singh P i wsp.: **Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer.** *Clinical & Translational Oncology* 2020, 22:1667-1680.
86. Wang X, Zhang H, Chen X: **Drug resistance and combating drug resistance in cancer.** *Cancer Drug Resistance* 2019, 2:141-160.
87. Leandro K, Bicker J, Alves G i wsp.: **ABC transporters in drug-resistant epilepsy: mechanisms of upregulation and therapeutic approaches.** *Pharmacological Research* 2019, 144:357-376.
88. Xiao H, Zheng Y, Ma L i wsp.: **Clinically-relevant ABC transporter for anti-cancer drug resistance.** *Frontiers in Pharmacology* 2021, 12:648407.
89. Machioka K, Izumi K, Kadono Y i wsp.: **Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines.** *Oncotarget* 2018, 9:16185.
90. Yin W, Xiang D, Wang T i wsp.: **The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells.** *Scientific Reports* 2021, 11:10791.
91. Wang JQ, Wu ZX, Yang Y i wsp.: **ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer: A review of recent updates.** *Journal of Evidence-based Medicine* 2021, 14:232-256.
92. Hafezi S, Rahmani M: **Targeting BCL-2 in cancer: advances, challenges, and perspectives.** *Cancers* 2021, 13:1292.
93. Pinto V, Bergantim R, Caires HR i wsp.: **Multiple myeloma: Available therapies and causes of drug resistance.** *Cancers* 2020, 12:407.
94. Robak P, Drozd I, Szemraj J i wsp.: **Drug resistance in multiple myeloma.** *Cancer Treatment Reviews* 2018, 70:199-208.
95. Bolandi SM, Pakjoo M, Beigi P i wsp.: **A role for the bone marrow microenvironment in drug resistance of acute myeloid leukemia.** *Cells* 2021, 10:2833.
96. Ranjbar R, Karimian A, Aghaie Fard A i wsp.: **The importance of miRNAs and epigenetics in acute lymphoblastic leukemia prognosis.** *Journal of Cellular Physiology* 2019, 234:3216-3230.
97. Si W, Shen J, Zheng H i wsp.: **The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance.** *Clinical Epigenetics* 2019, 11:1-24.
98. Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J: **Cancer stem cell (CSC) resistance drivers.** *Life Sciences* 2019, 234:116781.
99. Li Y, Wang Z, Ajani JA i wsp.: **Drug resistance and cancer stem cells.** *Cell Communication and Signaling* 2021, 19:1-11.
100. Creixell M, Kim H, Mohammadi F i wsp.: **Systems approaches to uncovering the contribution of environment-mediated drug resistance.** *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2022, 26:101005.
101. Phi LTH, Sari IN, Yang Y-G i wsp.: **Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment.** *Stem Cells International* 2018, 2018.
102. Vasani N, Basalga J, Hyman DM: **A view on drug resistance in cancer.** *Nature* 2019, 575:299-309.
103. Gottesman MM, Ludwig J, Xia D i wsp.: **Defeating drug resistance in cancer.** *Discovery Medicine* 2009, 6:18-23.
104. Shinawi M, Cheung SW: **The array CGH and its clinical applications.** *Drug Discovery Today* 2008, 13:760-770.
105. Cheung SW, Bi W: **Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics.** *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2018, 18:531-542.
106. Kang JU: **Medical Implementation of Microarray Technology.** *Korean Journal of Clinical Laboratory Science* 2020, 52:310-316.
107. Oostlander AE, Meijer G, Ylstra B: **Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics.** *Clinical Genetics* 2004, 66:488-495.
108. Pinkel D, Albertson DG: **Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer.** *Nature Genetics* 2005, 37:S11-S17.
109. Inazawa J, Inoue J, Imoto I: **Comparative genomic hybridization (CGH) - arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes.** *Cancer Science* 2004, 95:559-563.
110. Narrandes S, Xu W: **Gene expression detection assay for cancer clinical use.** *Journal of Cancer* 2018, 9:2249.
111. Tarca AL, Romero R, Draghici S: **Analysis of microarray experiments of gene expression profiling.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006, 195:373-388.
112. Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ i wsp.: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, 415:530-536.

113. Handschuh L: **Not only mutations matter: molecular picture of acute myeloid leukemia emerging from transcriptome studies.** *Journal of Oncology* 2019, 2019.
114. Patnala R, Clements J, Batra J: **Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools.** *BMC Genetics* 2013, 14:1-11.
115. Bereza W, Szczepanek J, Laskowska J i wsp.: **New candidate genes for lack of sensitivity to therapy in pediatric leukemias.** *Current Cancer Drug Targets* 2017, 17:333-343.
116. Stanulla M, Cavé H, Moorman AV: **IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker?** *Blood* 2020, 135:252-260.
117. Zhu M, Zhao S: **Candidate gene identification approach: progress and challenges.** *International Journal of Biological Sciences* 2007, 3:420.
118. Laskowska J, Szczepanek J, Styczyński J i wsp.: **Array comparative genomic hybridization in pediatric acute leukemias.** *Pediatric Hematology and Oncology* 2013, 30:677-687.
119. Cocco N, Anelli L, Zagaria A i wsp.: **Next-generation sequencing in acute lymphoblastic leukemia.** *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20:2929.
120. Gonzalez-Gascon y Marin I, Hernandez-Sanchez M, Rodríguez-Vicente AE i wsp.: **Characterizing patients with multiple chromosomal aberrations detected by FISH in chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia & Lymphoma* 2018, 59:633-642.
121. Styczyński J: **Skojarzony profil oporności *in vitro* na cytostatyki w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci *de novo* i we wznowie - związek z cyklem komórkowym i rearanżacjami genów.** *Współczesna Onkologia* 2007, 11:367-375.
122. www.genecards.org/: dostęp 01.10.2020 r.
123. <http://pantherdb.org/>: wersja 7.0, dostęp 01.10.2015 r.
124. www.genome.jp/kegg/: dostęp 01.10.2022 r.
125. www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/: dostęp 01.09.2015 r.
126. <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer/>: dostęp 01.09.2015 r.
127. Alkashgari HR, Ruiz-Jimenez C, Stoian C i wsp.: **TSLP as a potential therapy in the treatment of CRLF2 B cell acute lymphoblastic leukemia.** *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24:474.
128. Georges A, Coyaud E, Marcon E i wsp.: **USP7 regulates cytokinesis through FBXO38 and KIF20B.** *Scientific Reports* 2019, 9:1-16.
129. Megías-Vericat JE, Martínez-Cuadrón D, Solana-Altabella A i wsp.: **Systematic review of pharmacogenetics of ABC and SLC transporter genes in acute myeloid leukemia.** *Pharmaceutics* 2022, 14:878.
130. Zhong S, Khalil RA: **A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease.** *Biochemical Pharmacology* 2019, 164:188-204.
131. Thompson EM, Stoker AW: **A review of DUSP26: structure, regulation and relevance in human disease.** *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22:776.
132. Asl EA, Mehrabadi JF, Afshar D i wsp.: **Apoptotic effects of Linum album extracts on AGS human gastric adenocarcinoma cells and ZNF703 oncogene expression.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2018, 19:2911.
133. Baggen J, Thibaut HJ, Hurdiss DL i wsp.: **Identification of the cell-surface protease ADAM9 as an entry factor for encephalomyocarditis virus.** *MBio* 2019, 10:e01780-01719.
134. Kumari S, Singh J, Arora M i wsp.: **Copy number alterations in CDKN2A/2B and MTAP genes are associated with low MEF2C expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Cureus* 2022, 14:e32151.
135. Tutar L, Ozgur A, Tutar Y: **Involvement of miRNAs and pseudogenes in cancer.** *Methods in Molecular Biology* 2018, 1699:45-66.
136. Loscocco F, Visani G, Galimberti S i wsp.: **BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia.** *Frontiers in Oncology* 2019, 9:939.
137. Tan TK, Zhang C, Sanda T: **Oncogenic transcriptional program driven by TAL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *International Journal of Hematology* 2019, 109:5-17.
138. Wang X, Lin M, Zhao J i wsp.: **TSPAN7 promotes the migration and proliferation of lung cancer cells via epithelial-to-mesenchymal transition.** *Oncotargets and Therapy* 2018:8815-8822.
139. Sun R, Hu R, Xiong J i wsp.: **Novel ALK-EML4 fusion with prominent mucous and hyaline stroma: Expanding the molecular genetic spectrum of S100 and CD34 positive spindle cell tumor.** *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 2022, 65:695-698.
140. Hua X, Zhang H, Jia J i wsp.: **Roles of S100 family members in drug resistance in tumors: Status and prospects.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020, 127:110156.

141. Bottardi S, Guieze R, Bourgoïn V i wsp.: **MNDA controls the expression of MCL-1 and BCL-2 in chronic lymphocytic leukemia cells.** *Experimental Hematology* 2020, 88:68-82. e65.
142. Xie L, Ma L, Liu S i wsp.: **Chimeric antigen receptor T cells targeting CD7 in a child with high-risk T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *International Immunopharmacology* 2021, 96:107731.
143. Liang J-H, Zhu H-Y, Xu D-M i wsp.: **A new SH2D1A mutation in a female adult XLP disease with hemophagocytic lymphohistiocytosis and NK-cell leukemia.** *Annals of Hematology* 2019, 98:2829-2831.
144. Ling Y, Xie Q, Zhang Z i wsp.: **Protein kinase inhibitors for acute leukemia.** *Biomarker Research* 2018, 6:1-7.
145. Xu K, Yan X, Ouyang G i wsp.: **Upregulated miR-96-5p inhibits cell proliferation by targeting HBEGF in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line.** *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2020, 58:219-226.
146. Fang Y, Wang M, Hu S i wsp.: **Recurrent novel P2RY8/IGH translocations in B-lymphoblastic leukemia/lymphoma.** *Frontiers in Oncology* 2022, 12.
147. Liu Y, Wang G, Zhang J i wsp.: **CD9, a potential leukemia stem cell marker, regulates drug resistance and leukemia development in acute myeloid leukemia.** *Stem Cell Research & Therapy* 2021, 12:1-13.
148. Leung KT, Zhang C, Chan KYY i wsp.: **CD9 blockade suppresses disease progression of high-risk pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and enhances chemosensitivity.** *Leukemia* 2020, 34:709-720.
149. Tong Y, Xiang Y, Li B i wsp.: **Association between TERT gene polymorphisms and acute myeloid leukemia susceptibility in a Chinese population: a case-control study.** *Cancer Cell International* 2020, 20:1-6.
150. Jebaraj BMC, Stilgenbauer S: **Telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia.** *Frontiers in Oncology* 2021, 10:612665.
151. Eskandari E, Hashemi M, Naderi M i wsp.: **Leukocyte telomere length shortening, hTERT genetic polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2018, 19:1515.
152. Nault J-C, Ningarhari M, Rebouissou S i wsp.: **The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019, 16:544-558.
153. Powter B, Jeffreys SA, Sareen H i wsp.: **Human TERT promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2021, 147:1007-1017.
154. da Silva EM, Selenica P, Vahdatinia M i wsp.: **TERT promoter hotspot mutations and gene amplification in metaplastic breast cancer.** *NPJ Breast Cancer* 2021, 7:43.
155. Shen W, Xie J, Zhao S i wsp.: **ICAM3 mediates inflammatory signaling to promote cancer cell stemness.** *Cancer Letters* 2018, 422:29-43.
156. Peterman E, Valius M, Prekeris R: **CLIC4 is a cytokinetic cleavage furrow protein that regulates cortical cytoskeleton stability during cell division.** *Journal of Cell Science* 2020, 133.
157. Verma K, Zang T, Penning TM i wsp.: **Potent and highly selective aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) inhibitors act as chemotherapeutic potentiators in acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2019, 62:3590-3616.
158. Morell A, Čermáková L, Novotná E i wsp.: **Bruton's tyrosine kinase inhibitors ibrutinib and acalabrutinib counteract anthracycline resistance in cancer cells expressing AKR1C3.** *Cancers* 2020, 12:3731.
159. Liu Y, Lu R, Cui W i wsp.: **High IFITM3 expression predicts adverse prognosis in acute myeloid leukemia.** *Cancer Gene Therapy* 2020, 27:38-44.
160. Lu S, Yao Y, Xu G i wsp.: **CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma.** *Cell Death & Disease* 2018, 9:646.
161. Yuan H, Guo H, Luan X i wsp.: **Albumin nanoparticle of paclitaxel (abraxane) decreases while taxol increases breast cancer stem cells in treatment of triple negative breast cancer.** *Molecular Pharmaceutics* 2020, 17:2275-2286.
162. Kurata M, Onishi I, Takahara T i wsp.: **C/EBP β induces B-cell acute lymphoblastic leukemia and cooperates with BLNK mutations.** *Cancer Science* 2021, 112:4920-4930.
163. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG i wsp.: **PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia.** *Nature Genetics* 2019, 51:296-307.
164. Isidro-Hernández M, Mayado A, Casado-García A i wsp.: **Inhibition of inflammatory signaling in Pax5 mutant cells mitigates B-cell leukemogenesis.** *Scientific Reports* 2020, 10:19189.
165. Bruzzese A, Leardini D, Masetti R i wsp.: **GATA2 related conditions and predisposition to pediatric myelodysplastic syndromes.** *Cancers* 2020, 12:2962.

166. McReynolds LJ, Zhang Y, Yang Y i wsp.: **Rapid progression to AML in a patient with germline GATA2 mutation and acquired NRAS Q61K mutation.** *Leukemia Research Reports* 2019, 12:100176.
167. Zhang L, Gao L, Shao M i wsp.: **A MYC target long non-coding RNA GATA2-AS1 regulates non-small cell lung cancer growth.** *Neoplasma* 2019, 66:954-962.
168. Alikarami F, Riedel SS, Li Q i wsp.: **The role of GATA2 in drug resistance in AML.** *Blood* 2022, 140:97-98.
169. Guo X, Yan B, Qiu Y: **HOXA11 regulates chemoresistance by modulating p53 gene expression in acute myeloid leukemia.** w.: American Society of Hematology Washington, DC; 2019.
170. Talati C, Pinilla-Ibarz J: **Resistance in chronic myeloid leukemia: definitions and novel therapeutic agents.** *Current Opinion in Hematology* 2018, 25:154-161.
171. Dai H-P, Yin J, Li Z i wsp.: **Rapid molecular response to dasatinib in a pediatric relapsed acute lymphoblastic leukemia with NCOR1-LYN fusion.** *Frontiers in Oncology* 2020, 10:359.
172. Galetzka D, Böck J, Wagner L i wsp.: **Hypermethylation of RAD9A intron 2 in childhood cancer patients, leukemia and tumor cell lines suggest a role for oncogenic transformation.** *EXCLI Journal* 2022, 21:117.
173. Wayne AS, Shah NN, Bhojwani D i wsp.: **Phase 1 study of the anti-CD22 immunotoxin moxetumomab pasudotox for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2017, 130:1620-1627.
174. Paul MR, Wong V, Aristizabal P i wsp.: **Treatment of recurrent refractory pediatric Pre-B acute lymphoblastic leukemia using inotuzumab ozogamicin monotherapy resulting in CD22 antigen expression loss as a mechanism of therapy resistance.** *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2019, 41:e546-e549.
175. Liu W, Rodgers GP: **Olfactomedin 4 expression and functions in innate immunity, inflammation, and cancer.** *Cancer and Metastasis Reviews* 2016, 35:201-212.
176. Urtishak KA, Wang L-S, Culjkovic-Kraljacic B i wsp.: **Targeting EIF4E signaling with ribavirin in infant acute lymphoblastic leukemia.** *Oncogene* 2019, 38:2241-2262.
177. Grönroos T, Mäkinen A, Laukkanen S i wsp.: **Clinicopathological features and prognostic value of SOX11 in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Scientific Reports* 2020, 10:1-12.
178. Tosic N, Petrovic I, Grujicic NK i wsp.: **Prognostic significance of SOX2, SOX3, SOX11, SOX14 and SOX18 gene expression in adult de novo acute myeloid leukemia.** *Leukemia Research* 2018, 67:32-38.
179. In't Hout FE, Gerritsen M, Bullinger L i wsp.: **Transcription factor 4 (TCF4) expression predicts clinical outcome in RUNX1 mutated and translocated acute myeloid leukemia.** *Haematologica* 2020, 105:e454.
180. da Silva SD, Marchi FA, Su J i wsp.: **Co-overexpression of TWIST1-CSF1 is a common event in metastatic oral cancer and drives biologically aggressive phenotype.** *Cancers* 2021, 13:153.
181. Yeeravalli R, Kaushik K, Das A: **TWIST1-mediated transcriptional activation of PDGFRβ in breast cancer stem cells promotes tumorigenesis and metastasis.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2021, 1867:166141.
182. Abdel Raouf SM, Ibrahim TR, Abdelaziz LA i wsp.: **Prognostic value of TWIST1 and EZH2 expression in colon cancer.** *Journal of Gastrointestinal Cancer* 2021, 52:90-98.
183. BenAyed-Guerfali D, Dabbèche-Bouricha E, Ayadi W i wsp.: **Association of FOXA1 and EMT markers (Twist1 and E-cadherin) in breast cancer.** *Molecular Biology Reports* 2019, 46:3247-3255.
184. Filippou PS, Karagiannis GS, Constantinidou A: **Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target.** *Oncogene* 2020, 39:2040-2054.
185. Zhang Y-H, Lu A-D, Yang L i wsp.: **PRAME overexpression predicted good outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia patients receiving chemotherapy.** *Leukemia Research* 2017, 52:43-49.
186. Lobbardi R, Pinder J, Martinez-Pastor B i wsp.: **TOX regulates growth, DNA repair, and genomic instability in T-cell acute lymphoblastic leukemia A role for TOX in T-ALL.** *Cancer Discovery* 2017, 7:1336-1353.
187. Du R, Liu B, Zhou L i wsp.: **Downregulation of annexin A3 inhibits tumor metastasis and decreases drug resistance in breast cancer.** *Cell Death & Disease* 2018, 9:1-11.
188. Jin Y, Huang Y, Chen P: **ANXA3 deletion inhibits the resistance of lung cancer cells to oxaliplatin.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2020, 24:3741-3748.
189. Stachelscheid J, Jiang Q, Herling M: **The modes of dysregulation of the proto-oncogene T-cell leukemia/lymphoma 1A.** *Cancers* 2021, 13:5455.

190. Paduano F, Gaudio E, Mensah AA i wsp.: **T-cell leukemia/lymphoma 1 (TCL1): an oncogene regulating multiple signaling pathways.** *Frontiers in Oncology* 2018, 8:317.
191. Han Q, Ma J, Gu Y i wsp.: **RAG1 high expression associated with IKZF1 dysfunction in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia.** w.: AACR; 2018.
192. Aref S, Khaled N, Menshawy NE i wsp.: **Clinical value of RAG1 expression and IKZF1 deletions in Philadelphia negative pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** *Pediatric Hematology and Oncology* 2020, 37:380-389.
193. De Coninck S, Berx G, Taghon T i wsp.: **ZEB2 in T-cells and T-ALL.** *Advances in Biological Regulation* 2019, 74:100639.
194. Xiao C, Li M, Huang Q i wsp.: **SPAG9 promotes prostate cancer proliferation and metastasis via MAPK signaling pathway.** *American Journal of Translational Research* 2019, 11:5249-5260.
195. Mayumi A, Tomii T, Imamura T i wsp.: **Leukemic Cell with a Novel Kinase Fusion Gene SPAG9-JAK2 Exhibits High Sensitivity to Ruxolitinib.** w.: American Society of Hematology Washington, DC; 2019.
196. Jagadish N, Fatima R, Sharma A i wsp.: **Sperm associated antigen 9 (SPAG9) a promising therapeutic target of ovarian carcinoma.** *Tumor Biology* 2018, 40:1010428318773652.
197. Luo S, Ren B, Zou G i wsp.: **SPAG9/MKK3/p38 axis is a novel therapeutic target for liver cancer.** *Oncology Reports* 2019, 41:2329-2336.
198. Liu H, Li Z, Qiu F i wsp.: **Association between NR3C1 mutations and glucocorticoid resistance in children with acute lymphoblastic leukemia.** *Frontiers in Pharmacology* 2021, 12:634956.
199. Pan J, Yu H, Guo Z i wsp.: **Emerging role of sperm-associated antigen 9 in tumorigenesis.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018, 103:1212-1216.
200. Poursheikhani A, Yousefi H, Tavakoli-Bazzaz J i wsp.: **EGFR blockade reverses cisplatin resistance in human epithelial ovarian cancer cells.** *Iranian Biomedical Journal* 2020, 24:370.
201. Sardo FL, Pulito C, Sacconi A i wsp.: **YAP/TAZ and EZH2 synergize to impair tumor suppressor activity of TGFBR2 in non-small cell lung cancer.** *Cancer Letters* 2021, 500:51-63.
202. Liu X, Wu Y, Zhou Z i wsp.: **Celecoxib inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer via the miRNA-145/TGFBR2/Smad3 axis.** *International Journal of Molecular Medicine* 2019, 44:683-693.
203. Vander Ark A, Woodford E, Meng X i wsp.: **Reduction of TGFBR2 in osteoblasts by enzalutamide causes drug resistance in prostate cancer bone metastasis.** w.: AACR; 2018.
204. Pinto-Díez C, Ferreras-Martín R, Carrión-Marchante R i wsp.: **Deeping in the role of the MAP-kinases interacting kinases (MNKS) in cancer.** *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21:2967.
205. Mayumi A, Tomii T, Imamura T i wsp.: **Leukemic cell with a novel kinase fusion gene SPAG9-JAK2 exhibits high sensitivity to ruxolitinib.** *Blood* 2019, 134:5044.
206. Rho S-S, Kobayashi I, Oguri-Nakamura E i wsp.: **Rap1b promotes notch-signal-mediated hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion.** *Developmental Cell* 2019, 49:681-696. e686.
207. Cui G, Wang C, Lin Z i wsp.: **Prognostic and immunological role of Ras-related protein Rap1b in pan-cancer.** *Bioengineered* 2021, 12:4828-4840.
208. Tamai H, Yamaguchi H, Miyake K i wsp.: **Amlexanox downregulates S100A6 to sensitize KMT2A/AFF1-positive acute lymphoblastic leukemia to TNF α treatment.** *Cancer Research* 2017, 77:4426-4433.
209. Hsieh C-H, Chu C-Y, Lin S-E i wsp.: **TESC promotes TGF- α /EGFR-FOXO1-mediated tumor progression in cholangiocarcinoma.** *Cancers* 2020, 12:1105.
210. Ma Y, Tahaney WM, Qian J i wsp.: **PRTN3, RGCC and SLCO4C1 are critical SOX9-regulated genes that control TNBC growth.** w.: AACR; 2020.
211. Ma Y, Chen Y, Li Y i wsp.: **Cystatin A suppresses tumor cell growth through inhibiting epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer.** *Oncotarget* 2018, 9:14084.
212. Wiktorowicz K, Kaszkowiak K, Samborski W: **Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Część 3. Rola antygenów MHC w chorobach reumatycznych.** w.: *Forum Reumatologiczne: 2019; 2019: 33-42.*
213. Thompson MA, Seegmiller A, Smith C i wsp.: **50. Loss of TP53 in a pediatric patient with Down syndrome, B-lymphoblastic leukemia, and the t (8; 14)(q11. 2q32) CEBPD/IGH translocation.** *Cancer Genetics* 2019, 233:S20.

214. Sorrentino A, Rienzo M, Ciccodicola A i wsp.: **Human PRDM2: Structure, function and pathophysiology.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 2018, 1861:657-671.
215. Nishii R, Baskin-Doerfler R, Yang W i wsp.: **Molecular basis of ETV6-mediated predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2021, 137:364-373.
216. Okano M, Oshi M, Butash AL i wsp.: **Triple-negative breast cancer with high levels of annexin A1 expression is associated with mast cell infiltration, inflammation, and angiogenesis.** *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20:4197.
217. Oshi M, Tokumaru Y, Mukhopadhyay S i wsp.: **Annexin A1 expression is associated with epithelial–mesenchymal transition (EMT), cell proliferation, prognosis, and drug response in pancreatic cancer.** *Cells* 2021, 10:653.
218. Sabran A, Kumolosasi E: **Effects of annexin A1 on apoptosis and cell cycle arrest in human leukemic cell lines.** *Acta Pharmaceutica* 2019, 69:75-86.
219. Gonzalez MA, Bencomo AE, Barreto-Vargas C i wsp.: **Role of G0S2 in chronic myeloid leukemia and TKI resistance.** w.: AACR; 2020.
220. Yao C, Kobayashi M, Chen S i wsp.: **Nectin modulates leukemia-initiating cell quiescence and chemotherapy response.** *Oncotarget* 2017, 8:87607.
221. Yu Z, Zhu J, Wang H i wsp.: **Function of BCLAF1 in human disease.** *Oncology Letters* 2022, 23:1-21.
222. Tian L, Cao J, Ji Q i wsp.: **The downregulation of miR-3173 in B-cell acute lymphoblastic leukaemia promotes cell invasion via PTK2.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017, 494:569-574.
223. Yuniati L, Scheijen B, van der Meer LT i wsp.: **Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control.** *Journal of Cellular Physiology* 2019, 234:5379-5389.
224. Sun L, Gang X, Li Z i wsp.: **Advances in understanding the roles of CD244 (SLAMF4) in immune regulation and associated diseases.** *Frontiers in Immunology* 2021, 12:648182.
225. Liu Y, Zhang J, Du Z i wsp.: **Comprehensive analysis of PTPN family expression and prognosis in acute myeloid leukemia.** *Frontiers in Genetics* 2022, 13.
226. Wang Y, Xiu J, Ren C i wsp.: **Protein kinase PIM2: A simple PIM family kinase with complex functions in cancer metabolism and therapeutics.** *Journal of Cancer* 2021, 12:2570.
227. Simeoni F, Romero-Camarero I, Camera F i wsp.: **Enhancer recruitment of transcription repressors RUNX1 and TLE3 by mis-expressed FOXC1 blocks differentiation in acute myeloid leukemia.** *Cell Reports* 2021, 36:109725.
228. Parish AJ, Nguyen V, Goodman AM i wsp.: **GNAS, GNAQ, and GNA11 alterations in patients with diverse cancers.** *Cancer* 2018, 124:4080-4089.
229. Huang S, Zhang B, Fan W i wsp.: **Identification of prognostic genes in the acute myeloid leukemia microenvironment.** *Aging* 2019, 11:10557.
230. Oh E, Kim J-H, Um J i wsp.: **Genome-wide transcriptomic analysis of non-tumorigenic tissues reveals aging-related prognostic markers and drug targets in renal cell carcinoma.** *Cancers* 2021, 13:3045.
231. Mack EK, Marquardt A, Langer D i wsp.: **Comprehensive genetic diagnosis of acute myeloid leukemia by next-generation sequencing.** *Haematologica* 2019, 104:277.
232. Li R, Wu X, Xue K i wsp.: **ITGAL infers adverse prognosis and correlates with immunity in acute myeloid leukemia.** *Cancer Cell International* 2022, 22:1-11.
233. Johansen S, Brenner AK, Bartaula-Brevik S i wsp.: **The possible importance of β 3 integrins for leukemogenesis and chemoresistance in acute myeloid leukemia.** *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19:251.
234. Aaron M, Nadeau G, Ouimet-Grennan E i wsp.: **Identification of a single-nucleotide polymorphism within CDH2 gene associated with bone morbidity in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors.** *Pharmacogenomics* 2019, 20:409-420.
235. Chiou J-T, Wang L-J, Lee Y-C i wsp.: **Naja atra cardiotoxin 1 induces the FasL/Fas death pathway in human leukemia cells.** *Cells* 2021, 10:2073.
236. Waters AM, Der CJ: **KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2018, 8:a031435.
237. Afrăsănie V-A, Marinca MV, Alexa-Stratulat T i wsp.: **KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer—practical implications for the clinician.** *Radiology and Oncology* 2019, 53:265-274.
238. Jerchel IS, Hoogkamer AQ, Ariës IM i wsp.: **RAS pathway mutations as a predictive biomarker for treatment adaptation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia* 2018, 32:931-940.

239. Lee J, Sheen JH, Lim O i wsp.: **Abrogation of HLA surface expression using CRISPR/Cas9 genome editing: a step toward universal T cell therapy.** *Scientific Reports* 2020, 10:17753.
240. Yanada M, Konuma T, Kuwatsuka Y i wsp.: **Unit selection for umbilical cord blood transplantation for adults with acute myeloid leukemia in complete remission: a Japanese experience.** *Bone Marrow Transplantation* 2019, 54:1789-1798.
241. David K, Friedlander G, Pellegrino B i wsp.: **CD74 as a regulator of transcription in normal B cells.** *Cell Reports* 2022, 41:111572.
242. Huang L, Luo E-L, Xie J i wsp.: **FZD2 regulates cell proliferation and invasion in tongue squamous cell carcinoma.** *International Journal of Biological Sciences* 2019, 15:2330.
243. Thangavadivel S, Pan A, Chen X i wsp.: **Characterization of residual CLL following long-term bruton tyrosine kinase inhibitor therapy.** *Blood* 2021, 138:2620.
244. Khateb A, Ronai ZA: **Unfolded protein response in leukemia: from basic understanding to therapeutic opportunities.** *Trends Cancer* 2020, 6:960-973.
245. Evangelisti C, Rusciano I, Mongiorgi S i wsp.: **The wide and growing range of lamin B-related diseases: from laminopathies to cancer.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022, 79:126.
246. Yilmaz H, Toy HI, Marquardt S i wsp.: **In silico methods for the identification of diagnostic and favorable prognostic markers in acute myeloid leukemia.** *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22.
247. <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>: dostę 10.01.2023 r.
248. Huang L, Li B, Li X i wsp.: **Significance and mechanisms of P-glycoprotein in central nervous system diseases.** *Current Drug Targets* 2019, 20:1141-1155.
249. August KJ, Guest EM, Lewing K i wsp.: **Treatment of children with relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia with mitoxantrone, vincristine, pegaspargase, dexamethasone, and bortezomib.** *Pediatric Blood & Cancer* 2020, 67:e28062.
250. Neuendorff NR, Loh KP, Mims AS i wsp.: **Anthracycline-related cardiotoxicity in older patients with acute myeloid leukemia.** *Blood Advances* 2020, 4:762-775.
251. Zhang J, Gu Y, Chen B: **Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia.** *Oncotargets and Therapy* 2019, 12:1937.
252. Ward RA, Fawell S, Floc'h N i wsp.: **Challenges and opportunities in cancer drug resistance.** *Chemical Reviews* 2020, 121:3297-3351.
253. Rasche M, Zimmermann M, Borschel L i wsp.: **Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012.** *Leukemia* 2018, 32:2167-2177.
254. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML i wsp.: **Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment.** *The New England Journal of Medicine* 2004, 351:533-542.
255. Cheok MH, Yang W, Pui CH i wsp.: **Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells.** *Nature genetics* 2003, 34:85-90.
256. Szczepanek J, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M i wsp.: **Gene expression signatures and ex vivo drug sensitivity profiles in children with acute lymphoblastic leukemia.** *Journal of Applied Genetics* 2012, 53:83-91.
257. Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R i wsp.: **Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome.** *Blood* 2002, 99:245-251.
258. Jotte MRM, McNerney ME: **The significance of CUX1 and chromosome 7 in myeloid malignancies.** *Current Opinion in Hematology* 2022, 29:92-102.
259. Birdwell C, Fiskus W, Kadia TM i wsp.: **EVI1 dysregulation: impact on biology and therapy of myeloid malignancies.** *Blood Cancer J* 2021, 11:64.
260. Mehtonen J, Teppo S, Lahnalampi M i wsp.: **Single cell characterization of B-lymphoid differentiation and leukemic cell states during chemotherapy in ETV6-RUNX1-positive pediatric leukemia identifies drug-targetable transcription factor activities.** *Genome Medicine* 2020, 12:99.
261. Lee JK, Kang S, Wang X i wsp.: **HAP1 loss confers l-asparaginase resistance in ALL by downregulating the calpain-1-Bid-caspase-3/12 pathway.** *Blood* 2019, 133:2222-2232.
262. Huang P, Wright S: **Induction of apoptosis by nucleoside analogs.** w: *Nucleoside Analogs in Cancer Therapy.* CRC Press; 2021: 37-72.
263. Zhang F, Jiang J, Xu B i wsp.: **Over-expression of CXCL2 is associated with poor prognosis in patients with ovarian cancer.** *Medicine* 2021, 100.
264. Ding J, Xu K, Zhang J i wsp.: **Overexpression of CXCL2 inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma.** *BMB Reports* 2018, 51:630.

265. Tsoi H, Shi L, Leung M-H i wsp.: **Overexpression of BQ323636. 1 modulated AR/IL-8/CXCR1 axis to confer tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer.** *Life* 2022, 12:93.
266. Du J, He Y, Li P i wsp.: **IL-8 regulates the doxorubicin resistance of colorectal cancer cells via modulation of multidrug resistance 1 (MDR1).** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2018, 81:1111-1119.
267. Zhai J, Shen J, Xie G i wsp.: **Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer.** *Cancer Letters* 2019, 454:37-43.
268. Sun X, He X, Zhang Y i wsp.: **Inflammatory cell-derived CXCL3 promotes pancreatic cancer metastasis through a novel myofibroblast-hijacked cancer escape mechanism.** *Gut* 2022, 71:129-147.
269. Liu T, Sun H, Liu S i wsp.: **The suppression of DUSP5 expression correlates with paclitaxel resistance and poor prognosis in basal-like breast cancer.** *International Journal of Medical Sciences* 2018, 15:738-747.
270. James NE, Beffa L, Oliver MT i wsp.: **Inhibition of DUSP6 sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents via regulation of ERK signaling response genes.** *Oncotarget* 2019, 10:3315.
271. Gao Y, Li H, Han Q i wsp.: **Overexpression of DUSP6 enhances chemotherapy-resistance of ovarian epithelial cancer by regulating the ERK signaling pathway.** *Journal of Cancer* 2020, 11:3151.
272. Tao HF, Liu YS, Fang JL i wsp.: **Significance of SODD expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and its influence on chemotherapy.** *Genetics and Molecular Research* 2014, 13:2020-2031.
273. Deng L, Jiang L, Lin X-h i wsp.: **The PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 suppresses proliferation and migration and reverses multidrug resistance in acute myeloid leukemia.** *Acta Pharmacologica Sinica* 2017, 38:382-391.
274. Wei J, Huang X-J, Huang Y i wsp.: **Key immune-related gene ITGB2 as a prognostic signature for acute myeloid leukemia.** *Annals of Translational Medicine* 2021, 9.
275. Blackburn NB, Marthick JR, Banks A i wsp.: **Evaluating a CLL susceptibility variant in ITGB2 in families with multiple subtypes of hematological malignancies.** *Blood* 2017, 130:86-88.
276. Mei Y, Liao X, Zhu L i wsp.: **Overexpression of RSK4 reverses doxorubicin resistance in human breast cancer cells via PI3K/AKT signalling pathway.** *The Journal of Biochemistry* 2020, 167:603-611.
277. Austin CA, Lee KC, Swan RL i wsp.: **TOP2B: the first thirty years.** *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19:2765.
278. Hatzl S, Perfler B, Wurm S i wsp.: **Increased expression of micro-RNA-23a mediates chemoresistance to cytarabine in acute myeloid leukemia.** *Cancers* 2020, 12:496.
279. Megias-Vericat JE, Martinez-Cuadron D, Solana-Altabella A i wsp.: **Systematic review of pharmacogenetics of ABC and SLC transporter genes in acute myeloid leukemia.** *Pharmaceutics* 2022, 14.
280. Girardi E, Cesar-Razquin A, Lindinger S i wsp.: **A widespread role for SLC transmembrane transporters in resistance to cytotoxic drugs.** *Nature Chemical Biology* 2020, 16:469-478.
281. Mynott RL, Wallington-Beddoe CT: **Drug and solute transporters in mediating resistance to novel therapeutics in multiple myeloma.** *ACS Pharmacology & Translational Science* 2021, 4:1050-1065.
282. Meng X, Liu X, Guo X i wsp.: **FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells.** *Nature* 2018, 564:130-135.
283. Yeh TC, Liang DC, Liu HC i wsp.: **Clinical and biological relevance of genetic alterations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia in Taiwan.** *Pediatric Blood & Cancer* 2019, 66:e27496.
284. Kumari S, Singh J, Arora M i wsp.: **Copy number alterations in CDKN2A/2B and MTAP genes are associated with low MEF2C expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Cureus* 2022, 14.
285. Zhu F, Rui L: **PRMT5 in gene regulation and hematologic malignancies.** *Genes & Diseases* 2019, 6:247-257.
286. Journo S, Goldberg AK, Sokol ES i wsp.: **Genomic alterations drive metastases formation in pancreatic ductal adenocarcinoma cancer: deciphering the role of CDKN2A and CDKN2B in mediating liver tropism.** *Oncogene* 2022, 41:1468-1481.
287. Sippl C, Teping F, Ketter R i wsp.: **The influence of distinct regulatory miRNAs of the p15/p16/RB1/E2F pathway on the clinical progression of glioblastoma multiforme.** *World Neurosurgery* 2019, 132:e900-e908.

288. Zhou X, Liao F, Zhang J i wsp.: **Association of the independent polymorphisms in CDKN2A with susceptibility of acute lymphoblastic leukemia.** *Bioscience Reports* 2018, 38.
289. Ling Y, Xu N, Zhao K i wsp.: **Allogeneic hematopoietic cell transplant overcomes the poor prognostic value of CDKN2 deletion in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer Letters* 2021, 510:59-66.
290. Jackson KD, Durandis R, Vergne MJ: **Role of cytochrome P450 enzymes in the metabolic activation of tyrosine kinase inhibitors.** *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19:2367.
291. Niu Y, Yang X, Chen Y i wsp.: **Distinct prognostic values of Annexin family members expression in acute myeloid leukemia.** *Clinical & Translational Oncology* 2019, 21:1186-1196.
292. Hatah E, Hui PGY, Kumolosasi E: **Annexin A1 and leukemia: A systematic review.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2019, 18:2653-2668.
293. Sabran A, Kumolosasi E, Jantan I i wsp.: **Induction of cell death and modulation of Annexin A1 by phytoestrogens in human leukemic cell lines.** *Saudi Pharmaceutical Journal* 2021, 29:73-84.
294. Zhou T, Liu S, Yang L i wsp.: **The expression of ANXA3 and its relationship with the occurrence and development of breast cancer.** *Journal of BUON* 2018, 23:713-719.
295. Jin YF, Huang YT, Chen PF: **ANXA3 deletion inhibits the resistance of lung cancer cells to oxaliplatin.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2020, 24:3741-3748.
296. Tong M, Che N, Zhou L i wsp.: **Efficacy of annexin A3 blockade in sensitizing hepatocellular carcinoma to sorafenib and regorafenib.** *Journal of Hepatology* 2018, 69:826-839.
297. Liu C, Li N, Liu G i wsp.: **Annexin A3 and cancer.** *Oncology Letters* 2021, 22:1-10.
298. da Silveira Júnior LS, Soares VdL, Jardim da Silva AS i wsp.: **P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-1 expression in acute myeloid leukemia: Biological and prognosis implications.** *International Journal of Hematology* 2020, 42:594-603.
299. Wang S, Song R, Wang Z i wsp.: **S100A8/A9 in inflammation.** *Frontiers in Immunology* 2018, 9:1298.
300. Chen Y, Sumardika IW, Tomonobu N i wsp.: **Critical role of the MCAM-ETV4 axis triggered by extracellular S100A8/A9 in breast cancer aggressiveness.** *Neoplasia* 2019, 21:627-640.
301. Alanazi B, Munje CR, Rastogi N i wsp.: **Integrated nuclear proteomics and transcriptomics identifies S100A4 as a therapeutic target in acute myeloid leukemia.** *Leukemia* 2020, 34:427-440.
302. Lin M, Fang Y, Li Z i wsp.: **S100P contributes to promoter demethylation and transcriptional activation of SLC2A5 to promote metastasis in colorectal cancer.** *British Journal of Cancer* 2021, 125:734-747.
303. Wang XH, Du H, Li L i wsp.: **Increased expression of S100A6 promotes cell proliferation in gastric cancer cells.** *Oncology Letters* 2017, 13:222-230.
304. Ji X, Lu Y, Tian H i wsp.: **Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019, 114:108800.

Spis rycin

Rycina 1. Status cytogenetyczny i mutacyjny różnych genów związanych z opornością i powodzeniem protokołu chemioterapii w AML.....	20
Rycina 2. Częstość występowania zmian genetycznych typu I (A) i typu II (B) w dziecięcej AML.....	21
Rycina 3. Schemat leczenia T-ALL wg protokołu AIEOP-BFM ALL 2017.....	23
Rycina 4. Schemat leczenia B-ALL wg protokołu AIEOP-BFM ALL 2017.....	24
Rycina 5. Struktura chemiczna doksorubicyny.....	27
Rycina 6. Mechanizm śmierci komórkowej regulowany przez doksorubicynę.....	28
Rycina 7. Struktura chemiczna daunorubicyny.....	29
Rycina 8. Struktura chemiczna idarubicyny.....	30
Rycina 9. Struktura chemiczna mitoksantronu.....	30
Rycina 10. Podstawy oporności na leki.....	31
Rycina 11. Spersonalizowane działania terapeutyczne przeciwdziałające oporności lekowej podczas leczenia przeciwnowotworowego.....	35
Rycina 12. Obraz po skanowaniu macierzy CGH.....	53
Rycina 13. Elektroforegram przykładowych prób gDNA przed fragmentacją.....	78
Rycina 14. Wykres rozdziału elektroforetycznego cRNA ze współczynnikiem RIN 9,3.....	82
Rycina 15. Ocena jakości hybrydyzacji.....	83
Rycina 16. Wizualizacja przykładowych rearanżacji cytogenetycznych w DNA występujących u badanego pacjenta	84
Rycina 17. Porównanie klasyfikacji genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na DOX, DNR, IDA i MIT pod względem funkcji molekularnych.....	99
Rycina 18. Porównanie klasyfikacji genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na DOX, DNR, IDA i MIT pod względem procesów biologicznych.....	107
Rycina 19. Porównanie klasyfikacji genów związanych z opornością limfoblastów i mieloblastów na DOX, DNR, IDA i MIT pod względem szlaków komórkowych.....	113
Rycina 20. Diagramy <i>Venna</i> dla genów profili oporności na daunorubicynę, idarubicynę i mitoksantron w limfoblastach (ALL) i mieloblastach (AML).....	115
Rycina 21. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR.....	116
Rycina 22. Porównanie wartości median względnych poziomów ekspresji pomiędzy blastami wrażliwymi i opornymi na poszczególne leki.....	119-120

Spis tabel

Tabela 1. Częstość zachorowania na białaczki limfoblastyczne wśród chłopców i dziewczynek w latach 2008-2017 na terenie całej Polski.....	11
Tabela 2. Porównanie klasyfikacji FAB i WHO dla ostrej białaczki limfoblastycznej.....	12
Tabela 3. Genetyczne zmiany występujące u dzieci z ALL.....	13
Tabela 4. Częstość zachorowania na białaczki mieloblastyczne wśród chłopców i dziewczynek w latach 2008-2017 na terenie całej Polski.....	17
Tabela 5. Porównanie klasyfikacji FAB i WHO dla ostrej białaczki mieloblastycznej.....	18
Tabela 6. Stratyfikacja ryzyka według zmian genetycznych u pacjentów z AML.....	19
Tabela 7. Charakterystyka kliniczna pacjentów uczestniczących w poszczególnych etapach badań.....	41
Tabela 8. Wartości graniczne stężeń antracyklin, na podstawie których przypisywano pacjentów do poszczególnych profili oporności.....	44
Tabela 9. Charakterystyka starterów do PCR w czasie rzeczywistym.....	72
Tabela 10. Wyniki pomiaru spektrofotometrycznego oraz fluorometrycznego genomowego DNA.....	77
Tabela 11. Parametry gDNA wyznakowanego cyjaniną 3 i cyjaniną 5.....	79
Tabela 12. Wydajność reakcji znakowania.....	80
Tabela 13. Ilość i jakość wyizolowanego całkowitego RNA.....	82
Tabela 14. Najczęstsze zmiany cytogenetyczne zidentyfikowane wśród grupy badanej pacjentów.....	85
Tabela 15. Charakterystyka profili ekspresji uwzględniająca podział na poszczególne leki antracyklinowe i ostre białaczki.....	88
Tabela 16. Lista genów z największą zmianą (wzrostem ↑ i spadkiem ↓) poziomu ekspresji dla poszczególnych antracyklin i ostrych białaczek.....	89
Tabela 17. Porównanie wyników macierzy ekspresyjnych i PCR w czasie rzeczywistym.....	118